

PRACTICO UNO (ANEXO)

Anexo sobre métodos experimentales para la determinación de estructuras.

Cristalografía de Rayos X

Antes de poder determinar la estructura cristalográfica de una molécula es necesario obtener un único cristal de gran calidad de la molécula en estudio. Lograr el cristal adecuado no es algo sencillo, es más, suele ser el cuello de botella de los análisis cristalográficos. Una vez creado el cristal, se irradia la muestra con rayos X y se obtiene un diseño de difracción que consiste en miles de puntos sobre una superficie bidimensional. Se determina la posición de cada uno de los puntos su intensidad y las ondas que forma cada punto para producir un mapa de densidad electrónica, es decir una imagen tridimensional de las nubes electrónicas de una molécula. Se construye la macromolécula ajustándola a la densidad electrónica. Como resultado se obtiene un conjunto de coordenadas Cartesianas X,Y,Z para cada átomo de la molécula excepto los de hidrógeno.

Se puede asignar un factor de temperatura a cada átomo. Cuando este valor es alto sugiere desorden o movimiento térmico. Por desorden se entiende que el átomo ocupa diferentes posiciones en diferentes moléculas del cristal, mientras que movimiento térmico se refiere a la vibración de un átomo con respecto a la posición del resto.

Si algunas partes de la molécula tiene gran movilidad o desorden, se produce una densidad electrónica baja y uniforme, haciendo imposible asignar posiciones a los átomos de esa porción. Por esa razón es común encontrar el final de una cadena de proteína, o incluso un loop en el medio, que no se encuentre descrita en el archivo de coordenadas atómicas cristalográficas.

Otra gran limitación del método cristalográfico es no poder resolver la posición de los hidrógenos o no discernir entre nitrógeno, oxígeno y carbono. Esto hace incierta la identificación de la naturaleza química de Asp, Gln y Thr, en estos casos se suele inferir a partir del medio de la cadena lateral (según la orientación de la cadena para formar determinados enlaces débiles). A veces incluso es incierto si un átomo que no pertenece a la proteína es un oxígeno del agua o un ión metálico.

La cristalización, a veces, distorsiona porciones de la estructura debido al contacto entre moléculas vecinas en el cristal. Sin embargo, los cristales de proteínas usados para estudios de difracción están altamente hidratados, por lo tanto las estructuras cristalográficas no son muy diferentes de la estructura de las proteínas en solución acuosa. En moléculas estudiadas con cristalografía y NMR se ha observado que las estructuras obtenidas por ambos métodos son muy similares.

Otra cosa importante que debe tenerse en cuenta a la hora de trabajar con una estructura cristalográfica es su resolución (o factor R). Valores pequeños de resolución significan una pequeña incertidumbre, es decir una alta resolución, mientras valores grandes representan una resolución pobre. Entonces una resolución de alta calidad tendrá una factor R de 0.20 o menos (es lo mismo que decir que la incertidumbre de la posición de un átomo es de 1 en 5 a 1 en 10).

Resonancia Magnética Nuclear

Una gran diferencia entre estructuras obtenidas a partir cristalografía de rayos X o NMR es que mientras que en el primer caso la determinación se hizo en un sólido, en NMR esta se hizo en una solución acuosa, donde las moléculas sufren movimientos térmicos como la vibración.

NMR detecta las variaciones químicas en los núcleos atómicos con spin distinto de cero. Estos cambios dependen del medio electrónico del núcleo, es decir, la identidad y distancia de los átomos vecinos.

El ^1H es el único átomo de las proteínas que puede ser visualizado con NMR sin marcar. Pequeñas proteínas (menos de 15KD) pueden ser resueltas sin necesidad de marcadores especiales. Para obtener buenos datos de proteínas es necesario marcar uniformemente con ^{13}C y ^{15}N . Para obtener una buena resolución de NMR la molécula debe moverse rápidamente. Esto suele limitar el tamaño de la molécula a 30KD, aunque el aumento de la fuerza del campo magnético tiene la capacidad de incluso doblar ese tamaño límite. La proteína debe ser soluble a altas concentraciones (0,2-1mM, 6-30mg/ml) y permanecer estable por unos días, sin agregarse bajo las condiciones experimentales.

El análisis NMR da como resultado un grupo de distancias estimadas entre pares de átomos específicos. Estas distancias son obtenidas para pares de átomos enlazados y no enlazados. De esta forma se obtiene un gran número de configuraciones, es decir más que una única estructura se obtiene un ensemble de modelos. Muchas veces las posiciones de los átomos en estos modelos son aproximadas, y deben ser ajustadas a distancias y ángulos “normales”. Sin embargo, lo más frecuente es encontrar en la base de datos el ensemble de estructuras, con unos 10 o 50 miembros. La comparación entre los modelos de este ensemble puede informar que tan bien fue determinada la estructura por NMR.

Los resultados con NMR no son tan precisos como los obtenidos por cristalografía. Una gran ventaja de NMR frente a los análisis cristalográficos es que con el primero se puede medir el movimiento de cada residuo, y de esta forma se puede obtener distintas posiciones del residuo. Las porciones con alta movilidad producen señales medibles con NMR, en cambio estos sitios en las estructuras cristalográficas tienen una gran incertidumbre. Además NMR es capaz de describir la posición relativa de muchos, pero no todos, los átomos de hidrógeno.