

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la conformación de los antibióticos nucleosídicos,
puromicina y gougerotina y de su interacción con ribosomas
por espectroscopía RMN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ernesto Martínez Ataz

DIRECTOR:

Manuel Rico Sarompas

Madrid, 2015

T1544
MAR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

BIBLIOTECA UCM

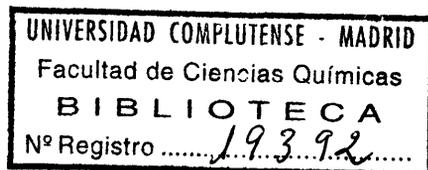


5300125035

ESTUDIO DE LA CONFORMACION DE LOS ANTIBIOTICOS
NUCLEOSIDICOS, PUROMICINA Y GOUGEROTINA Y DE SU
INTERACCION CON RIBOSOMAS POR
ESPECTROSCOPIA RMN

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor
en Ciencias Químicas presenta:
ERNESTO MARTINEZ ATAZ



Instituto de Química Física «Rocasolano»

Madrid, Noviembre de 1976

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química Física "Rocasolano", del C.S.I.C. bajo la dirección del Dr.D. Manuel Rico Sarmatas, a quien deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento.

Hago extensivo mi reconocimiento al Prof. Dr.D. Jesús Morcillo, Director del Departamento de Estructura Molecular y Espectroscopía de dicho Instituto, por las facilidades que me han sido prestadas en el mismo. Deseo agradecer especialmente al Prof. Dr.D. David Vázquez, Director del Instituto de Bioquímica Macromolecular, su ayuda y orientación a lo largo de este trabajo.

Asimismo, expreso mi agradecimiento a todos los que han contribuido a la realización de este trabajo, en especial, a la Sra.D^a Cristina López y a los Sres. Apolo Gómez y Luis de la Vega.

A CARMEN

I N D I C E

	<u>pag.</u>
INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTOS TEORICOS	6
I.1. <u>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear</u>	7
I.1.1. Parámetros espectrales	7
I.1.2. Desplazamientos químicos	9
I.1.3. Constantes de acoplamiento	11
I.2. <u>Tiempos de relajación de espín nuclear</u> ...	14
I.2.1. Definición	14
I.2.2. Mecanismos de relajación	17
I.3. <u>Estudio de la interacción de una molécula pequeña con una macromolécula por espectroscopía de RMN</u>	23
I.3.1. Espectro de RMN para el caso de la existencia de intercambio químico de un núcleo entre dos posiciones distintas	23
I.3.2. Equilibrios de asociación entre una molécula pequeña y una macromolécula	33
I.4. <u>Ribosomas y síntesis proteica</u>	48
I.4.1. Ribosomas de Escherichia Coli	48
I.4.2. Biosíntesis de proteínas	51
I.5. <u>Inhibición de biosíntesis de proteínas por antibióticos que actúan sobre el centro peptidil-transferasa</u>	55
II. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	62
II.1. <u>Materiales y métodos</u>	63
II.1.1. Productos y preparación de muestras	63
II.1.2. Preparación de ribosomas de E. Coli	64
II.1.3. Espectrómetro	68
II.1.4. Obtención de espectros	71
II.1.5. Medida de tiempos de relajación ...	73

II.2.	<u>Espectros de ^1H de Puromicina. Resultados</u>	77
II.2.1.	Asignación y análisis de espectros	77
II.2.2.	Variación con la temperatura ...	81
II.2.3.	Variación con la concentración .	88
II.2.4.	Variación con el pH	94
II.2.5.	Espectros en DMSO- d_6	105
II.2.6.	Tiempos de relajación longitudi- dinal, T_1	108
II.3.	<u>Espectros de ^1H de Gougerotina. Resultados</u>	110
II.3.1.	Asignación y análisis de espectros	110
II.3.2.	Variación con la temperatura ...	115
II.3.3.	Variación con la concentración .	119
II.3.4.	Variación con el pH	122
II.3.5.	Espectros en DMSO- d_6	126
II.3.6.	Tiempos de relajación longitudi- dinal, T_1	130
II.4.	<u>Espectros de ^{13}C de Puromicina y Gouge- rotina. Resultados y Asignación</u>	131
II.4.1.	Puromicina	131
II.4.2.	Gougerotina	139
II.5.	<u>Interacciones antibiótico-ribosoma</u>	146
II.5.1.	Determinación de las constantes de asociación, del número de sitios de ligadura y del factor de rela- jación	146
II.5.2.	Programa de cálculo	153
II.5.3.	Medidas experimentales	158
II.5.4.	Variación con la temperatura ...	171
II.5.5.	Efecto de iones paramagnéticos .	173
II.5.6.	Efecto de la viscosidad	176
II.5.7.	Interacción Puromicina-tRNA	180
II.5.8.	Resultados	181
III.	<u>INTERPRETACION DE RESULTADOS Y DISCUSION</u>	184
III.1.	<u>Estructura y conformación molecular de puromicina</u>	185

III.1.1.	Conformación del anillo de furanosa .	188
III.1.2.	Conformación del grupo exocíclico -CH ₂ OH	197
III.1.3.	Conformación en torno al enlace gli- cosídico	201
III.1.4.	Conformación en torno al enlace C3'-N3'	205
III.1.5.	Conformación del resto OMe-tirosinil	207
III.2.	<u>Estructura y conformación molecular de gougerotina</u>	212
III.2.1.	Conformación del anillo de piranosa	214
III.2.2.	Conformación en torno al enlace gli- cosídico	215
III.2.3.	Conformación en torno a los ángulos ϕ_1 y ϕ_2	217
III.2.4.	Conformación en torno al ángulo de torsión χ_1	219
III.2.5.	Otros rasgos conformacionales	221
III.3.	<u>Interacción de puromicina y gougerotina con ribosomas de E. Coli por espectros- copía de RMN</u>	223
III.3.1.	Interacción de puromicina y gougero- tina con el centro peptidil-transfe- rasa	223
III.3.2.	Interacción secundaria de puromicina y gougerotina con ribosomas	230
III.3.3.	Perspectivas futuras del estudio de la interacción de antibióticos con el centro peptidil-transferasa, por es- pectroscopía de RMN	235
IV.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	240
	BIBLIOGRAFIA	253

INTRODUCCION

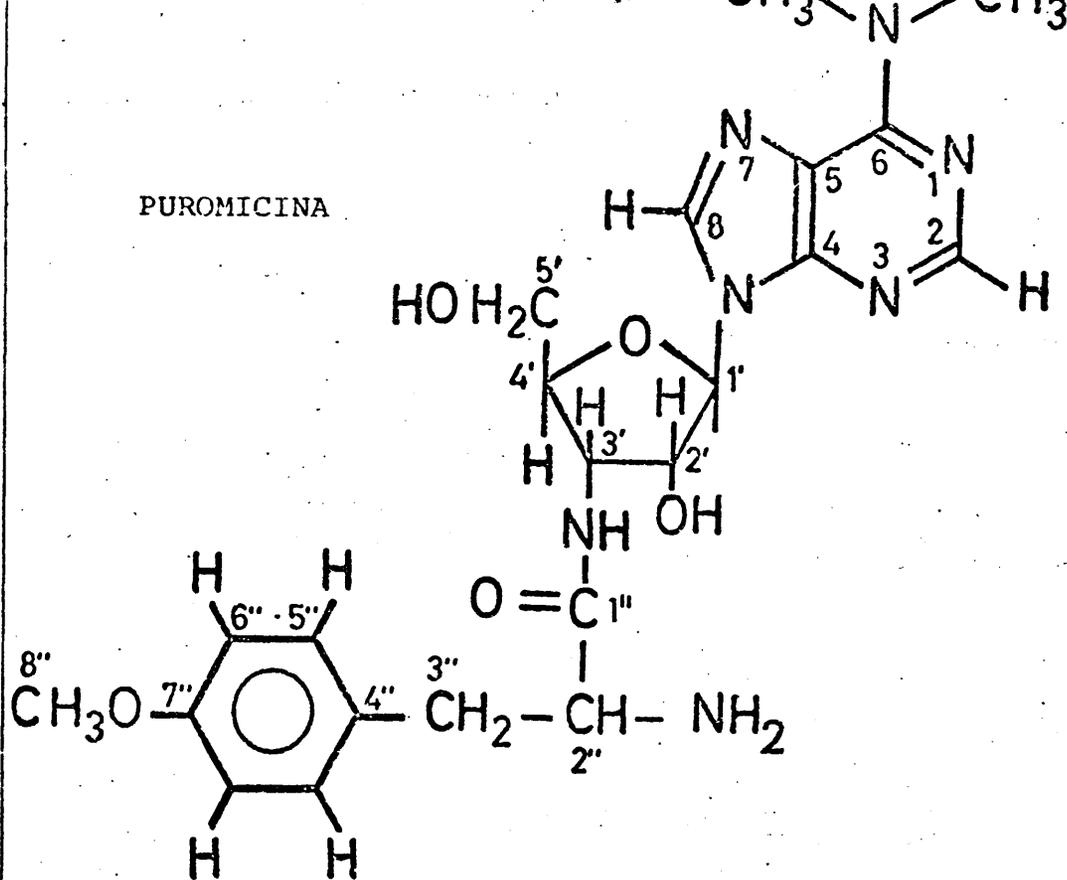
La utilidad de la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en la determinación de la estructura y conformación de moléculas de mediana complejidad es un hecho bien establecido. La reciente introducción de algunos desarrollos instrumentales, principalmente la operación en el modo de transformación Fourier, ha hecho posible extender las aplicaciones de esta técnica a algunos problemas de interés biológico, de entre los que pueden citarse: la determinación de la estructura y conformación de biomacromoléculas pequeñas ($P.M. < 30.000$) y el estudio de interacciones entre una molécula pequeña y una biomacromolécula.

En el Laboratorio de RMN del Instituto de Química Física "Rocasolano" se decidió hace unos años constatar las posibilidades de la técnica en este último campo, con el objetivo de disponer de una herramienta de trabajo que pudiera aplicarse a una gran variedad de procesos biológicos fundamentales, pues muchos de ellos pueden reducirse, con fines prácticos, al estudio de un sistema modelo, formado por una biomacromolécula, una molécula pequeña y el medio en el que se encuentran disueltos (sistemas enzima-inhibidor, droga-receptor, hapteno-anticuerpo, etc.). Las posibilidades de la espectroscopía de RMN en este campo son tales que, en casos favorables, es posible obtener además de la información termodinámica y cinética de la interacción que se obtiene por otros medios, información de tipo estructural y microdinámico.

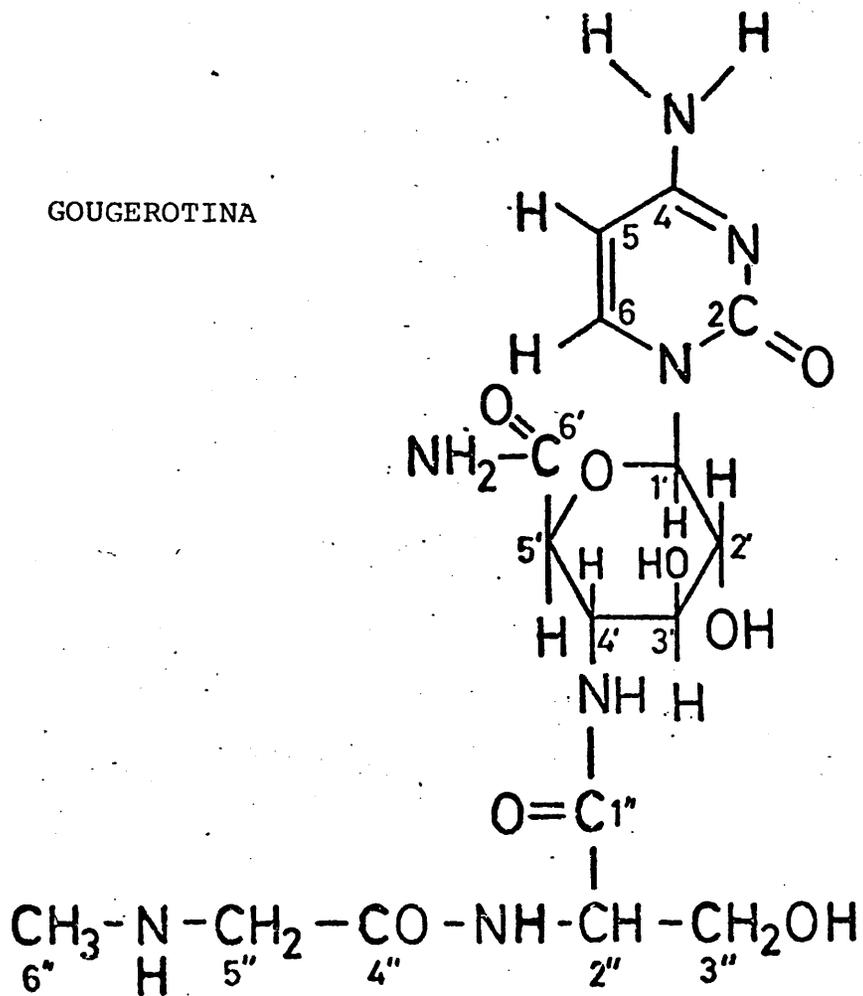
El sistema elegido para iniciar estos estudios fue el formado por ribosomas de E. Coli y antibióticos inhibidores de la biosíntesis de proteínas a nivel del centro peptidil-transferasa. Como es bien conocido, los ribosomas son partículas ribonucleoproteicas en donde tiene lugar, a través de un complicado proceso, la biosíntesis de proteínas. Existen, por otra parte, diferentes tipos de antibióticos que inhiben selectivamente dicho proceso a distintos niveles, por lo que el estudio de su interacción con ribosomas es, y ha sido, de extraordinario valor para describir un gran número de propiedades estructurales y funcionales del ribosoma, así como para describir en detalle las distintas etapas de la biosíntesis de proteínas. Asimismo, existen antibióticos que en su acción muestran selectividad frente a ribosomas procarióticos o eucarióticos, lo que, junto con otros factores, determina su posible utilización farmacológica.

Los antibióticos elegidos para este estudio fueron puromicina y gougerotina, ambos productos comerciales, y cuyas estructuras se ilustran en la página siguiente. El primero tiene una estructura análoga al grupo terminal 3'-aminoacil-adenosil del aminoacil-tRNA, que es el portador del aminoácido al sitio aceptor del centro peptidil transferasa. Este centro, al que se adscribe la actividad enzimática para formar el enlace peptídico, está situado en la subunidad mayor ribosómica. La puromicina actúa como sustrato aceptor uniéndose al péptido naciente e impidiendo

PUROMICINA



GOUGEROTINA



que prosiga la síntesis proteica. La gougerotina se liga al sitio aceptor del centro peptidil-transferasa, probablemente en una zona distinta de la de puromicina, no actúa como sustrato, pero impide el acceso del siguiente aminoacil-tRNA, por lo que la síntesis no prosigue.

El trabajo que se describe en esta Memoria fue realizado con los siguientes propósitos: en primer lugar, describir detalladamente la conformación, en disolución, de los antibióticos puromicina y gougerotina, con el objetivo final de inferir los requisitos que el sitio aceptor (o los subsitios correspondientes) del centro peptidil-transferasa ribosómico impone sobre sus ligandos; en segundo lugar, explorar las posibilidades de la espectroscopía de RMN en el estudio de la interacción de estos antibióticos con el centro peptidil-transferasa ribosómico y obtener la pertinente información estructural, termodinámica, cinética y microdinámica.

En la primera parte de la presente Memoria se describen los parámetros magnéticos que pueden obtenerse del análisis de los espectros de RMN, así como los fundamentos teóricos en los que se basan las relaciones establecidas entre sus valores y algunos rasgos estructurales, conformacionales y dinámicos. Se ha dedicado un especial interés al capítulo I.3. en el que se ha pretendido realizar un trabajo de revisión y puesta al día acerca del estudio de la interacción de una molécula pequeña con una macromolécula, por espectroscopía de RMN. Esta primera

parte se completa con una descripción más detallada de las características físicas y químicas del ribosoma, del proceso de biosíntesis de proteínas y de la inhibición de ésta por antibióticos que actúan a nivel del centro peptidil-transferasa.

En la segunda parte se describe en detalle los métodos experimentales utilizados y los resultados obtenidos. Se incluye en ella la descripción de la obtención de ribosomas, la obtención de espectros de ^1H y ^{13}C de puromicina y gougerotina, la variación de éstos con la temperatura, concentración y pH, así como el estudio experimental de la interacción entre estos antibióticos y ribosomas de E. Coli.

En la tercera y última parte de esta Memoria, se utilizan los resultados obtenidos del análisis de los espectros de ^1H y ^{13}C para determinar gran número de rasgos conformacionales de las moléculas de puromicina y gougerotina. Se discuten, a continuación, las conclusiones obtenidas acerca del estudio de la interacción antibióticos-ribosomas, principalmente en lo que se refiere a la interacción secundaria detectada, que ocluye los efectos de la interacción de los primeros con el centro peptidil-transferasa. Se analizan, por último, las perspectivas futuras del estudio de esta última interacción por la técnica de RMN.

I. FUNDAMENTOS TEORICOS

I.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

I.1.1.- Parámetros espectrales.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear contienen una gran cantidad de información útil para la determinación de estructuras y conformaciones moleculares, el estudio de interacciones moleculares y la descripción de muchos aspectos microdinámicos, tales como movimientos moleculares en el estado líquido, procesos de intercambio, de rotación en torno a enlaces, etc.. Esta joven rama de la Espectroscopía se ha constituido en las dos últimas décadas en elemento imprescindible y de gran utilidad en este tipo de estudios. Es, sin embargo, inherentemente una técnica de poca sensibilidad. Los recientes avances instrumentales (particularmente la introducción de la modalidad de operación de Transformada de Fourier), han hecho posible, sin embargo, extender el campo de aplicación a problemas de interés bioquímico.

Los principios básicos en los que se fundamenta esta técnica están descritos en distintos libros y revisiones (1-4). En esta sección comentaremos los parámetros que se extraen del espectro, junto con la información que proporcionan, deteniéndonos sólo en aquellos aspectos que se utilizan en este trabajo.

Desde el punto de vista estructural y conformacional, los parámetros más importantes son los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento espín-espín y las intensidades. La posición de una señal de

resonancia (desplazamiento químico) depende del tipo de núcleo y de su entorno químico (electrónico). Normalmente, y refiriéndonos a un tipo de núcleo dado, como por ejemplo el protón, es posible observar una señal para cada protón químicamente distinto. Por otro lado, la intensidad de la señal depende sólo, a igualdad de condiciones externas, del número de núcleos presentes en la muestra. Por último, la señal correspondiente a un protón puede aparecer desdoblada en un cierto número de componentes. Del número de éstas y de su separación (constante de acoplamiento), puede obtenerse información acerca del número de protones unidos a carbonos cercanos y de los ángulos diedros entre enlaces. La utilización convergente de toda esta información proporciona normalmente las bases suficientes para describir en detalle los más sutiles aspectos de la estructura y conformación de la molécula en estudio.

Desde el punto de vista dinámico, los parámetros más importantes son los tiempos de relajación longitudinal, T_1 y los tiempos de relajación transversal, T_2 , cuya definición y descripción en términos de la dinámica molecular se lleva a cabo en detalle en la sección siguiente. Los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento pueden verse afectados también por procesos dinámicos. Estas variaciones, junto con los valores de los parámetros dinámicos, T_1 y T_2 , pueden proporcionar información de gran valor para el cálculo de las constantes cinéticas de los distintos procesos dinámicos que sufren las moléculas en disolución.

I.1.2.- Desplazamientos químicos.

Los desplazamientos químicos tienen su origen en el apantallamiento magnético de los núcleos debido a los electrones de su entorno. La presencia de un campo magnético externo, H_0 , induce en éstos un movimiento orbital que a su vez origina un campo magnético local inducido, cuya magnitud es proporcional al campo magnético externo.

Un núcleo dado, por tanto, experimenta un campo magnético que es el resultante del campo externo, modificado por el apantallamiento local (σ):

$$H_{\text{local}} = H_0(1-\sigma)$$

La constante de apantallamiento se desdobra, para su estudio, en varios términos, unos dependientes de los electrones del propio átomo y otros de átomos distintos. Entre los primeros, se consideran dos: el término diamagnético, σ_0 , y el paramagnético, σ_p . El primero puede considerarse como un reflejo de la densidad electrónica en el núcleo, magnitud a la que es proporcional el desplazamiento químico, a igualdad de otras circunstancias. El término paramagnético, σ_p , depende de la energía de separación entre el estado fundamental y los estados excitados, así como de la simetría de los orbitales atómicos de los correspondientes electrones. Este término es poco importante en el caso del protón, pero su contribución es notable al apantallamiento de otros núcleos, como por ejemplo, el de ^{13}C . Los efectos de átomos vecinos sobre el apantallamiento de un

núcleo dado, son importantes si los electrones de esos átomos muestran una susceptibilidad magnética muy anisotrópica, como es el caso de átomos que forman parte de enlaces múltiples. Otra contribución a la constante de apantallamiento, importante en el caso de moléculas aromáticas, es la debida a corrientes interatómicas que fluyen en torno a sistemas cerrados conjugados.

La descripción teórica de los desplazamientos químicos, en términos de funciones de onda electrónicas, se ha hecho, pero su aplicación al cálculo de éstos tropieza con serias dificultades debido, principalmente, al hecho de que no se conozcan las funciones de onda de estados excitados. A pesar de ello, los desplazamientos químicos son excelentes parámetros empíricos para la detección de múltiples rasgos estructurales y de interacción. En este sentido, y en el caso concreto del protón, para el que existe una gran cantidad de información experimental, es posible racionalizar e incluso predecir cualitativamente los valores de los desplazamientos químicos de protones concretos, e incluso de sus variaciones con la presencia de sustituyentes electronegativos, cambios de ionización de grupos prototrópicos, posición respecto a anillos aromáticos, formación de enlaces de hidrógeno, interacciones hiperfinas con iones paramagnéticos, etc..

I.1.3.- Constantes de acoplamiento.

Además de los campos locales que experimenta un núcleo como resultado del movimiento de los electrones en sus proximidades, han de considerarse también los campos locales debidos a la presencia en la misma molécula de otros núcleos con momento magnético.

En las condiciones de "alta resolución" el acoplamiento directo entre dipolos magnéticos se promedia a cero. Existe, sin embargo, otro acoplamiento entre espines nucleares, de mucha menor magnitud, que tiene lugar a través de la interacción con los electrones correspondientes a los enlaces que unen a dichos núcleos. Este acoplamiento es independiente del campo magnético externo y produce un desdoblamiento de las señales de los núcleos implicados. La medida de estas interacciones son las llamadas constantes de acoplamiento y pueden medirse, en primera aproximación por la separación de las líneas componentes del multiplete resultantes del desdoblamiento.

La importancia de las constantes de acoplamiento radica en que dependen de sutiles detalles estructurales, por lo que sus valores pueden utilizarse, en principio, para obtener información geométrica de la molécula en consideración. En la práctica, el cálculo teórico de las constantes de acoplamiento es difícil debido al gran número de electrones y parámetros geométricos que han de considerarse. Sin embargo, existen casos en los que puede predecirse, de forma semiempírica la dependencia de las constantes de

acoplamiento con algún parámetro geométrico-estructural.

Este es el caso de las constantes vecinales entre protones unidos a átomos de carbono, 3J , para las que

$${}^3J(\phi) = A\cos^2\phi + B\cos\phi + C$$

en donde ϕ representa el ángulo diedro formado por los enlaces H1-C1-C2 y C1-C2-H2, y $A=4,22$, $B=-0,5$ y $C=4,5$. Esta ecuación (ecuación de Karplus) sólo es estrictamente válida para sistemas con átomos de carbono cuaternarios. Los cambios de hibridación de los enlaces o la presencia de sustituyentes electronegativos en dicho fragmento afectarán claramente a los orbitales de enlace y, consecuentemente, se alterará también el acoplamiento vecinal ${}^3J_{H1H2}$. Normalmente se considera que, si bien la forma funcional de la ecuación es correcta, los valores que adopten las constantes A, B y C han de modificarse, empíricamente, para tener en cuenta la electronegatividad de los sustituyentes implicados. Aun con estas limitaciones, la ecuación de Karplus ha sido y es la base para la interpretación en términos conformacionales de los valores de acoplamientos vecinales.

Para las constantes entre protones existen otras varias relaciones entre ellas y parámetros geométricos, que son de utilidad con fines estructurales. Asimismo, la forma de la ecuación de Karplus parece mantenerse para otros núcleos, o bien, para el caso en que los átomos a los que van unidos los protones no son carbonos, sino otros átomos tales como O, N, etc..

De entre las constantes de acoplamiento $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, las constantes directas $^1J_{\text{H}^{13}\text{C}}$ dependen, entre otras cosas, del carácter s del orbital del correspondiente enlace C-H. Las constantes geminales, vecinales y de más largo alcance son muy laboriosas de medir, pues para ello es necesario obtener espectros de ^{13}C sin irradiación de protón. No obstante, estos acoplamientos prometen ser parámetros de gran valor para la determinación de conformaciones moleculares, una vez que se hayan establecido las necesarias bases empíricas.

I.2. Tiempos de relajación de espín nuclear

I.2.1.- Definición.

El movimiento de la magnetización macroscópica nuclear en presencia de un campo magnético externo fue expresado por Bloch (5,6) en términos de ecuaciones diferenciales fenomenológicas. El punto de partida es la ecuación clásica del movimiento de un momento magnético $\vec{\mu}$ en presencia de un campo magnético. La variación con el tiempo del momento angular \vec{p} es:

$$\frac{d\vec{p}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{H}$$

Recordando que el momento magnético nuclear es proporcional al momento angular, según la constante de proporcionalidad γ (relación giromagnética), y sumando vectorialmente los momentos magnéticos nucleares, se obtiene para la magnetización macroscópica, \vec{M} :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{H}$$

Introduciendo el campo magnético \vec{H}_1 , de la radiofrecuencia, como un campo rotatorio, que gira en el plano xy con velocidad $\vec{\omega}$ y suponiendo \vec{H}_0 aplicado a lo largo del eje z, la ecuación anterior, desdoblada en sus componentes cartesianos queda:

$$\begin{aligned} dM_x/dt &= \gamma (M_y H_0 + M_z H_1 \text{sen } \omega t) \\ dM_y/dt &= \gamma (M_z H_1 \text{cos } \omega t - M_x H_0) \\ dM_z/dt &= -\gamma (M_x H_1 \text{sen } \omega t + M_y H_1 \text{cos } \omega t) \end{aligned} \quad \text{\{I.2.1\}}$$

Refiriendo estas ecuaciones a un sistema de ejes que giran siguiendo a \vec{H}_1 y en el que éste se encuentra en la dirección x' , las anteriores ecuaciones quedan:

$$\begin{aligned} du/dt &= -(\omega_0 - \omega)v \\ dv/dt &= (\omega_0 - \omega)u - \gamma H_1 M_z \\ dM_z/dt &= \gamma H_1 v \end{aligned} \quad \{I.2.2\}$$

Estas ecuaciones no están completas, pues no dan cuenta de la relajación. Bloch (5,6) supuso que la relajación longitudinal y la transversal podían tratarse como procesos cinéticos de primer orden, por los que M_z vuelve a su valor de equilibrio (M_0) con una constante característica T_1 y u y v vuelven al suyo, que es cero, con una constante característica que es T_2 .

Las ecuaciones de Bloch completas son, pues:

$$\begin{aligned} du/dt &= -(\omega_0 - \omega)v - u/T_2 \\ dv/dt &= (\omega_0 - \omega)u - \gamma H_1 M_z - v/T_2 \\ dM_z/dt &= \gamma H_1 v - (M_z - M_0)/T_1 \end{aligned} \quad \{I.2.3\}$$

y constituyen en sí una definición fenomenológica de los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , y transversal, T_2 .

De acuerdo con las anteriores ecuaciones, las medidas de T_1 y T_2 pueden realizarse convenientemente por métodos de pulsos mediante los cuales es posible trasladar el vector magnetización a la dirección adecuada y medir fácilmente la cinética de su vuelta al equilibrio. En este sentido, basta considerar la forma especialmente simple que

adoptan las anteriores ecuaciones en ausencia de H_1 y para $\omega = \omega_0$. La utilización de los métodos de transformación Fourier de la caída libre de la inducción (FID), que se mide después del pulso, permite la medida simultánea de los tiempos de relajación de todas las señales individuales que componen un espectro. Los métodos de medida de tiempos de relajación utilizados en este trabajo se detallan en II.1.5.

Cuando las ecuaciones de Bloch se resuelven para obtener la forma de línea en condiciones de barrido lento y lejos de la saturación ($H_1 \ll H_0$) se obtienen lorencianas cuya anchura a mitad de altura es $(1/\pi T_2)$, expresado en Hz, lo que proporciona una medida muy conveniente de T_2 . A la anchura de la línea contribuyen otros factores, como son la inhomogeneidad del campo y algunos otros que adquieren relevancia cuando no se alcanzan las condiciones de "estrechamiento extremo" de las señales. Para las condiciones utilizadas en este trabajo, los tiempos de relajación, T_2 , pueden obtenerse simplemente a partir de las anchuras de las señales.

Es interesante destacar que el proceso de relajación de \vec{M} respecto al eje z (relajación longitudinal) implica un intercambio de energía entre el sistema de espines y el medio ("lattice", red) (la energía clásica es $E = \vec{M}_z \cdot \vec{H}_0$) por lo cual el tiempo de relajación T_2 se conoce también como tiempo de relajación espin-red. La relajación en un plano perpendicular a \vec{H}_0 (transversal) es una redistribu-

ción de energía entre los propios espines nucleares y su tiempo característico, T_2 , se conoce también con el nombre de tiempo de relajación espin-espin.

I.2.2.- Mecanismos de relajación.

Los principales mecanismos de relajación tienen lugar a través de la interacción de los momentos magnéticos nucleares con campos magnéticos locales fluctuantes de frecuencia característica igual a ω_0 . Estos campos magnéticos locales pueden provenir de otros núcleos del sistema de espines, de iones con electrones desapareados, de distribuciones asimétricas de cargas electrónicas, etc.. Además, los núcleos que tengan momento eléctrico de cuadrupolo pueden relajarse mediante la interacción con campos eléctricos fluctuantes inhomogéneos.

Las fluctuaciones de los campos locales tienen su origen en los movimientos rotacionales y traslacionales de las moléculas individuales, perturbados intermitentemente por las colisiones moleculares (movimiento browniano). La efectividad de la relajación nuclear dependerá, pues, en principio de dos factores: la magnitud de los campos locales y la velocidad característica de fluctuación de dichos campos.

El planteamiento cuantitativo del problema (7) se lleva a cabo de acuerdo con los siguientes pasos:

- 1) Relacionar el tiempo de relajación con la probabilidad de la transición entre los estados de

espín excitado y fundamental.

- 2) Expresar la probabilidad de esa transición en términos de la intensidad del campo local que varía con la frecuencia apropiada.

La probabilidad de la transición se calcula por métodos de teoría de la radiación (1,8) a partir de la Hamiltoniana dependiente del tiempo que expresa la interacción del sistema de espines con los campos locales fluctuantes. Para un sistema con dos niveles de energía, α y β ,

$$W = |(\beta|H(t)|\alpha)|^2 \quad \{I.2.4\}$$

La Hamiltoniana dependiente del tiempo, en el caso de relajación en líquidos se toma como una función aleatoria del tiempo. Normalmente, es posible separar la Hamiltoniana en una parte operador H' (con las constantes atómicas apropiadas y los operadores de espín) y una parte dependiente del tiempo que expresa los cambios de coordenadas espaciales con el tiempo. Es decir,

$$H(t) = H' F(t) \quad \{I.2.5\}$$

donde $F(t)$ es una función aleatoria del tiempo.

La densidad espectral de esta función aleatoria a una frecuencia dada, que es proporcional a la intensidad del campo fluctuante, viene dada por la transformada de Fourier de la función de correlación, $g(\tau)$, de la función aleatoria $F(t)$, en donde

$$g(\tau) = \overline{F(t) F^*(t+\tau)} \quad \{I.2.6\}$$

y el promedio se toma sobre todos los valores posibles de $F(t)$. La intensidad de la componente que varía con frecuencia ω viene dada por

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) \exp(-i\omega\tau) d\tau \quad \{I.2.7\}$$

y la probabilidad de la transición puede expresarse como:

$$W_{\alpha\beta} = (\alpha |H'| \beta)^2 J(\omega) \quad \{I.2.8\}$$

En los cálculos se supone normalmente que la función de correlación de $F(t)$ es exponencial, con un tiempo característico, τ_c , el tiempo de correlación, que viene a ser una medida de la persistencia de las fluctuaciones. En este caso,

$$g(\tau) = \overline{F(t) F^*(t)} \exp(-\tau/\tau_c) \quad \{I.2.9\}$$

De esta manera, para un tipo particular de movimiento aleatorio las funciones $F(t)$ son conocidas y pueden integrarse. La transformada de Fourier de $g(\tau)$ proporciona entonces el valor de $J(\omega)$, en función de τ_c , es decir:

$$J(\omega) = \overline{F(t) F^*(t)} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-\tau/\tau_c) \exp(-i\omega\tau) d\tau \quad \{I.2.10\}$$

Consideremos ahora la expresión de las cinéticas de relajación ($1/T_1$) y ($1/T_2$), para un núcleo i de espín ($1/2$) que relaja por acoplamiento dipolar con otro j de espín ($1/2$) del que le separa una distancia r . Dicho sistema formado por dos espines, dando lugar a cuatro estados de

energía, puede dar lugar a tres transiciones según la variación de su número cuántico de espín total ($\Delta m=0,1,2$). Las partes del operador, H' , de la Hamiltoniana para el acoplamiento dipolar son, para cada una de estas tres transiciones

$$\begin{aligned} H'(0) &= -\frac{3}{2} \gamma_i \gamma_j \hbar \left\{ -\frac{2}{3} I_{iz} I_{jz} + \frac{1}{6} (I_{i+} I_{j-} + I_{i-} I_{j+}) \right\} \\ H'(1) &= -\frac{3}{2} \gamma_i \gamma_j \hbar \{ I_{iz} I_{j+} + I_{i+} I_{jz} \} \\ H'(2) &= -\frac{3}{4} \gamma_i \gamma_j \hbar I_{i+} I_{j+} \end{aligned} \quad \text{\{I.2.11\}}$$

en donde $I_{\pm} = I_x \pm i I_y$. Y las correspondientes funciones espaciales, $F(t)$ vienen dadas por los polinomios de Legendre de segundo orden.

$$\begin{aligned} F_0 &= (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) / r_{ij}^3 \\ F_1 &= \sin \theta_{ij} \cos \theta_{ij} \exp(-i \phi_{ij}) / r_{ij}^3 \\ F_2 &= \sin^2 \theta_{ij} \exp(-2 i \phi_{ij}) / r_{ij}^3 \end{aligned} \quad \text{\{I.2.12\}}$$

donde θ_{ij} , ϕ_{ij} y r_{ij} son las coordenadas polares esféricas del núcleo j , relativo al núcleo i .

Ya que para obtener las funciones de densidad espectral $J(\omega)$, hemos de obtener $\overline{F(t)F^*(t)}$, para el caso aquí considerado obtendremos fácilmente que:

$$\begin{aligned} \overline{F_0(t)F_0^*(t)} &= \frac{4}{5r^6} \\ \overline{F_1(t)F_1^*(t)} &= \frac{2}{15r^6} \\ \overline{F_2(t)F_2^*(t)} &= \frac{8}{15r^6} \end{aligned} \quad \text{\{I.2.13\}}$$

Recurriendo al cálculo de probabilidades de tran-

sición (1,8) obtendremos una serie de ecuaciones para las velocidades de relajación dipolar $(1/T_1)$, $(1/T_2)$ según i y j sean núcleos de la misma especie (M), por ejemplo ^1H y ^1H o de distinta especie (D), por ejemplo ^{13}C , relajando por medio de acoplamiento dipolar a ^1H :

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_M = \frac{3}{2} \gamma_i^4 \hbar^2 I_i (I_i + 1) \{J^{(1)}(\omega_i) + J^{(2)}(2\omega_i)\} \quad \text{[I.2.14]}$$

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_D = \gamma_i^2 \gamma_j^2 \hbar^2 I_j (I_j + 1) \left\{ \frac{1}{12} J^{(0)}(\omega_i - \omega_j) + \frac{3}{2} J^{(1)}(\omega_i) + \frac{3}{4} J^{(2)}(\omega_i + \omega_j) \right\} \quad \text{[I.2.15]}$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_M = \gamma_i^4 \hbar^2 I_i (I_i + 1) \left\{ \frac{3}{8} J^{(0)}(0) + \frac{15}{4} J^{(1)}(\omega_i) + \frac{3}{8} J^{(2)}(2\omega_i) \right\} \quad \text{[I.2.16]}$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_D = \gamma_i^2 \gamma_j^2 \hbar^2 I_j (I_j + 1) \left\{ \frac{1}{6} J^{(0)}(0) + \frac{1}{24} J^{(0)}(\omega_i - \omega_j) + \frac{3}{4} J^{(1)}(\omega_i) + \frac{3}{2} J^{(1)}(\omega_j) + \frac{3}{8} J^{(2)}(\omega_i + \omega_j) \right\} \quad \text{[I.2.17]}$$

siendo:

$$J^{(k)}(\omega) = \frac{\overline{F_k(t) F_k^*(t)}}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad \text{[I.2.18]}$$

con $k=0,1,2$.

De donde se deduce, que para acoplamiento dipolar ^1H con ^1H tendremos

$$\left(\frac{1}{T_1}\right) = \frac{3}{10} \cdot \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r^6} \cdot \left\{ \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_I^2 \tau_c^2} \right\} \quad \text{[I.2.19]}$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right) = \frac{3}{20} \cdot \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r^6} \cdot \left\{ 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_I^2 \tau_c^2} \right\} \quad \text{[I.2.20]}$$

Pudiendo observar que si se cumple la condición de "estrechamiento extremo" $\omega_I^2 \tau_c^2 \ll 1$, obtendremos que $(1/T_1) = (1/T_2)$, es decir, $T_1 = T_2$. Para el caso de un núcleo de ^{13}C rela-

jando a través de un mecanismo dipolar con ^1H , con desacoplamiento continuo de protón, obtendremos:

$$\frac{1}{T_{1,2}} = \frac{\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{10 r_{C-H}^6} \cdot f_{1,2}(\tau) \quad \{\text{I.2.21}\}$$

donde

$$f_1(\tau) = \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega_C - \omega_H)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_C + \omega_H)^2 \tau_C^2} \right) \quad \{\text{I.2.22}\}$$

y

$$f_2(\tau) = \left(2\tau_C + \frac{0,5 \cdot \tau_C}{1 + (\omega_C - \omega_H)^2 \tau_C^2} + \frac{1,5 \cdot \tau_C}{1 + \omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + (\omega_C - \omega_H)^2 \tau_C^2} \right) \quad \{\text{I.2.23}\}$$

En los anteriores razonamientos, para la obtención de las cinéticas de relajación, se han supuesto dos condiciones:

1) Que el movimiento relativo de cualquier partícula en el sistema de espines y cualquiera otra partícula, no está correlacionado. Este supuesto en principio no sería válido, para dos partículas situadas en una misma molécula, que se mueve como un cuerpo rígido; sin embargo, fue demostrado por Hubbard (9) para un sistema de cuatro espines cuyos movimientos estaban correlacionados, que la desviación de una exponencial sencilla para los procesos de relajación era menor de un 1%, por lo que se puede suponer, que el movimiento al azar en nuestro sistema, no está correlacionado.

2) Que los procesos de relajación ocurren en un tiempo muy largo comparado con los períodos de Larmor. En nuestro caso los primeros son del orden de 0,1 a 10 seg. y los segundos del orden de 10^{-8} seg.

I.3. Estudio de la interacción de una molécula pequeña con una macromolécula por espectroscopía de RMN

I.3.1.- Espectro de RMN para el caso de la existencia de intercambio químico de un núcleo entre dos posiciones distintas.

La forma y la anchura de las señales de resonancia magnética nuclear son sensibles a aquellos procesos dependientes del tiempo que ocurren a una velocidad que sea del orden de la extensión del espectro, medido éste en unidades de frecuencia (Hz).

Consideremos un sistema en el cual un núcleo pueda estar moviéndose de forma aleatoria entre dos entornos distintos a los que corresponderán distintos desplazamientos químicos y entre los cuales no exista ningún tipo de acoplamiento de espín. En principio, si la velocidad de intercambio es lenta, el espectro constará de dos señales separadas, mientras que si es suficientemente rápida, el espectro constará de una sola señal situada en una posición intermedia.

La descripción cuantitativa de este sistema puede llevarse a cabo introduciendo convenientemente algunas modificaciones en las ecuaciones de Bloch, expresadas en un sistema de ejes que giran siguiendo al campo aplicado de radiofrecuencias, H_1 .

Sean u y v las componentes transversales de la magnetización M , en la misma dirección y en una perpen-

dicular, respectivamente al campo H_1 que gira. La componente v es, como es sabido (10), proporcional a la intensidad de absorción. Si el campo oscilante H_1 es despreciable frente al campo magnético externo, H_0 , la polarización, M_2 , no cambia apreciablemente respecto a su valor de equilibrio, M_0 , y las ecuaciones para u y v quedan en la forma

$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} + u\left(\frac{1}{T_2}\right) + (\omega_0 - \omega)v &= 0 \\ \frac{dv}{dt} + v\left(\frac{1}{T_2}\right) - (\omega_0 - \omega)u &= -\gamma H_1 M_0 \end{aligned}$$

siendo ω la velocidad de giro del sistema de ejes alrededor del eje z .

Estas ecuaciones pueden considerarse como las partes real e imaginaria de una ecuación compleja. Si definimos el momento complejo G como:

$$G = u + i v$$

la ecuación para G queda

$$\frac{dG}{dt} + \left[\left(\frac{1}{T_2} \right) - i(\omega_0 - \omega) \right] G = -i\gamma H_1 M_0$$

En el caso aquí considerado los núcleos están sujetos al mismo campo, H_0 , pero al estar en distintos entornos, sus constantes de apantallamiento serán diferentes y consecuentemente también lo serán sus frecuencias de resonancia, ω_A y ω_B . La ecuación anterior para el caso de que no haya intercambio queda expresada en la forma:

$$\frac{dG_A}{dt} + \alpha_A G_A = -i\gamma H_1 M_{0A} \quad \{I.3.1\}$$

$$\frac{dG_2}{dt} + \alpha_3 G_B = -iYH_1 M_{OB} \quad \{I.3.2\}$$

en donde

$$\alpha_A = \frac{1}{T_{2A}} - i(\omega_A - \omega)$$

$$\alpha_B = \frac{1}{T_{2B}} - i(\omega_B - \omega)$$

siendo T_{2A} y T_{2B} los tiempos de relajación transversal del núcleo considerado, en las posiciones A y B, respectivamente, en ausencia de intercambio.

En las proximidades de A, $G = G_A + G_B \approx G_A$ y para el caso del estado estacionario $(dG_A/dt) = 0$, la solución de la ecuación {I.3.1} es

$$G_A = \frac{-iYH_1 M_{OA}}{\alpha_A}$$

cuya parte imaginaria es:

$$v = \frac{-YH_1 M_{OA} T_{2A}}{[1 + (\omega_A - \omega)^2 T_{2A}^2]}$$

La forma de línea es proporcional a $|v|$ y es:

$$g(\omega) = \frac{T_{2A}}{[1 + (\omega_A - \omega)^2 T_{2A}^2]}$$

y en unidades de frecuencia (Hz)

$$g(\nu) = \frac{T_{2A}}{(1 + 4\pi^2 (\nu_A - \nu)^2 T_{2A}^2)}$$

es decir, una lorenciana con máximo en $\nu = \nu_A$, de amplitud máxima T_{2A} y de anchura a mitad de altura $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_{2A}$.

La intensidad total es proporcional a $(\gamma H_1 M_{0A})$, es decir, al campo de radiofrecuencias (siempre que $H_1 \ll H_0$) y al número total de núcleos en el sitio A, que contribuyen a M_{0A} . Una señal análoga, de intensidad proporcional a M_{0B} y de anchura $(1/\pi T_{2B})$ se obtendrá con centro en $\nu = \nu_B$, al resolver la ecuación {I.3.2}.

Introduzcamos ahora la posibilidad de intercambio, para lo cual consideramos que un núcleo permanece en la posición A hasta que repentinamente salta a la otra posición B, o viceversa, despreciándose la precesión nuclear durante el salto. Supongamos que, estando el núcleo en la posición A, la probabilidad por unidad de tiempo de que se produzca un salto a B (que se considera constante) es $(1/\tau_A)$, con lo que τ_A será el tiempo de vida media de permanencia del núcleo en la posición A. Análogamente, se define τ_B para el sitio B.

Las poblaciones relativas correspondientes a los sitios A y B serán:

$$P_A = \frac{\tau_B}{\tau_A + \tau_B} \quad P_B = \frac{\tau_A}{\tau_A + \tau_B}$$

siendo $P_A + P_B = 1$.

Las ecuaciones de Bloch, modificadas por McConnell (10) para incluir el intercambio son:

$$\frac{dG_A}{dt} + [(1/T_{2A}) - i(\omega_A - \omega)] G_A = -i\gamma H_1 M_{0A} + \tau_B^{-1} G_B - \tau_A^{-1} G_A \quad \text{\{I.3.3\}}$$

$$\frac{dG_B}{dt} + [(1/T_{2B}) - i(\omega_B - \omega)] G_B = -i\gamma H_1 M_{0B} + \tau_A^{-1} G_A - \tau_B^{-1} G_B \quad \text{\{I.3.4\}}$$

donde $(\tau_B^{-1}G_B)$ representa el incremento por unidad de tiempo de G_A debido a la transferencia de magnetización desde el sitio B al A. Análogamente $(\tau_A^{-1}G_A)$ corresponde a la velocidad con que disminuye la magnetización en A. La solución de las ecuaciones {I.3.3} y {I.3.4} para las condiciones de "barrido lento" y estado estacionario se obtienen haciendo

$$\frac{dG_A}{dt} = \frac{dG_B}{dt} = 0$$

Dichas ecuaciones quedan, entonces,

$$G_A \alpha_A - (1/\tau_B)G_B = -i\gamma H_1 p_A M_0 \quad \text{\{I.3.5\}}$$

$$G_B \alpha_B - (1/\tau_A)G_A = -i\gamma H_1 p_B M_0 \quad \text{\{I.3.6\}}$$

donde α_A y α_B son, ahora:

$$\alpha_A = (1/T_{2A}) - i(\omega_A - \omega) + (1/\tau_A)$$

$$\alpha_B = (1/T_{2B}) - i(\omega_B - \omega) + (1/\tau_B)$$

Las soluciones para G_A y G_B son:

$$G_A = i\gamma H_1 M_0 \frac{(1/\tau_B) + p_A (\alpha_B - (1/\tau_B))}{-\alpha_A \alpha_B + (1/\tau_A) (1/\tau_B)}$$

$$G_B = i\gamma H_1 M_0 \frac{(1/\tau_A) + p_B (\alpha_A - (1/\tau_A))}{-\alpha_A \alpha_B + (1/\tau_A) (1/\tau_B)}$$

la magnetización total, G, es:

$$G = i\gamma H_1 M_0 \frac{(1/\tau_A) + (1/\tau_B) + p_A (\alpha_B - (1/\tau_B)) + p_B (\alpha_A - (1/\tau_A))}{-\alpha_A \alpha_B + (1/\tau_A) (1/\tau_B)}$$

\{I.3.7\}

La intensidad de absorción a la frecuencia ω es, como hemos visto, proporcional a ν , la parte imaginaria de G . Antes de analizar el comportamiento del sistema completo, es conveniente considerar dos situaciones extremas que conducen a soluciones simples y que son aquellas en las que los tiempos de vida τ_A y τ_B son o muy grandes o muy pequeños.

- Intercambio lento. Si las cinéticas de intercambio ($1/\tau_A$) y ($1/\tau_B$) son suficientemente pequeñas comparadas con la separación de frecuencias ($\omega_A - \omega_B$), el espectro constará de dos señales distintas en la vecindad de las frecuencias ω_A y ω_B . Si la frecuencia de observación ω está próxima a ω_A y suficientemente lejos de ω_B , G_B es ahí prácticamente cero y al resolver {I.3.5} se obtiene:

$$G_A = \frac{-i\gamma H_1 \rho_A M_0}{\alpha_A}$$

cuya parte imaginaria es

$$\nu = -\gamma H_1 M_0 \rho_A \frac{[(1/T_{2A}) + (1/\tau_A)]}{[(1/T_{2A}) + (1/\tau_A)]^2 + \Delta\omega_A^2}$$

Si se hace

$$(1/T'_{2A}) = (1/T_{2A}) + (1/\tau_A) \quad \text{\{I.3.8\}}$$

resulta

$$\nu = -(\gamma H_1 M_0 \rho_A) \frac{T'_{2A}}{1 + T'_{2A}{}^2 (\omega_A - \omega)^2}$$

y la función de forma de línea, en unidades de frecuencia, es

$$g(\nu) = \frac{T'_{2A}}{1 + 4\pi^2 T'^2_{2A} (\nu_A - \nu)^2}$$

la cual es análoga a la obtenida anteriormente para las ecuaciones de Bloch sin intercambio, sin más que cambiar T_{2A} por T'_{2A} . En la expresión del inverso de este último aparece un término adicional $(1/\tau_A)$ que ensancha la anchura de la señal individual. Con centro en ν_B tendremos otra señal de anchura $(1/\pi T'_{2B})$. Si T_{2A} es conocido, una medida de la anchura de estas señales ensanchadas nos proporcionará información sobre τ_A . Este procedimiento es válido siempre que el ensanchamiento no sea tan grande como para que las señales correspondientes a A y B solapen.

- Intercambio rápido. En el límite de intercambio rápido, las correspondientes cinéticas $(1/\tau_A)$ y $(1/\tau_B)$ son grandes y la expresión de G, {I.3.7} queda reducida a:

$$G = -i\gamma H_1 M_0 \frac{1}{p_A(\alpha_A - (1/\tau_A)) + p_B(\alpha_B - (1/\tau_B))}$$

cuya parte imaginaria es:

$$\nu = -\gamma H_1 M_0 \frac{T_{2m}}{1 + T_{2m}^2 (\omega_m - \omega)^2}$$

donde

$$\omega_m = p_A \omega_A + p_B \omega_B$$

y

$$(1/T_{2m}) = p_A (1/T_{2A}) + p_B (1/T_{2B}) \quad \text{\{I.3.9\}}$$

y la función de forma de línea, en unidades de frecuencia (Hz):

$$g(\nu) = \frac{T_{2m}}{1 + 4\pi^2 T_{2m}^2 (\nu_m - \nu)^2}$$

lo que representa una línea de resonancia centrada sobre una frecuencia que es la media pesada de ν_A y ν_B y con una cinética de relajación que es también la media de las cinéticas individuales.

Si el intercambio no es lo suficientemente rápido para dar una coalescencia completa, la señal centrada sobre ν_m tendrá una anchura mayor que la dada por {I.3.9}. Haciendo $\nu = \nu_m$ en {I.3.7} y desarrollando en potencias de τ , se puede obtener una expresión correspondiente a la {I.3.9}, que resulta ser

$$(1/T_{2m}) = P_A (1/T_{2A}) + P_B (1/T_{2B}) + 4\pi^2 P_A^2 P_B^2 (\nu_A - \nu_B)^2 (\tau_A + \tau_B)$$

Experimentalmente, este efecto puede conducir a un valor de $(1/T_2)$ que es apreciablemente mayor que $(1/T_1)$.

- Velocidad de intercambio intermedia. La transición de un espectro compuesto por dos líneas a otro de una línea ocurre cuando $(1/\tau_A)$ y $(1/\tau_B)$ son del orden de $(\omega_A - \omega_B)$. La expresión de la parte imaginaria de la ecuación {I.3.7} cuando los tiempos de relajación transversal T_{2A} y T_{2B} son iguales es:

$$\nu = - \frac{\gamma H_1 M_0 (1 + \frac{\tau}{T_2}) P + 2R}{P^2 + R^2} \quad \text{{I.3.10}}$$

donde

$$\tau = \frac{\tau_A \tau_B}{\tau_A + \tau_B}$$

$$P = \tau \left[\left(\frac{1}{T_2} \right)^2 - \left(\frac{1}{2} (\omega_A + \omega_B) - \omega \right)^2 + \frac{1}{4} (\omega_A - \omega_B)^2 \right] + \frac{1}{T_2}$$

$$Q = \tau \left[\frac{1}{2} (\omega_A + \omega_B) - \omega - \frac{1}{2} (P_A - P_B) (\omega_A - \omega_B) \right]$$

$$R = \left[\frac{1}{2} (\omega_A + \omega_B) - \omega \right] \left(1 + \frac{2\tau}{T_2} \right) + \frac{1}{2} (P_A - P_B) (\omega_A - \omega_B)$$

Examinemos el significado de esta complicada ecuación para un caso sencillo en que se cumplen las siguientes condiciones restrictivas:

- a) Iguales poblaciones y tiempos de vida en los dos estados:

$$P_A = P_B = \frac{1}{2} \quad \tau_A = \tau_B = 2\tau$$

- b) Grandes tiempos de relajación transversal:

$$\frac{1}{T_{2A}} = \frac{1}{T_{2B}} = 0$$

Ello significa que estamos tratando con señales cuya anchura, en ausencia de intercambio, es pequeña comparada con su separación.

Bajo estas condiciones limitantes, la parte imaginaria de G es:

$$v = -\frac{1}{4} \gamma H_1 M_0 \frac{\tau (\omega_A - \omega_B)^2}{\left[\frac{1}{2} (\omega_A + \omega_B) - \omega \right]^2 + \tau^2 (\omega_A - \omega)^2 (\omega_B - \omega)^2}$$

obtenida sin más que sustituir en {I.3.10} las condiciones

impuestas. Esta expresión puede ponerse en términos de frecuencias $\nu (= \frac{\omega}{2\pi})$, lo que nos da la forma de la función $g(\nu)$,

$$g(\nu) = \frac{\tau(\nu_A - \nu_B)^2}{\left[\frac{1}{2}(\nu_A + \nu_B) - \nu \right]^2 + 4\pi^2 \tau^2 (\nu_A - \nu)^2 (\nu_B - \nu)^2} \quad \{I.3.11\}$$

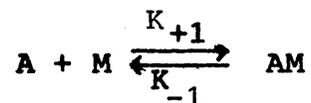
De esta expresión queda claro que la forma de la función depende solamente del producto $\tau(\nu_A - \nu_B)$, y es fácil ver que para grandes τ se obtienen dos líneas centradas en ν_A y ν_B , mientras que para pequeños τ se obtiene una sola línea situada a la frecuencia intermedia. El valor de $\tau = \frac{2}{2\pi(\nu_A - \nu_B)}$ es un valor crítico para el que se produce la coalescencia de los picos en una señal ancha. Para valores inferiores de τ se produce un progresivo estrechamiento de la línea. Para τ relativamente grandes habrá un ensanchamiento de las líneas individuales, pudiendo determinarse a partir de éste los valores de aquél utilizando la expresión {I.3.8} siempre que se cumplan las condiciones impuestas anteriormente.

En la región de coalescencia parcial, el producto $\tau(\nu_A - \nu_B)$ puede estimarse por comparación del espectro observado con la forma de una serie de curvas calculadas variando $\tau(\nu_A - \nu_B)$, o bien, comparando la posición entre las posiciones de los dos máximos con la separación bajo las condiciones de intercambio lento. Puede demostrarse fácilmente a partir de {I.3.11} que esta relación, r , es

$$r = \left[1 - \frac{1}{2\pi^2 \tau_c^2 (\nu_A - \nu_B)^2} \right]^{1/2}$$

I.3.2.- Equilibrios de asociación entre una molécula pequeña y una macromolécula.

Después de este tratamiento general, en el que se ha visto la dependencia de la forma del espectro de resonancia para el caso de intercambio de un núcleo entre dos posiciones distintas, pasemos a considerar en detalle el caso particular del equilibrio de asociación entre una molécula pequeña (antibiótico, inhibidor, etc.) con una macromolécula (ribosoma, enzima, etc.). La reacción es:



y en el equilibrio, $K = \frac{[AM]}{[A][M]}$. El complejo AM se hace y se deshace con velocidades que son, respectivamente, k_{+1} y k_{-1} . Normalmente se observa sólo el espectro del protón de A, el cual mostrará variaciones en cuanto a la frecuencia de resonancia de la señal correspondiente y de su anchura, análogas a las consideradas en el capítulo anterior, y dependientes de las cinéticas en el equilibrio, k_{+1} y k_{-1} .

La ecuación cinética de formación de AM es:

$$\frac{d[AM]}{dt} = k_1 [A] [M]$$

que puede ponerse

$$\frac{d[AM]}{dt} = \frac{k_1}{K} [AM] = k_{-1} [AM]$$

por tanto,

$$k_{-1} = (1/\tau_M) = \frac{1}{[AM]} \frac{d[AM]}{dt}$$

Por otro lado, las poblaciones en el equilibrio son

$$P_A = \frac{[A]}{[A_0]} \quad \text{y} \quad P_M = \frac{[AM]}{[A_0]}$$

en donde $[A_0]$ es la concentración inicial de A. Los tiempos de vida τ_A y τ_M son proporcionales a las correspondientes poblaciones

$$\frac{\tau_A}{\tau_M} = \frac{P_A}{P_M}$$

luego

$$(1/\tau_A) = \frac{P_M}{P_A} \left(\frac{1}{\tau_M}\right) \quad \text{\{I.3.12\}}$$

La variación de τ_M con la temperatura viene dada por

$$\tau_M = \left(\frac{h}{kT}\right) e^{\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} - \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)} \quad \text{\{I.3.13\}}$$

donde ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger son respectivamente los incrementos de entalpia y entropia correspondientes al complejo activado del equilibrio de asociación.

Las ecuaciones {I.3.3} y {I.3.4}, para el estado estacionario pueden ponerse:

$$\alpha_A G_A - (1/\tau_M) G_M = -iYH_1 M_{0A}$$

$$-(1/\tau_A) G_A + \alpha_M G_M = -iYH_1 M_{0M}$$

en donde α_A y α_M son, como anteriormente,

$$\alpha_A = (1/T_{2A}) + (1/\tau_A) - i\Delta\omega_A$$

$$\alpha_M = (1/T_{2M}) + (1/\tau_M) - i\Delta\omega_M$$

y, en donde, se ha puesto

$$\Delta\omega_A = \omega - \omega_A$$

y

$$\Delta\omega_M = \omega - \omega_M$$

La solución de las ecuaciones anteriores para G_A es:

$$G_A = \frac{i\gamma H_1 (M_{OA}\alpha_M + M_{OM}(1/\tau_M))}{-\alpha_A\alpha_M + (1/\tau_A)(1/\tau_M)}$$

En Espectroscopía de RMN, estos equilibrios se miden normalmente en unas condiciones de concentración, tales que $[A_0] \gg [M_0]$, por lo que $M_{OA} \gg M_{OM}$, $P_A \gg P_M$ y, por tanto, $(1/\tau_A) \ll (1/\tau_M)$. En estas condiciones la expresión de G_A en una buena aproximación es:

$$G_A = \frac{i\gamma H_1 M_{OA}\alpha_M}{-\alpha_A\alpha_M + (1/\tau_A)(1/\tau_M)}$$

La zona que se observa en estos experimentos es la que está cerca de la resonancia de A. Se puede demostrar por un análisis detallado de los distintos términos (11) que, para esta región del espectro, la magnetización total $G (=G_A + G_M)$ viene dada en muy buena aproximación por G_A . G_M contribuiría apreciablemente si M tuviera su resonancia en esta región del espectro y unos tiempos de vida extremadamente grandes. Aún así, su efecto sólo aparecería sobre un pequeño intervalo de frecuencias, es decir, daría lugar a una señal muy fina y poco intensa superpuesta a una señal ancha. Si se escribe G como una señal pura A y reordenada, queda:

$$G = \frac{-i\gamma H_1 M_{OA}}{\alpha_A - (1/\alpha_M)(1/\tau_A)(1/\tau_M)}$$

y la componente imaginaria v:

$$v = -\gamma H_1 M_{0A} \frac{A}{A^2 + B^2}$$

donde

$$A = \left(\frac{1}{T_{2A}} \right) + \left(\frac{1}{\tau_A} \right) \frac{\left(\frac{1}{T_{2M}} \right)^2 + \left(\frac{1}{\tau_M} \right) \left(\frac{1}{T_{2M}} \right) + \Delta\omega_M^2}{\left[\left(\frac{1}{T_{2M}} \right) + \left(\frac{1}{\tau_M} \right) \right]^2 + \Delta\omega_M^2}$$

$$B = \Delta\omega_A + \frac{\left(\frac{1}{\tau_A} \right) \left(\frac{1}{\tau_M} \right) \Delta\omega_M}{\left[\left(\frac{1}{T_{2M}} \right) + \left(\frac{1}{\tau_M} \right) \right]^2 + \Delta\omega_M^2}$$

El primer término del denominador entre paréntesis y la parte del numerador entre paréntesis son esencialmente independientes de la frecuencia en la región de interés ($\omega \approx \omega_A$), bien porque $\Delta\omega_M$ sea grande y su valor porcentual varíe muy poco, con lo que puede considerarse constante, o bien porque $-\Delta\omega_M$ sea pequeño en cuyo caso su contribución es pequeña y puede despreciarse. El valor de v será máximo para la frecuencia en que se anule el segundo término del denominador,

$$\Delta\omega_A = \frac{-\Delta\omega_M (1/\tau_A) (1/\tau_M)}{\left[\left(\frac{1}{T_{2M}} \right) + \left(\frac{1}{\tau_M} \right) \right]^2 + \Delta\omega_M^2} \quad \{I.3.14\}$$

y la magnitud $(1/T_2')$, relacionada con la anchura a mitad de altura, $\Delta\omega_{(1/2)} = 2(1/T_2')$ (seg^{-1}) puede hallarse encontrando un valor de $\Delta\omega_A$ que corresponda a una intensidad igual a $v/2$. Representando por $(1/T_{2p})$ la diferencia $(1/T_2)' - (1/T_{2A})$ se obtiene:

$$(1/T_{2P}) = (1/\tau_A) \frac{[(1/T_{2M})^2 + (1/T_{2M})(1/\tau_M) + \Delta\omega_M^2]}{[(1/T_{2M}) + (1/\tau_M)]^2 + \Delta\omega_M^2}$$

que, haciendo uso de {I.3.12} y teniendo en cuenta que $p_A \sim 1$, queda

$$(1/T_{2P}) = p_M (1/\tau_M) \frac{[(1/T_{2M})^2 + (1/T_{2M})(1/\tau_M) + \Delta\omega_M^2]}{[(1/T_{2M}) + (1/\tau_M)]^2 + \Delta\omega_M^2} \quad \{I.3.15\}$$

De acuerdo con esta ecuación el exceso de anchura $(1/\pi T_2)$ Hz, mostrada por la señal A en presencia de M respecto a cuando está ausente depende de los siguientes factores: la población de M, que viene dada por la constante de equilibrio de asociación, la cinética del intercambio $(1/\tau_M)$, la cinética de relajación correspondiente al sitio ligado $(1/T_{2M})$ y, por último, la diferencia entre las frecuencias de resonancia del protón en los sitios libre y ligado.

Un tratamiento análogo al realizado para $(1/T_2)$ puede llevarse a cabo para $(1/T_1)$ partiendo de la ecuación de Bloch que describe el comportamiento de la componente M_z de la magnetización (5). Después de aplicar las restricciones introducidas, principalmente el hecho de que $M_{0M} \ll M_{0A}$, queda

$$(1/T_{1P}) = p_M \frac{(1/T_{1M})(1/\tau_M)}{[(1/\tau_M) + (1/T_{1M})]} \quad \{I.3.16\}$$

Es interesante hacer notar que las expresiones de $(1/T_{2P})$ y $(1/T_{1P})$ difieren solo en la presencia de los términos dependientes de la frecuencia $\Delta\omega_M^2$ en la primera. En caso de que no exista ésta, o ella sea despreciable frente a

los términos de {I.3.15} ambas expresiones tienen la misma forma.

En casos favorables, pues, la medida de $(1/T_{2p})$ para distintas concentraciones iniciales de A y M, y a distintas temperaturas, complementadas, en su caso, con la medida de $(1/T_{1p})$ y, a ser posible, a distintas frecuencias de operación, nos permitiría obtener información acerca de la constante de equilibrio, K, las constantes cinéticas, k_{+1} y k_{-1} , así como de la magnitud de la relajación en el sitio unido $(1/T_{2M})$ e, incluso, de la diferencia entre las frecuencias de resonancia en ambos sitios.

Admitiendo que la relajación en el sitio ligado tenga lugar por el mecanismo de interacción dipolo-dipolo, ya sea intramolecular (por interacción con otro núcleo de la propia molécula) o intermolecular (por interacción con otro núcleo de la macromolécula, las expresiones de $(1/T_{1M})$ y $(1/T_{2M})$ son:

$$(1/T_{1M}) = \frac{3}{10} \gamma_I^4 \hbar^2 \sum_{i=1}^n \frac{1}{r_i^6} f_1(\tau_c)$$

$$(1/T_{2M}) = \frac{3}{20} \gamma_I^4 \hbar^2 \sum_{i=1}^n \frac{1}{r_i^6} f_2(\tau_c)$$

donde γ_I es la relación giromagnética del protón y r es la distancia del núcleo en consideración a otros núcleos cercanos. τ_c es el tiempo de correlación correspondiente a la molécula unida a M, y las funciones f_1 y f_2 son:

$$f_1(\tau_c) = \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_I^2 \tau_c^2} \quad \text{{I.3.17}}$$

$$f_2(\tau_c) = 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1+\omega_I^2\tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1+4\omega_I^2\tau_c^2} \quad \{I.3.18\}$$

Si se dispone de valores de $(1/T_{1M})$ y $(1/T_{2M})$ para uno o varios núcleos de A, pueden inferirse sus correspondientes tiempos de correlación, τ_c , así como la naturaleza intra o intermolecular de la relajación. Todo ello contribuye a describir en términos dinámicos y estructurales la naturaleza del complejo AM.

Desgraciadamente, los casos reales, no se presentan tan favorablemente como para poder extraer toda esta información existiendo de hecho múltiples limitaciones, por ejemplo, en los intervalos de concentración y temperatura en los que es posible moverse, con lo que la información a obtener puede reducirse seriamente.

En la expresión {I.3.15} sólo p_M depende de las concentraciones iniciales, por lo que una adecuada serie de experimentos en que se varíen éstas y se midan los incrementos de las anchuras $(1/T_{2p})$ de las líneas de A puede proporcionarnos p_M y, por tanto, la constante de equilibrio K, que puede compararse con la determinada por otros métodos. En caso de que exista un especial condicionamiento del sistema a medir que impida esta determinación, hay que recurrir a introducir el valor de K medido por otras técnicas. Como resultado adicional del experimento anterior se obtendrá también un valor para todo lo que multiplica a p_M en {I.3.15}. La utilización de este valor en

la determinación de $(1/T_{2M})$, $(1/\tau_M)$ y $\Delta\omega_M^2$ depende mucho de los valores relativos de éstos y, para ello, es instructivo considerar la variación de las ecuaciones {I.3.15} y {I.3.16} con el inverso de la temperatura (12). Esta afectará principalmente a la cinética de intercambio $(1/\tau_M)$ y su efecto viene expresado por {I.3.13}. La diferencia de frecuencias $\Delta\omega_M^2$ suele considerarse independiente de la temperatura. En todo caso su variación con ésta suele ser pequeña. La cinética de relajación en M $(1/T_{1M})$ depende de la temperatura ya que τ_c es función de ella, aceptándose para su variación una ecuación de activación análoga a la {I.3.13}.

En la figura 1, se ilustra la variación de $(1/T_{1p})$ y $(1/T_{2p})$ con el inverso de la temperatura. En ella, pueden distinguirse claramente tres regiones que consideraremos por separado.

Región I. Intercambio lento.

En esta región la cinética de intercambio $(1/\tau_M)$ es lenta y pueden despreciarse los términos del numerador y denominador de {I.3.15} en que ella aparece. Los valores de $(1/T_{2p})$ y $(1/T_{1p})$ son iguales y dependen sólo de p_M y de $(1/\tau_M)$:

$$(1/T_{1p}) = (1/T_{2p}) = p_M(1/\tau_M)$$

En las condiciones que prevalecen en estos experimentos, en los que $[A_0] \gg [M_0]$, y para constantes de asociación relativamente grandes, p_M puede considerarse constante o, en todo caso, su variación con respecto a la Temperatura es muy pequeña respecto a la que sufre $(1/\tau_M)$. Por tanto, al

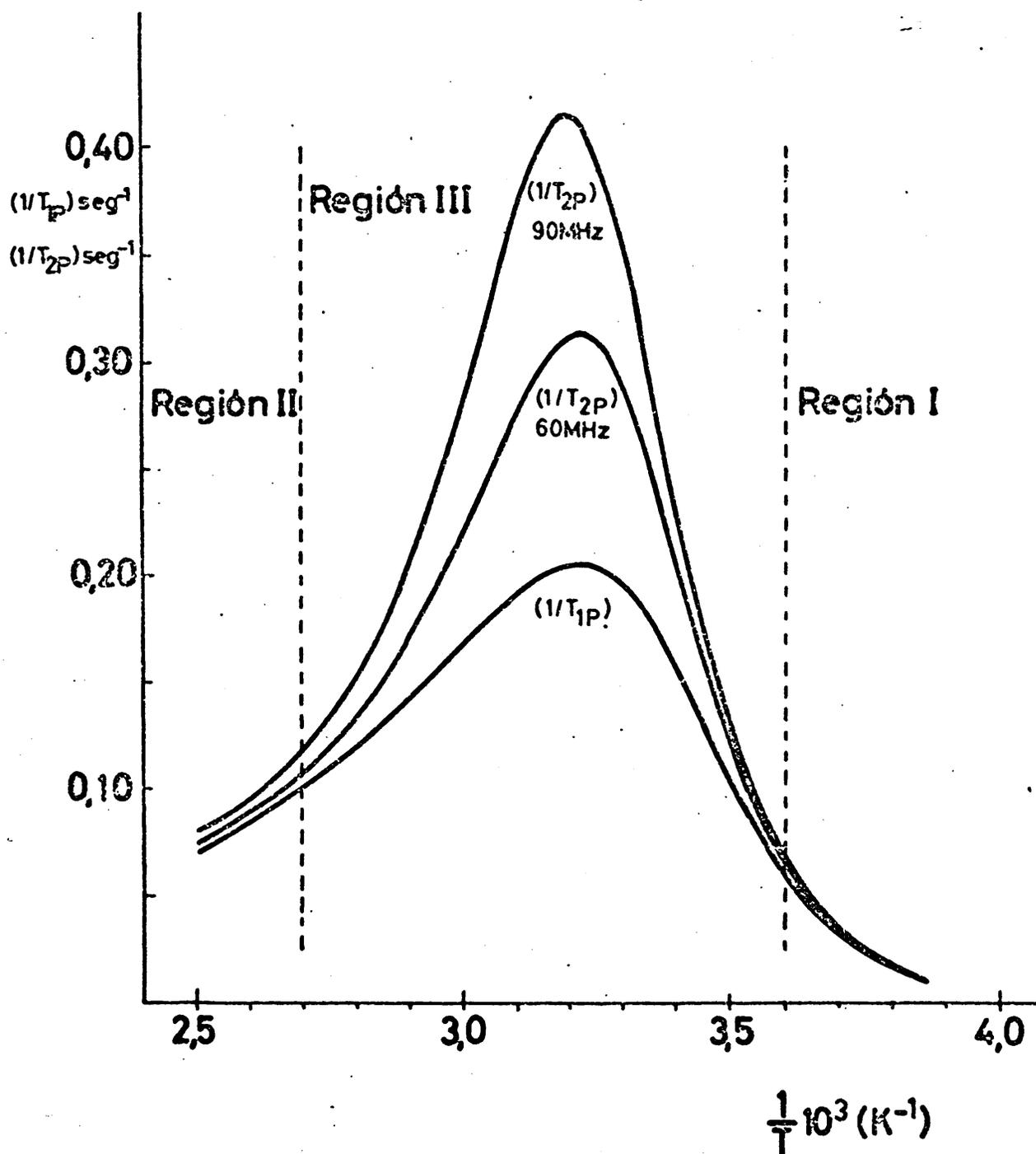


Figura 1. Variación de $(1/T_{1p})$ y $(1/T_{2p})$ con el inverso de la temperatura

aumentar la temperatura, y aumentar consecuentemente la cinética de intercambio ($1/\tau_M$) aumentan también ($1/T_{1p}$) y ($1/T_{2p}$). Un estudio a distintas temperaturas en esta región puede conducir a la determinación de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , entalpías y entropías de activación correspondientes al complejo activado de asociación. Si se miden las señales de distintos protones de A, para todas ellas han de obtenerse los mismos valores de ($1/T_{1p}$) y ($1/T_{2p}$). La posición del máximo de la señal que se observa viene dada por {I.3.14} que, para las condiciones que rigen en esta región, es $\Delta\omega_A=0$, es decir, la señal permanece en la posición correspondiente a la frecuencia de resonancia del sitio libre A, y no cambia con la temperatura.

Región II. Intercambio rápido.

En esta región, la cinética de intercambio ($1/\tau_M$) es muy grande comparada a los restantes términos del numerador y denominador de {I.3.15}, es decir, ($1/T_{2M}$) y $\Delta\omega_M^2$. En ese caso ($1/T_{1p}$) y ($1/T_{2p}$) vienen dados por:

$$(1/T_{1p}) = p_M(1/T_{1M})$$

$$(1/T_{2p}) = p_M(1/T_{2M})$$

es decir, la relajación viene dictada por la relajación en el sitio M. Para el caso que $\tau_c \ll (1/\omega_I)$ (véase {I.3.17} y {I.3.18}), en donde, τ_c es el tiempo de correlación correspondiente al complejo AM y ω_I la frecuencia de operación, los valores de ($1/T_{1M}$) y ($1/T_{2M}$) coinciden. En contraposición al caso anterior, en éste, cuando se aumenta la tempe-

ratura disminuyen $(1/T_{1p})$ y $(1/T_{2p})$, siempre que se cumpla la anterior condición.

Un estudio a distintas temperaturas en esta región puede conducir a la determinación de ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger para el proceso de reorientación del complejo AM. Si se miden señales de distintos protones de A, para cada una de ellas se obtendrán, en general, distintos valores de $(1/T_{1p}) = (1/T_{2p})$, que pueden reflejar los distintos tiempos de correlación de los correspondientes núcleos, o bien, las diferencias que muestran en cuanto al número y proximidad de otros núcleos en el complejo.

La posición del máximo de la señal que se observa viene dada por {I.3.14} que, para las condiciones que rigen en esta región se reduce a:

$$\Delta\omega_A = p_M \Delta\omega_M \quad \text{{I.3.19}}$$

es decir, el máximo se obtiene a una frecuencia que es la media ponderada de las frecuencias de resonancia en los sitios libre y ligado, y no cambia con la temperatura.

Región III. Intercambio intermedio.

Es la región en que está incluido el máximo de $(1/T_{1p})$. Se caracteriza porque, en ella, los valores de $(1/T_{1p})$ y $(1/T_{2p})$, siempre que $\Delta\omega_M \neq 0$, son diferentes. Consideremos, sin embargo, en primer lugar, por su sencillez el caso en que $\Delta\omega_M = 0$.

La expresión de $(1/T_{1p})$ es {I.3.16} y la de $(1/T_{2p})$ su análoga

$$(1/T_{2p}) = p_M \frac{(1/T_{2M})(1/\tau_M)}{(1/T_{2M}) + (1/\tau_M)}$$

y la relajación vendrá determinada por la magnitud relativa de $(1/T_{2M})$ y $(1/\tau_M)$. La variación con la temperatura de $(1/T_{2p})$ nos indicará qué término domina. Así si $(1/T_{2p})$ crece con la temperatura, ello es indicativo de que su valor dependerá sólo de $(1/\tau_M)$, para lo cual es necesario que $(1/\tau_M) \ll (1/T_{2M})$, es decir, que la cinética de intercambio sea lenta y mucho menor que la relajación en M. Lo contrario sucede cuando $(1/T_{2p})$ decrece con la temperatura. Un síntoma inequívoco de estar situados en esta segunda zona es el hecho de obtener diferentes valores de $(1/T_{2p})$ para distintos protones de A.

Cuando el valor de $\Delta\omega_M$, aún no siendo nulo, es pequeño en relación con $(1/T_{2M})$ y $(1/\tau_M)$, es decir, $\Delta\omega_M \ll (1/T_{2M}), (1/\tau_M)$, la situación puede asimilarse al caso anterior.

Si se obtienen valores de $(1/T_{1p})$ significativamente menores que los obtenidos para $(1/T_{2p})$, siempre que se cumpla que $\tau_c \ll (1/\omega_I)$ en {I.3.17} y {I.3.18}, ello es indicativo de que el término $\Delta\omega_M$ es comparable a $(1/T_{2M})$ o a $(1/\tau_M)$. Existe un valor de $(1/\tau_M)$ que hace máximo a $(1/T_{2p})$ y si se cumple que $1/T_{2M} \ll \Delta\omega$, este valor es $(1/\tau_M) = \Delta\omega_M$.

La zona de la región III cercana a la I depende poco de la frecuencia de operación y en ella $(1/T_{2p})$ crece

con la temperatura. La zona próxima a II, sin embargo, es muy sensible a la frecuencia, y dado que en dicha zona puede considerarse ya que $(1/\tau_M) \gg \Delta\omega_M$, resulta para $(1/T_{2p})$

$$(1/T_{2p}) = P_M \left[(1/T_{2M}) + \frac{\Delta\omega_M^2}{(1/\tau_M)} \right]$$

y si $(1/T_{2M}) \cdot (1/\tau_M) \ll \Delta\omega_M^2$,

$$(1/T_{2p}) = P_M \frac{\Delta\omega_M^2}{(1/\tau_M)}$$

es decir, que $(1/T_{2p})$ depende del cuadrado de la diferencia de frecuencias, $\Delta\omega_M$.

Cuando el valor de $\Delta\omega_M^2$ es muy grande, $\Delta\omega_M \gg (1/\tau_M)$, $(1/T_{2M})$, la situación es análoga a la región de intercambio lento, es decir,

$$(1/T_{2p}) = P_M (1/\tau_M)$$

En la región de intercambio intermedio, se produce un progresivo desplazamiento de la posición del máximo de la resonancia observada, cuando se aumenta la temperatura, desde la posición correspondiente al sitio libre A, a la que viene dada por la media ponderada de A y M.

Si la condición $\tau_c \ll (1/\omega_I)$ en las expresiones {I.3.17} y {I.3.18} no se cumple, es decir, si operamos con una frecuencia instrumental pequeña y la macromolécula tiene un peso molecular muy grande, no es de esperar obtener los mismos valores de $(1/T_{2p})$ y $(1/T_{1p})$, aún en el caso de encontrarnos en la región II, de intercambio rápido. Normalmente, se obtendrán valores mucho mayores para

$(1/T_{2p})$ que para $(1/T_{1p})$, dependiendo este último en gran medida de la frecuencia de operación y de su relación con el valor de τ_c .

Las curvas de la variación de $(1/T_{2p})$ y $(1/T_{1p})$ con la temperatura que son de esperar para el caso en que no se cumpla la condición $\tau_c \ll (1/\omega_T)$ son las que se ilustran en la fig. 2.

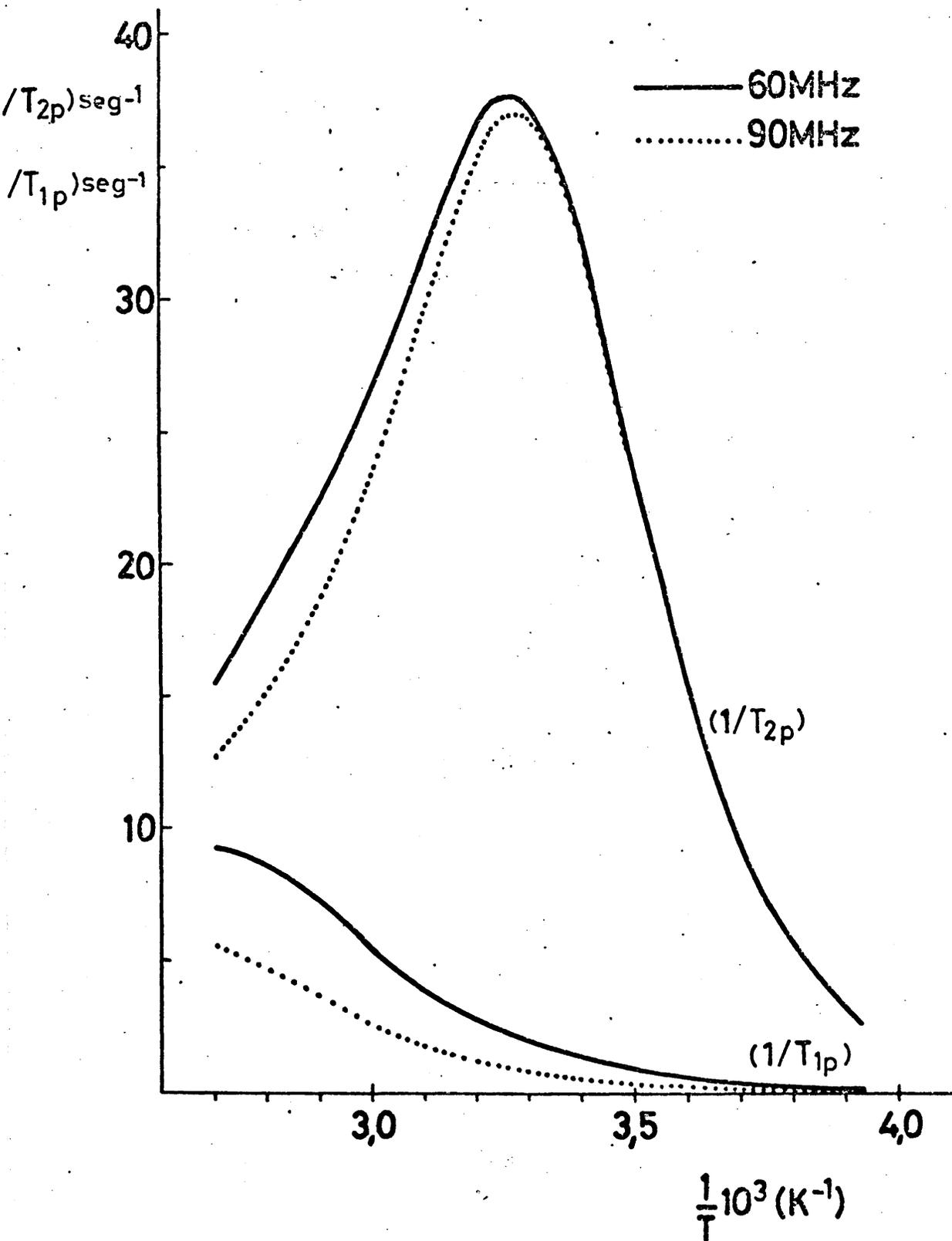


Figura 2. Variación de $(1/T_{1p})$ y $(1/T_{2p})$ con el inverso de la temperatura en el caso que no se cumple la condición de estrechamiento extremo.

I.4. Ribosomas y síntesis proteica

I.4.1.- Ribosomas de *Escherichia coli*.

Los ribosomas (13) son los orgánulos celulares donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas (14 y 15). En *Escherichia coli* y en los demás organismos procarióticos, así como en las mitocondrias, los ribosomas tienen un peso molecular aproximado de $2,6 \times 10^6$. Poseen en su forma más compacta un coeficiente de sedimentación aproximado de 70 unidades Svedberg (70S). Están compuestos de dos subunidades desiguales: una mayor, que sedimenta a 50S y contiene el centro catalítico formador de los enlaces peptídicos (la peptidil transferasa). Y una menor, que sedimenta a 30S y fija el RNA mensajero. Ambas subunidades son agregados de proteínas y RNA, pudiendo ser identificadas (16) las 34 proteínas de la subunidad 50S (S1, S2...S34) y las 21 de la subunidad 30S (L1, L2...L21) adoptándose una nomenclatura común de acuerdo a sus movilidades electroforéticas. Todas las proteínas ribosómicas son distintas y se hallan en un máximo de una copia por ribosoma, a excepción de L7 y L12, oscilando sus pesos moleculares entre $1,0 \times 10^4$ y $6,5 \times 10^4$ siendo los más comunes alrededor de $1,5 \times 10^4$. Por lo que respecta a los rRNAs se han identificado 2 especies (23S y 5S RNA) en la subunidad mayor y 1 especie (16S RNA) en la menor. La estructura del ribosoma se halla fuertemente influenciada por la concentración de Mg^{++} en la solución; así, por ejemplo, a concentraciones 10 mM de Mg^{++} la mayoría de los ribosomas sedimentan a 70S,

pero al bajar esta concentración entre 1 y 0,1 mM, éstos se disocian en sus subunidades, siendo el proceso reversible, ya que al restituir la concentración inicial de Mg^{++} las partículas 70S vuelven a formarse. A concentraciones inferiores a 0,1 mM de Mg^{++} se produce un desdoblamiento o apertura de las subunidades 30S y 50S. Así pues el Mg^{++} es esencial para mantener las dos subunidades unidas en su estructura compacta y funcional. El Mg^{++} fijado a los ribosomas (a los grupos fosfato del RNA) puede ser desplazado por otros cationes como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ o NH_4^+ , sin embargo la estructura o configuración del ribosoma cambia según cuales sean los iones que neutralizan las cargas del RNA y solamente ciertas combinaciones de cationes a concentraciones apropiadas permiten la configuración adecuada para la actividad de la partícula. Así Mg^{++} entre 7 y 11 mM y K^+ o NH_4^+ entre 50 y 100 mM, son condiciones que permiten "in vitro" actividades óptimas en la traducción de mensajeros naturales. Las concentraciones altas de cationes monovalentes inducen el desdoblamiento de los ribosomas e incluso el desprendimiento de las proteínas ribosómicas. Una descripción estructural de las subunidades se consiguió fundamentalmente de datos hidrodinámicos y de dispersión de rayos X obtenidos por Anderegg and Van Holde (17).

La subunidad 30S tiene una masa anhidro de 0,9 ($\pm 0,3$) $\times 10^6$ daltons, siendo una partícula relativamente asimétrica, asemejándose a un elipsoide de revolución achatado o bien a un cilindro con dimensiones 56x224x224 Å,

que corresponde a un volumen hidratado de $1,5 \times 10^6 \text{ \AA}^3$, conteniendo 0,39 gramos de agua por gramo de ribonucleoproteína atrapada dentro de la partícula. Al menos un 90% de este volumen está suficientemente empaquetado que puede excluir moléculas de 10 \AA tales como sacarosa. La subunidad 50S tiene una masa anhidra de $1,55 \times 10^6$ daltons, es más simétrica que la 30S y existen diferentes modelos que encajan con los datos experimentales, como son un elipsoide triaxial $130 \times 175 \times 259 \text{ \AA}$; un cilindro elíptico $121 \times 162 \times 194 \text{ \AA}$; y un elipsoide de revolución $225 \times 225 \times 113 \text{ \AA}$. Los tres modelos dan un volumen hidratado muy próximo a $3 \times 10^6 \text{ \AA}^3$, con 0,40 gr de agua por gramo de ribonucleoproteína atrapada dentro de la partícula, siendo más del 80% del volumen impermeable a sacarosa. Parece haber quedado demostrado (18) que las regiones helicoidales del rRNA son muy importantes para la fijación de las proteínas. Schaup, Green y Kurlad (19) han mostrado que S4, S7, S8, S15, S17 y S20 se unen al 16S RNA, sin embargo S17 lo hace de forma inespecífica. Por lo que respecta a la subunidad 50S se han identificado L2, L6, L16, L17, L19, L20, L23 y L24 como proteínas con afinidad por el 23S RNA, mientras que L2, L6, L18 y L25 la tienen por el 5S RNA (20). El hecho de que todas las proteínas ribosómicas interaccionan con sus correspondientes anticuerpos, junto con consideraciones de hidratación hacen suponer que al menos en la subunidad 30S, las proteínas deben formar una capa monomolecular mantenida toda ella unida más o menos directamente por el rRNA. La estructura de la subunidad 50S parece algo más complicada.

Por técnicas de marcaje por afinidad, se han podido localizar las proteínas L2, L11, L16 y L27 cerca del centro peptidyl transferasa (21).

I.4.2.- Biosíntesis de proteínas.

La biosíntesis de proteínas tiene lugar en las bacterias a nivel de sus ribosomas que contienen un 60% de RNA y 40% de proteínas y se caracteriza por un coeficiente de sedimentación 70S. En el proceso se pueden distinguir claramente tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

La fase de iniciación se caracteriza por la disociación de la unidad 70S, en las subunidades 50S y 30S, a esta última se unirán el mRNA y el formil metionil-tRNA (fMet-tRNA) formando un complejo de iniciación, el cual se asocia firmemente con la subunidad 50S y produce el ribosoma funcional 70S. La presencia de tres factores de iniciación (IF1, IF2, IF3) así con la de GTP es indispensable para la verificación de esta etapa.

Mediante el anticodon del tRNA se reconoce el triplete nucleotídico del codon correspondiente del mRNA. Esta interacción está específicamente estabilizada por la subunidad ribosómica 30S. Otras partes del t-RNA interaccionan con la subunidad 50S. El f-Met-tRNA se fija en la iniciación al sitio "P" del ribosoma (ver fig. 3) dirigido por el triplete del mRNA que lo codifica y que contiene las bases A(adenina), U(uracilo) y G(guanina) en este orden. Quedando el sitio "A" libre para que se fije AA₁-tRNA₁ (aminoacil-tRNA

primero). Entonces tiene lugar la formación del enlace peptídico catalizado por la actividad peptidil transferasa de la subunidad ribosómica 50S, transfiriéndose el f-Met de tal manera que el grupo -COOH de la metionina se fija al grupo α -amino del aminoácido AA₁ del AA₁-t-RNA₁ fijado en el sitio A. Hay a continuación una translocación de f-Met-AA₁-t-RNA₁ del sitio "A" al sitio "P" del ribosoma, estando acompañado el movimiento del mRNA al movimiento del f-Met-AA₁-t-RNA₁. Entonces el tRNA descargado de su formilmetionil se separa y deja libre el sitio "P". El sitio "A" queda entonces libre y se fijará en el mismo AA₂-t-RNA₂ (aminoacil tRNA segundo) en un paso similar al de fijación de AA₁-t-RNA₁. La peptidil transferasa cataliza de nuevo la formación del enlace peptídico, formándose F-met-AA₁-AA₂-t-RNA₂ fijado al sitio "A". De esta manera continúa el ribosoma "leyendo" todos los tripletes del mRNA. En el proceso de elongación se requieren GTP y tres factores proteicos, llamados E F Tu, E F Ts, y E F G que se encuentran en la fracción soluble de la célula, los factores EFTu y EFTs pueden asociarse, y de esta forma se les llama EFT.

La fase de terminación tiene lugar cuando en la secuencia de lectura del mRNA, se encuentra un triplete "sin sentido", es decir que no codifica la incorporación de ningún aminoacil-tRNA.

La liberación del polipeptidil-tRNA del ribosoma cuando se ha llegado a un codon de terminación, es inducido por un factor de liberación proteica específico (factor RF

que se fraccionó en dos RF1 y RF2, requiriéndose cada uno de ellos según cuales fueran los tripletes sin sentido de terminación) que está unido al ribosoma e induce que la peptidil transferasa provoque la hidrólisis del enlace éster existente entre el polipeptido y el tRNA. Y un tercer factor RF3, que por sí solo no tenía actividad, pero que estimulaba la unión de los factores RF1 y RF2 al triplete terminador correspondiente. El ribosoma 70S se aparta entonces del mRNA y queda libre, pudiendo entrar nuevamente en el ciclo.

I.5. Inhibición de biosíntesis de proteínas por antibióticos que actúan sobre el centro peptidil transferasa

La formación del enlace peptido en la síntesis de proteínas tiene lugar por la unión del grupo carboxilo en el C terminal del residuo peptídico en el sitio P ribosómico con el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ del aminoácido fijado en el sitio A ribosómico.

El centro enzimático catalizador de dicha reacción se conoce como centro peptidil transferasa. Ya que dicho centro está también implicado en la actividad hidrolítica peptidil-tRNA asociado con la fase de terminación, cualesquiera condiciones que bloqueen la actividad peptidil transferasa bloquearán también la hidrólisis peptidil-tRNA (22 y 23).

Con el fin de disponer de un modelo experimental para el estudio de la etapa de formación de enlace peptídico, independiente de otras reacciones que conducen a la síntesis de proteínas, se ideó un sistema basándose en el antibiótico puromicina, que es un análogo estructural de la parte 3'-terminal aminoacil-adenosina del aminoacil-tRNA y un sustrato aceptor conveniente para la formación del enlace peptídico en una reacción en la cual el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ de la puromicina se une al C terminal del grupo peptídico (Reacción de la Puromicina). Como la puromicina carece de la parte de la molécula de aminoacil-tRNA responsable de la interacción con el mRNA, en la subunidad

30S y probablemente con algunos sitios de la subunidad 50S, el producto de la reacción (peptidil-puromicina) queda libre del ribosoma y se interrumpe el alargamiento de la cadena polipeptídica. Esta reacción que ocurre sobre la subunidad 50S no requiere GTP ni factores del sobrenadante, sin embargo depende fuertemente de la presencia de cationes monovalentes y divalentes.

La localización del centro peptidil transferasa sobre la subunidad se ha demostrado por la formación de enlace peptídico en un sistema muy simplificado descrito como "Reacción del fragmento"; y que consiste en que los fragmentos terminales CACCA-, AACCA-, ACCA- y CCA-Met f del fMet-tRNA_f reaccionan con la puromicina para dar fMet-puromicina. Esta reacción sólo requiere la subunidad mayor, cationes monovalentes y divalentes y bien metanol o etanol.

En el estudio de una serie de partículas carentes de determinadas proteínas (α, β, γ cores), se pudo demostrar que se requiere a la proteína L16, para la unión con clo-ranfenicol, igualmente L15 parece estar implicado en la actividad peptidil transferasa, sin embargo otras proteínas distintas de L15 y L16, también podrían estar implicadas en la actividad peptidil transferasa, ya que γ -cores, que carecen de dichas proteínas, enlaza aún a $|^3\text{H}|$ puromicina y CACCA-Leu-Ac.

Estudios de etiquetamiento por afinidad han suge-

rido que las proteínas L2 y L27 (Sonenberg et al.); (Pellegrini et al.), L16 y L24 (Pongs et al.); L13, L14, L15, L16 y L27 (Czernilofsky y Kuechler) están implicados en la unión del sustrato al centro peptidil transferasa de ribosomas de E. coli.

El 5S RNA se requiere para la actividad peptidil transferasa de la subunidad 50S, ya que partículas reconstituidas sin 5S RNA no son activas en la formación del enlace peptídico. Sin embargo, el extremo 3' del 5S RNA puede ser modificado sin afectar la actividad peptidil transferasa.

La evidencia para la interacción de un antibiótico con el centro peptidil transferasa, ha sido obtenida de los siguientes criterios: a) Efecto inhibitor sobre la formación del enlace peptídico y (θ) sobre la unión al sustrato. b) Unión directa de inhibidores a los ribosomas o a sus subunidades. c) Inhibición de la unión a ribosomas de inhibidores de la formación del enlace peptídico. d) Identificación de algunos componentes ribosómicos comunes para el centro peptidil transferasa y el sitio (o sitios) de unión de los inhibidores. Hay que tener en cuenta que algunos inhibidores pueden bloquear la actividad peptidil transferasa en determinadas condiciones sin actuar sobre el centro peptidil transferasa, ya que el ribosoma sufre importantes cambios conformacionales durante la translación.

Tanto puromicina como gougerotina, inhiben la reacción del fragmento y ha sido demostrado que poseen un

solo sitio de interacción de alta afinidad sobre el ribosoma, y por consiguiente, un único centro peptidil transferasa. A concentraciones muy altas del antibiótico, hay una significativa desviación de la linealidad en los plots de Sctatchard, ya que existen otros sitios de unión para el antibiótico con mucha menor afinidad. Harris y Symons (24) han descrito un detallado modelo del centro activo peptidil transferasa de E. coli, cuyos resultados aclaran convenientemente la acción de los antibióticos inhibidores a este nivel.

El sitio A o sitio aceptor de peptidil transferasa es el responsable de la unión del extremo 3'-terminal del amino-acil-tRNA durante la formación del enlace peptídico y se pueden diferenciar dentro de él los siguientes sitios:

a) Un sitio hidrofóbico (I), el cual es relativamente específico para la unión de los grupos R aminoacilo aromáticos de la A-L-Phe, A-L-tyr y de la L-phe, S-benzyl-L-cisy y O-benzyl-L-ser análogos aminoacílicos de puromicina. Este sitio está implicado en la unión del grupo p-metoxi-benzyl de puromicina.

b) Un sitio hidrofílico (II), el cual está implicado en la unión por vía de una atracción culombiana entre un grupo cargado negativamente del ribosoma (por ejemplo un α -, β - o γ - carboxil o un grupo fosforil) y los siguientes grupos cargados positivamente: el grupo metilguanidinio de la blastocidina S y el grupo Σ -amino de la estreptomicina, 2'(3')-O-L-Lysil adenosina y α -M-tosil-L-lisil clorometil-

cetona. El grupo no cargado 6-metiluracilo de la esparso-
micina y el grupo ureido de la 3'-N-homocitrullil-3' amino-
adenosina pueden también unirse por puente de hidrógeno a
este sitio.

c) Sitio III, para la unión de la adenina 3'-terminal del
aminoacil-tRNA, la dimetiladamina de puromicina, la hipoxan-
tina de I-L-phe, la citosina de C-L-phe, blastidina S,
gougerotina y amicitina, y el grupo heterocíclico de la
estreptidina.

d) Sitio IV, específico para la unión del penúltimo 3'-
residuo (3'-CMP) del aminoacil-tRNA.

e) Sitio IVa, para la unión, por medio de una atracción
culombiana a un grupo R positivamente cargado de lisina
o arginina sobre el ribosoma del primer grupo fosforil
del extremo 3' del aminoacil-tRNA y del grupo 5'-carboxil
de la blastidina S. Además el grupo 5'-amida de gouge-
rotina puede enlazar por enlace de hidrógeno a este sitio,
esto es consistente con la drástica reducción de la acti-
vidad inhibidora de los análogos de gougerotina, carentes
del grupo amida.

f) Sitio V, específico para el tercer nucleótido (3'-CMP)
del extremo 3' del aminoacil-tRNA.

El sitio P o sitio dador de la peptidil transfe-
rasa, es el responsable de la unión del extremo 3'-terminal
del peptidil-tRNA durante la formación del enlace peptí-
dico. Detalles sobre la especificidad del sustrato en el

sitio P fueron estudiados con varios α -M-amil-aminoamil-oligonucleotidos como dadores en la reacción del fragme , en la cual es esencial la presencia de grupo α -amino bloqueado, para una mayor actividad, frente a los derivados no bloqueados.

Se han propuesto los siguientes sitios dentro del sitio P:

- a) Un sitio hidrofóbico (VII), para la unión de grupos R aminoamil de los aminoácidos hidrofóbicos.
- b) Un sitio hidrofílico (VIII), para la unión del grupo básico guanidinio del residuo arginil.
- c) Un sitio (IX), para la unión de la porción $C_p C_p A$ de varios α -N-amil-aminoamil-oligonucleotidos.

Además de los anteriormente citados sitios en A y P, se propuso otro sitio (VI) para el peptido recién sintetizado, en vista de la conocida protección de los peptidos nacientes de las proteasas.

Este sitio estará posiblemente ocupado por el residuo N-metil-glicina de gougerotina, el grupo dicloro acetilo de cloranfenicol y los residuos M-aminoamilos de los M-aminoamil análogos de cloranfenicol. En el caso de estos compuestos, parte de cada una de las respectivas moléculas también enlaza al sitio VI, además de enlazar al sitio A.

Harris y Symons propusieron que en vivo el papel desempeñado colectivamente por los sitios III, IV, IVa y V en el sitio A y I en el sitio P era actuar como sitios de

reconocimiento de la peptidil transferasa para el término C_pC_pA de aminoacil y peptidil-tRNA, mientras que los sitios I y II del sitio A pueden restringir el movimiento del grupo α -amino del aminoacil-tRNA y orientarlo en una configuración favorable para un ataque sobre la unión ester carboxilico de peptidil-tRNA. Estos dos últimos sitios pueden actuar también para prevenir interferencia de varios grupos R aminoacil con la reacción transferasa, lo mismo se puede decir de los sitios VII y VIII de P'.

II. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

II.1. Materiales y métodos

II.1.1.- Productos y preparación de muestras.

El antibiótico puromicina, en forma de dihidrocloreuro, se obtuvo de la casa SERVA (Feinbiochemica, Heidelberg, Alemania) y la gougerotina de Calbiochem AG (Lucerna, Suiza). Como referencia interna se utilizaron, en distintos casos, alcohol terbutílico, DSS (2,2'-dimetil-silapentan-sulfonato sódico) y TSP-D4 (trimetil tetradeutero silopropionato sódico), procedentes estos últimos de Stholer Isotope Chemicals, a través de su representante en España, Fedelco S.A.. El dimetil sulfóxido deuterado, $(CD_3)_2SO$, se obtuvo también de esta última firma y el agua pesada, D_2O (99,75 %), de la casa Fluka (Suiza).

El ácido clorhídrico, hidróxido sódico, alúmina, glucosa, sales y disolventes orgánicos empleados en la preparación de ribosomas fueron productos Merck. La bacto-triptona y el extracto de levadura se obtuvieron de la casa Difco y el ácido poliuridílico y el tris (tris-hidroximetil-amino-metano) de Sigma. La ^{14}C -fenilalanina nos fue proporcionada por Radiochemical Centre y el cloramfenicol por el Dr. D. de la Bella, Zambon Lab. (Bresso-Milano, Italia).

Las muestras a analizar por RMN se prepararon por pesada directa y disolución en el disolvente correspondiente (0,5 ml). Las disoluciones se transfirieron a tubos-muestra de ultraprecisión de 5 mm de diámetro exterior. Algunas series de disoluciones antibiótico-ribosomas se obtuvieron por diluciones sucesivas de una disolución madre

o por diluciones de partes alicuotas de una disolución patrón.

Las muestras empleadas en la obtención de tiempos de relajación fueron cuidadosamente desgasificadas a vacío por medio de sucesivas (generalmente 4 ó 5) congelaciones y descongelaciones con aire líquido, cerrándose a continuación el tubo a la llama. Este proceso va dirigido a eliminar la presencia de oxígeno disuelto, que es paramagnético, e introduce un mecanismo adicional de relajación.

II.1.2.- Preparación de ribosomas de E. coli.

La preparación de ribosomas de E. coli se llevó a cabo en el Instituto de Biología Celular utilizando las técnicas y productos existentes en dicho Instituto dirigidas a este fin. En cuanto al crecimiento de la bacteria, se empleó la cepa D10 (25), que carece de ribonucleasa I, lo que evita daños innecesarios al RNA ribosómico. La composición del medio de cultivo en el que se creció la bacteria fue: bactotripton, 10 gr; ClNa, 8 gr; extracto de levadura, 1 gr y glucosa, 2 gr. Todo ello para 1 litro de volumen final (26). Las bacterias se crecieron a 37°C en 2 fermentadores de 20 litros provistos de aireación y agitación. El crecimiento se detuvo en fase logarítmica ($A_{660 \text{ nm}} = 1$) añadiendo anhídrido carbónico sólido. Una vez enfriadas a 0-4°C se recogieron mediante centrifugación en flujo continuo, siendo lavadas en una disolución amortiguadora. Inmediatamente después se congelaron mediante una mezcla de nieve carbónica y acetona, y se almacenaron

a -20°C por un período máximo de 3 meses a lo largo del cual conservan intacta su actividad.

Las células almacenadas a -20°C se homogeneizaron en un mortero frente a alúmina (relación 1:2) hasta que, la parte de células y alúmina alcanzó una gran consistencia, indicación de que el DNA celular había salido al medio. Entonces se añadió, en proporción, 4:1 (volumen/peso de células) la disolución amortiguadora siguiente: TRIS (10 mM), acetato magnésico (10 mM), cloruro amónico (60 mM), β -mercapto-etanol (0,6 mM). Se centrifugó dos veces: la primera a 10.000 g durante cinco minutos para eliminar la alúmina y los restos de células más groseros y la segunda durante 30 minutos a 20.000 g.

La etapa siguiente consistió en sedimentar los ribosomas por centrifugación a 150.000 g durante 2 1/2 horas. Estos ribosomas presentaban un alto grado de contaminación proteica, tanto inespecífica, como de factores asociados a las distintas etapas de la síntesis de proteínas, así como de mRNA.

Para su purificación, los ribosomas fueron resuspendidos en una disolución amortiguadora de alta concentración en amonio (TRIS (20 mM), acetato magnésico (40 mM), cloruro amónico (1M) y 2-mercapto-etanol 5 mM (6 mM)) y centrifugados a través de un gradiente discontinuo de sacarosa al 20 y 40 % en la disolución anterior durante toda la noche a 150.000 g. Después de repetir tres veces esta operación, el sedimento de ribosomas aparecía com-

pletamente transparente y fue resuspendido en la mínima cantidad posible de la disolución anterior y almacenado en pequeñas porciones a -20°C . Tras la resuspensión de los ribosomas, estos fueron sometidos a un proceso de clarificado (20 minutos a 30.000 g) con objeto de eliminar agregados. La relación A_{260}/A_{280} , que puede tomarse como índice de pureza respecto a contaminación proteica inespecífica, fue 2,02 en los ribosomas lavados. Cuando esta relación era inferior a 2,02 se consideraba que los ribosomas no estaban suficientemente lavados.

Las concentraciones de ribosomas se determinaron por medida de la absorción a una longitud de onda de 260 nm (45 unidades corresponden a una disolución 10^{-6} M equivalente a 2,65 mg/ml (p.m. $2,65 \cdot 10^6$ gr)).

La actividad de los ribosomas se comprobó mediante dos tipos de ensayo: el de síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico (27) y el de fijación de ^{14}C -cloramfenicol (27). Para la realización de ambos ensayos se utilizaron las técnicas y productos existentes en el Instituto de Biología Celular.

En el primer ensayo, se utilizó una disolución de ribosomas (1,5 mg/ml), poli U (0,1 mg/ml), ^{14}C -Fen- t RNA (6,5 p moles), GTP (1,25 mM), cloruro magnésico (12 mM) y factores del sobrenadante a 1/10 del volúmen total, que fue de 0,1 ml. Las incubaciones se realizaron durante 30 minutos a 37°C y se detuvieron por adición de 2 ml de ácido tricloroacético frío al 5%. Previamente han de añá-

dirse 5 microgramos de albúmina bovina, que actúa como coadyunante en la precipitación proteínica. Antes de filtrar este precipitado es necesario hidrolizar el aminoacil-^tRNA que no haya reaccionado para lo que se calienta el sistema a 90°C durante 15 minutos. Tras enfriar, se filtra el precipitado a través de filtros Whatman GF/C en los que se estima la radiactividad retenida en un espectrómetro de centelleo líquido. La preparación del ¹⁴C-Fenilalanina-^tRNA y de los factores del sobrenadante puede verse en (27).

En el segundo ensayo, se determinó por contaje radiactivo la cantidad de ¹⁴C-cloramfenicol libre y ligado a los ribosomas, una vez separados éstos por ultracentrifugación. Las disoluciones fueron $2,5 \cdot 10^{-6}$ M de ribosomas, $1,0 \cdot 10^{-6}$ M de ¹⁴C-cloramfenicol en una disolución amortiguadora de TRIS-ClH (33 mM), cloruro magnésico (13 mM) y cloruro potásico (270 mM), todo ello en un volumen final de 0,1 ml, del que se tomaron porciones de 0,025 ml para estimación de radiactividad, antes y después de la centrifugación. Esta se llevó a cabo a 38.000 r.p.m. durante dos horas.

Una vez comprobada su actividad, los ribosomas se liofilizaron a -40°C y 5 a 50 μ de presión, durante el tiempo requerido, en un liofilizador tipo Virfis, modelo 10-145 MRBA. Las muestras fueron previamente congeladas en una disolución de acetona y anhídrido carbónico sólido. El liofilizado se recogió y resuspendió en la mínima can-

1

tividad de disolución amortiguadora en D₂O (99,75%), disolución de donde se tomaron las porciones necesarias para formar las disoluciones que habrían de estudiarse por RMN.

II.1.3.- Espectrómetro.

El espectrómetro utilizado en este trabajo es un espectrómetro de alta resolución, BRUKER HX-90E, de campo magnético constante de 21 Kgauss, que corresponde a frecuencias de resonancia de 90 MHz para ¹H, 22,63 MHz para ¹³C y 13,8 MHz para ²D.

Los espectros de ¹H y ¹³C se han obtenido en la modalidad FT (transformación Fourier), en las condiciones que se describen más adelante. Para operar en esta modalidad el espectrómetro dispone de un miniordenador en línea, NICOLET BNC-12, con 24 K de capacidad de memoria (8K para programas y 16K para datos) y una unidad de cintas, KENNEDY 3110, con capacidad de almacenamiento de hasta 512 registros de 4K. La longitud de la palabra de ordenador es de 20 bits, lo que determina la resolución digital de la entrada de una señal variable, pudiendo reducirse aquella para pasar a ser de 12, 10, 8 ó 6 bits. Esta reducción en el número de bits de la palabra, con su consiguiente pérdida de precisión en la medida de la señal de entrada, puede ser conveniente en ciertos casos para poder aumentar el número de barridos. El caso típico en que ello sucede y que se presenta con carácter general en todas las muestras medidas consiste en la presencia de una

línea muy intensa (la de los protones del H-O-D) junto con otras señales de pequeña intensidad. La reducción en el número de bits de la palabra puede controlarse mediante programa, de forma que cuando la palabra está próxima a saturarse (15/16 de su contenido) el ordenador pasa automáticamente a una resolución digital inferior, a la vez que divide el contenido de la palabra por 4, para que la adición de datos sea coherente.

La capacidad máxima horizontal de memoria, o número de puntos, es como se ha dicho, de 16K. Naturalmente, puede operarse con menos puntos, con lo que se consigue un ahorro en el tiempo del experimento, pero a costa de una pérdida de resolución. La anchura de barrido en Hz, o intervalo de frecuencias que se desea observar del espectro, se da como entrada al ordenador mediante un teletipo. Para ello, se le define el intervalo de tiempo que ha de tardar en adquirir información entre dos puntos consecutivos de memoria. Asimismo, y mediante el teletipo, se definen al ordenador los tiempos de espera entre acumulaciones, órdenes de disparo de las unidades de pulsos, desacoplamiento, etc..

La frecuencia donde ha de darse el pulso de radiofrecuencias, que viene a definir un extremo del intervalo espectral que se desea observar, puede modificarse convenientemente mediante un cursor variable y su valor constatarse en el contador de frecuencias. Lo mismo puede hacerse para la frecuencia correspondiente al canal de desacoplamiento.

Además del canal analítico, o de observación y del canal de doble irradiación, existe otro, el de bloqueo ("lock") interno cuyo objetivo es el de mantener una relación fija campo/frecuencia. Mediante el bloqueo interno, pueden corregirse pequeñas variaciones del campo magnético sin que quede afectada la posición relativa de las líneas de resonancia. Para ello ha de centrarse la frecuencia de "bloqueo" sobre una señal de resonancia de la propia muestra. Con objeto de no perturbar la observación del ^1H o del ^{13}C , se utiliza con este propósito la señal de ^2D del disolvente, por lo que la frecuencia de bloqueo corresponde a la de resonancia de este núcleo. La potencia de esta fuente se gradua de tal manera que se consiga un nivel máximo de la señal sin que llegue a producir efectos de saturación.

El canal de desacoplamiento de protón puede utilizarse en experimentos de homo- y hetero-doble irradiación. En el primer caso, para la realización del experimento, basta seleccionar la posición de la frecuencia a la que se desea irradiar y la potencia necesaria para conseguir el efecto deseado. En el caso hetero-nuclear, cuyo ejemplo más corriente es la obtención de espectros de ^{13}C con desacoplamiento total de ^1H , se utiliza la modalidad de desacoplamiento de banda ancha y la potencia de salida se gradua de forma que oscile entre 10 y 20 vatios.

El espectrómetro dispone de una unidad de dos pulsos conectada al ordenador, y gobernada por él, que se

utiliza para la medida de tiempos de relajación. Asimismo, dispone de una unidad generadora de pulsos, hasta un máximo de 4, para experimentos de multipulsos más sofisticados.

La temperatura de la sonda puede variarse y controlarse convenientemente entre -150°C y 200°C .

II.1.4.- Obtención de espectros.

Los espectros de protón se obtuvieron en general, con las siguientes condiciones:

El pulso de radiofrecuencias se aplicó en la zona de bajo campo en una posición suficientemente alejada de la referencia para no tener problemas de doblado de señales. Las anchuras de barridos fueron normalmente de 900 Hz, excepto en aquellos casos en los que el intervalo de frecuencias del espectro fuese mayor. La duración o anchura del pulso de radiofrecuencias estaba normalmente comprendida entre 3 y 5 microsegundos, seleccionándose en cada caso el valor que mostraba una respuesta máxima, para el estado estacionario que se alcanza después de un cierto número de pulsos. Excepto cuando se especifique lo contrario, la temperatura de operación normal fue la de la sonda, que es de 26°C . El número de barridos utilizado se fijó de acuerdo con la concentración de la muestra, variando entre 10 y 10.000. El número de posiciones de memoria para la adquisición de datos fue también variable (normalmente 8K ó 4K) atendiendo siempre al interés concreto en el compromiso resolución-tiempo de experimento.

Los espectros de ^{13}C se obtuvieron de modo análogo a los de ^1H , con las siguientes particularidades:

La base de trabajo en espectroscopía de ^{13}C son los espectros con desplazamiento total de protones. Con ello se consigue aumentar la relación señal/ruido de los espectros, que de por sí es muy baja debido a la pequeña abundancia natural de ese núcleo y al hecho de que su relación giromagnética es también pequeña. Al irradiar la banda del protón se consigue hacer coalescer los multipletes debidos a acoplamientos con este núcleo en una sola señal, obteniéndose además un incremento de la señal debido al efecto Overhauser nuclear. Aun en estas condiciones, el número de barridos necesarios para conseguir una aceptable relación señal/ruido suele ser muy elevado, lo que unido al hecho de que el tiempo de repetición de pulsos ha de ser grande debido a los tiempos de relajación T_1 relativamente largos de este núcleo, hace que los tiempos de experimento sean, en muchos casos, extremadamente grandes (del orden de días).

En la mayor parte de los espectros de ^{13}C , el interferograma o FID se multiplicó por una exponencial al objeto de mejorar la relación señal/ruido, aun a costa de producir un ensanchamiento de las señales, lo que no presenta inconvenientes graves, debido al gran intervalo de desplazamientos químicos que muestran los núcleos de ^{13}C . Debido a esta razón, las anchuras de barrido utilizadas fueron de 4.500-6.000 Hz, mucho mayores que en el caso de ^1H .

El desacoplamiento puenteado ("gated decoupling") es una modalidad de trabajo en espectroscopía de ^{13}C que permite obtener el espectro con los acoplamientos de ^1H , conservando el incremento de intensidad proporcionada por el NOE. Ello permite observar el tipo de desdoblamiento que muestra cada señal de ^{13}C , lo que sirve para determinar el número de ^1H directamente unidos a dicho núcleo, así como medir las constantes de acoplamiento $J_{\text{C-H}}$. El experimento consiste en irradiar la muestra con la fuente de protón durante un cierto tiempo (2 seg) desconectarla, y comenzar la adquisición poco después (0,1 seg). En general, es necesario que la relación tiempo de desacoplamiento a tiempo total por barrido no sea mayor que a 2/3. El fundamento físico del experimento reside en el hecho de que la relajación de la perturbación de poblaciones origen del NOE es más lenta (del orden de la cinética de relajación) que la correspondiente a la perturbación de niveles introducida por la fuente de protones.

Los espectros a distintas temperaturas se registraron con ayuda del equipo de temperatura variable incorporado al instrumento. La temperatura nominal del medidor se calibró en todos los casos frente al termómetro de metanol-agua (28). La precisión en la medida de las temperaturas puede evaluarse en $\pm 1^\circ\text{C}$.

II.1.5.- Medida de tiempos de relajación.

La medida de los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , de los núcleos de ^1H y ^{13}C se ha llevado a cabo

utilizando dos métodos de pulsos, el de la secuencia $180^\circ-\tau-90^\circ$. y el de la secuencia $90^\circ-\tau-90^\circ$. El primero de ellos se ha utilizado en la medida de tiempos de relajación relativamente pequeños (<2 seg) y el segundo para tiempos de relajación más grandes.

El método que utiliza la secuencia $180^\circ-\tau-90^\circ$, consiste en invertir la magnetización mediante un pulso correspondiente a 180° , dejar un intervalo de tiempo variable para cada punto, τ_i , permitiendo que la magnetización relaje hacia su valor de equilibrio, y, por último, obtener el valor de la magnetización remanente, para lo que se aplica un nuevo pulso de 90° , midiendo a continuación la FID resultante. Se permite, entonces, que el sistema retorne al equilibrio esperando al menos unas 5 veces el valor de T_1 ($T=5T_1$, $M_z=0.993 M_0$) y se vuelve a repetir la secuencia $180^\circ-\tau_i-90^\circ$ para un valor distinto de τ_i , con lo que puede determinarse la velocidad con que tiene lugar el proceso de vuelta al valor de equilibrio de M_z .

Cuantitativamente, la variación de M_z viene dada por la ecuación de Bloch correspondiente:

$$\frac{dM_z}{dt} = - \frac{(M_z - M_0)}{T_1} \quad \{\text{II.1.5.1}\}$$

cuya integración con $M_z=M_0$ para $t=0$ proporciona:

$$M_z = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1})$$

que puede ponerse:

$$\ln(A_{\infty} - A_{\tau}) = \ln(2A_{\infty}) - \frac{\tau}{T_1} \quad \{\text{II.1.5.2}\}$$

donde A_{τ} es la amplitud inicial de la FID que sigue al pulso de 90° en la medida correspondiente al tiempo τ y A_{∞} es el valor límite de A_{τ} cuando τ es muy grande. Al realizar la transformación Fourier de la correspondiente FID se obtienen las señales de los distintos núcleos de la muestra con unas alturas que pueden considerarse como proporcionales al valor de A_{τ} . Los valores de T_1 para cada señal se determinan a partir de las pendientes de las rectas que se obtienen al representar los $\ln(A_{\infty} - A_{\tau})$ frente a τ , en donde se toman como los valores de A las alturas de las señales correspondientes.

El método que utiliza la secuencia $90^{\circ}-\tau-90^{\circ}$ es aplicable cuando $T_1 \gg T_2$, es decir, cuando la magnetización creada en el plano xy por un pulso de 90° decae a su valor de equilibrio, que es igual a cero, mucho más rápidamente que M_z alcanza su valor de equilibrio, M_0 . Un segundo pulso de 90° permite medir el valor que M_z ha alcanzado en el tiempo τ . Si la muestra se somete a una serie de pulsos de 90° separados por un intervalo de tiempo τ , M alcanza rápidamente un estado de equilibrio que depende de τ y T_1 . El valor de la señal en el estado de equilibrio se mide y la secuencia $90-\tau-90-\tau-90-\tau\dots$, se repite para diferentes valores de τ .

La condición inicial para la integración de la ecuación {II.1.5.1} es ahora $M_z = 0$ para $t=0$, con lo que

$$M_z = M_o (1 - e^{-\tau/T_1})$$

o bien

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln(A_\infty) - \tau/T_1$$

De este modo, una representación de $\ln(A_\infty - A_\tau)$ frente a τ es una línea recta cuya pendiente proporciona T_1 . Como en el caso anterior, al transformar la FID y obtenerse el espectro de frecuencias, se obtienen las señales correspondientes a los distintos núcleos, realizándose una representación gráfica para cada una de ellas, en las que A_τ se identifica con su altura.

Mediante este método y cuando los tiempos de relajación T_1 son grandes, puede conseguirse un ahorro de tiempo de experimentación considerable, ya que se elude el tiempo de espera de $5T_1$ del caso anterior. Sin embargo, y como se ha dicho, el método está limitado al caso de que $T_2 \ll T_1$.

II.2. Espectros de ^1H de puromicina. Resultados

II.2.1.- Asignación y análisis de espectros.

El espectro de RMN del ^1H , a 90 MHz, del dihidrocloruro de puromicina disuelto en D_2O , a concentración 0,18 M (pH=2,5) y a temperatura de 26°C puede verse en la figura 4. La referencia interna es DSS. Los singletes a 8,51 y 8,37 ppm corresponden, respectivamente, a los protones H8 y H2 de la di-Me-adenosina (29). El sistema AA'BB' con centro en 7,1 ppm es debido a los protones aromáticos de la O-Me-tirosina. El doblete con centro en 6,07 ppm ($J=2,5$ Hz) es el correspondiente al protón anómero H1'. A alto campo de la señal de H-O-D (4,79 ppm) se sitúan las restantes resonancias protónicas. La señal fina e intensa (correspondiente a 3 protones) a δ 3,82 es la debida al grupo OMe de la O-Me-tirosina, y la señal ancha (~ 20 Hz) con centro en $\sim 3,6$ ppm, correspondiente a 6 protones, ha de asignarse a los del grupo N-di-metilo de la N-diMe-adenina. La señal del protón H2' (doblete de dobletes) está situada a δ 4,77 y está parcialmente oculta por la señal de agua. Esta señal se observa claramente al variar la temperatura y desplazarse consecuentemente la señal del disolvente. A δ 4,56 está centrado un doblete de dobletes que se asigna fácilmente al protón H3', y a δ 4,37 se observa la parte X de un sistema ABX, que corresponde al protón H_α de la OMe-tirosina. En la subida de la señal ancha de los protones del grupo N-di-Me se observa un multiplete complejo compuesto de ocho líneas con centro en δ 3,90 que corres-

ponde al protón H4'. Centrado en δ 3,55 el espectro muestra la parte AB de un sistema ABX que ha de asignarse a los protones H5'_h y H5'_l y, por último, centrado en δ 3,16 se observa un sistema similar asignable a los protones H _{β h} y H _{β l} del resto O-Me-tirosina.

La asignación de señales a protones concretos descrita anteriormente está basada en la comparación de los desplazamientos químicos observados con los de moléculas análogas, en la observación de patrones de desdoblamiento que son de esperar por cada protón, en la correspondencia entre desdoblamientos observados entre las diferentes señales y en las conclusiones obtenidas de experimentos de doble resonancia. El espectro de la puromicina habría sido estudiado previamente por JARDETZKY (30) y por JOHNSON y BHACCA (31). Nuestra asignación confirma la realizada por estos últimos autores.

Para obtener valores más precisos de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los sistemas H2'-H3'-H4'-H5'_l-H5'_h y H _{α} -H_l-H_h es necesario llevar a cabo un análisis completo de las correspondientes zonas espectrales utilizando el programa de cálculo LAOCN 3 (32). Ello se realizó para los espectros correspondientes a las temperaturas 26°C y 91°C, y los resultados se dan en la Tabla 1. Los errores máximos son $\pm 0,02$ ppm en los desplazamientos químicos y $\pm 0,2$ Hz en las constantes de acoplamiento.

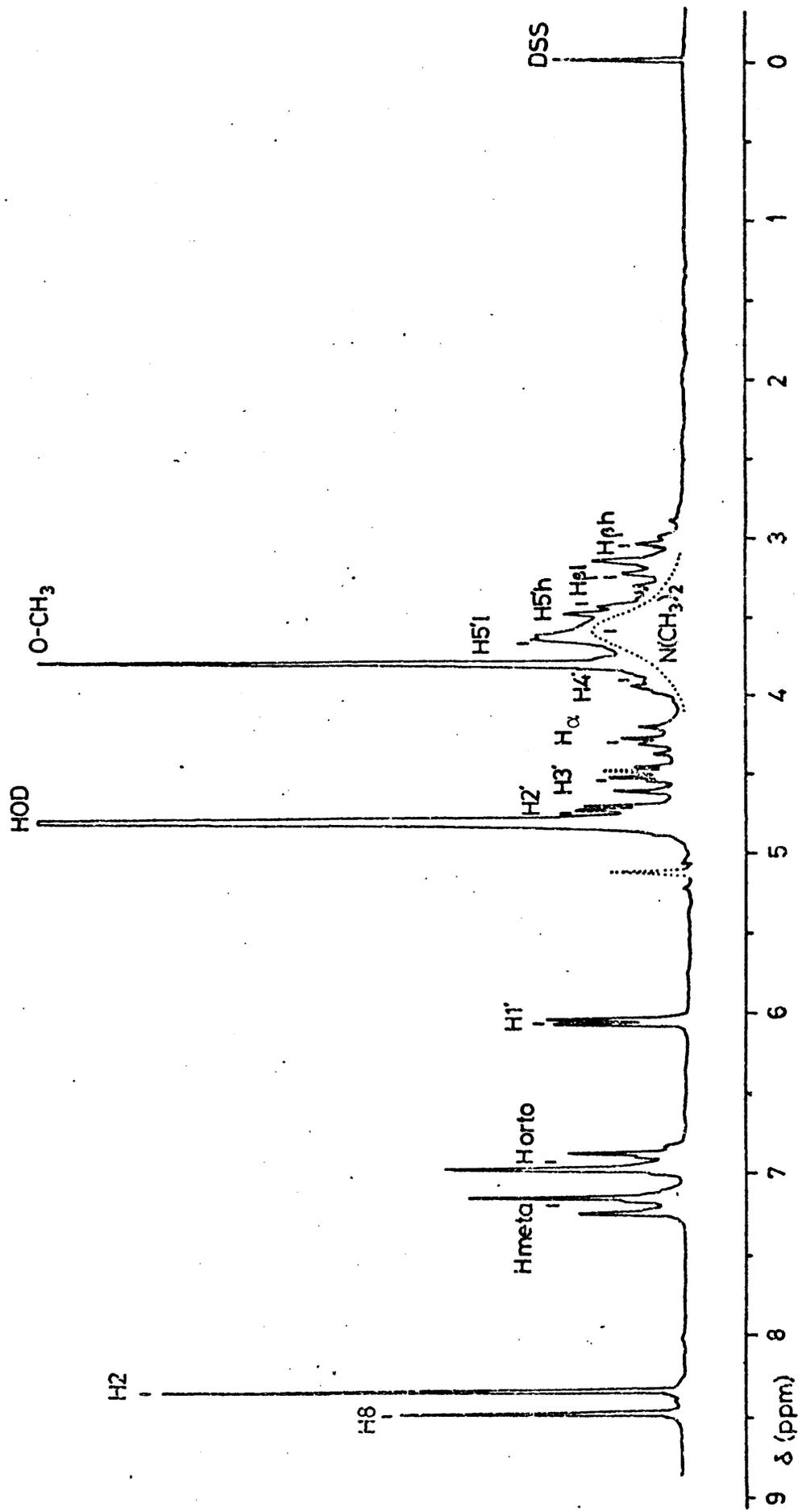


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H , a 90 MHz, del dihidrocloruro de puromicina, 0,13 M en D_2O , a 26°C .

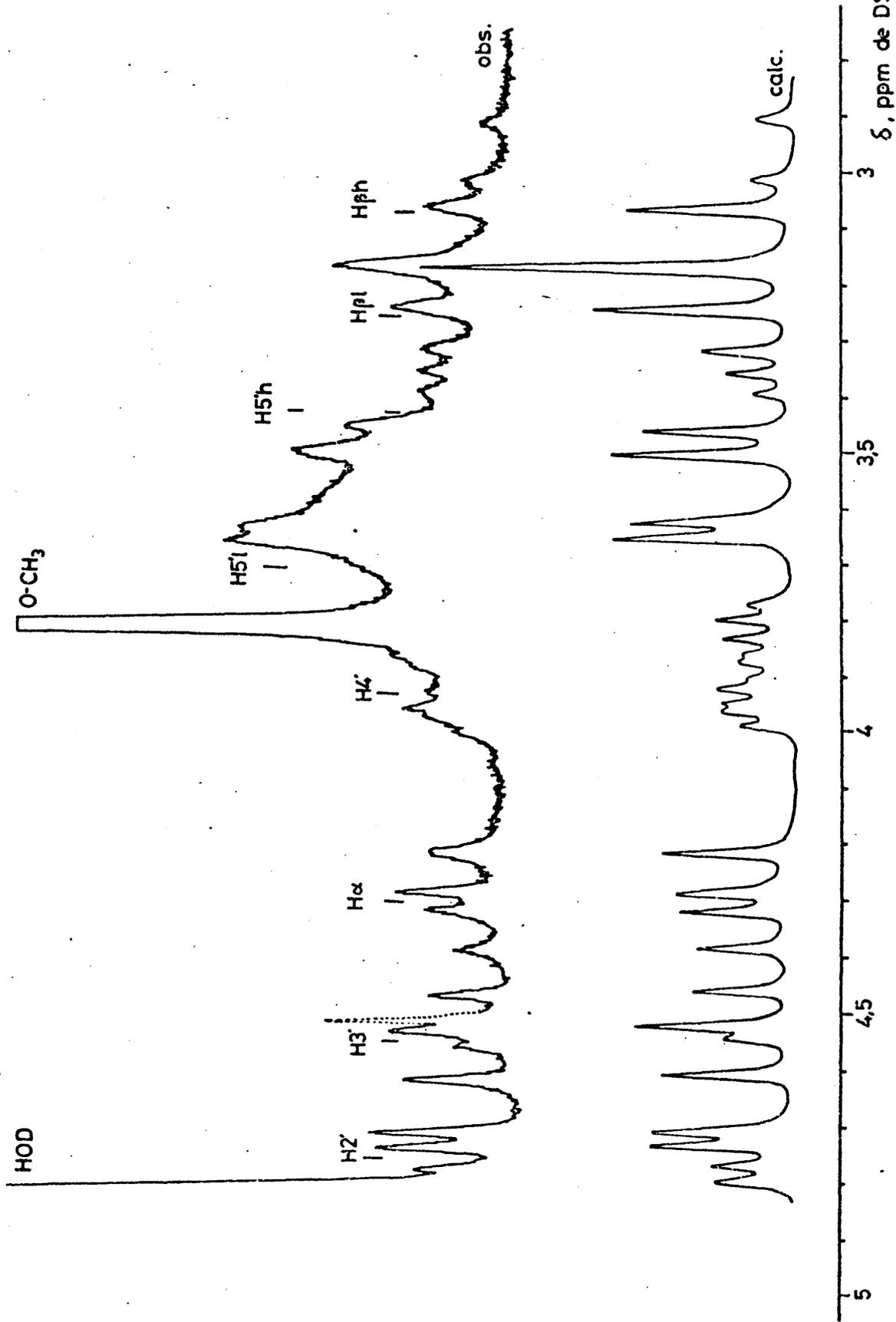


Figura 5. Espectros calculado y observado de la zona δ 2,5-5 del dihidrocloruro de puromicina, a 26°C.

En la figura 5 se compara el espectro observado con el calculado a partir de los parámetros resultantes del análisis para el dihidrocloruro de puromicina a 26°C. El espectro calculado no incluye la señal ancha con centro en $\delta \sim 3,6$ de los protones del grupo N-diMe. Las correcciones que el análisis completo introduce para las constantes de acoplamiento respecto a las evaluadas por medidas de desdoblamiento son menores que el error experimental de medida en espectros generales (15 Hz/cm). Por ello, consideraremos válidos los valores de desdoblamiento medidos sobre los espectros a distintas condiciones de concentración, temperatura, pH, etc..

II.2.2.- Variación con la temperatura.

Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de las señales del espectro de RMN del dihidrocloruro de puromicina (pH=2,5), 0,18 M en D₂O, muestran ligeras variaciones cuando se observan los espectros a distintas temperaturas. La mayor variación observada es la que muestra la anchura de la señal con centro en $\delta 3,6$, correspondiente al grupo N-diMe de la N-di-Me-adenina.

En la Tabla 2 se han resumido las medidas de desplazamientos químicos efectuadas en el intervalo 26°C-91°C. En dicha Tabla se incluyen también las anchuras de la señal del grupo N-diMe. Asimismo, se incluyen en esa Tabla los resultados de los ajustes por mínimos cuadrados efectuados suponiendo, en el intervalo considerado, una dependencia lineal de los desplazamientos químicos respecto a la tem-

TABLA 1

Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento resultantes del análisis realizado con el programa LAOCN 3 para los sistemas H2'-H3'-H4'-H5'₁-H5'_h y H_α-H_{β1}-H_{βh} del dihidrocloruro de puromicina

	26°C	90°C
Sistema H2'-H3'-H4'-H5' ₁ -H5' _h		
Desplazamientos químicos (δ, ppm; ±0,02)		
H2'	4.77	4.81
H3'	4.56	4.58
H4'	3.90	3.98
H5' _h	3.42	3.56
H5' ₁	3.69	3.77
Constantes de acoplamiento (J, Hz; ±0,2)		
2'3'	5.8	6.1
3'4'	8.1	7.6
4'5' ₁	2.4	2.5
4'5' _h	3.9	4.5
5' _a 5' _b	-12.8	-13.2
Sistema H _α -H _{β1} -H _{βh}		
Desplazamientos químicos (δ, ppm; ±0,02)		
H _α	4.31	4.38
H _{βh}	3.07	3.15
H _{β1}	3.26	3.32
Constantes de acoplamiento (J, Hz; ±0,2)		
H _α H _{βh}	9.5	8.8
H _α H _{β1}	6.4	6.3
H _{β1} H _{βh}	-13.6	-13.7

peratura. Las columnas C_T y $\delta_{calc}^{26^\circ C}$ se refieren, respectivamente, al coeficiente de variación con la temperatura (ppm/grado) y al desplazamiento químico corregido a $26^\circ C$. Las columnas que siguen a cada una de las anteriores recogen el error probable de estos parámetros.

En la Tabla 3 se han reunido las medidas de constantes de acoplamiento efectuadas en el intervalo de temperatura $26^\circ C$ - $91^\circ C$ y, análogamente, los resultados de un ajuste por mínimos cuadrados.

La variación de anchura que muestra la señal del grupo N-diMe es fácilmente interpretable, en términos de una rotación impedida en torno al enlace C6-N6, de la N-di-Metil-adenina. Cuando ésta está protonada (en N1) y, análogamente, a lo que sucede con los protones del grupo CH_3 en la N-di-Me-adenina (33), debe aumentar el carácter de doble enlace de la unión C6-N6, con lo que la rotación interna en torno a ella se hace más difícil, encontrándose dicha cinética en la región de intercambio intermedio. Al aumentar la temperatura, la cinética crece y la anchura de la línea disminuye (véase {I.3.11} de I.3.1).

A partir de la variación de la anchura de esta señal con la temperatura y, utilizando las ecuaciones de Gutowsky y Holm (34) es posible obtener los parámetros de activación correspondientes al proceso de rotación impedida del grupo N-di-Me. Dichos parámetros son: $E_A=14,0$ Kcal/mol, $\log A=12,2$; $\Delta G_{299}^\ddagger=14,8$ Kcal/mol, $\Delta H_{299}^\ddagger=13,5$ Kcal/mol y $\Delta S_{299}^\ddagger=-4,4$ u.e., que concuerdan satisfactoriamente con los obte-

nidos por Pitner (35) para la 6-N-dimetil-adenina monodeuterada ($E_a=13,8$ Kcal/mol, $\log A=12,0$; $\Delta G_{295}^\ddagger=14,9$ Kcal/mol, $\Delta H_{295}^\ddagger=14,9$ Kcal/mol y $\Delta S_{295}^\ddagger=-5,8$ u.e.).

La variación de los desplazamientos químicos de las señales protónicas del dihidrocloruro de puromicina con la temperatura, que vienen expresadas cuantitativamente por el coeficiente C_T , son muy pequeñas. Comparense, por ejemplo, el mayor coeficiente observado, el de $H5'_h$ ($C_T=2,5 \cdot 10^{-3}$), con el que muestra la señal residual de HOD, que es de $9,7 \cdot 10^{-3}$. Es interesante señalar la notable diferencia entre los coeficientes de los protones $H5'_h$ y $H5'_l$, siendo el de éste último protón de sólo $0,9 \cdot 10^{-3}$. Otro de los grupos que muestran una mayor dependencia relativa de los desplazamientos químicos es el grupo aromático, y sus correspondientes coeficientes son, para los H_{meta} , $C_T=1,5 \cdot 10^{-3}$ y, para los H_{orto} , $C_T=1,7 \cdot 10^{-3}$. Por último, también destacan en este aspecto los protones unidos a los carbonos α y β del resto O-Me-tirosinil. Es importante señalar que todos los coeficientes son positivos, es decir, que, en todos los casos, los desplazamientos químicos se corren hacia bajo campo al aumentar la temperatura.

La variación que muestran las constantes de acoplamiento con la temperatura es también muy pequeña. De hecho, para la precisión con que estas se han medido, sólo las constantes $J_{4,5'_h}$ y la $J_{\alpha\beta h}$ muestran variaciones significativas. El coeficiente de la primera es $8 \cdot 10^{-3}$ y el de la segunda $-13 \cdot 10^{-3}$ Hz/grado. Es interesante señalar el signo diferente que muestran estos dos coeficientes.

TABLA 2

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS, $\pm 0,02$) de los protones del dihidrocloruro de puromicina (0,18M en D₂O, pH=2,5) a distintas temperaturas y resultados del ajuste lineal por mínimos cuadrados

$\delta \backslash T(^{\circ}C)$	26	31	37	43	54	65	78	90	$C_T \cdot 10^4$ ppm/ $^{\circ}C$	σ_c^b	$\delta_{26^{\circ}C}$ calc	σ_{δ}^b
H2	8,36	8,37	8,38	8,39	8,40	8,42	8,43	8,43	11	1	8,372	5
H8	8,51	8,50	8,50	8,51	8,51	8,51	8,51	8,49	-2	1	8,514	6
N(CH ₃) ₂ : δ	3,6	3,6	3,6	3,6	3,64	3,64	3,66	3,66	7	1	3,621	5
N(CH ₃) ₂ : w ^{a)}	21	18	12	9	5	2	1	1	-	-	-	-
H1'	6,08	6,07	6,08	6,09	6,09	6,10	6,10	6,10	4	1	6,081	4
H2'	4,76	-	4,79	4,79	4,79	4,82	4,81	4,82	10	2	4,770	9
H3'	4,56	4,55	4,56	4,57	-	4,59	4,59	4,59	7	1	4,559	6
H4'	3,90	3,91	3,91	3,92	3,93	3,95	3,99	3,98	14	2	3,902	9
H5' _h	3,42	3,43	3,44	3,46	3,48	3,53	3,55	3,57	25	2	3,423	14
H5' _l	3,70	3,69	3,69	3,70	3,72	3,74	3,75	3,75	9	2	3,692	13
H _{α}	4,30	4,31	4,32	4,33	4,35	4,36	4,38	4,39	14	1	4,309	4
H _{βh}	3,07	3,08	3,08	3,09	3,11	3,13	3,16	3,17	17	2	3,069	4
H _{βl}	3,25	3,26	3,26	3,28	3,28	3,31	3,31	3,33	13	1	3,256	9
H _{meta}	7,21	7,20	7,21	7,23	7,24	7,27	7,28	7,29	15	2	7,208	9
H _{orto}	6,95	6,95	6,97	7,00	7,00	7,02	7,04	7,06	17	2	6,957	10
OCH ₃	3,82	3,81	3,83	3,83	3,84	3,84	3,86	3,86	7	1	3,822	5

- a) w: Anchura en Hz a mitad de altura de la señal -N(CH₃)₂.
- b) Errores probables en la última cifra significativa.

TABLA 3

Constantes de acoplamiento (J,Hz; $\pm 0,05$) entre los protones del dihidrocloruro de puromicina (0,18 M en D₂O, pH = 2,5) a distintas temperaturas y resultados del ajuste lineal por mínimos cuadrados.

J \ T(°C)	26	31	37	43	54	65	78	90	$C_T \cdot 10^3$ Hz/°C	$\sigma_c \cdot 10^3$	J_{26}^3	σ_J
1'2'	2,4	2,6	2,8	2,6	2,6	2,8	2,7	2,7	4	2	2,5	0,1
2'3'	5,9	5,9	6,3	6,2	6,0	6,2	6,0	6,2	3	2	6,0	0,1
3'4'	8,0	7,9	8,0	7,8	-	8,1	7,8	7,6	- 4	2	8,0	0,1
4'5' _h	4,1	4,0	3,9	4,1	4,3	4,4	4,6	4,4	8	3	4,0	0,1
4'5' _l	2,3	2,4	2,2	2,4	2,6	2,8	2,4	2,4	4	2	2,3	0,1
$\alpha\beta_h$	9,5	9,5	9,4	9,2	9,4	9,0	9,0	8,6	-13	2	9,5	0,1
$\alpha\beta_l$	6,4	6,6	6,3	6,4	6,3	6,1	6,4	6,4	- 1	2	6,4	0,1
$\alpha l\beta_h$	13,5	-13,7	-13,9	-13,8	-13,5	-13,4	-13,8	-13,6	- 1	2	-13,6	0,1
om	8,7	8,5	8,4	8,4	8,4	8,8			3	2	8,5	1

TABLA 5

Constantes de acoplamiento (J,Hz; $\pm 0,05$) entre los protones de la puromicina ($1,4 \cdot 10^{-2}$ M en D₂O, pH=10,5) a distintas temperaturas.

J \ T(°C)	31	43	55	66	76	J _{media}
1'2'	3,1	3,1	3,3	3,3	3,0	3,2
2'3'	6,0	6,0	-	5,7	6,3	6,0
3'4'	7,5	7,5	-	-	-	7,5
4'5' _h	4,2	4,2	3,6	3,6	-	3,9
4'5' _l	2,7	2,7	1,8	2,1	2,7	2,4
$\alpha\beta_h$	9,0	9,3	9,0	8,4	8,2	8,8
$\alpha\beta_l$	6,1	5,8	6,3	6,0	6,0	6,0
$\alpha l\beta_h$	-13,0	-13,4	-	-13,2	-	-13,2
om	8,1	8,7	8,5	8,7	9,0	8,6

TABLA 4

Desplazamientos químicos (δ , a partir de DSS, $\pm 0,02$) de puromicina ($1,4 \cdot 10^{-2}$ M en D_2O , pH = 10,5) a distintas temperaturas y resultados del ajuste lineal por mínimos cuadrados.

$\delta \backslash T(^{\circ}C)$	31	43	55	66	76	$C_T \cdot 10^4$ ppm/ $^{\circ}C$	σ_c^a	$\delta_{calc}^{26^{\circ}C}$	σ_c
H2	8,02	8,08	8,12	8,14	8,16	30	4	7,940	22
H8	8,14	8,17	8,18	8,18	8,18	8	3	8,126	17
$N(CH_3)_2$	3,30	3,34	3,36	3,39	3,39	21	3	3,245	17
H1'	5,79	5,83	5,88	5,90	5,93	31	2	5,698	12
H2'	4,60	--	--	4,65	4,67	15	1	4,552	6
H3'	4,33	4,37	--	--	--	-	-	--	-
H4'	3,83	3,84	3,87	--	--	17	5	3,775	21
H5' _h	3,35	3,39	3,42	3,46	3,45	24	4	3,283	24
H5' _l	3,65	3,66	3,68	3,69	3,70	12	1	3,614	4
H $_{\alpha}$	3,68	3,70	3,70	3,71	3,70	5	2	3,673	13
H $_{\beta l}$	2,96	2,98	2,95	2,98	2,96	0	4	2,966	24
H $_{\beta h}$	2,72	2,74	2,77	2,82	2,81	32	4	2,647	23
H $_{meta}$	7,15	7,19	7,19	7,20	7,21	12	3	7,125	18
H $_{orto}$	6,92	6,94	6,95	6,96	6,97	11	1	6,890	5
OCH $_3$	3,78	3,80	3,80	3,81	3,80	5	2	3,773	13

a) Errores probables en la última cifra significativa.

En las Tablas 4 y 5 se dan datos análogos a los dados en las Tablas 2 y 3, obtenidos a pH=10,5. No se observa en este caso ninguna variación en la anchura de la señal correspondiente al grupo $-N(CH_3)_2$, confirmando que la rotación impedida de este grupo sólo tiene lugar cuando la base está protonada. Naturalmente, los desplazamientos químicos de, prácticamente, todas las señales muestran corrimientos debidos al cambio del estado de ionización de la molécula, que se comentarán en otro lugar. Las variaciones que los desplazamientos químicos muestran frente a la temperatura a este pH son más acusadas en los protones H2, $N(CH_3)_2$ y H1', que son precisamente los más afectados por la asociación por "apilamiento", que debe favorecerse al desaparecer la carga positiva de la base. La variación mostrada por los protones H_α , $H_{\beta 1}$ y $H_{\beta h}$ a este pH, difiere también de la que presentan a pH 2,5. Estas variaciones deben adscribirse al cambio en el estado de ionización del grupo $-NH_2$ y a sus efectos de largo alcance sobre los desplazamientos químicos de dichos protones.

Las constantes de acoplamiento muestran variaciones menores que el error experimental, exceptuando, si acaso, la constante $J_{\alpha\beta h}$ que, al igual que a pH 2,5 disminuye al aumentar la temperatura.

II.2.3.- Variación con la concentración.

Se ha estudiado la variación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los protones de la puromicina, a dos pH muy diferentes, 1,5 y 10,5, correspon-

dientes, respectivamente al dicatión y a la forma no protonada de dicha molécula. A éste último pH, la solubilidad es mucho menor por lo que, consecuentemente, también lo es el intervalo de concentraciones estudiado.

En la Tabla 6 se dan los desplazamientos químicos de los protones del dihidrocloruro de puromicina a 26°C, pH=1,5, a distintas concentraciones molares en D₂O, comprendidas entre 3.10⁻³ M y 2.10⁻¹ M. En las columnas finales, se da el coeficiente de variación con la concentración (ppm.litro/mol) y el desplazamiento químico calculado a dilución infinita, junto con sus desviaciones estándar. Estos valores provienen de un ajuste lineal por mínimos cuadrados de los desplazamientos químicos, suponiendo que éstos varían linealmente con la concentración en el intervalo estudiado. Los coeficientes de variación resultantes son pequeños y muestran distintos signos. Las mayores variaciones son las mostradas por los protones aromáticos de la OMe-tirosina y de éstos la de los protones en orto al grupo metoxilo (C_T=-0,43 ppm.litro/mol). En ambos casos, el coeficiente es negativo, lo que implica que los desplazamientos químicos de estos protones se corren a alto campo cuando aumenta la concentración.

En la Tabla 7 se dan resultados análogos para las constantes de acoplamiento. Como puede verse, no se obtiene una variación monótona de los valores de dichas constantes con la concentración, debido a la menor precisión con que pueden medirse estos valores. Por ello, se consideran

como resultados finales los valores promediados y se admite que los coeficientes son menores que el error de medida (0,5 Hz).

En la Tabla 8 se dan los desplazamientos químicos de los protones de la puromicina a 26°C, pH=10,5, a distintas concentraciones molares en D₂O, comprendidas entre 2.10⁻³ y 1.10⁻² M. En las columnas finales se da el coeficiente de variación con la concentración (ppm.litro/mol) y el desplazamiento químico calculado a dilución infinita, junto con sus desviaciones estándar, en modo análogo a como se hizo en el caso anterior. Globalmente, los coeficientes de variación obtenidos para la forma no protonada, son mucho mayores que los correspondientes al dicatión (del orden de 50 veces mayor para los protones que en uno y otro caso muestran mayores variaciones. Para el pH=10,5, estos protones son el H1' y el H2, ambos con coeficiente negativo. Ello es consecuente con la existencia de una interacción por apilamiento de las bases, semejante a la que tiene lugar en nucleósidos y nucleótidos. Esta interacción que afectaría principalmente a los desplazamientos químicos de H2 y H1', se vería favorecida a pH 10,5 al no estar protonada la base.

En la Tabla 9 se dan los valores de las constantes de acoplamiento para el pH=10,5 en función de la concentración. Al igual que en el caso anterior se toman como resultados finales los valores promediados y se admite que la variación con la concentración es menor que el error de

191

TABLA 6

Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los protones del dihidrocloruro de puromicina (26°C, en disolución de D₂O, pH=1,5) a distintas concentraciones y resultados del ajuste lineal por mínimos cuadrados.

Concentración (M)	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	C _M ^{a)}	σ_c ^{b)}	δ_o ^{c)}	σ_δ ^{b)}
H ₂	8,39	8,38	8,38	8,39	8,38	8,37	-0,07	3	8,385	3
H ₈	8,51	8,51	8,51	8,51	8,51	8,51	0,00	0	8,510	0
N(CH ₃) ₂	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	-		3,6	
H _{1'}	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,08	-0,11	1	6,102	1
H _{2'}	-	-	-	-	4,77	4,77	-		4,77	
H _{3'}	-	4,55	4,56	4,55	4,55	4,56	0,04	3	4,551	2
H _{4'}	3,88	3,89	3,89	3,88	3,90	3,90	0,10	5	3,886	4
H _{5'} _h	3,38	3,38	3,37	3,39	3,40	3,42	0,25	5	3,379	4
H _{5'} _l	3,67	3,67	3,67	3,68	3,68	3,69	0,12	2	3,672	2
H _α	4,28	4,29	4,28	4,29	4,30	4,31	0,14	4	4,285	3
H _{βh}	3,07	3,07	3,07	3,07	3,07	3,07	0,00	0	3,070	0
H _{βl}	3,27	3,27	3,27	3,27	3,27	3,26	-0,08	1	3,271	1
H _{meta}	7,26	7,26	7,25	7,26	7,24	7,21	-0,28	4	7,259	3
H _{orto}	7,04	7,03	7,03	7,02	7,00	6,96	-0,43	5	7,032	4
OCH ₃	3,83	3,83	3,83	3,83	3,83	3,82	-0,05	1	3,830	0

- a) Coeficiente de variación de los desplazamientos químicos con la concentración (ppm.litro/mol).
- b) Errores probables en la última cifra significativa.
- c) Desplazamiento químico a dilución infinita.

TABLA 7

Constantes de acoplamiento (J,Hz; $\pm 0,5$) entre los protones del dihidrocloruro de puromicina (26°C, en disolución de D₂O, pH=1,5) a distintas concentraciones.

Concentración (M)	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	J _{media}
J _{1'2'}	2,5	2,4	2,7	2,5	2,5	2,5	2,5
J _{2'3'}	-	-	5,8	6,0	5,8	5,8	5,9
J _{3'4'}	-	-	7,9	7,8	8,1	8,1	8,0
J _{4'5'h}	4,2	4,7	4,8	4,5	3,6	3,8	4,2
J _{4'5'l}	2,7	2,7	2,7	2,1	2,4	2,5	2,5
J _{αβh}	9,1	8,7	9,3	9,1	9,1	9,4	9,1
J _{αβl}	7,5	5,7	6,4	6,3	6,5	6,7	6,5
J _{β1βh}	-	-	-13,8	-13,5	-13,5	-13,5	-13,6
J _{om}	8,5	8,5	8,7	8,7	8,7	8,7	8,6

TABLA 9

Constantes de acoplamiento (J,Hz; $\pm 0,5$) entre los protones de la puromicina (26°, en disolución de D₂O, pH=10,5) a distintas concentraciones

Concentración (M)	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	J _{media}
J _{1'2'}	3,6	3,9	3,6	4,2	3,8
J _{2'3'}	6,0	5,2	6,0	5,8	5,8
J _{3'4'}	7,2	6,9	6,6	6,4	6,8
J _{4'5'h}	-	4,5	-	4,2	4,3
J _{4'5'l}	-	3,0	-	3,0	3,0
J _{αβh}	-	9,0	9,7	9,9	9,5
J _{αβl}	-	6,0	6,6	6,3	6,3
J _{β1βh}	-	-	-	-12,7	(-12,7)
J _{om}	8,8	8,7	8,8	8,8	8,8

TABLA 8

Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los protones de la puromicina (26°C, en disolución de D₂O, pH=10,5) a distintas concentraciones y resultados del ajuste lineal por mínimos cuadrados

Concentración (M)	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$C_M^a)$	$\sigma_c^b)$	$\delta_o^c)$	$\sigma_\delta^b)$
H2	8,13	8,12	8,11	8,04	-12	1	8,164	7
H8	8,17	8,18	8,18	8,16	- 2	1	8,183	9
N(CH ₃) ₂	3,40	3,37	3,37	3,32	- 9	2	3,415	12
H1'	5,96	5,95	5,92	5,85	-15	1	5,999	3
H2'	-	-	-	-	-	-	-	-
H3'	-	-	-	-	-	-	-	-
H4'	-	-	-	-	-	-	-	-
H5' _h	3,42	3,41	3,40	3,35	- 9	1	3,444	6
H5' _l	3,65	3,66	3,65	3,65	- 1	1	3,656	3
H _α	3,69	3,69	3,68	3,69	-			
H _{βl}	3,01	3,00	3,01	2,97	- 5	2	3,025	10
H _{βh}	2,73	2,74	2,74	2,73	- 1	1	2,738	7
H _{meta}	7,20	7,20	7,20	7,17	- 4	1	7,215	6
H _{orto}	6,97	6,96	6,97	6,94	- 4	1	6,980	9
-OCH ₃	3,78	3,79	3,79	3,79	1	1	3,783	5

- a) Coeficiente de variación de los desplazamientos químicos con la concentración (ppm.litro/mol).
- b) Errores probables en la última cifra significativa.
- c) Desplazamiento químico a dilución infinita.

medida. Es interesante señalar, sin embargo, que, si bien las variaciones de las constantes con la concentración, para cada uno de los pH 1,5 y 12,5 no son significativas, algunas de las constantes de acoplamiento, principalmente, $J_{1,2}$ y $J_{3,4}$, muestran un cambio que sí lo es, al pasar la molécula de la forma de dicatión (pH=1,5) a la forma no protonada (pH=10,5).

II.2.4.- Variación con el pH.

Se ha estudiado la variación de los parámetros magnéticos protónicos de la puromicina con el pH. Este estudio se ha llevado a cabo para dos concentraciones de puromicina: una a $5,6 \cdot 10^{-2}$ M y otra a $6,6 \cdot 10^{-3}$ M. Para la disolución más concentrada sólo pudo estudiarse el intervalo comprendido entre pH 2,5 y 7,2 debido a que, a este último valor, la puromicina precipita. Para la disolución más diluida, la variación con el pH se estudió en el intervalo comprendido entre pH 1,5 y 10,0.

En la Tabla 10, se dan los valores de los desplazamientos químicos protónicos de la puromicina, a 26°C, $6,6 \cdot 10^{-3}$ M en D_2O , para distintos valores del pH. En la figura 6 se representan estos valores separadamente para los protones de la base, el azúcar y el resto -OMe-tirosina. Las curvas de titulación obtenidas corresponden a las calculadas mediante la ecuación

$$\delta = \delta_{\min} + \frac{\delta_1 \times 10^{(pK_1 - pH)}}{1 + 10^{(pK_1 - pH)}} + \frac{\delta_2 \times 10^{(pK_2 - pH)}}{1 + 10^{(pK_2 - pH)}} \quad \{\text{II.2.4.1}\}$$

(siendo δ_{\min} el desplazamiento químico mínimo (forma básica), y δ_1 y δ_2 los desplazamientos químicos por protonación) para cada uno de los protones considerados, y son las que proporcionan un ajuste óptimo para los puntos considerados. Para cada protón, cuyo desplazamiento químico muestra una variación significativa al cambiar el estado de ionización de alguno de los grupos ionizables de la molécula, se obtiene un valor del pK. El valor final de los pK correspondientes a los dos grupos ionizables se obtuvo como la media pesada de los obtenidos para los distintos protones, utilizando como factor de peso el desplazamiento químico debido a la protonación. Todos estos datos se recogen en la Tabla 14.

El valor del pK más ácido, pK_1 , corresponde obviamente a la protonación del sistema cíclico de la N-diMe-adenina, que se admite que tiene lugar en el átomo de nitrógeno N1 de dicho ciclo. En este punto, es interesante comentar que la rotación impedida observada en el dicatión para los grupos N-diMe no se observa ya a pHs mayores que el pK correspondiente a la protonación de la base. Ambos fenómenos están, pues, relacionados, concluyéndose que la introducción del protón en N1 modifica la distribución electrónica de tal forma que el enlace C6-N6 adquiere un cierto carácter de doble enlace que restringe la rotación en torno suyo.

TABLA 10a

Desplazamientos químicos (δ , ppm, $\pm 0,02$) de los protones de la puomicina (26°C , $6,6 \cdot 10^{-3}\text{M}$ en D_2O) a distintos valores del pH (1,5-10,0).

$\delta \backslash \text{pH}$	1,5	2,5	3,8	4,4	5,2	6,2	7,1	8,5	10,0
H2	8,37	8,38	8,34	8,24	8,12	8,08	8,08	8,09	8,09
H8	8,50	8,50	8,45	8,34	8,21	8,19	8,18	8,20	8,20
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-	3,62	3,57	3,49	3,38	3,36	3,35	3,36	3,35
H1'	6,09	6,08	6,05	5,98	5,89	5,89	5,90	5,90	5,90
H2'	-	-	-	-	-	-	4,63	4,65	4,63
H3'	4,55	4,54	4,54	-	4,47	4,42	4,40	4,39	4,39
H4'	3,90	3,89	3,89	3,88	3,86	-	3,80	3,83	3,82
H5' _h	3,39	3,38	3,40	3,47	3,42	3,37	3,34	3,34	3,35
H5' _l	3,68	3,66	3,68	3,70	3,70	3,66	3,62	3,62	3,62
H _{α}	4,28	4,27	4,29	4,29	4,27	3,89	-	3,70	3,70
H _{βl}	3,26	3,27	3,28	3,28	3,27	3,13	2,99	2,99	2,99
H _{βh}	3,09	3,06	3,08	3,08	3,06	2,91	2,75	2,75	2,73
H _{meta}	7,26	7,25	7,26	7,25	7,25	7,22	7,17	7,18	7,18
H _{orto}	7,04	7,03	7,05	7,06	7,03	6,98	6,96	6,97	6,97
OCH_3	3,84	3,83	3,84	3,83	3,83	3,81	3,80	3,81	3,81

PUROMICINA

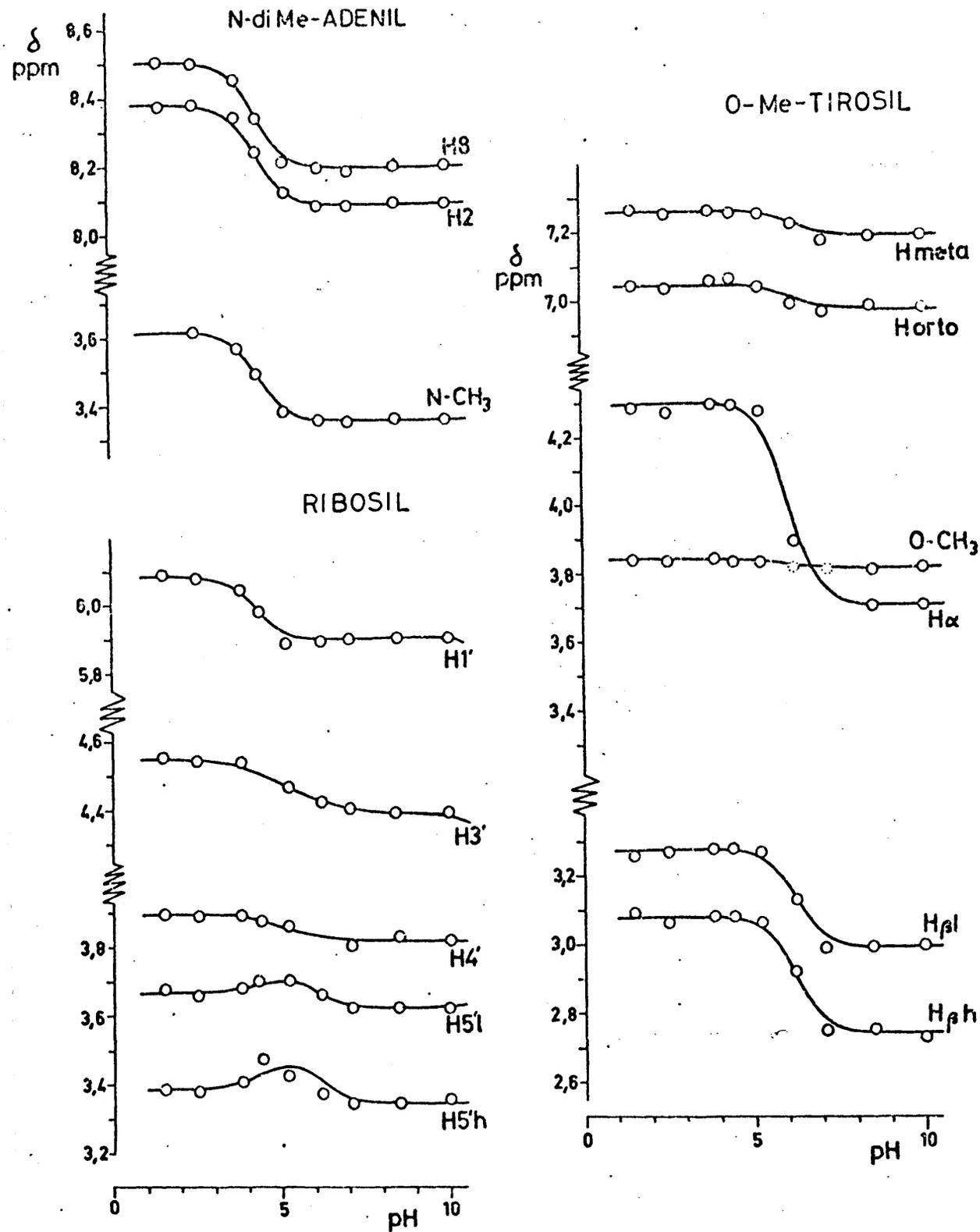


Figura 6. Variación con el pH de los desplazamientos químicos de ¹H del hidrocloreto de puromicina, 6,6 · 10⁻³M en D₂O, a 26°C.

El efecto de la protonación se hace sentir sobre el protón H8 con la misma intensidad que tiene lugar sobre los protones H2 y $-N(CH_3)_2$ (véase Tabla 10 y figura 6), lo que supone un reordenamiento de la carga electrónica que se extiende al anillo pentagonal del ciclo de purina. También se observan efectos menores, si bien significativos, sobre distintos protones del anillo de ribosa, destacándose entre ellos el del protón H1' por su magnitud, y el de los protones H5'_h y H5'_l por el signo contrario al normalmente observado en desplazamientos debidos a efectos inductivos.

El valor del pK más básico, pK₂, corresponde a la protonación del grupo $-NH_2$ de la OMe-tirosina, puesto que los protones más afectados son los H_α, H_{βh} y H_{βl}, ya que a $6,6 \cdot 10^{-3}$ M en D₂O sus δ_2 son 0,595, 0,285 y 0,337 ppm respectivamente. Los efectos de la protonación de este grupo se transmiten también a protones más alejados, tales como los del núcleo aromático, e, incluso, a algunos protones del anillo de ribosa.

En la Tabla 11, se dan los valores de las constantes de acoplamiento medidas para la disolución diluida ($6,6 \cdot 10^{-3}$ M) a distintos valores del pH. Al igual que se observó en II.2.3., las constantes J_{1,2} y J_{3,4} de la ribosa muestran una variación significativa al pasar del dicatión a la forma neutra.

En la Tabla 12 se dan los valores de los desplazamientos químicos protónicos de la puromicina a 26°C para la disolución más concentrada ($5,6 \cdot 10^{-2}$ M), para distintos

valores del pH, y en la figura 7 se representan gráficamente estos valores y sus ajustes a las curvas teóricas. Los pK resultantes, evaluados de modo análogo que en el caso anterior, y los desplazamientos químicos debidos a la protonación se recogen también en la Tabla 14.

Como puede verse, los valores de los pK, tanto pK_1 como pK_2 , no son los mismos para una y otra concentración. Concretamente, pK_1 disminuye y pK_2 aumenta al aumentar la concentración. Esta dependencia puede ser índice de la existencia de algún tipo de asociación intermolecular en la que estén involucrados los respectivos grupos ionizables.

Al existir en esta disolución un mayor intervalo de pH entre los dos pK, la dependencia inversa de los desplazamientos químicos de $H5'_h$ y $H5'_l$ respecto a los normalmente observados es más fácil de observar, (véase fig. 7).

En la Tabla 13, se dan los valores de las constantes de acoplamiento medidos para la disolución concentrada ($5,6 \cdot 10^{-2}$ M) a distintos valores del pH. En dicha Tabla, puede constatarse nuevamente la variación de las constantes de acoplamiento $J_{1,2}$ y $J_{3,4}$, con el estado de ionización de la molécula.

Algunas anomalías observadas en las medidas de desplazamientos químicos a alto pH aconsejaron la obtención de espectros en la zona de pH comprendida entre 10 y 13. Los desplazamientos químicos de las señales de puromicina en este intervalo de pH se dan en la Tabla 10b. Puede ob-

servarse claramente en dicha Tabla que los protones H1' y H3' sufren un corrimiento a alto campo al aumentar el pH muy superior al error experimental de medida. Este corrimiento ha de adscribirse a la existencia de un tercer pK correspondiente al equilibrio de disociación del protón peptídico o bien al del grupo hidroxilo en C2', análogamente a lo que ocurre en la adenosina (29) para la que se obtiene un pK=12,5.

TABLA 10b

Desplazamientos químicos (δ , ppm $\pm 0,02$) de los protones de la puromicina (26°C, $7,5 \cdot 10^{-3}$ M en D₂O) a distintos valores de pH (9,7-12,5).

	9,7	11,5	12,5
H2	8,06	8,07	8,11
H8	8,19	8,17	8,16
N(CH ₃) ₂	3,33	3,35	3,37
H1'	5,88	5,79	5,61
H2'	--	4,63	4,66
H3'	4,37	4,32	4,18
H4'	--	--	--
H5' _h	3,33	3,37	3,46
H5' _l	3,63	3,65	3,68
H _α	3,69	--	3,70
H _{βl}	2,97	2,98	3,02
H _{βh}	2,73	2,74	2,74
H _{meta}	7,17	7,18	7,21
H _{orto}	6,94	6,95	6,98
OCH ₃	3,80	3,80	3,78

PUROMICINA

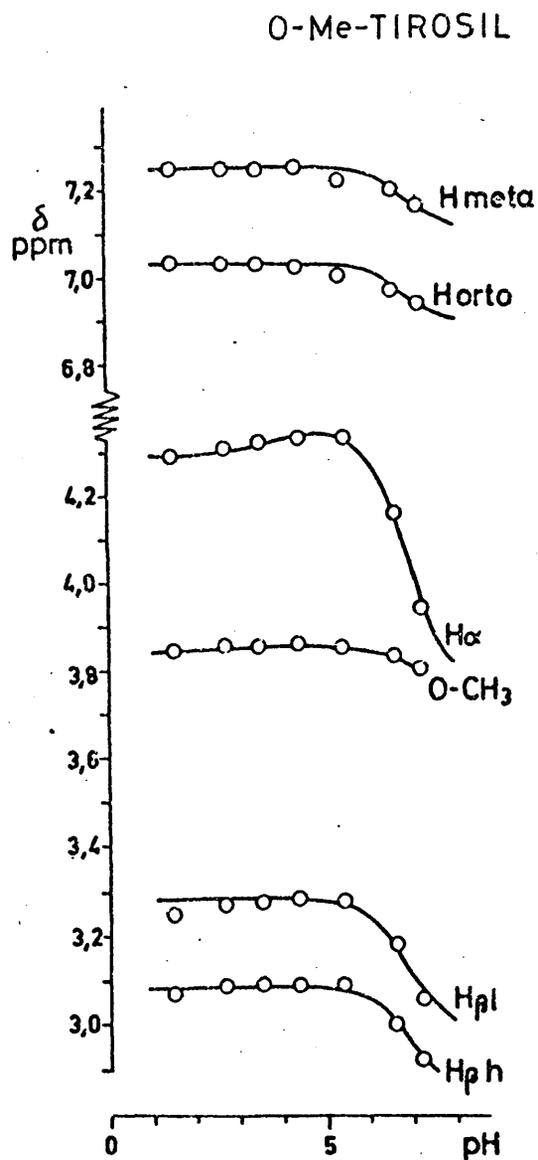
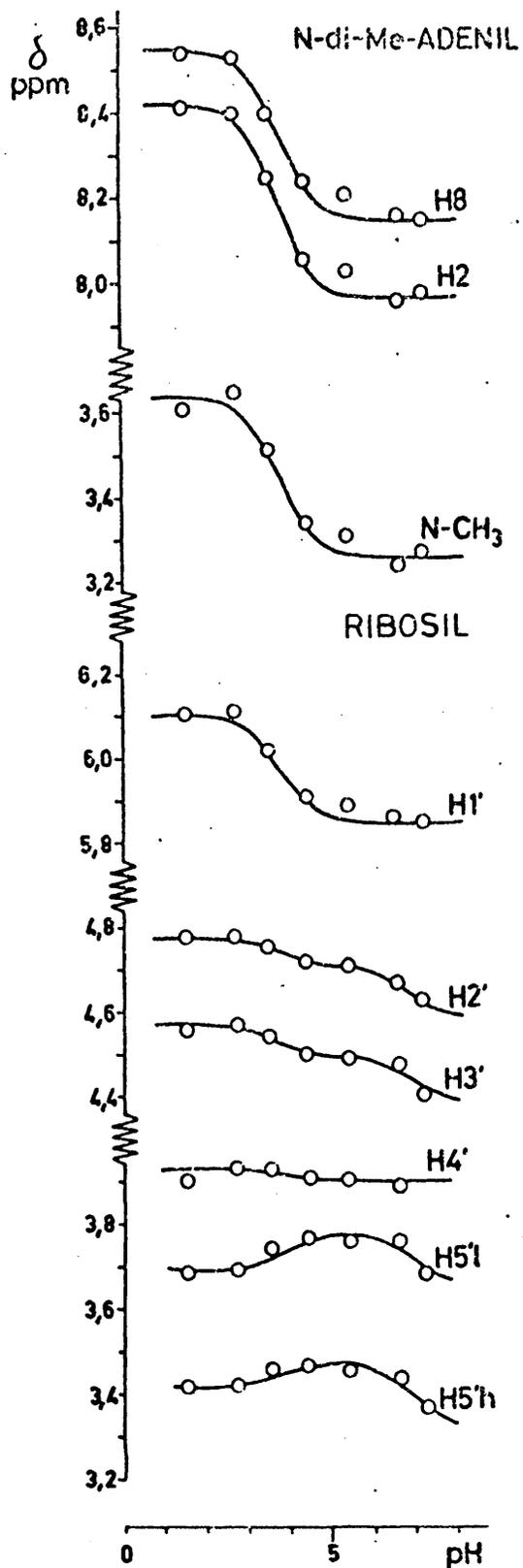


Figura 7. Variación del pI de los desplazamientos químicos de ^1H de puromicina, $5,6 \cdot 10^{-2}\text{M}$ en D_2O , a 26°C .

TABLA 11

Constantes de acoplamiento (J,Hz $\pm 0,5$) entre los protones de la puromicina (26°C, $6,6 \cdot 10^{-3}$ M en D₂O) a distintos valores del pH.

J\pH	1,5	2,5	3,8	5,2	6,2	7,1	8,5	10,0	9,7	11,5	12,5
1'2'	2,4	2,3	3,0	3,3	3,0	2,9	3,0	3,0	2,7	3,5	3,9
2'3'	6,1	6,0	5,9	-	-	-	5,7	5,7	6,3	5,7	6,2
3'4'	8,2	8,7	8,0	7,8	-	-	8,1	7,5	7,5	7,3	6,2
4'5' _h	4,2	4,2	4,2	3,6	-	4,2	3,7	3,6	-	4,8	4,5
4'5' _l	2,0	2,4	2,3	2,1	-	-	-	2,7	-	3,0	-
5'h5'l	-13,2	-	-13,2	-	-	-	-	-12,3	-	-	-
$\alpha\beta_h$	9,3	9,9	9,3	9,7	9,7	9,7	9,7	9,6	10,0	9,0	9,7
$\alpha\beta_l$	6,3	6,6	6,9	6,6	6,3	5,6	5,5	6,0	6,0	-	6,8
$\beta_1\beta_h$	-13,8	-13,3	-13,2	-13,5	-	-12,9	-12,9	-13,2	-13,5	-	-12,9
om	8,9	8,9	9,0	8,9	8,4	9,5	8,7	8,7	8,5	8,7	8,7

TABLA 13

Constantes de acoplamiento (J,Hz $\pm 0,05$) entre los protones de la puromicina (26°C, $5,6 \cdot 10^{-2}$ M en D₂O) a distintos valores del pH

J\pH	1,5	2,7	3,5	4,4	5,4	6,6	7,2
1'2'	2,7	2,5	2,8	3,2	2,9	3,2	3,0
2'3'	6,1	5,6	6,0	6,1	6,2	5,8	5,8
3'4'	8,5	8,1	7,6	7,3	7,4	7,2	7,2
4'5' _h	4,2	4,1	3,0	4,0	3,3	4,0	3,8
4'5' _l	2,4	2,3	1,9	2,1	1,8	2,4	2,1
5'a5'b	-13,0	-12,9	-	-	-	-	-
$\alpha\beta_l$	9,6	9,3	9,3	9,3	9,6	8,7	9,3
$\alpha\beta_h$	6,6	6,5	6,5	6,6	6,3	6,6	6,0
$\beta_1\beta_h$	-13,9	-13,9	-13,7	-13,8	-13,8	-14,3	-13,5

TABLA 12

Desplazamientos químicos (δ , ppm $\pm 0,02$) de los protones de la puromicina (26°C, $5,6 \cdot 10^{-2}$ M en D_2O) a distintos valores del pH.

$\delta \backslash$ pH	1,5	2,7	3,5	4,4	5,4	6,6	7,2
H2	8,40	8,39	8,24	8,05	8,02	7,95	7,97
H8	8,53	8,51	8,39	8,23	8,20	8,15	8,14
$N(CH_3)_2$	3,6	3,64	3,50	3,33	3,30	3,23	3,26
H1'	6,10	6,10	6,01	5,90	5,88	5,85	5,84
H2'	-	4,77	4,75	4,71	4,70	4,66	4,62
H3'	4,55	4,57	4,54	4,50	4,49	4,47	4,40
H4'	3,90	3,93	3,93	3,91	3,90	3,89	-
H5' _h	3,42	3,42	3,46	3,47	3,46	3,44	3,37
H5' _l	3,68	3,69	3,74	3,77	3,76	3,76	3,68
H _{α}	4,29	4,31	4,32	4,33	4,33	4,16	3,94
H _{βl}	3,25	3,28	3,28	3,29	3,28	3,18	3,06
H _{βh}	3,07	3,09	3,09	3,09	3,09	3,00	2,92
H _{meta}	7,25	7,25	7,25	7,25	7,22	7,20	7,16
H _{orto}	7,03	7,03	7,03	7,02	7,00	6,97	6,94
OCH ₃	3,84	3,85	3,85	3,86	3,85	3,83	3,81

TABLA 14

Valores de los pK deducidos de las curvas de titulación y desplazamientos químicos debidos a la protonación.

	$6,6 \cdot 10^{-3}$ M				$5,6 \cdot 10^{-2}$ M			
	pK ₁	δ_1	pK ₂	δ_2	pK ₁	δ_1	pK ₂	δ_2
H2	4,4	0,290	-	-	3,8	0,45	-	-
H8	4,4	0,308	-	-	3,8	0,40	-	-
N(CH ₃) ₂	4,4	0,265	-	-	3,8	0,38	-	-
H1'	4,3	0,188	-	-	3,8	0,26	-	-
H2'	-	-	-	-	3,9	0,07	6,9	0,12
H3'	4,4	0,078	6,2	0,078	3,8	0,07	6,9	0,10
H4'	4,4	0,046	6,2	0,032	3,9	0,03	-	-
H5' _a	4,4	-0,095	6,2	0,137	3,9	-0,08	6,9	0,18
H5' _b	-	-0,040	6,2	0,090	3,9	-0,09	6,9	0,12
H _{α}	-	-	6,1	0,595	3,8	-0,05	6,9	0,58
H _{β}	-	-	6,2	0,285	-	-	6,8	0,29
H _{β} '	-	-	6,2	0,337	-	-	6,9	0,24
H _{meta}	-	-	6,3	0,075	-	-	6,9	0,14
H _{orto}	-	-	6,2	0,073	-	-	6,9	0,14
OCH ₃	-	-	6,1	0,033	-	-	6,9	0,07
pK ^{a)} finales	4,4	-	6,1	-	3,8	-	6,9	-

a)

Media ponderada con los valores de los correspondientes δ 's.

II.2.5.- Espectros en dimetilsulfóxido-d₆.

Se han realizado espectros del dihidrocloruro de puromicina en disolución de dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO), a dos concentraciones, $8,2 \cdot 10^{-3}$ M y $7,0 \cdot 10^{-2}$ M. De la disolución más diluída se obtuvieron espectros a dos temperaturas, 26° y 67°C. Los desplazamientos químicos y algunas de las constantes de acoplamiento medidas se recogen en la Tabla 15. Además de las señales ya observadas en disolución acuosa, en los espectros en DMSO aparecen las señales del protón amido unido al nitrógeno en C3' (doblete, $J=6,8$ Hz) y la de los protones del grupo $-\overset{+}{N}H_3$ en el C_α de la O-Me-tirosina. Aparece también una señal intensa, cuyo desplazamiento químico depende mucho de la temperatura y de la concentración, correspondiente a todos los protones intercambiables, entre los que han de contarse los dos protones de los grupos hidroxilo en C2' y C5', el protón en N1 de la N-dimetil-adenosina, y el agua residual que normalmente impurifica al DMSO.

La asignación del doblete a bajo campo al protón del grupo amida, ha sido confirmada por experimentos de doble irradiación. En efecto, al irradiar en el centro de esa señal (δ 8,70, en el espectro a concentración $7,0 \cdot 10^{-2}$ M) se obtiene una coalescencia en la señal a δ 4,48, correspondiente a los protones H2' y H3' y, viceversa, al irradiar en este punto coalesce el doblete a δ 8,70. De modo análogo se confirmaron las asignaciones de los protones $-\overset{+}{N}H_3$, H_α, H_{β1}, H_{βh} y H4'.

Los protones, cuyos desplazamientos químicos se afectan más al pasar de D_2O a DMSO son: el H8 de la base, que sufre un desplazamiento a bajo campo, el H2' de la ribosa, y los protones H_α y $H_{\beta 1}$ de la O-Me-tirosina. Las señales de estos tres últimos protones se corren, por el contrario, hacia alto campo. El máximo corrimiento es el que presenta el protón H_α (0,33 ppm).

Al variar la concentración se afectan principalmente los protones H2 y H8 de la base, así como el protón de la amida y principalmente los del grupo $-NH_3^+$. En todos los casos, al aumentar la concentración las señales se desplazan a campo bajo. Al variar la temperatura, se afectan principalmente las señales del protón H8 y la del grupo amida, en ambos casos desplazándose a alto campo al aumentar la temperatura.

La magnitud de las variaciones observadas no son, en todo caso, muy grandes (<0,3 ppm), y los desplazamientos químicos relativos y las constantes de acoplamiento se conservan, lo que indica que, en general, la conformación molecular global es análoga en uno y otro disolvente y que las interacciones intra e inter-moleculares no son muy serias. La variación más notable en este sentido es la mostrada por la suma de acoplamientos $|J_{\alpha\beta l} + J_{\alpha\beta h}|$, que en DMSO es de 13,0 Hz y en D_2O 15,9 Hz. Esta variación es indicativa de que en DMSO las poblaciones relativas de los tres rotámeros correspondientes al enlace $C_\alpha-C_\beta$ están más homogéneamente poblados.

TABLA 15

Espectros de ^1H del dihidrocloruro
de puromicina en dimetilsulfóxido- d_6

δ (a)	$7,0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ 26°C	$8,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ 26°C	$8,2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ 67°C	$7,0 \cdot 10^{-2}\text{M}$ 26°C(D ₂ O)
H2	8,42	8,29	8,26	8,39
H8	8,72	8,53	8,41	8,51
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	3,58	3,55	3,50	~3,6
H1'	6,07	5,99	5,99	6,09
H2'	4,48	4,48	4,54	4,77
H3'	4,48	4,48	4,54	4,55
H4'	3,98	-	3,89	3,88
H5' _a	3,38	-	-	3,40
H5' _b	~3,7	-	-	3,68
H _{α}	3,98	-	4,09	4,27
H _{βh}	3,00	2,98	3,03	3,07
H _{βl}	3,00	2,98	3,03	3,27
H _{meta}	7,19	7,18	7,21	7,24
H _{orto}	6,91	6,90	6,91	7,00
OCH ₃	3,74	3,74	3,76	3,83
-NHCO	8,70	8,59	8,41	-
-NH ₃ ⁺	8,51	8,26	8,21	-
$^3J_{\text{NH-H3}'}$ =	6,8 Hz		7,2 Hz	-
$^3J_{\alpha\beta l} + ^3J_{\alpha\beta h}$ =	13,0 Hz		14,2 Hz	15,5
$^3J_{4,5,1}$ =	4,0 Hz		4,0 Hz	

a) $\delta \pm 0,02$ p.p.m. con respecto a TMS en DMSO y a DSS en D₂O.

II.2.6.- Tiempos de relajación longitudinal (T_1).

Siguiendo el método de pulsos $180^\circ-\tau-90^\circ$, descrito en II.1.5., se han medido los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , de los protones del dihidrocloruro de piroxicina (disolución en D_2O , 0,18 M, pH=2,5, 26°C). En la Tabla 16 se dan las medidas, expresadas en cm, de las intensidades de las líneas elegidas para cada protón, en función del tiempo de espera entre pulsos, τ . En la columna final de la Tabla se dan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados de la ecuación {II.1.5.2}, que proporciona el tiempo de relajación, T_1 , para cada protón, junto con su error probable.

-109-

TABLA 16

Medidas de tiempos de relajación longitudinal protonicos (T_1), para una disolución 0,18 M en D_2O , pH=2,5, a 26°C, del dihidrocloruro de puromicina.

	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	∞	T_1	σ
H2	-11,70	-7,28	-5,16	0,92	7,00	12,61	15,09	2,62±0,07	
H8	- 2,42	-0,70	2,62	6,12	7,88	8,08	8,16	0,78±0,04	
$N(CH_3)_2$	0,	0,98	1,80	2,40	2,75	2,80	2,94	0,65±0,08	
H1'	- 1,49	-0,60	1,16	2,82	3,84	3,92	3,82	0,82±0,03	
H2'	- 0,56	0,62	1,58	2,10	2,20	2,30	2,30	0,41±0,01	
H3'	- 0,46	0,62	1,30	1,70	1,84	1,85	2,00	0,42±0,03	
H4'	- 0,10	0,20	0,72	1,18	1,24	1,18	1,25	0,52±0,05	
H5' _a	+ 0,96	1,06	1,30	1,30	1,45	1,40	1,35	0,18±0,07	
H5' _b	+ 1,00	1,50	1,70	1,72	1,80	1,80	1,78	0,15±0,05	
H _{α}	- 0,34	0,30	0,90	1,62	1,80	1,82	1,85	0,57±0,03	
H _{β}	0,73	1,06	1,12	1,20	1,20	1,28	1,20	0,14±0,01	
H _{β'}	0,90	1,14	1,25	1,40	1,32	1,30	1,38	0,15±0,01	
H _{meta}	- 1,28	1,58	3,96	5,90	6,34	6,40	6,20	0,48±0,01	
H _{orto}	- 1,72	0,42	3,50	6,02	6,85	6,90	6,90	0,59±0,05	
OCH ₃	-12,06	1,80	12,70	23,10	26,60			0,59±0,02	

II.3. Espectros de ^1H de gougertina. Resultados

II.3.1.- Asignación y análisis de espectros.

El espectro de RMN del ^1H , a 90 MHz, del hidroclo-
ruro de gougertina disuelto en D_2O , a concentración 0,12 M
y a temperatura de 26°C , puede verse en la figura 8. La re-
ferencia interna es DSS. Los dobletes a δ 7,83 y δ 6,13
($J=7,5$ Hz) se asignan respectivamente a los protones H6 y
H5 del resto citidilo, de acuerdo con los abundantes datos
experimentales existentes para nucleósidos y nucleótidos
de citidina (35). La señal compleja con centro en δ 5,78,
corresponde, obviamente, al protón anomérico H1'. La estruc-
tura de esta señal es indicativa de que los protones H2' y
H3' están fuertemente acoplados. A campo más alto de la
señal de H-O-D se sitúa, en primer lugar, la señal corres-
pondiente al H_α del resto serinil, con centro en δ 4,58,
tripleto. La absorción comprendida en el intervalo δ 4,4-3,6
corresponde a 8 protones. El multiplete con centro en δ 4,1
se asigna a los protones H5' y H4', lo que se justifica
más adelante por análisis completo. El doblete con centro
en δ 3,89, que puede observarse más claramente al variar el
pH, corresponde a los protones H_β y H_β' del resto serinil,
cuyo desplazamiento químico coincide accidentalmente. El
singlete situado a δ 3,84, ha de asignarse a los protones
 $-\text{C}_\alpha, \text{H}_2-$ del resto sarcosil. Las señales de los protones H2'
y H3', fuertemente acoplados se encuentran ocultas por las
dos últimas señales descritas. Su situación se ha confirmado
por doble resonancia. Al irradiar en δ 3,89 se obtienen coa-

lescencias en H_{α} (serinil) y en la señal del protón $H1'$. Por último, el singlete de intensidad equivalente a 3 protones situado a δ 2,69, ha de asignarse a los protones del grupo $N-CH_3$ del resto sarcosilo.

Al igual que en el caso de la puromicina, la asignación de señales a protones concretos, no ofrece dudas y puede considerarse como firmemente establecida.

La estructura de los multipletes observados para los protones del núcleo de glucosa, es muy compleja y no pueden observarse suficientes detalles como para llevar a cabo un análisis completo riguroso. Con objeto de confirmar la asignación de los protones $H2'$, $H3'$, $H4'$ y $H5'$ y extraer valores de los acoplamientos vecinales, se llevaron a cabo una serie de cálculos de espectros con parámetros iniciales que fueron progresivamente refinándose por el procedimiento de prueba y error, hasta conseguir un acuerdo razonable entre los espectros observado y calculado. En la Tabla 17 se dan los valores de los parámetros magnéticos, desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento finales, y en la figura 9 se representan los espectros observado y calculado.

TABLA 17

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS) y constantes de acoplamiento (J, Hz) resultantes del análisis de los sistemas de espines H1'-H2'-H3'-H4'-H5', H $_{\alpha}$ -H $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ ' y H $_{2\alpha}$ ' del cloruro de gougerotina.

Sistema H1'-H2'-H3'-H4'-H5'

Desplazamientos químicos (δ , ppm; $\pm 0,02$)		Constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,5$)	
H1'	5,73	1'2'	9,0
H2'	3,87	2'3'	9,2
H3'	3,85	3'4'	9,2
H4'	4,09	4'5'	9,8
H5'	4,17		

Sistema H $_{\alpha}$ -H $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ '

Desplazamientos químicos (δ , ppm; $\pm 0,02$)		Constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,5$)	
H $_{\alpha}$	4,56	J $_{\alpha\beta}$ +J $_{\alpha\beta}'$	10,9
H $_{\beta}$ H $_{\beta}'$ }	3,88		

Sistema C $_{\alpha}$ H $_2$

Desplazamientos químicos (δ , ppm; $\pm 0,02$)	
C $_{\alpha}$ H $_2$	3,98

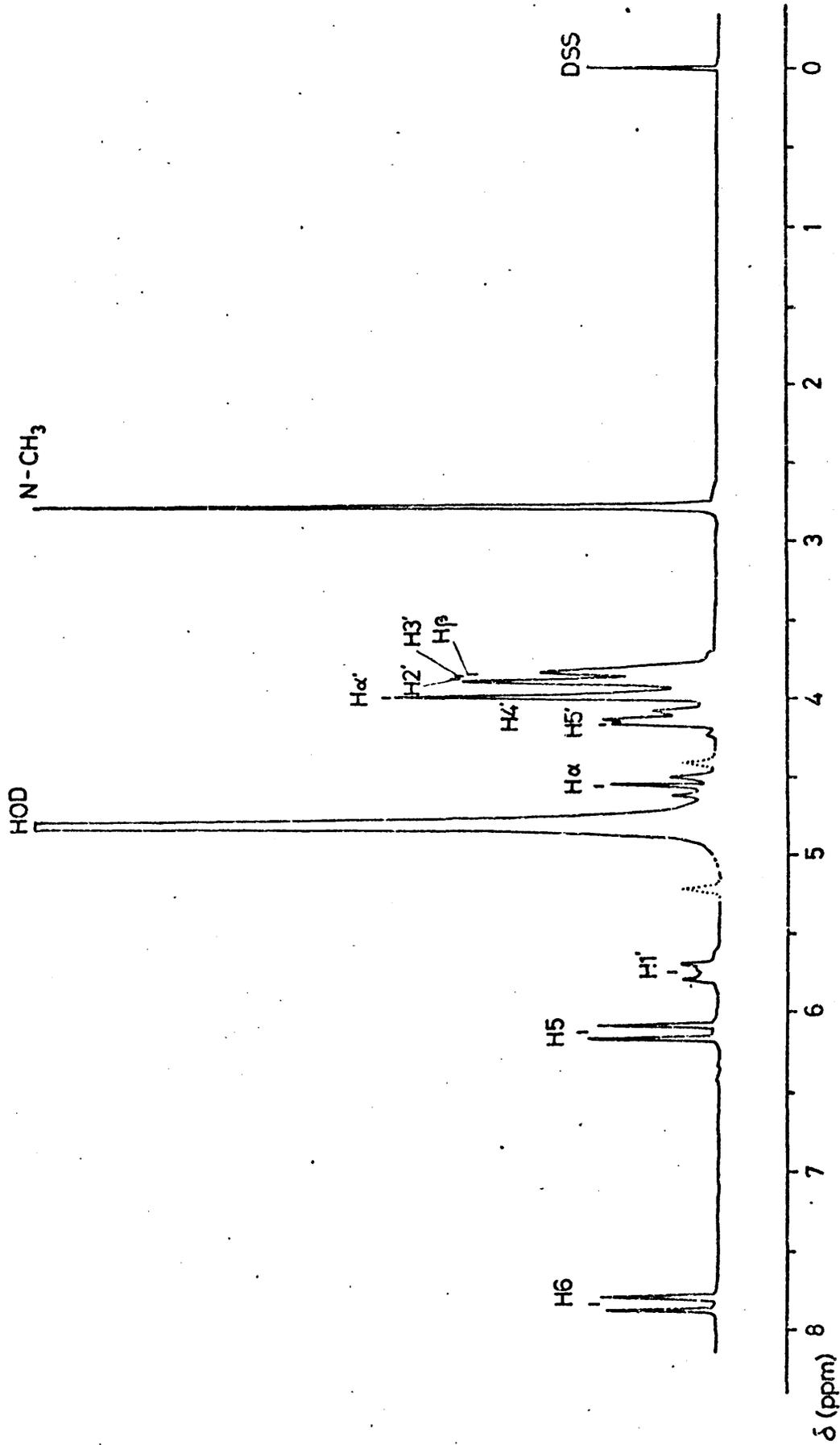


Figura 8. Espectro de RMN de ¹H, a 90 MHz, del hidrocloreto de gougierotina, 0,12 M en D₂O, a 26°C.

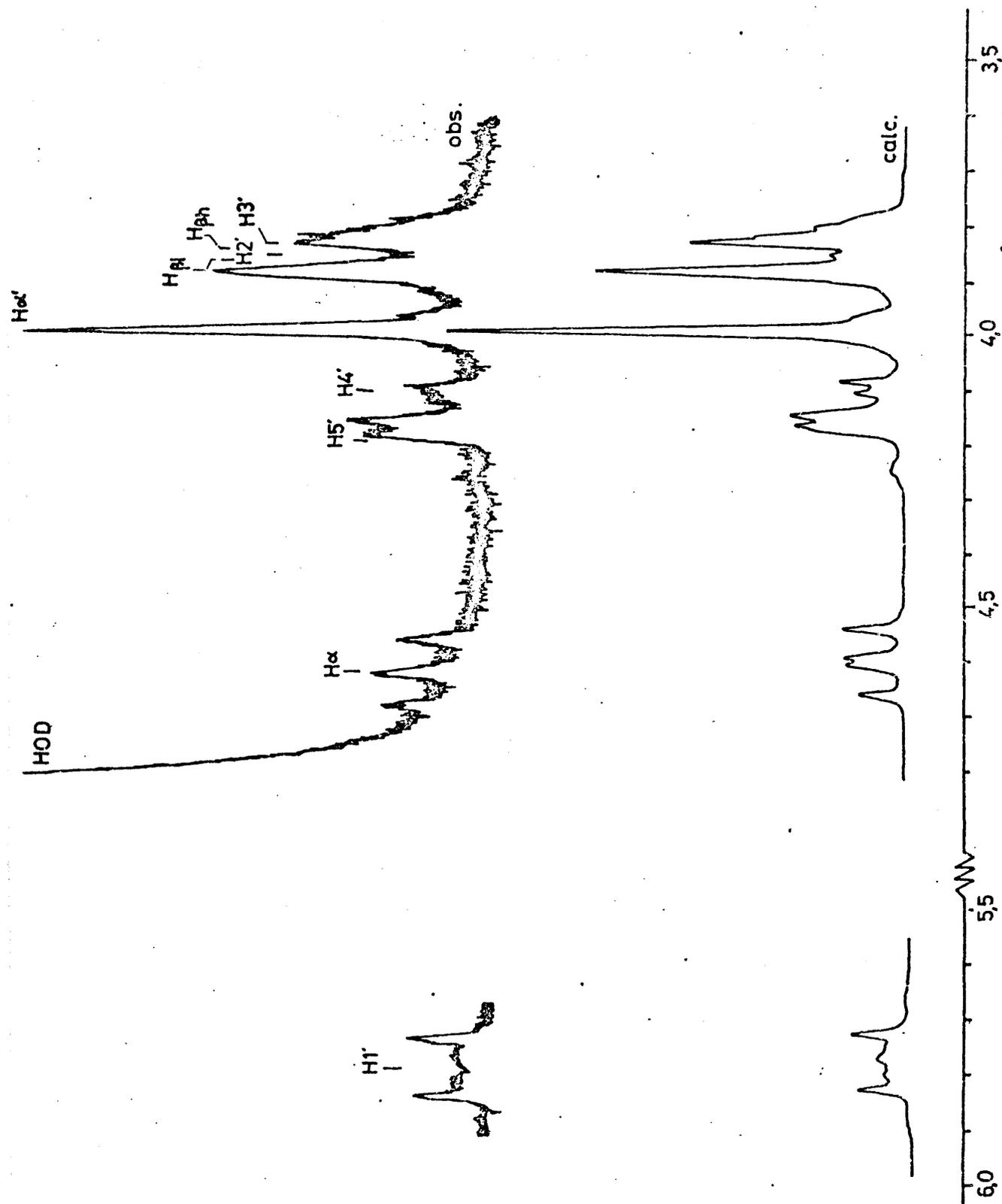


Figura 9. Espectros calculado y observado, en la zona δ 3,5-6, de hidrocloreuro de

II.3.2.- Variación con la temperatura.

En la Tabla 19 se dan los desplazamientos químicos y algunas constantes de acoplamiento de los protones del hidrocloreuro de gougerotina, en disolución 0,12 M en D_2O , pH 5,4, a diversas temperaturas comprendidas en el intervalo $26^\circ-60^\circ C$.

Asímismo, en la Tabla 18 se dan los desplazamientos químicos y algunas constantes de acoplamiento de los protones del hidrocloreuro de gougerotina en disolución $1,1 \cdot 10^{-2} M$ en D_2O , pH=1,5 a diversas temperaturas en el intervalo de 26° a $67^\circ C$, y en la Tabla 20 para la gougerotina en disolución $8,6 \cdot 10^{-3} M$ en D_2O , pH=13 en el mismo intervalo de temperaturas.

Ninguno de los parámetros observados muestra, en este intervalo, una variación mayor que el error experimental.

TABLA 18

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS, $\pm 0,02$) y constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,5$) observadas a distintas temperaturas del hidroclo-
ruro de gougerotina ($1,1 \cdot 10^{-2}$ M en D_2O , pH=1,5).

$\delta \backslash T(^{\circ}C)$	26	41	51	57	67
H5	6,34	6,35	6,35	6,36	6,37
H6	8,09	8,09	8,06	8,06	8,05
H1'	5,77	5,78	5,75	5,76	5,74
H2'	--	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--	--
H4'	4,12	4,12	4,12	4,11	4,13
H5'	4,22	4,23	4,23	4,25	4,24
H _{α}	4,57	--	--	--	4,57
H _{β}	3,86	3,87	3,86	3,87	3,87
H _{α} '	3,99	3,99	3,99	3,99	3,99
NCH ₃	2,79	2,79	2,80	2,80	2,82
J 56	7,6	7,8	7,6	7,8	8,1
J 1'2'	9,4	9,0	9,0	9,3	8,7
$\alpha\beta + \alpha\beta'$	12,6	10,8	12,2	11,6	12,0

TABLA 19

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS $\pm 0,02$) y constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,05$) observadas a distintas temperaturas del hidrocioruro de gougerotina (0,12M en D₂O, pH=5,4).

$\delta \backslash T(^{\circ}C)$	26	28	38	44	47	54	60
H5	6,13	6,13	6,13	6,13	6,13	6,14	6,13
H6	7,83	7,82	7,81	7,81	7,81	7,81	7,80
H1'	5,78	5,76	5,76	5,76	5,76	5,75	5,75
H2'	3,91	3,90	--	--	--	--	--
H3'	3,89	3,88	--	--	--	--	--
H4'	4,13	4,12	4,12	4,12	4,12	4,12	4,13
H5'	4,21	4,22	4,21	4,21	4,22	4,23	4,23
H _{α}	4,59	4,58	4,58	4,58	--	4,59	4,58
H _{β}	3,89	3,89	3,88	3,88	3,88	3,88	3,89
H _{α} '	3,84	3,83	3,83	3,83	3,83	3,83	3,82
NCH ₃	2,69	2,69	2,69	2,69	2,70	2,70	2,69
J 56	7,5	7,5	7,5	7,6	7,6	7,6	7,6
J 1'2'	9,0	9,0	9,0	9,5	9,2	9,2	9,4
$\alpha\beta + \alpha\beta'$	10,6	10,6	11,4	--	--	--	11,2

TABLA 20

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS, $\pm 0,02$) y constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,5$) observadas a distintas temperaturas para la gougerotina ($8,6 \cdot 10^{-3}$ M en D_2O , pH=13)

$\delta \backslash T(^{\circ}C)$	26	41	51	57	67
H5	6,14	6,13	6,13	6,13	6,13
H6	7,83	7,81	7,81	7,81	7,82
H1'	5,65	5,68	5,66	5,67	--
H2'	3,85	3,86	3,85	3,85	3,84
H3'	3,85	3,86	3,85	3,85	3,84
H4'	4,08	4,07	4,07	4,08	--
H5'	4,16	4,15	4,16	4,15	--
H_{α}	--	--	--	--	--
H_{β}	3,85	3,86	3,85	3,85	3,84
H_{α}'	3,36	3,35	3,35	3,35	3,34
NCH_3	2,34	2,33	2,33	2,33	2,33
J 56	7,5	7,5	7,5	7,8	7,5
J 1'2'	--	8,7	9,3	9,0	--
$ \alpha\beta + \alpha\beta' $	--	--	--	--	--

II.3.3.- Variación con la concentración.

En las Tablas 21, 22 y 23, se dan los desplazamientos químicos y algunas constantes de acoplamiento a 26°C, del hidrocioruro de gougerotina a (pH=1,5), (pH=5,7) y a (pH=13) respectivamente a diferentes concentraciones, no observándose en los parámetros medidos ningún cambio con la variación de la concentración mayor que el error experimental.

TABLA 21

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS; $\pm 0,02$ ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz; 0,5) de los protones del hidrocioruro de gougerotina (26°C, en disolución de D₂O, pH=1,5) a distintas concentraciones.

$\delta \backslash$ Concentración (M)	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
H5	6,35	6,35	6,36	6,34
H6	8,11	8,12	8,11	8,10
H1'	5,78	5,79	5,78	5,78
H2'	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--
H4'	4,12	4,12	4,12	4,11
H5'	4,21	4,22	4,23	4,23
H _α	--	--	4,57	4,56
H _β	3,88	3,88	3,88	3,88
H _α '	4,00	3,99	3,99	3,99
NCH ₃	2,79	2,80	2,80	2,80
J 56	8,4	7,8	7,6	7,8
J 1'2'	9,0	8,8	9,3	9,6
J αβ+αβ'	10,8	12,0	11,4	11,7

TABLA 22

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS; $\pm 0,02$ ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,2$) de los protones del hidrocloreto de gougertina (26°C en disolución de D₂O, pH=5,7) a distintas concentraciones.

δ \ Concentración (M)	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$
H5	6,11	6,13	6,12	6,13
H6	7,83	7,83	7,82	7,83
H1'	5,69	5,70	5,69	5,71
H2'	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--
H4'	3,93	3,92	3,95	--
H5'	4,04	4,05	4,05	--
H _{α}	--	--	--	--
H _{β}	3,85	3,85	3,85	3,86
H _{α} '	4,00	4,01	4,02	4,01
NCH ₃	2,76	2,77	2,78	2,79
J 56	7,5	7,3	7,5	7,5
J 1'2'	6,8	6,8	6,8	6,8

-121-

TABLA 23

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS, $\pm 0,02$ ppm) de los protones de la gougerotina (26°C en disolución de D₂O, pH λ 13) a distintas concentraciones

δ \ Concentración (M)	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$9,6 \cdot 10^{-3}$
H5	6,11	6,10	6,11	6,11
H6	7,81	7,81	7,81	7,81
H1'	5,65	5,66	5,63	5,62
H2'	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--
H4'	--	--	--	--
H5'	--	--	--	--
H $_{\alpha}$	--	--	--	--
H $_{\beta}$	3,83	3,85	3,84	3,83
H $_{\alpha}'$	3,33	3,34	3,34	3,34
NCH ₃	2,31	2,33	2,32	2,32

II.3.4.- Variación con el pH.

Se ha estudiado la variación de los parámetros magnéticos protónicos de la gougerotina con el pH. Este estudio se ha llevado a cabo para una disolución $8,3 \cdot 10^{-3}$ M en D_2O , y para un intervalo de pH comprendido entre 1,5 y 11,3.

En la Tabla 24 se dan los resultados de estas medidas. Y en la figura 10 se representan los valores de los desplazamientos químicos de los protones frente al valor del pH. Las curvas de titulación obtenidas corresponden a las calculadas mediante la ecuación {II.2.4.1}, con los valores de pK_1 , pK_2 e incrementos de desplazamientos químicos dados en la Tabla 25. Estos valores son los que proporcionan un ajuste óptimo de los puntos considerados.

El valor del pK más ácido, $pK_1=4,3$, corresponde obviamente a la protonación del resto citidilo, que tiene lugar en el átomo de nitrógeno N3 de dicho ciclo. Los protones mayormente afectados por este cambio de estado de ionización son, lógicamente, los protones H5 y H6 de la base. Los protones H1' y H5' parecen también afectarse muy ligeramente.

El valor del pK más básico, $pK_2=7,5$, corresponde a la protonación del átomo de N del resto sarcosilo, y consecuentemente, los desplazamientos químicos más afectados son los de los protones en los carbonos en α a dicho átomo ($-CH_{2\alpha}$, - y N-Me). Un pequeño efecto puede detectarse también sobre el protón unido al carbono α del resto serinil.

TABLA 24

Desplazamientos químicos (δ , ppm a partir de DSS; $\pm 0,02$) y constantes de acoplamiento (J, Hz; $\pm 0,05$) de los protones de gougerotina ($8 \cdot 10^{-3}$ M en D_2O , $26^\circ C$) a distintos valores del pH.

$\delta \setminus$ pH	1,5	3,5	4,3	5,4	6,1	6,5	7,2	8,3	9,2	9,5	11,3
H5	6,32	6,31	6,22	6,11	6,12	6,12	6,12	6,10	6,10	6,12	6,11
H6	8,09	8,07	7,94	7,79	7,81	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80
H1'	5,76	5,76	5,75	5,73	5,74	5,74	5,74	5,73	5,73	5,75	5,70
H2'	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
H4'	4,10	4,10	4,11	4,09	4,10	4,09	4,08	4,08	4,08	4,10	4,07
H5'	4,22	4,21	4,20	4,18	4,18	4,18	4,18	4,19	4,18	4,19	4,18
H_α	--	--	--	4,56	4,56	4,55	4,54	4,53	--	--	4,52
H_β	3,87	3,86	3,87	3,86	3,87	3,85	3,85	3,86	--	3,86	3,85
$H_{\alpha'}$	3,99	3,99	3,99	3,97	3,94	3,82	3,78	3,52	3,37	3,36	3,34
NCH_3	2,79	2,79	2,78	2,78	2,75	2,67	2,65	2,45	2,34	2,34	2,32
J 56	8,1	8,2	7,9	7,7	7,5	7,6	7,8	7,5	--	--	7,8
J 1'2'	9,3	9,0	9,0	9,0	8,4	9,2	9,4	9,3	--	--	9,0
J $ \alpha\beta+\alpha\beta' $	--	--	--	10,5	10,8	10,2	10,8	--	--	--	--

GOUGEROTINA

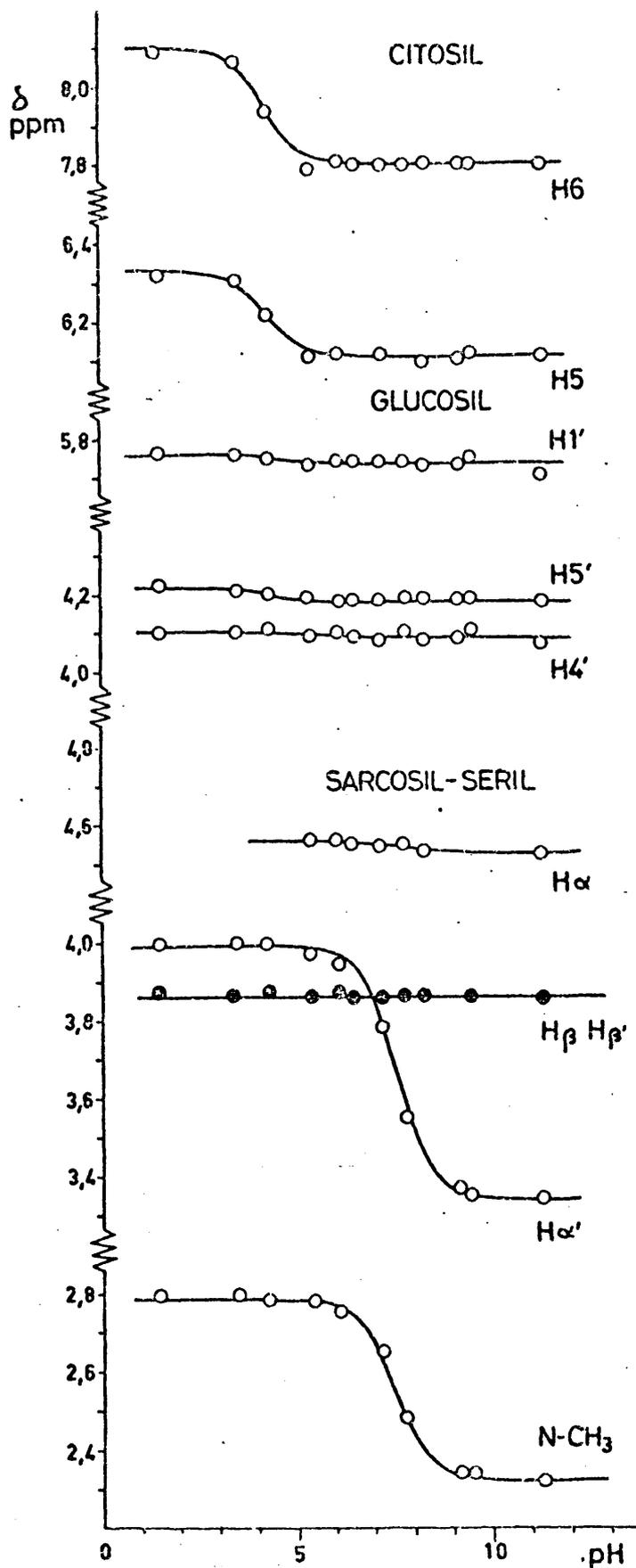


Figura 10. Variación con el pH de los desplazamientos químicos de ^1H de gougerotina, $8 \cdot 10^{-3}\text{M}$ en D_2O , a 26°C .

TABLA 25

Valores de los pK deducidos de las curvas de titulación y desplazamientos químicos debidos a la protonación (δ_1 y δ_2)
 $8,3 \cdot 10^{-3}$ M

δ	pK ₁	δ_1	pK ₂	δ_2
H5	4,3	0,21	--	--
H6	4,3	0,29	--	--
H1'	4,3	0,03	--	--
H2'	--	--	--	--
H3'	--	--	--	--
H4'	4,3	0,01	--	--
H5'	4,3	0,04	--	--
H _{α}	--	--	7,6	0,04
H _{β}	--	--	--	--
H _{α} '	--	--	7,6	0,65
NCH ₃	--	--	7,6	0,47

Valores de
 pK finales 4,3 7,6

II.3.5.- Espectros en dimetilsulfóxido-d₆.

Se han realizado espectros del hidrocioruro de gougertina en disolución de dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO), $9,1 \cdot 10^{-3}$ M, a dos temperaturas, 26°C y 68°C. En el espectro a 26°C, además de las señales ya observadas en el espectro en disolución de D₂O, se obtienen las señales de los protones de los tres grupos amida y la del grupo -NH₂ en C4 del resto citidilo. La señal a más bajo campo (δ 8,29, doblete J = 8,2 Hz) se asigna al protón del grupo amida del resto serinil, pues al irradiar en esta posición con una segunda fuente, se observa una coalescencia en el multiplete a δ 4,34 asignado al protón H_α, con el que se encuentra en una situación vecinal. El multiplete con centro en δ 7,97, ha de asignarse al protón amida del resto 4'-aminoglucosil, ya que al irradiar en las proximidades de la señal del protón H4' (δ 3,8), se obtiene una coalescencia en δ 7,97. En ambos casos, los experimentos de doble irradiación se llevaron a cabo intercambiando las posiciones de las fuentes de observación e irradiación, confirmándose consistentemente las conclusiones obtenidas.

Con centro en δ 7,22 se obtiene una señal ancha (13 Hz) con intensidad correspondiente a cuatro protones. Esta señal ha de asignarse a los protones del grupo amida en C5' y a los del grupo -NH₂ en C4 del citidilo, cuyo intercambio con los protones del H₂O que acompaña al DMSO ha de ser más lento que el correspondiente a los protones unidos al átomo de nitrógeno (amina) del resto sarcosilo. La

señal correspondiente a estos protones se identifica entonces con la del H_2O , de donde se deduce que ambos se encuentran en un rápido equilibrio de intercambio.

También se observan en este espectro las señales correspondientes a los grupos hidroxilo en $C2'$, $C3'$ y C_β (serinil). La señal a δ 5,33 con apariencia de triplete ensanchado ($J=3,6$) corresponde al OH en el C_β (serinil), pues éste átomo de carbono es el único de los tres que soporta dos protones. La asignación concreta de las otras dos señales (δ 4,88 y δ 5,11) a los protones de los grupos hidroxilo en $C2'$ y $C3'$ no puede determinarse.

Con relación al espectro en disolución de D_2O , en general, todas las señales muestran un desplazamiento a alto campo, comprendido entre 0,02 ppm ($H6$ del citidilo) y 0,53 ppm ($-C_\alpha, H_2-$ del resto sarcosilo). Los protones más afectados son el $H5$ de la base y los protones en α al átomo de nitrógeno del grupo sarcosilo. Ello parece indicar que al cambiar el disolvente se alteran principalmente las concentraciones relativas de la forma amino y de la forma protonada del sarcosilo. Asimismo, en el resto citidilo, parece alterarse la cinética de rotación del grupo $-NH_2$ exocíclico, o bien la posición del equilibrio entre formas tautoméricas de la base.

Al aumentar la temperatura, las variaciones que se observan en los desplazamientos químicos de los protones unidos a átomos de carbono, son menores que el error experimental. Todas las señales observadas correspondientes a

protones unidos a heteroátomos (O ó N) se desplazan a campo alto, indicando de forma cualitativa la rotura de enlaces de hidrógeno y el enriquecimiento proporcional de formas no asociadas.

Las señales a δ 8,29, 5,33, 5,11 y una componente (2 protones) de la señal a δ 7,22 se ensanchan al aumentar la temperatura, indicando que estos protones, a temperatura ambiente, se encuentran en una situación de intercambio lento. La señal a δ 7,97 (protón amida del grupo 4'-amino-glucosil), no sufre modificaciones en su anchura, indicando que, a 68°C continúa en esa situación. Por último, una segunda componente de la señal a δ 7,22, correspondiente a dos protones, y asignable a los protones del grupo -NH_2 del resto citidilo, sufre un estrechamiento al aumentar la temperatura. Ello indica que tales protones, a temperatura ambiente, se encuentran en un proceso de equilibrio rápido (probablemente el de rotación en torno al enlace exocíclico C4-N4).

TABLA 26

Espectros de ^1H (en ppm referidas a DSS $\pm 0,02$ ppm) del hidrocloreto de gougertina en disolución de dimetilsulfóxido- d_6 ($9,1 \cdot 10^{-3}$ M).

δ (DSS)	26°	68°	D ₂ O
H5	5,76	5,78	6,11
H6	7,76	7,73	7,79
H1'	5,54	5,57	5,73
H2'	--	--	--
H3'	--	--	--
H4'	--	3,78	4,09
H5'	3,91	3,96	4,18
H $_{\alpha}$	4,34	4,36	4,56
H $_{\beta}$	--	3,64	3,87
H $_{\alpha}'$	3,47	3,48	3,97
NCH ₃	2,46	2,48	2,78
-CONH-(4'-aminoglucosil)	7,97	7,80	
-CONH-(serinil)	8,29	8,14	
-CONH ₂ (glucosil)	7,22	7,07	
-NH ₂ (citidil)	7,22	7,07	
-C $_{\beta}$ H ₂ OH	5,33	5,08	
C2'-OH	5,11, 4,88	4,74	
C3'-OH			
J (Hz)			
J ₁₂	8,7	8,8	9,0
J ₅₆	7,5	7,5	7,5
J _{H$_{\beta}$aOH}	3,0	--	--
J _{H$_{\beta}$bOH}	4,2	--	--
J _{NH-C4'H}	7,5	--	--
J _{NH-C$_{\alpha}$H}	8,2	--	--
J _{$_{\alpha}\beta$a} + J _{$_{\alpha}\beta$b}	--	10,5	10,6

II.3.6.- Tiempos de relajación T_1 .

Se han medido los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , de los protones del hidrocloreuro de gougerotina (disolución en D_2O , 0,12 M, pH=5,4, 26°C), siguiendo el método de pulsos $180^\circ-\tau-90^\circ$, descrito en II.1.5. En la Tabla 27 se dan las medidas de $((A_\infty - A_\tau)/A_\infty)$, en donde los correspondientes valores de A se han medido en cm, para distintos valores de τ . En la columna final de la Tabla se dan los resultados del ajuste por mínimos cuadrados y los valores resultantes para los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , junto con los errores estandar de ajuste. A cada medida se asignó un peso, que fue el valor de $(A_\infty - A_\tau)$, por corresponder éste al error absoluto de cada medida del $\log ((A_\infty - A_\tau)/A_\infty)$.

TABLA 27

Medidas de tiempos de relajación longitudinal protonicos (T_1), para una disolución 0,12 M en D_2O , pH=5,4, a 26°C, del hidrocloreuro de gougerotina.

$((A_\infty - A_\tau)/A_\infty) \setminus \tau(s)$	0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	$T_1 (s)$	σ
H5	2,0	1,62	1,44	1,09	0,82	-	0,44	0,06
H6	2,0	1,77	1,33	0,92	0,56	0,10	0,28	0,02
H1'	2,0	1,47	1,20	0,95	0,48	0,12	0,29	0,02
H2'	-	-	-	-	-	-	-	-
H3'	-	-	-	-	-	-	-	-
H4'+H5'	2,0	-	1,35	1,18	0,67	0,28	0,40	0,03
H $_\alpha$	-	-	-	-	-	-	-	-
H $_\beta$	2,0	1,72	1,19	0,81	0,53	0,17	0,31	0,03
H $_{\alpha'}$	2,0	1,33	1,36	0,89	0,62	-	0,34	0,06
NCH $_3$	2,0	2,0	1,61	1,57	0,95	0,45	0,53	0,04

II.4. Espectros de ^{13}C de puromicina y gougerotina. Resultados y Asignación

II.4.1.- Puromicina.

El espectro de RMN de ^{13}C , a 22,63 MHz, del dihidrocloruro de puromicina, en disolución 0,18 M en D_2O , pH 2,5 y 26°C de temperatura, se muestra en la figura 11. En la Tabla 28 se consignan los desplazamientos químicos de ^{13}C (en abundancia natural) a diferentes pH, la multiplicidad de cada señal debida a acoplamientos directos, $^1J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$, y el valor de estas constantes. Los desplazamientos químicos se dan en la Tabla con referencia al TMS. Se incluyen también los valores de los tiempos de relajación, T_1 , así como la asignación propuesta teniendo en cuenta todos estos datos.

En la Tabla 29 se comparan los desplazamientos químicos de la puromicina, en sus formas de dicatión y catión, con valores tomados como modelo, que han sido escogidos de moléculas análogas (36 y 38). En la Tabla 30 se comparan los desplazamientos químicos que sufren los carbonos de los restos N,N-dimetil-adenil y ribosil cuando se protona la base, con los que tienen lugar en las mismas condiciones en moléculas análogas (37). Del mismo modo, en la Tabla 31 se comparan las constantes de acoplamiento a través de un enlace, $^1J_{^{13}\text{C}-^1\text{H}}$, observadas para el dicatión, con valores seleccionados de moléculas análogas (39 y 40).

La asignación de señales a núcleos concretos de ^{13}C se ha basado en los siguientes criterios: a) desplazamientos

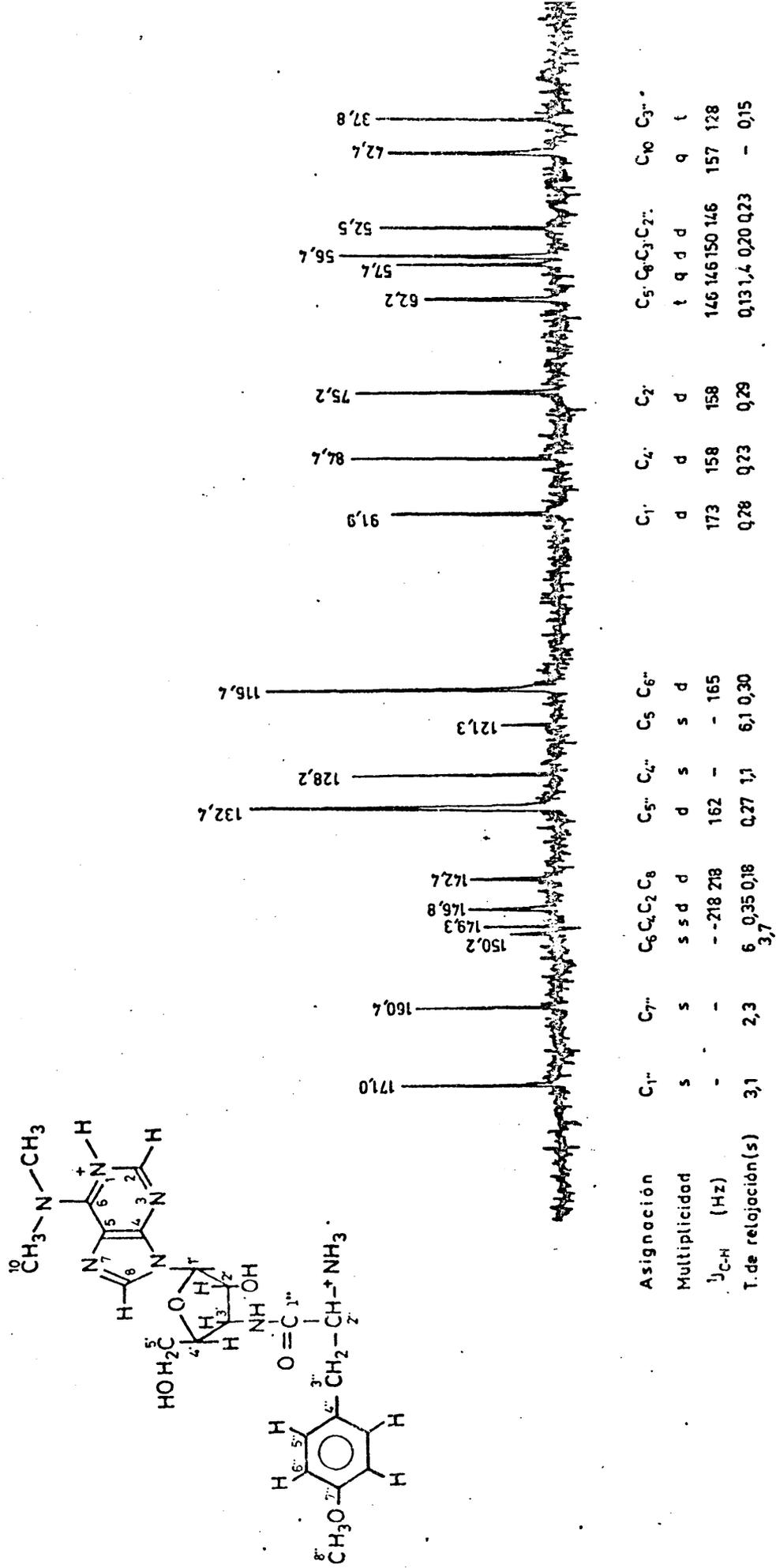


Figura 11. Espectro de RMN de ¹³C, a 22,63 MHz, del dihidrocloruro de puromicina, 0,18 M en D₂O, a 2

155
TABLA 28

Desplazamientos químicos de ^{13}C (δ , ppm respecto a TMS; $\pm 0,5$), constantes de acoplamiento $^{13}\text{C-H}$ (J, Hz; ± 1) y tiempos de relajación longitudinal de ^{13}C (T_1 , s) de puromicina (0,18 M en D_2O).

	δ			Mult ^{a)}	1J	T_1	Asignación
	pH 2,5	pH 3,8	pH 5,5				
171,0	171,5	171,3	s	-	3,1 $\pm 0,2$	C1"	
160,4	160,5	160,5	s	-	2,3 $\pm 0,8$	C7"	
150,2	154,2	155,7	s	-	6 ± 1	C6	
149,3	150,1	150,2	s	-	3,7 $\pm 0,2$	C4	
146,8	151,7	153,6	d	217	0,35 $\pm 0,01$	C2	
142,4	140,8	139,8	d	219	0,18 $\pm 0,05$	C8	
132,4	133,1	132,7	d	161	0,27 $\pm 0,02$	C5"	
128,2	128,5	128,3	s	-	1,1 $\pm 0,1$	C4"	
121,3	120,8	120,8	s	-	6,1 $\pm 0,8$	C5	
116,4	116,9	116,6	d	164	0,30 $\pm 0,02$	C6"	
91,9	91,8	91,5	d	172	0,28 $\pm 0,05$	C1'	
84,4	84,9	84,7	d	157	0,23 $\pm 0,03$	C4'	
75,2	75,6	75,4	d	157	0,29 $\pm 0,01$	C2'	
62,2	63,0	62,9	t	146	0,13 $\pm 0,01$	C5'	
57,4	57,9	57,7	c	146	1,4 $\pm 0,2$	C8"	
56,4	57,1	56,6	d	150	0,20 $\pm 0,02$	C3'	
52,5	53,2	53,0	d	146	0,23 $\pm 0,02$	C2"	
42,4	42,0	41,1	c	156	---	C10	
37,8	38,5	38,6	t	131	0,15 $\pm 0,02$	C3"	

a) Multiplicidad: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete

químicos de moléculas análogas; b) multiplicidad debida a los acoplamientos directos $^{13}\text{C}-^1\text{H}$; c) tiempos de relajación T_1 de ^{13}C y d) desplazamientos químicos por protonación.

El espectro de ^{13}C del dihidrocloruro de puromicina puede dividirse en dos zonas bien diferenciadas (figura 11): la zona a bajo campo, que incluye al carbono carbonílico y a los carbonos aromáticos y la zona a alto campo que incluye a los restantes núcleos de carbono de la molécula.

En la zona a bajo campo, el carbono carbonílico se asigna inequívocamente a la señal a δ 171,0 por su desplazamiento químico grande, por no mostrar desdoblamiento debidos a protones directamente unidos y por su tiempo de relajación relativamente grande. De los carbonos del anillo bencénico, dos de ellos no presentan acoplamiento con protón ($\text{C4}''$ y $\text{C7}''$). La señal de entre ellas que aparece a campo más bajo (δ 160,4) se asigna a $\text{C7}''$, que soporta al grupo metoxilo, y la otra, que aparece a δ 128,2, se asigna a $\text{C4}''$. Los tiempos de relajación de estas señales son consecuentes con su asignación a carbonos no protonados. Las dos señales de mayor intensidad del espectro, que se sitúan dentro de esta zona, se asignan a los carbonos $\text{C5}''$ y $\text{C6}''$, correspondiendo cada señal a dos carbonos equivalentes. Ambas señales aparecen como dobletes en el espectro sin irradiación de protón, ajustándose el valor de $^1J_{^{13}\text{C}-\text{H}}$ al esperado para carbonos aromáticos. Asimismo, sus tiempos de relajación son casi un orden de magnitud menores que los cuaternarios,

lo que confirma de nuevo su asignación. Por su desplazamiento químico, la señal a δ 116,4 ha de asignarse a los carbonos en orto al grupo metoxilo y la señal a δ 132,4 a los protones meta.

Las restantes señales de esta zona se asignan a los carbonos del resto N,N-dimetil-adenil. La señal a más alto campo de entre ellas, δ 121,3, se asigna a C5. Esta asignación se basa en la multiplicidad de dicha señal en el espectro sin irradiación de ^1H , en su gran tiempo de relajación y en el hecho bien conocido (41) de ser el carbono C5 el de mayor densidad electrónica Π del anillo de purina. De las cuatro señales restantes, dos de ellas se muestran como dobletes en el espectro sin irradiación de ^1H y las otras dos como singletes (respecto al acoplamiento directo $^1\text{J}_{13\text{CH}}$). Las dos primeras han de asignarse, pues, a los carbonos C2 y C8. La atribución definitiva de C2 a la señal a δ 146,8 se basa en el gran desplazamiento a bajo campo que sufre dicha señal al desprotonarse la base en N1. Este mismo criterio se utiliza también en la asignación de C6 a la señal a δ 155,7 en el espectro correspondiente al monoclóruo (base desprotonada). La asignación específica de C4 y C6 a las señales a δ 150,2 y δ 149,3 en el espectro del dicloruro (base protonada) no puede hacerse con toda seguridad. La estructura de los multipletes observados en el espectro sin irradiación de ^1H (debidos a acoplamientos $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ a través de más de un enlace) favorecen la asignación propuesta en la Tabla 28, si bien los datos de desplazamiento por protonación parecen apoyar la asignación inversa.

TABLA 29

Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C (δ , ppm respecto a TMS; $\pm 0,5$) del di- (pH 2,5) y mono- (pH 5,5) hidrocloreuro de puromicina (0,18M en D_2O) con los de moléculas análogas.

	2ClH Puromicina (pH 2,5)			ClH Puromicina (pH 5,5)		
	$\delta_{\text{modelo}}^{\text{a)}$	δ_{obs}	$\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{modelo}}^{\text{a)}$	δ_{obs}	$\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{mod}}$
C2	146,5	146,8	0,3	152,9	153,6	0,7
C4	151,9	149,3	-2,6	150,0	150,2	0,2
C5	121,9	121,3	-0,6	121,8	121,0	-0,8
C6	149,2	150,2	1,0	156,1	155,7	-0,4
C8	141,1	142,4	1,3	139,6	139,8	0,2
C10	-	42,4	-	37,8	41,1	3,3
C1'	91,7	91,9	0,2	90,8	91,5	0,7
C2'	73,5	75,2	1,7	73,4	75,4	2,0
C3'	56,5	56,4	-0,1	55,9	56,6	0,7
C4'	88,6	84,4	-4,2	88,4	84,7	-3,7
C5'	64,6	62,2	-2,4	64,5	62,9	-1,6
C1''	171,2	171,0	-0,2	171,2	171,3	0,1
C2''	55,6	52,5	-3,1	55,6	53,0	-2,6
C3''	37,2	37,8	0,6	37,2	38,6	1,4
C4''	128,4	128,2	-0,2	128,4	128,3	-0,1
C5''	131,4	132,4	1,0	131,4	132,7	1,3
C6''	116,4	116,4	0,0	116,4	116,6	0,2
C7''	160,6	160,4	-0,2	160,6	160,5	-0,1
C8''	57,3	57,4	0,1	57,3	57,7	0,4

a) Los desplazamientos químicos de ^{13}C de la base se evaluaron a partir de los de la 6-N,N-dimetil-adenosina (36) corregidos (pH 2,5) o no (pH 5,5) con los desplazamientos por protonación del ATP (37). Los de la ribosa, se corrigieron por la introducción de un grupo $-\text{NH}_2$ en C3' en lugar del sustituyente $-\text{OH}$ (36). Los del resto OMe-tirosinil se evaluaron corrigiendo los de la tirosina por la metilación del grupo fenólico y por la formación de la amida (38).

TABLA 30

Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C (en ppm) por protonación, $\Delta\equiv(\delta_{\text{Ad}^+}-\delta_{\text{Ad}})$, del resto N,N-diMe-adenil en puromicina con el de moléculas análogas (37)

	Δ_{modelo}	Δ_{obs}	$\Delta_{\text{obs}}-\Delta_{\text{modelo}}$
C2	-6,4	-7,8	-0,4
C4	1,9	-0,9	-2,8
C5	0,1	0,3	0,2
C6	-6,9	-5,5	1,4
C8	1,5	2,6	1,1
C10	-	1,3	-
C1'	1,1	0,4	-0,7
C2'	0,0	-0,2	-0,2
C3'	0,6	-0,6	-1,2
C4'	0,2	-0,5	-0,7
C5'	0,1	-0,8	-0,9

TABLA 31

Comparación de las constantes de acoplamiento (en Hz) $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ($^1J, \text{Hz}; \pm 1$) del dihidrocloruro de puromicina (0,18M en D_2O , pH 2,5) con las de moléculas análogas

	$^1J_{\text{modelo}}^{\text{a)}$	$^1J_{\text{obs}}$
C2	214	217
C8	219	219
C10	-	156
C1'	173	172
C2'	154	157
C3'	152	150
C4'	154	157
C5'	144	146
C2''	148	146
C3''	129	131
C5''	158	161
C6''	160	164
C8''	-	146

a) Desplazamientos químicos del aminonucleósido de puromicina de tirosina.

En la zona a alto campo (figura 11) las señales correspondientes al resto ribosil son fácilmente asignables, basándose en la abundante bibliografía existente al respecto. La señal correspondiente al C5' se distingue fácilmente por su multiplicidad (tripleto), su tiempo de relajación y su valor de $^1J_{13CH}$ ligeramente menor que el de los restantes carbonos del azúcar. Las señales correspondientes a C2", C3", OCH_3 y $N(CH_3)_2$ se asignan fácilmente basándose en su desplazamiento químico y multiplicidad.

Con respecto a los tiempos de relajación, pueden observarse dos grupos de señales, las de tiempo de relajación pequeño (<0,5 s) y las de tiempo de relajación grande (>1 s). Las primeras corresponden a los carbonos con protones enlazados. Para estos carbonos, es claro que el mecanismo de relajación predominante ha de ser el acoplamiento magnético dipolar. Los valores de los tiempos de relajación son prácticamente iguales para los carbonos unidos a un solo protón, mientras que los unidos a dos protones muestran un valor cercano a la mitad del de los anteriores. Todo ello parece indicar que la molécula se mueve globalmente en un proceso de difusión rotacional con un mismo tiempo de correlación. El carbono del grupo metoxilo (C8") y los carbonos del grupo $N-(CH_3)_2$ muestran tiempos de relajación más elevados, lo que es compatible con la existencia de un proceso de rotación interna en torno a los enlaces exocíclicos con un tiempo de correlación más pequeño. Los valores observados para los tiempos de relajación de puro micina, concuerdan razonablemente con los de moléculas análogas (44).

De la comparación que se realiza en la Tabla 29 entre los desplazamientos químicos del mono- y di-hidrocioruro de puromicina con los de moléculas análogas, puede concluirse que, en general, el acuerdo es satisfactorio. Existen unos pocos núcleos de carbono (C10, C4' y C2") para los que las desviaciones son mayores que 3 ppm. Estas desviaciones pueden razonablemente atribuirse a deficiencias del modelo elegido. Conclusiones similares pueden deducirse del exámen de las Tablas 30 y 31, en las que se comparan los desplazamientos químicos por protonación y los acoplamientos $^1J_{^{13}\text{C-H}}$ con los de moléculas análogas.

II.4.2.- Gougerotina.

En las Tablas 32 a 35 se dan para la gougerotina datos análogos a los dados en las Tablas 28 a 31 para la puromicina. Estos datos incluyen desplazamientos químicos de ^{13}C , constantes de acoplamiento $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ y tiempos de relajación T_1 de ^{13}C . Asimismo, se incluye en estas Tablas la asignación completa del espectro de ^{13}C a varios pH.

Al igual que en el caso anterior y, con fines expositivos, podemos dividir el espectro en dos zonas: la zona a bajo campo que incluye a los carbonos carbonílicos y a los del resto citidilo (excepto C5); y la zona a alto campo que incluye a los restantes carbonos, (figura 12).

Dentro de la zona a bajo campo, la señal a δ 143,4 (pH 7,0) es fácilmente asignable a C6 por su estructura de doblete en el espectro sin irradiación de ^1H . Asimismo, la señal a δ 159,4 se asigna a C2 por su desplazamiento químico

140

y la magnitud y el sentido de su corrimiento por protonación del resto citidilo en N3. De las cuatro señales restantes en esta zona (todas singletes) la situada a δ 167,5 sufre un pequeño corrimiento al protonarse el resto citidilo y la que se encuentra a δ 170,2 lo hace al protonarse el grupo amino del resto sarcosilo, permaneciendo invariables las situadas a δ 173,3. En consecuencia, la primera señal ha de asignarse a C4, la segunda al carbonilo del resto sarcosilo (C4") y las dos últimas a los carbonilos del resto serinil (C1") y al del grupo amida (C6') unido a C5'.

En la zona a alto campo, la señal a δ 98,8 es de asignación inmediata a C5 por su posición, desdoblamiento y por el valor del acoplamiento directo.

De entre los carbonos del resto glucosil, C1' y C4' se asignan fácilmente por su posición. El primero a bajo campo (carbono anómero) y el segundo a más alto campo que el resto de los carbonos del anillo, debido a que su sustituyente es N y no O. Las señales intermedias se asignan a C3', C2' y C5', por este orden, de bajo a alto campo, como es regla en otros β -glucósidos.

La señal a δ 63,2 aparece como triplete en el espectro desacoplado de ^1H , por lo que su asignación al carbono β del resto serinil (C3"), que soporta dos protones, es inmediata. Un razonamiento análogo puede aplicarse a la señal a δ 35,3 (cuartete) que ha de asignarse al $-\text{NCH}_3$ terminal del resto sarcosilo (C6"). La señal a δ 51,6 (pH 5,4) desaparece a valores superiores del pH, como consecuencia

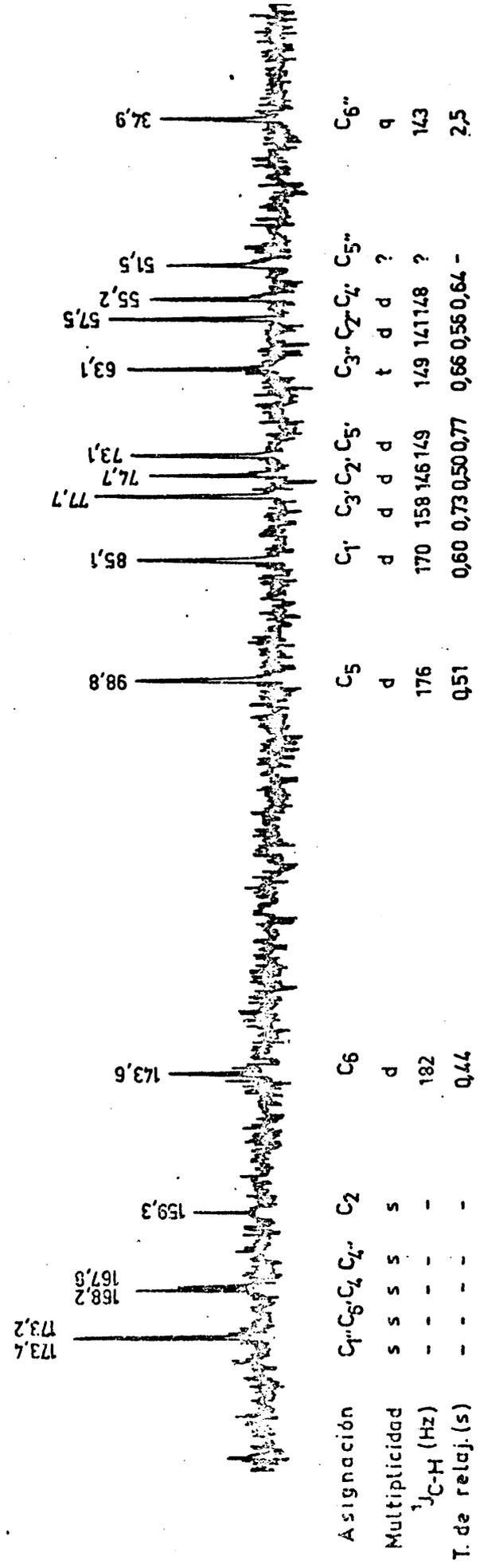
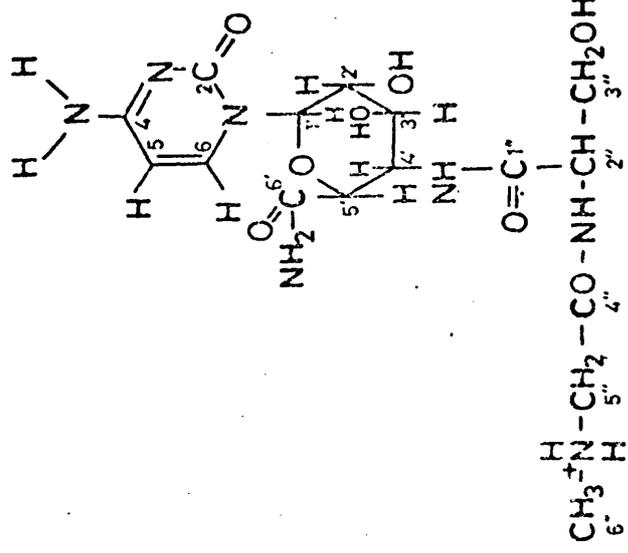


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C , a 22,63 MHz, del hidrocloreto de gougertina, 0,12 M en D₂O, a 26

TABLA 32

Desplazamientos químicos de ^{13}C (δ , ppm respecto a TMS; $\pm 0,05$), constantes de acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (^1J , Hz; ± 1) y tiempos de relajación longitudinal de ^{13}C (T_1 , s) de gougerotina (0,12M en D_2O , 26°C)

	pH				Mult ^{a)}	^1J (pH=5,4)	T_1	Asig- nación
	1,0	5,4	7,0	12,5				
174,1	173,3	173,3	-	s	-		C6'	
173,8	173,3	173,3	-	s	-		C1''	
161,4	167,8	167,5	-	s	-		C4	
168,7	168,2	170,2	-	s	-		C4''	
150,8	159,3	159,4	-	s	-		C2	
146,6	143,6	143,4	143,9	d	182	0,44 \pm 0,01	C6	
98,5	98,8	98,8	99,1	d	176	0,51 \pm 0,04	C5	
85,1	85,1	85,1	85,2	d	170	0,60 \pm 0,07	C1'	
78,1	77,7	77,8	80,2	d	158	0,73 \pm 0,05	C3'	
75,2	74,7	75,3	76,2	d	146	0,50 \pm 0,04	C2'	
73,7	73,1	73,1	74,1	d	149	0,77 \pm 0,06	C5'	
63,5	63,1	63,2	63,6	t	149	0,66 \pm 0,17	C3''	
58,0	57,5	57,5	56,5	d	141	0,56 \pm 0,13	C2''	
55,4	55,2	55,2	55,3	d	148	0,64 \pm 0,04	C4'	
51,6	51,5	-	-	-	-	---	C5''	
35,0	34,9	35,3	36,8	c	143	2,5 \pm 0,5	C6''	

TABLA 33

Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C (δ , ppm respecto a TMS; $\pm 0,5$) del di- (pH 1,5) y mono- (pH 5,4) hidrocloreuro de gougerotina (0,12 M en D_2O) con los de moléculas análogas

	2ClH Gougerotina (pH 1,5)			ClH Gougerotina (pH 5,4)		
	$\delta_{\text{modelo}}^{\text{a)}$	δ_{obs}	$\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{modelo}}^{\text{a)}$	δ_{obs}	$\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{mod}}$
C2	150,4	150,8	0,4	160,0	159,4	0,6
C4	161,4	161,4	0,0	168,8	167,5	-1,3
C5	97,3	98,5	1,2	98,6	98,8	0,2
C6	146,7	146,6	-0,1	144,3	143,4	0,1
C1'	90,7	85,1	-5,6	90,1	85,1	-5,0
C2'	75,2	75,2	0,0	76,4	75,3	-1,1
C3'	73,1	78,1	5,0	73,1	77,8	4,7
C4'	54,3	55,4	1,1	54,3	55,2	0,9
C5'	76,6	73,7	-2,9	76,6	73,1	-3,5
C6'	176,7	174,1	-2,6	176,7	173,3	-3,4
C1''	171,1	173,8	2,7	171,1	173,3	2,2
C2''	55,4	58,0	2,6	55,4	57,5	2,1
C3''	61,0	63,5	2,5	61,0	63,2	2,2
C4''	172,6	168,7	-3,5	172,6	170,2	-2,4
C5''	52,7	51,6	-1,1	52,7	--	-
C6''	33,7	35,0	1,3	33,7	35,3	1,6

a) Los desplazamientos químicos de ^{13}C de la base se evaluaron a partir de los de la citidina corregidos (pH 1,5) o no (pH 5,4) con los desplazamientos por protonación del CMP (37). Los del azúcar se evaluaron a partir de los de -glucosa y se corrigieron por la introducción de grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{CONH}_2$ en C4' y C5' (36 y 42). Los del dipeptido se obtuvieron a partir de los de glicil-serina, corrigiendo por la formación de amida (serinil) y la introducción de un grupo $-\text{CH}_3$ en el C_α del resto glicil (12 y 38).

TABLA 34

Comparación de los desplazamientos químicos (en ppm) de ^{13}C por protonación, ($\Delta \equiv \delta_{\text{cy}} + \delta_{\text{cy}}$), de los núcleos del resto citidil en gougerotina con los de moléculas análogas

	Δ_{modelo}	Δ_{obs}	$\Delta_{\text{obs}} - \Delta_{\text{modelo}}$
C2	-9,6	-8,6	1,0
C4	-7,4	-6,1	1,3
C5	-1,3	-0,3	1,0
C6	+2,4	3,2	0,8
C1'	-0,2	0,0	0,2

TABLA 35

Comparación de las constantes de acoplamiento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (^1J , Hz; ± 1) del hidrocloreuro de gougerotina (0,12M en D_2O , pH 2,5) con los de moléculas análogas (42 y 43).

	$^1\text{J}_{\text{modelo}}$	$^1\text{J}_{\text{obs}}$
C5	183	176
C6	186	182
C1'	-	170
C2'	145	146
C3'	160	158
C4'	-	148
C5'	-	149
C2''	141	141
C3''	142	149
C6''	145	143

del intercambio de H por D que tiene lugar en el carbono α del resto sarcosilo, proceso que se observa claramente en el espectro de ^1H . Dicha señal se asigna, pues, a C5".
Queda finalmente la señal a δ 57,5 que se asigna, por exclusión, al carbono α del resto sarcosilo (C2") para el que es de esperar un desplazamiento químico cercano al observado.

Respecto a los tiempos de relajación, se han medido sólo los inferiores a 3 segundos, ya que, debido a la pequeña solubilidad del antibiótico, los tiempos de medida correspondientes a $T_1 > 3\text{s}$, son prohibitivos (~ 2 semanas). Los tiempos de relajación medidos, si exceptuamos el del grupo $-\text{NCH}_3$ terminal, presentan todos aproximadamente el mismo valor, comprendidos entre 0,4 y 0,8 seg.

II.5. Interacciones antibiótico-ribosoma

II.5.1.- Determinación de las constantes de asociación del número de sitios de ligadura y del factor de relajación.

En el capítulo I.3. se han expuesto las modificaciones que han de esperarse en el espectro de RMN de una molécula pequeña cuando ésta interacciona con una macromolécula. En principio, y si nos limitamos a observar las señales del antibiótico libre, pueden esperarse variaciones en tres de los parámetros magnéticos que caracterizan a cada una de ellas: frecuencia de resonancia, tiempo de relajación T_2 y tiempo de relajación T_1 . Por ser la anchura de la señal ($\Delta w = 1/\pi T_2$) el parámetro que muestra mayores variaciones en este tipo de estudios, referiremos nuestra discusión a este parámetro. La expresión {I.3.15} de I.3. nos proporciona la variación del exceso de la anchura observada ($1/\pi T_{2p}$) con la fracción molar de antibiótico ligado, P_M , y los parámetros ($1/T_{2M}$), ($1/\tau_M$) y $\Delta\omega_M$. Estos tres últimos no dependen de las concentraciones iniciales, por lo que, a efectos de estudiar la variación de anchuras respecto a estas variables, la anterior ecuación puede expresarse como,

$$(1/T_{2p}) = P_M \Delta^* \quad \{\text{II.5.1}\}$$

donde Δ^* , o factor de relajación, es todo lo que multiplica a P_M en la expresión {I.3.15} de I.3.

Si llamamos A_0 y R_0 a las concentraciones inicia-

les de antibiótico y ribosoma, respectivamente, y suponemos que el ribosoma tiene n sitios independientes de ligadura respecto al antibiótico con una misma constante de afinidad K_A , ésta viene expresada por

$$K_A = \frac{[AS]}{[A][S]}$$

en donde las concentraciones $[A]$, $[S]$ y $[AS]$ son las correspondientes al equilibrio, $[S]$ es la concentración de sitios libres y $[AS]$ es la concentración de sitios en los que se encuentra ligado el antibiótico. La fracción molar de antibiótico ligado, P_M , será entonces,

$$P_M = \frac{[AS]}{[A_0]} \quad \text{\{II.5.2\}}$$

En función de la concentración de $[AS]$ y de las concentraciones iniciales, la expresión de la constante de equilibrio queda:

$$K_A \equiv \frac{1}{K_D} = \frac{[AS]}{([A_0] - [AS])(n[R_0] - [AS])}$$

donde K_D es la constante de disociación del complejo $[AS]$.

La anterior expresión puede resolverse para $[AS]$

dando:

$$[AS] = \frac{([A_0] + [nR_0] + K_D) - \sqrt{([A_0] + n[R_0] + K_D)^2 - 4n[R_0][A_0]}}{2}$$

que, para efectos de cálculo, es más conveniente expresar como:

$$[AS] = \frac{2n[R_0][A_0]}{([A_0] + n[R_0] + K_D) + \sqrt{([A_0] + n[R_0] + K_D)^2 - 4n[R_0][A_0]}} \quad \text{\{II.5.3\}}$$

Para la interacción de nuestro interés, por la que el antibiótico se liga al centro peptidil-transferasa del ribosoma, $n=1$ y $K_A > 10^4 M^{-1}$. Asimismo, el rango de concentraciones accesible instrumentalmente es $[A_0] \sim 10^{-3}$ y $[R_0] \sim 10^{-6}$. Con todo ello, la expresión de $[AS]$ queda en buena aproximación,

$$[AS] = \frac{[R_0][A_0]}{[A_0] + K_D} \quad \text{\{II.5.4\}}$$

y si $K_D \ll [A_0]$,

$$[AS] \approx [R_0]$$

es decir, si la constante de asociación es muy grande, todos los ribosomas tendrán ligada a una molécula de antibiótico.

Sustituyendo \{II.5.4\} en \{II.5.2\} y ésta en \{II.5.1\} y expresando ésta en función de las anchuras observadas, queda:

$$\pi \Delta w = \pi (w'_H - w_A) = (1/T_{2p}) = \frac{[R_0]}{[A_0] + K_D} \Delta^* \quad \text{\{II.5.5\}}$$

donde Δw es la diferencia entre la anchura de la línea observada, w'_H , y la correspondiente al antibiótico libre, w_A . Expresando \{II.5.5\} en la forma

$$\left(\frac{1}{\Delta w}\right) = \frac{[A_0]}{[R_0]\Delta} + \frac{[K_D]}{[R_0]\Delta} = \frac{1}{[R_0]\Delta} ([A_0] + K_D) \quad \text{\{II.5.6\}}$$

en donde se ha puesto $\Delta = \Delta^*/\pi$, una representación gráfica de los valores observados para $(1/\Delta w_i)$ para distintos valores de A_{0i} , manteniendo R_0 constante, nos proporcionará

una recta cuya intersección con el eje X da directamente el valor de K_D . Es claro que para ello A_0 ha de ser suficientemente pequeño para que $A_0 \sim K_D$, pues de otra forma la recta pasaría por el origen y sólo podría obtenerse para K_D un valor límite, $K_D \ll A_0$.

Como se verá más adelante, existen pruebas evidentes de que además del equilibrio de interacción del antibiótico con el centro peptidil-transferasa (caracterizado por $n_1=1$ y $K_1 > 10^3 \text{ M}^{-1}$) existe otra interacción con uno o varios sitios (n_2) del ribosoma, que supondremos equivalentes e independientes y con una constante de afinidad mucho menor (K_2).

La expresión de $(1/T_{2p})$ es ahora,

$$(1/T_{2p}) = P_{M1} \Delta_1^* + P_{M2} \Delta_2^* \quad \text{\{II.5.7\}}$$

Siempre que se cumpla la condición de que el intercambio directo entre los dos sitios no contribuya a la relajación (10). Los valores de P_{M1} y P_{M2} son:

$$P_{M1} = \frac{[AS]_1}{[A_0]} \quad \text{y} \quad P_{M2} = \frac{[AS]_2}{[A_0]}$$

donde $[AS]_1$ y $[AS]_2$ son, respectivamente, la concentración en el equilibrio de sitios llenos del tipo 1 y del tipo 2.

Las expresiones de las correspondientes constantes de equilibrio, que han de satisfacerse al alcanzarse éste, son:

$$K_1 = \frac{[AS]_1}{([A_0] - [AS]_1 - [AS]_2) (n_1 [R_0] - [AS]_1)}$$

y

$$K_2 = \frac{[AS]_2}{([A_0] - [AS]_1 - [AS]_2)(n_2[R_0] - [AS]_2)}$$

Despejando $[AS]_1$ de la primera ecuación y $[AS]_2$ de la segunda queda:

$$[AS]_1 = \frac{A}{B + \sqrt{B^2 - 2A}} \quad \text{(II.5.8)}$$

donde

$$A = 2n_1[R_0]([A_0] - [AS]_2)$$

$$B = ([A_0] - [AS]_2 + n_1[R_0] + K_{D1})$$

y

$$[AS]_2 = \frac{C}{D + \sqrt{D^2 - 2C}} \quad \text{(II.5.9)}$$

donde

$$C = 2n_2[R_0]([A_0] - [AS]_1)$$

$$D = ([A_0] - [AS]_1 + n_2[R_0] + K_{D2})$$

Este sistema de dos ecuaciones, una vez resuelto, nos permite conocer los valores de $[AS]_1$ y $[AS]_2$ a partir de valores dados de $[A_0]$, $[R_0]$, n_1 , n_2 , K_{D1} y K_{D2} .

Puede comprobarse fácilmente que, para el segundo equilibrio, si $K_{D2} \gg [A_0]$, $n_2[R_0]$, la ecuación (II.5.9) queda

$$[AS]_2 = \frac{n_2[R_0][A_0]}{K_{D2}}$$

y la contribución a la anchura de la línea de A correspondiente a este equilibrio es:

$$(1/T_{2p})' = \frac{n_2[R_0]}{K_{D2}} \Delta_2^*$$

es decir, es independiente de la concentración inicial de $[A_o]$ y depende sólo de la de $[R_o]$, lo cual se observa en nuestras medidas.

La ecuación que describe el exceso de anchura total observado es, para nuestro sistema, en una buena aproximación:

$$\Delta w = \frac{[R_o]}{[A_o]} \Delta_1 + \frac{n_2 [R_o]}{K_{D2}} \Delta_2 \quad \text{\{II.5.10\}}$$

que puede expresarse

$$\left(\frac{1}{\Delta w}\right) = \frac{[A_o]}{[R_o]} K_{D2} \frac{1}{\Delta_1 K_{D2} + [A_o] n_2 \Delta_2} \quad \text{\{II.5.11\}}$$

Una representación gráfica de los valores de $(1/\Delta w_1)$ obtenidos para distintos valores de $[A_{oi}]$ consta de dos partes bien diferenciadas. A pequeños valores de $[A_o]$, $(1/\Delta w)$ crece desde cero con una pendiente $(1/[R_o] \Delta_1)$, mientras que a mayores valores de $[A_o]$, $(1/\Delta w)$ permanece constante con un valor $(K_{D2} / [R_o] n_2 \Delta_2)$. Por tanto, si el intervalo de concentraciones de $[A_o]$ en que nos movemos es el correspondiente a esta segunda parte, sólo podremos obtener un valor para la relación $(K_{D2}/n_2 \Delta_2)$. Si, por el contrario, es posible instrumentalmente hacer alguna medida en la primera parte, a partir de ella puede obtenerse un valor para Δ_1 . En todo caso, y dado que para estar situados en la segunda región, ha de cumplirse que

$$\Delta_1 K_{D2} \ll [A_o] n_2 \Delta_2$$

es posible obtener un límite máximo para Δ_1 que será:

$$\Delta_1 \ll [A_{om}] \left(\frac{n_2 \Delta_2}{K_{D2}} \right)$$

siendo $[A_{om}]$ la mínima concentración de $[A_o]$ medida. La aplicación de la expresión {II.5.11} exige también que $K_{D2} \gg A_o$, lo que supone la existencia de un límite mínimo para K_{D2} , que es $K_{D2} \gg [A_{om}]$, donde $[A_{om}]$ es la concentración máxima utilizada de $[A_o]$. Asimismo $n_2 [R_o] \ll K_{D2}$, con lo que se obtiene también un límite superior para n_2 , que es $n_2 \ll K_{D2} / [R_{om}]$, siendo $[R_{om}]$ la concentración máxima utilizada de $[R_o]$.

En el caso de que la concentración de sitios del segundo tipo sea tan grande que $n_2 [R_o] \gg A_o, K_{D2}$, todo el antibiótico estaría ligado y la anchura Δw sería independiente tanto de $[A_o]$ como de $[R_o]$, lo que no ocurre.

Para el tratamiento del caso general, sin restricciones, de la existencia de dos equilibrios de interacción simultáneos entre una molécula pequeña y una macromolécula se ha confeccionado un programa de cálculo para ordenador que se describe en el capítulo siguiente. Todo lo descrito es igualmente aplicable para el parámetro $(1/T_1)$ sin más que cambiar en las correspondientes expresiones $(1/T_{2p})$ por $(1/T_{1p})$, siendo en este caso Δ^* el factor de relajación longitudinal que viene dado por la expresión {I.3.16} de I.3. Asimismo, también es aplicable al parámetro $\Delta v = \Delta \omega / 2\pi$ (véase {I.3.19} de I.4.), es decir, a los corrimientos de frecuencia observados al cambiar las concentraciones relativas de $[A_o]$ y $[R_o]$, siempre que nos encontramos en la región de intercambio rápido.

II.5.2.- Programa de cálculo.

Se ha escrito un programa de cálculo en FORTRAN IV para el tratamiento de datos de relajación o de frecuencia de las señales de RMN de una molécula pequeña, A, en presencia de una macromolécula, R, para distintas concentraciones relativas de éstas, suponiendo un modelo de interacción en el que existen dos constantes de afinidad, K_1 y K_2 , así como n_1 y n_2 sitios de cada uno de los dos tipos, respectivamente.

Los valores de K_1 , K_2 , n_1 , n_2 , Δ_1 y Δ_2 se ajustan por mínimos cuadrados, partiendo de un conjunto de valores iniciales. Estos se corrigen iterativamente hasta que las correcciones calculadas no producen ya cambios significativos en los datos calculados que se comparan con los observados.

El programa admite como entrada una serie de fichas, correspondientes a N experimentos, conteniendo las concentraciones iniciales de A, $[A_{0i}]$ y de R, $[R_{0i}]$, en donde i va desde 1 a N. También han de darse los excesos de anchura medidos, Δw_{1j} , para cada protón j de A ($j=1,n$) en cada experimento i. Asimismo se dan como entrada los valores iniciales de las incógnitas K_1 , K_2 , n_1 , n_2 , todas ellas comunes para todos los $n \times N$ puntos y los Δ_{1j} y Δ_{2j} correspondientes a cada protón. En el programa, se permite la opción de dejar fijas algunas de estas incógnitas y no considerarlas, por tanto, como tales, así como identificar algunas de ellas, como, por ejemplo, hacer iguales todas las Δ_{1j} .

Con los valores iniciales de K_1 , K_2 , n_1 , n_2 , $[A_{0i}]$ y $[R_{0i}]$ se resuelven las ecuaciones {II.5.8} y {II.5.9} para obtener $[AS]_{1i}$ y $[AS]_{2i}$, se calculan P_{M1i} y P_{M2i} y, utilizando los excesos de anchura, Δ_{1j} y Δ_{2j} correspondientes a cada protón, se calculan Δw_{ij}^{calc} , mediante {II.5.7}, que puede escribirse como

$$\Delta w_{ij}^{calc} = P_{M1i} \Delta_{1j} + P_{M2i} \Delta_{2j} \quad \text{\{II.5.12\}}$$

la suma de cuadrados de residuos es:

$$\phi = \sum_{m=1}^{N \times n} \epsilon_m^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^n (\Delta w_{ij}^{obs} - \Delta w_{ij}^{calc})^2$$

Se supone, entonces que, para entornos pequeños, el cambio de una incógnita, x_1 , produce cambios lineales en las anchuras calculadas,

$$\Delta(\Delta w_{ij}^{calc}) = \frac{\partial \Delta w_{ij}^{calc}}{\partial x_1} \Delta x_1 \quad \text{\{II.5.13\}}$$

El problema es, pues, encontrar los cambios, Δx_1 , que hay que introducir en las incógnitas para que las anchuras observada y calculada coincidan, es decir

$$\sum_1 \frac{\partial \Delta w_{ij}^{calc}}{\partial x_1} \Delta x_1 = (\Delta w_{ij}^{obs} - \Delta w_{ij}^{calc}) \quad \text{\{II.5.14\}}$$

Esta condición puede expresarse matricialmente como

$$\underline{DC} \underline{\Delta} = \underline{B}$$

donde \underline{DC} es la matriz de derivadas parciales que se obtienen por derivación de {II.5.12} junto con {II.5.8} y

{II.5.9}. $\underline{\Delta}$ el vector de correcciones y \underline{B} el vector de residuos. El procedimiento estandar de mínimos cuadrados para resolver $\underline{\Delta}$, consiste en formar las ecuaciones normales

$$\underline{DC}^+ \underline{DC} \underline{\Delta} = \underline{DC}^+ \underline{B} \quad \{\text{II.5.15}\}$$

en donde $\underline{DC}^+ \underline{DC}$ es una matriz real simétrica con determinante no nulo. El sistema de ecuaciones {II.5.15} posee la solución $\underline{\Delta}=0$ sólo si $\underline{DC}^+ \underline{B}=0$, es decir, si todos los residuos son nulos. Si $\underline{\Delta} \neq 0$, es necesario corregir el conjunto de parámetros y repetir el proceso. En la práctica, la situación $\underline{\Delta}=0$ es inalcanzable debido a los errores de medida con que vienen afectados los Δw_{ij} , con lo que el proceso de ajuste se interrumpe cuando la suma de los cuadrados de los residuos permanece constante en dos ciclos consecutivos.

Como salida, el programa proporciona los valores de las incógnitas, sus errores estandar, los vectores de error, es decir, aquellas combinaciones de incógnitas que conducen a errores máximo o mínimo y que es una expresión de las correlaciones existentes entre incógnitas, así como una tabla que incluye las anchuras observada y calculada, las desviaciones y la matriz de derivadas parciales $(\partial w_{ij} / \partial x_i)$.

El funcionamiento del programa se ha verificado utilizando un caso simulado, y los resultados se resumen en la Tabla 36. Con los valores de las incógnitas de la primera columna, y para distintas concentraciones de $[A_0]$

y $\{R_0\}$, comprendidas, respectivamente, en los intervalos $1 \cdot 10^{-3}$ - $10 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ - $10 \cdot 10^{-6}$ se calcularon los correspondientes valores de Δw . Estos se redondearon a la primera cifra decimal de Hz, por lo que su error de medida puede considerarse como $\pm 0,05$ Hz, y se adoptaron como valores experimentales. Partiendo de unos valores iniciales cualesquiera, el programa fue refinándolos y en un limitado número de iteraciones proporcionó los valores y errores de las incógnitas que se recogen en la Tabla 36. En principio, se mantuvieron fijas las incógnitas correspondientes al primer equilibrio (columna 1) y, posteriormente, se fueron dejando algunas de ellas libres, obteniéndose una solución satisfactoria sólo cuando se mantienen fijas K_1 y n_1 o bien K_1 y Δ_1 . La independencia del sistema frente a K_1 era de preveer, pues voluntariamente se ha fijado como límite mínimo de la concentración de A, $1 \cdot 10^{-3} \ll 2,5 \cdot 10^5$. La bondad de los valores obtenidos para las incógnitas depende mucho también, como puede verse en las columnas 5 y 6, de la precisión de las medidas.

TABLA 36

Verificación del programa RIBO para la determinación de constantes de asociación, número de sitios y factores de relajación en equilibrios de interacción antibiótico-ribosoma.

	Valores de las incógnitas	Valores obtenidos en el proceso iterativo					
		1	2	3	4	5	6
K_{A1}	$2,5 \cdot 10^5$	fija	fija	fija	fija	fija	fija
K_{A2}	34	$34,3 \pm 0,2$	$33,7 \pm 0,2$	$34,1 \pm 0,3$	36 ± 4	27 ± 2	21 ± 8
n_1	1	fija	fija	$1,01 \pm 0,03$	-9 ± 23	fija	fija
n_2	1800	1790 ± 7	1808 ± 1	1794 ± 11	1900 ± 100	2260 ± 160	2600 ± 900
Δ_{11}	200	fija	212 ± 1	fija	6 ± 11	400 ± 60	600 ± 200
Δ_{12}	200	fija	212 ± 1	fija	6 ± 11	400 ± 60	600 ± 200
Δ_{21}	90	$90,0 \pm 0,2$	$90,1 \pm 0,2$	$90,0 \pm 0,2$	85 ± 7	87 ± 2	93 ± 9
Δ_{22}	60	$60,0 \pm 0,2$	$60,1 \pm 0,2$	$60,1 \pm 0,2$	57 ± 5	58 ± 1	59 ± 6
^a σ (Hz)		0,03	0,03	0,03	0,2	0,3	1.
^b σ_{exp} (Hz)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,5	1.

^a Desviación estandar resultante del ajuste.

^b Error evaluado en la medida de anchuras.

II.5.3.- Medidas experimentales.

Como se ha visto en el capítulo anterior, la medida de los incrementos de anchura que sufren las señales de los protones de las moléculas de un antibiótico en presencia de concentraciones variables de ribosomas, o más generalmente, para distintas relaciones de concentraciones antibiótico/ribosoma, puede proporcionar información acerca de los equilibrios de interacción entre ellos. Con este propósito, se han obtenido espectros de RMN de protón, para los antibióticos puromicina y gougerotina, para distintas concentraciones antibiótico/ribosoma. Se realizaron tres tipos de series de medidas: 1) manteniendo constante la concentración de antibiótico y variando la de ribosoma; 2) manteniendo constante la de ribosoma y variando la de antibiótico y 3) manteniendo constante de relación A/R y variando por dilución sus respectivas concentraciones absolutas. En el primer caso, el intervalo de la concentración de ribosomas se varió entre $1 \cdot 10^{-7}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ M. El primer límite viene determinado por la detección de un exceso de anchura menor que el error experimental de medida de la anchura de la línea en ausencia de ribosomas.

A concentraciones mayores que el segundo límite, las señales se ensanchan en un grado que el error experimental en la anchura medida se hace muy grande. En el segundo caso, la concentración de antibiótico se varió entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $3 \cdot 10^{-2}$ M. El primer límite viene fijado por la sensibilidad de nuestro espectrómetro en un tiempo ra-

zonable (12 horas). El segundo viene determinado por la solubilidad del antibiótico al pH correspondiente al buffer en el que son activos los ribosomas (véase I.4.). Así, por ejemplo, en el caso de la puromicina sólo pudo llegarse a una concentración máxima de $9,0 \cdot 10^{-3}$ M.

Las anchuras determinadas son las correspondientes a las medidas a la mitad de la altura de cada señal. En todo lo que sigue se identifica la anchura a mitad de altura (Hz) con $(1/\pi T_2)$. Ello no es rigurosamente correcto, ya que a la anchura de la señal contribuye también en alguna medida la debida a la inhomogeneidad del campo. Sin embargo, para las anchuras observadas, la contribución de ésta última puede razonablemente considerarse despreciable.

Las anchuras de las señales del antibiótico disuelto en el buffer pH 8,0, se midieron directamente sobre el espectro expandido a una escala de 7,5 Hz/cm, con lo que el error experimental en su determinación puede evaluarse en $\pm 0,2$ Hz. Al añadir ribosomas, las señales correspondientes a los distintos protones se ensanchan. En la puromicina, las señales protónicas a alto campo de la señal de H-O-D quedan oscurecidas por la de esta última y por la correspondiente al tris-hidroximetil-amino-metano. A bajo campo de la señal de H-O-D pueden observarse y medirse las señales correspondientes a H1', la de los protones H_{orto} y H_{meta} del anillo bencénico del resto O-Metirosimil y la de los protones H2 y H8 del resto N-di-Me-adenil. Las dos primeras, están desdobladas por acoplamiento

to espin-espin, y las dos últimas muestran un desplazamiento químico relativo muy pequeño. En la gougerotina, pueden detectarse las señales del $-NH-CH_3$ terminal y las de los protones H5 y H6 de la citidina, consistentes éstas últimas en sendos dobletes por acoplamiento mutuo.

Al ensancharse, debido a la presencia de los ribosomas, las propias señales o sus componentes, solapan, lo que complica la medida de la anchura. Por ello, para su determinación se ha empleado un método de ajuste por mínimos cuadrados del contorno espectral. Mediante este método, que se describe en detalle en (45), y en el que se utiliza el programa de cálculo denominado NMROV, se ajusta por mínimos cuadrados un contorno espectral digitizado para proporcionar la posición y anchura de las líneas que contribuyen a dicho contorno.

En dicho programa hemos introducido algunas modificaciones para el mejor tratamiento del caso que nos ocupa, y que pueden resumirse en los siguientes puntos:

1) Posibilidad de que las distintas señales puedan mostrar distintas anchuras.

2) Posibilidad de que distintas señales mantengan una separación fija, ya sea ésta debida a acoplamientos o a desplazamientos químicos.

3) Posibilidad de que distintas líneas sean ajustadas con una misma anchura.

4) Posibilidad de que determinadas señales mantengan una relación de intensidades dada.

Como ejemplo, vamos a describir la realización de una medida, cuyos resultados se ilustran en la figura 13. En la parte inferior está representado el espectro de la puromicina ($7,7 \cdot 10^{-3}$ M en disolución amortiguadora pH 8,0) en la zona δ 5-9 ppm a partir de DSS. En la parte intermedia, se representa el espectro correspondiente a concentraciones de A $7,7 \cdot 10^{-3}$ M y R $1,8 \cdot 10^{-6}$ M, en donde puede observarse un ensanchamiento general de las distintas señales, que, por simple inspección, parece ser selectivo. Es muy importante hacer notar cómo la anchura de la señal del grupo metilo del acetato, presente como constituyente del "buffer", no se afecta en absoluto por la presencia de ribosomas. En la parte superior, se representa el espectro calculado mediante el programa NMROV. Como entrada, se proporcionaron, además del contorno a ajustar, las posiciones de las distintas señales y unas anchuras evaluadas por inspección. Se mantuvieron fijos los desdoblamientos de H1', H5" y H6", medidos en el espectro a). El cálculo entra en un proceso iterativo en el que van variándose los parámetros iniciales hasta obtener un ajuste óptimo entre los contornos observado y calculado. Las anchuras y excesos sobre las de a) se expresan en la figura, para cada protón. En la figura 14 se ilustra el caso análogo para el antibiótico gougerotina. En a) se muestra el espectro de dicho antibiótico a concentración $8,6 \cdot 10^{-3}$ M, pH 8,0, 26°C) y en b) el espectro del antibiótico en presencia de ribosomas en concentración $7,2 \cdot 10^{-6}$ M. En e) se representa el

PUROMICINA

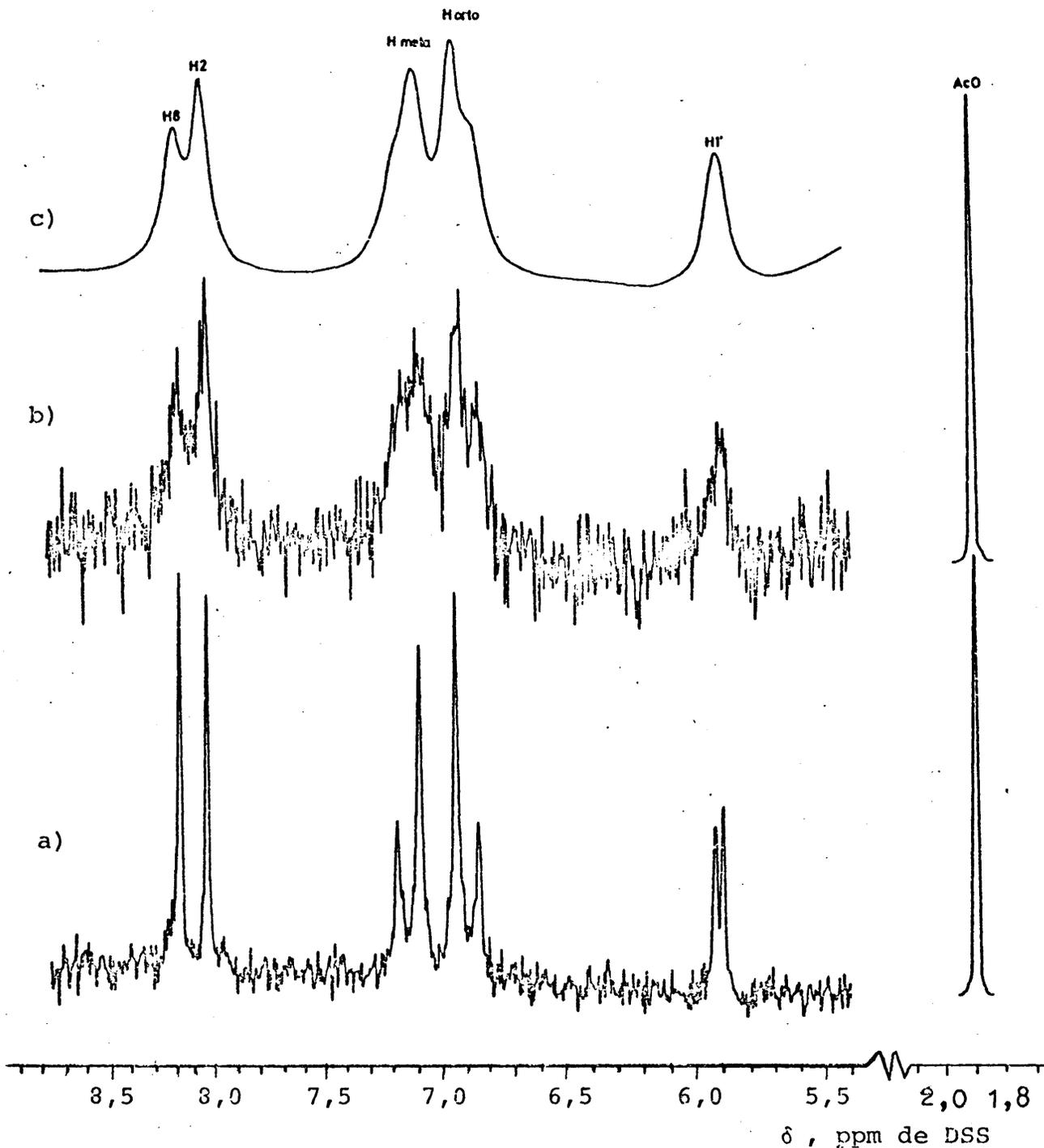


Figura 13. Espectro de las señales a bajo campo del HOD, de puromicina, en ausencia (a) y en presencia (b) de ribosomas. Contorno calculado mediante el programa NMROV (c).

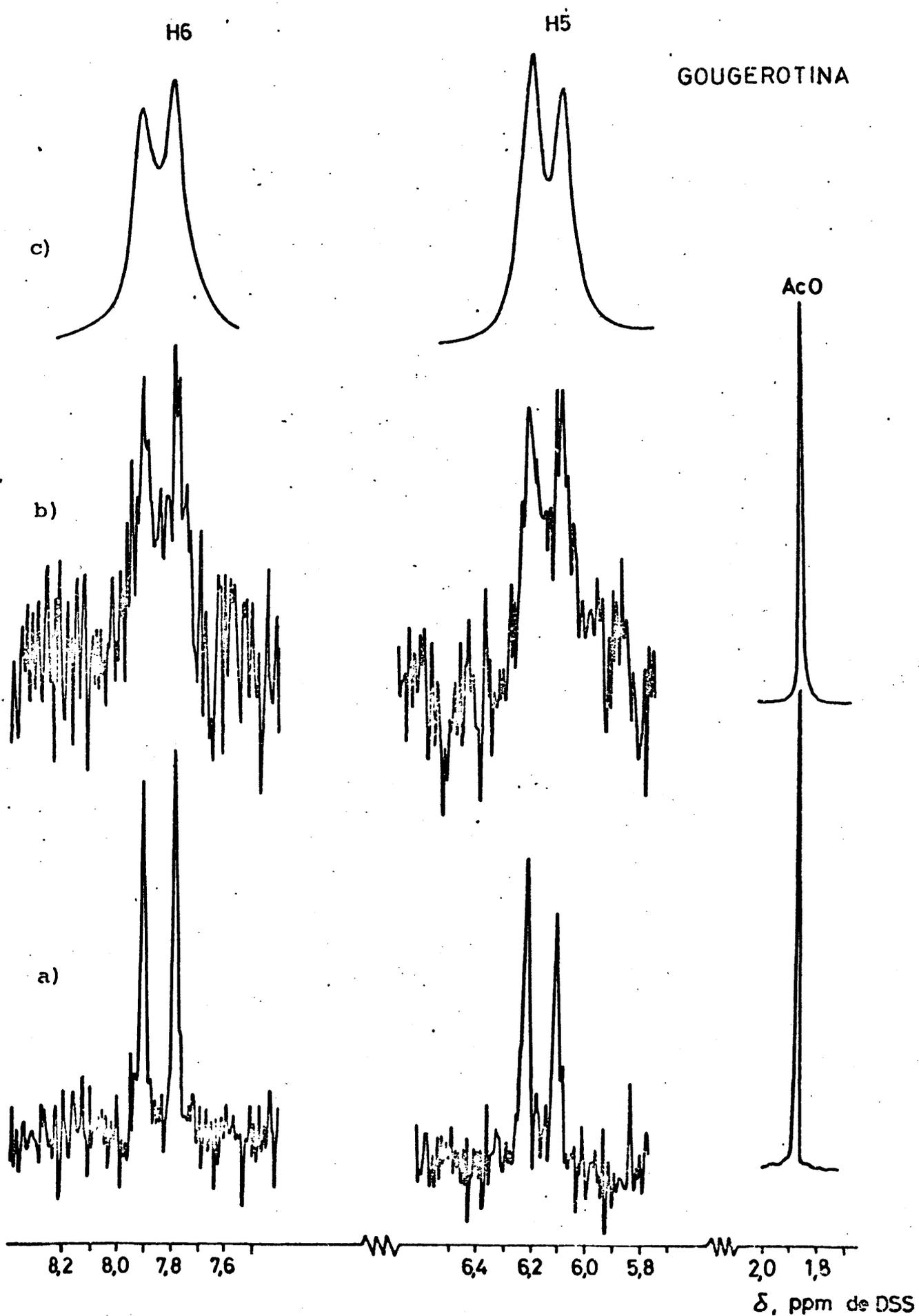


Figura 14. Espectro de las señales a bajo campo del HOD, de gougerotina en ausencia (a) y en presencia (b) de ribosomas. Contorno calculado mediante el programa NMROV (c).

contorno correspondiente a este último espectro, calculado mediante el programa NMROV.

Debido al solapamiento de las líneas, a medida que se aumenta la concentración de ribosomas y los espectros se ensanchan en mayor grado, los errores en la determinación de anchuras aumentan. Estos errores pueden evaluarse en general, como un 15% del valor de la anchura. En las Tablas 37 y 38, se dan para distintas relaciones antibiótico/ribosoma y para los distintos protones de los antibióticos puromicina y gougerotina, los excesos de anchura sobre los del antibiótico en ausencia de ribosomas.

En la figura 15, se representan los excesos de anchura obtenidos para las distintas señales de la puromicina en función de la concentración de ribosomas. A pesar de los errores experimentales, puede observarse que la dependencia de los excesos respecto a la concentración de ribosomas, muestra una tendencia lineal, y que la pendiente para los distintos protones es distinta. En la figura 17, se representan el producto $(1/\Delta w)R_0$ frente a la concentración de A_0 . En ella puede observarse que las pendientes de las correspondientes rectas de regresión son pequeñas y que ellas no pasan por el origen. En las figuras 16 y 18, se ilustran representaciones análogas para los protones de la gougerotina. Estos hechos experimentales, como se discutió en II.5.1, conducen a concluir que, superpuesto al equilibrio de interacción del antibiótico con el centro peptidil-transferasa, existe otro equilibrio de interacción

de constante de afinidad mucho más pequeña que es el que produce las variaciones observadas en los espectros de RMN.

Con objeto de comprobar si, en todo caso, este comportamiento observado era característico de los inhibidores del centro peptidil transferasa, se midieron los excesos de anchura para el nucleósido adenosina, cuyos resultados se dan en la Tabla 39.

TABLA 37

Incrementos de anchura de las señales del espectro protónico ($\Delta w \equiv w^{\text{obs}} - w^{\text{libre}}$, Hz) de puromicina (A_0) en presencia de ribosomas (R_0), respecto a las correspondientes anchuras del antibiótico

$[A_0] \cdot 10^3$	$[R_0] \cdot 10^6$	H2	H8	H _{orto}	H _{meta}	H1'
3,1	0,31	0,1	0,6	0,5	1,0	0,5
1,7	0,91	2,3	4,4	2,2	2,3	-
4,7	0,91	1,3	2,2	1,8	1,9	1,4
6,8	0,91	1,0	1,6	1,3	1,5	1,0
9,3	0,91	0,9	1,8	1,3	1,9	1,2
1,3	2,2	4,2	7,4	2,7	4,3	5,4
2,1	2,2	3,2	5,7	4,5	5,5	5,0
3,2	2,2	2,9	5,1	3,8	5,3	5,2
4,2	2,2	2,7	5,4	4,4	5,1	3,3

TABLA 38

Incrementos de anchura de las señales del espectro protónico ($\Delta w = w^{obs} - w^{libre}$, Hz) de gougertina (A_0) en presencia de ribosomas (R_0), respecto a las correspondientes anchuras del antibiótico.

$[A_0] \cdot 10^3$	$[R_0] \cdot 10^6$	NCH ₃	H6	H5
8,3	1,7	0,1	0,6	0,4
8,0	3,4	0,2	1,8	1,5
7,7	4,9	0,4	2,7	2,7
7,5	6,2	0,8	4,1	4,0
7,2	7,5	1,0	4,8	3,4
2,9	3,0	0,4	4,0	2,1
2,2	9,1	1,8	6,5	5,7
3,3	9,1	1,8	5,4	3,9
6,5	9,1	1,6	6,0	3,8
13,0	9,1	1,5	6,4	4,4
26,0	9,1	1,3	5,2	3,7

TABLA 39

Anchuras observadas para algunos protones de la adenosina en presencia (w_R) y ausencia (w_0) de ribosomas ($1,1 \cdot 10^{-2}$ M de adenosina, $7,4 \cdot 10^{-6}$ M de ribosomas, disolución amortiguadora tris, pH 8,0)

	Anchura (Hz)		Exceso de anchura
	w_0	w_R	
H8	1,4	6,2	4,8
H2	1,4	4,2	2,8
H1'	1,3	5,8	4,5
Ac ⁻	1,2	1,2	0,0

PUROMICINA

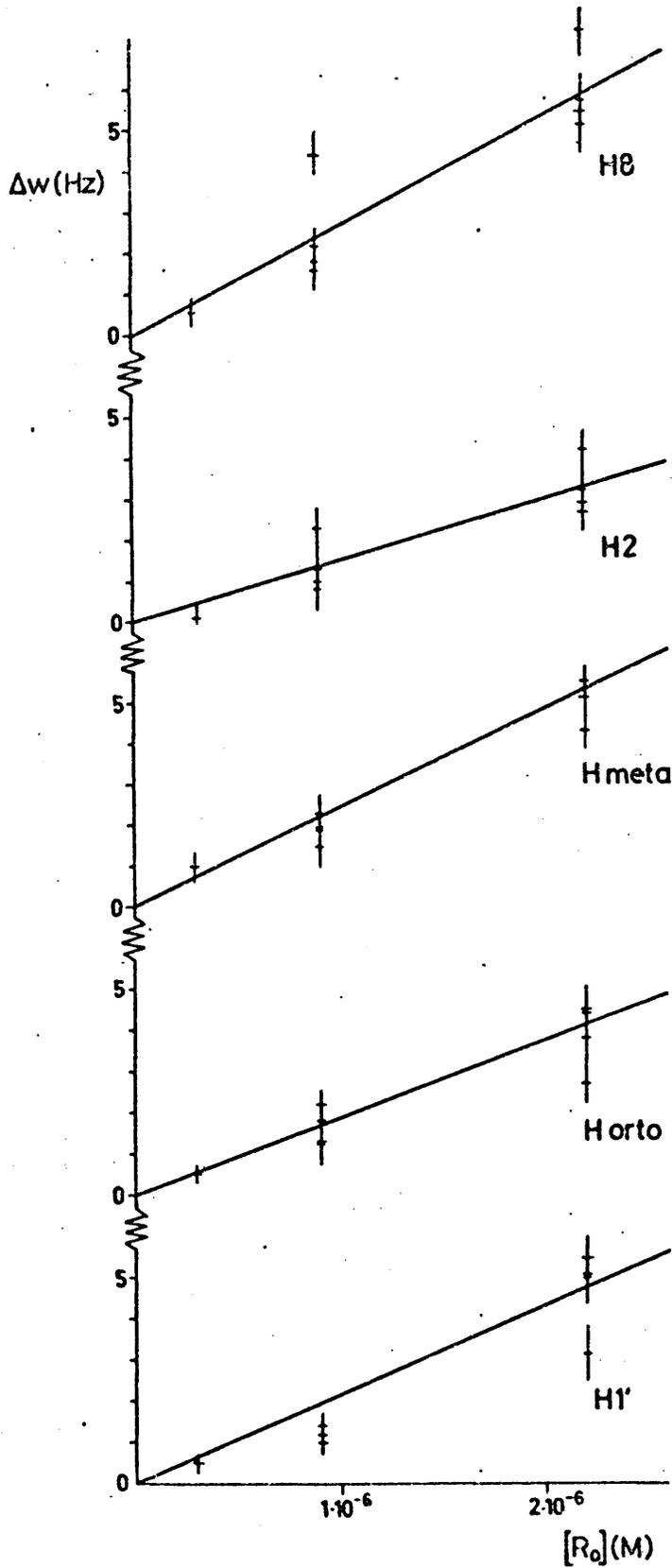


Figura 15. Variación de los excesos de anchura, de algunos protones de puromicina con la concentración de ribosomas.

GOUGEROTINA

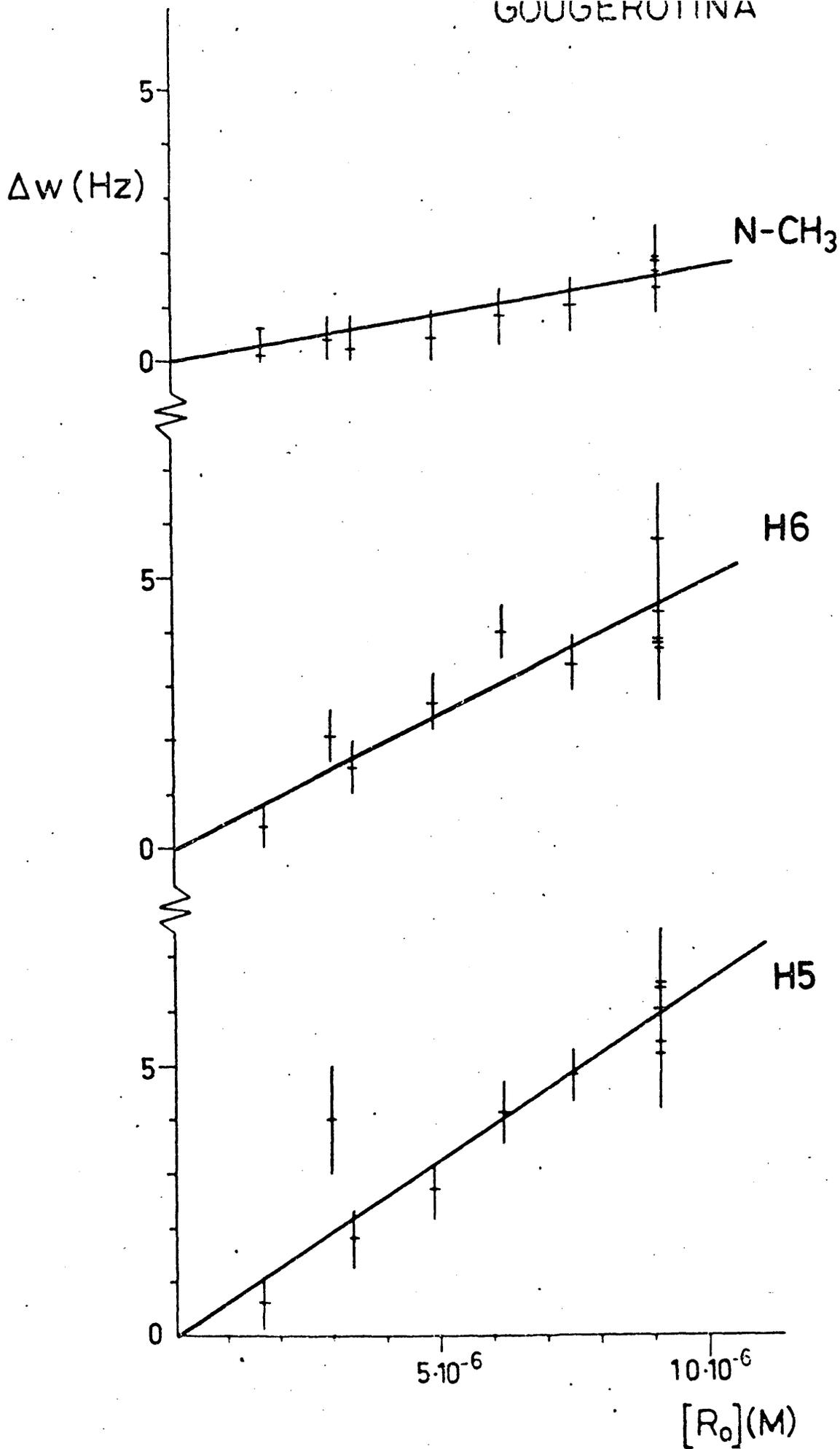


Figura 16. Variación de los excesos de anchura de algunos protones de gougerotina con la concentración de ribosomas.

PUROMICINA

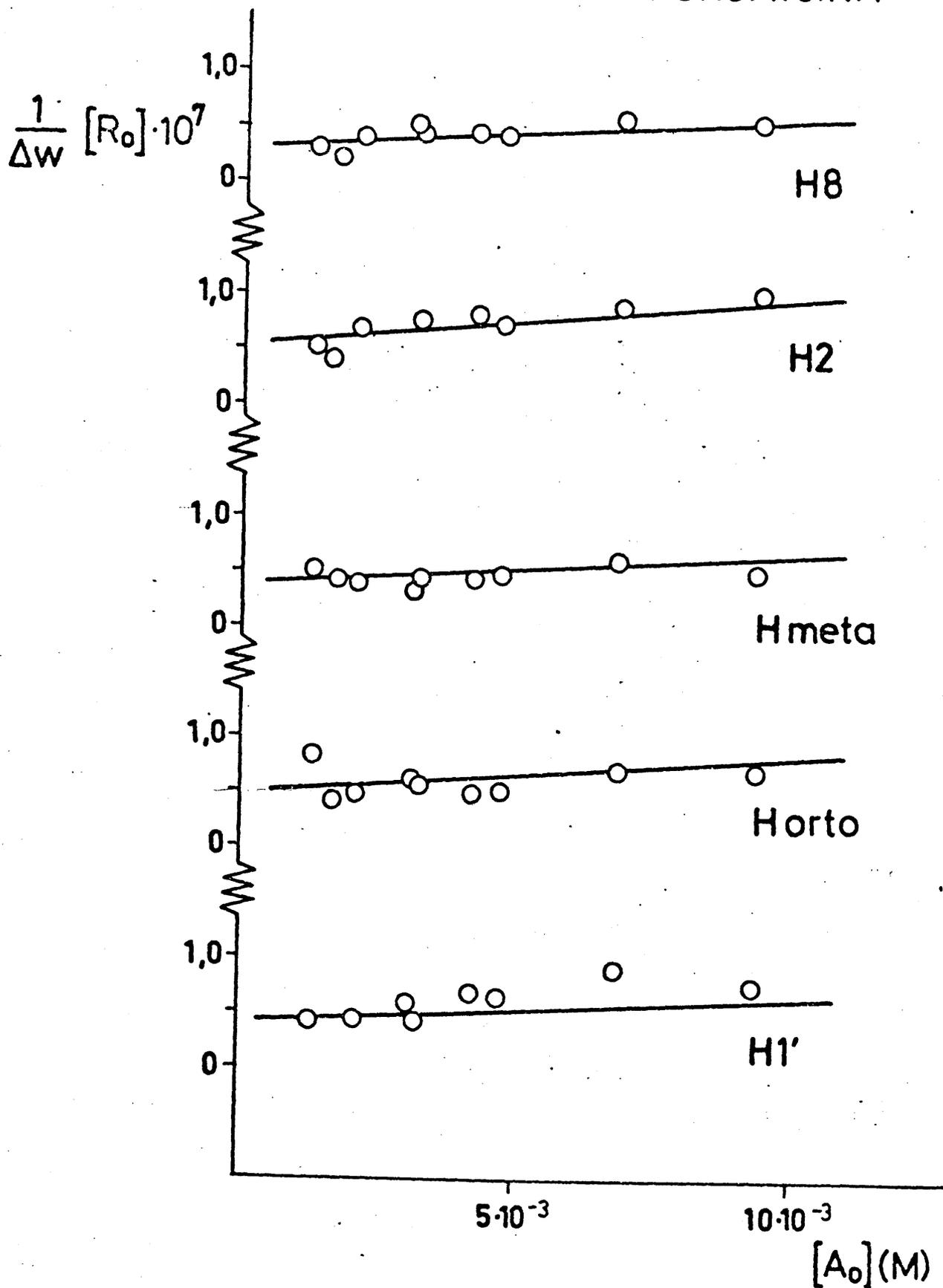


Figura 17. Variación de $(|R_0|/\Delta W)$ con la concentración de anti-biótico, para algunos protones de puromicina.

GOUGEROTINA

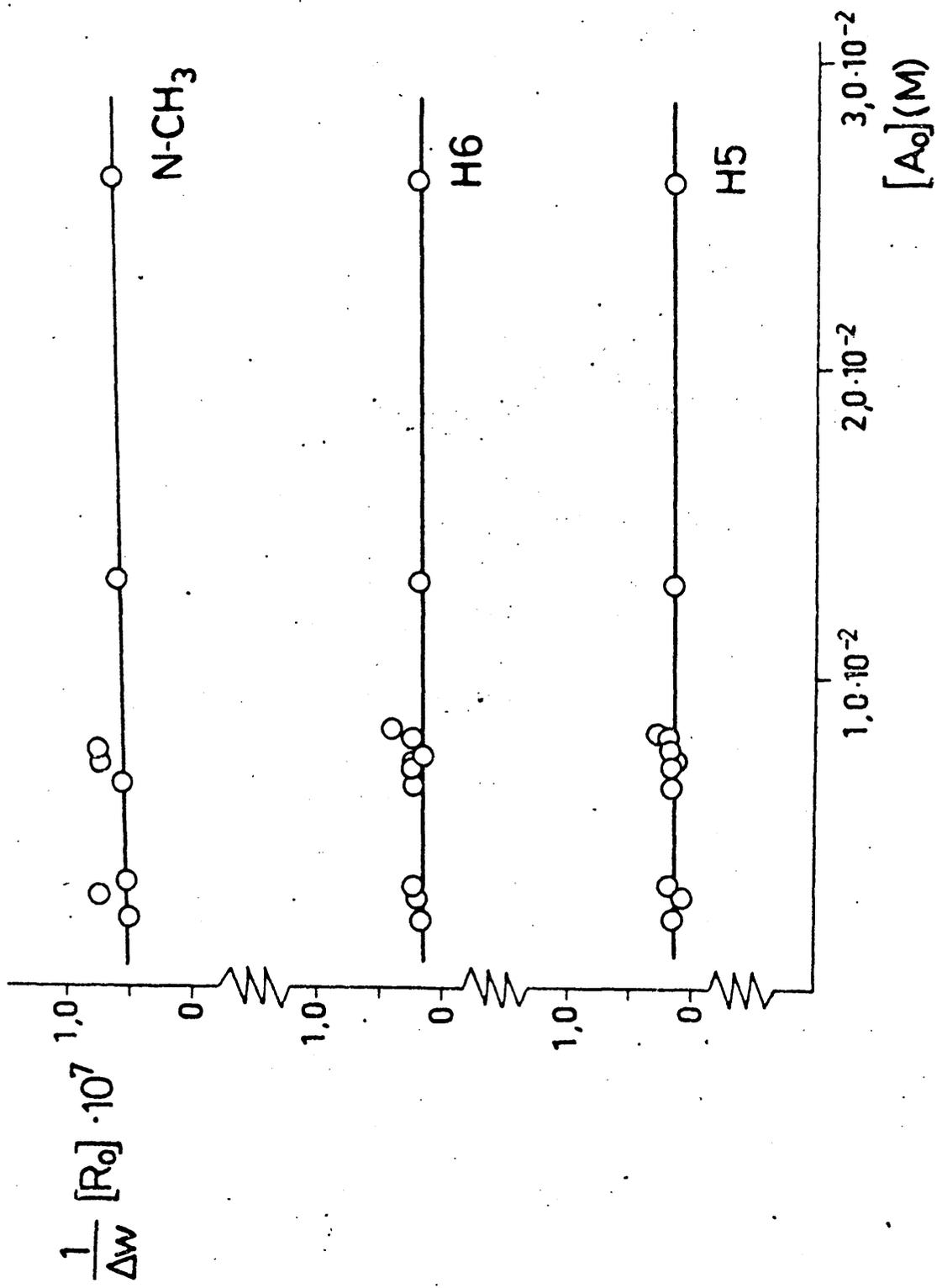


Figura 18. Variación de $(|R_0|/\Delta w)$ con la concentración de antibiótico, para algunos protones de gougerotina.

Como puede observarse, mientras la señal del grupo acetato, componente de la disolución amortiguadora no varía, las de los protones de la adenosina sufren un incremento de anchuras que además, es selectivo. Los desplazamientos químicos, por el contrario, no sufren ningún corrimiento. En definitiva, la adenosina muestra un comportamiento análogo en su interacción con los ribosomas al que muestra la puromicina, cuando, sin embargo, es bien conocido (46) que la adenosina no presenta propiedades inhibitoras del centro peptidil-transferasa.

II.5.4.- Variación con la temperatura.

En un sistema compuesto por antibiótico y ribosoma, en concentraciones dadas, disueltos en D_2O , al variar la temperatura se alteran distintas magnitudes, que contribuyen a la anchura de las señales del espectro protónico del antibiótico. Estas son: el tiempo de correlación de la molécula de antibiótico libre y el del ribosoma, la viscosidad del medio que contribuye a la magnitud anterior, la fracción de antibiótico ligado y las cinéticas de formación y disociación del complejo.

Como se vio en el capítulo I.3.2., la observación de la variación de la anchura de las señales con la temperatura puede servir de índice cualitativo, en principio, para determinar el tipo de intercambio "rápido" o "lento" a que está sujeto el sistema en estudio. En nuestro caso, los excesos de anchura observados disminuyen al aumentar la temperatura, lo que es indicativo de que estamos situa-

dos en la región de intercambio rápido, es decir, $(1/\tau_M)$ en {I.3.15} es muy grande, por lo que el exceso de anchura viene dado por

$$(1/T_{2P}) = P_M (1/T_{2M})$$

Para constantes de asociación relativamente grandes $K \geq 10^2 \text{ M}^{-1}$, la variación en P_M , en un intervalo restringido de temperaturas (25°C-45°C) es muy pequeña y puede despreciarse, por lo que la variación en los excesos de anchura han de reflejar los que sufra $(1/T_{2M})$. Como se vio en I.3.2., esta magnitud es función del tiempo de correlación del complejo, τ_c , que a su vez puede expresarse en función de la temperatura por una ecuación de activación, en la que ΔG^\ddagger es la energía libre de activación correspondiente al proceso de difusión rotacional del complejo. En nuestro caso, sin embargo, $K \leq 10^2 \text{ M}^{-1}$, y la fracción molar del complejo puede variar sustancialmente con la temperatura, por lo que el estudio de la variación del tiempo de relajación con la temperatura para una sola relación de concentraciones no permite la evaluación de la energía de activación a que anteriormente hemos aludido.

En la Tabla 40, se dan las medidas resultantes para las anchuras de algunas señales protónicas de la gougertina ($2,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) en presencia de ribosomas ($9,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) a distintas temperaturas comprendidas entre 26° y 45°C. Como puede observarse, los excesos de anchura disminuyen al aumentar la temperatura, lo que indica cualitativamente

que el sistema está situado en la región de equilibrio rápido. Ello es consistente con la existencia de un equilibrio de asociación de baja afinidad.

TABLA 40

Excesos de anchura ($\Delta w = w_R - w_O$, Hz) de las señales correspondientes a los protones H5, H6 y NCH₃ de gougerotina en función de la temperatura, ($[A_O] = 2,6 \cdot 10^{-2}$ M y $[R_O] = 9,1 \cdot 10^{-6}$ M).

T (°K)	H ₆	H ₅	NCH ₃
303	5,0	3,8	1,6
308	4,6	3,3	1,6
312	3,6	2,4	1,1
316	2,6	1,9	0,9

II.5.5.- Efecto de iones paramagnéticos.

La presencia de pequeñas concentraciones de iones paramagnéticos puede introducir en este tipo de medidas una seria fuente de error, debido a la extraordinaria eficiencia de estos iones para promover la relajación nuclear. Ello es consecuencia de que el momento magnético electrónico es $\sim 10^3$ veces mayor que el del protón, por lo que los campos locales fluctuantes debidos a los iones paramagnéticos son mucho mayores que los debidos a moléculas diamagnéticas conteniendo dipolos magnéticos nucleares.

En estudios análogos al realizado aquí, se extreman las precauciones experimentales para evitar la presencia de estos iones, para lo cual se trata el material de vidrio a utilizar con una disolución de ácido nítrico diluido, y la disolución sobre la que se realizan las medidas contiene siempre el agente complejante EDTA en concentraciones del orden de 10^{-4} M. Desgraciadamente, en nuestro caso, esta previsión no es aplicable, debido a que los ribosomas van suspendidos en una disolución que es $\sim 10^{-2}$ M en Mg^{2+} , iones que son necesarios para evitar la disociación de los ribosomas.

El espectro de RMN de la disolución amortiguadora que se utiliza como medio para la realización de las medidas, muestra tres señales de resonancia: la del \underline{CH}_3 del ión acetato, la de los protones, $HO\underline{CH}_2-C$ del tris- y la del HOD, con una anchura que viene dada fundamentalmente por la homogeneidad del campo magnético. Si a esta disolución se añade EDTA, en una concentración de $5 \cdot 10^{-3}$ M, las señales anteriores no sufren ninguna variación en su anchura. Ello indica que de existir iones paramagnéticos en la disolución amortiguadora, su concentración es tan pequeña que su contribución a la relajación de los protones correspondientes a las distintas señales es despreciable.

Podría suponerse, sin embargo, que los iones paramagnéticos fuesen introducidos en la disolución por los propios ribosomas y que al establecerse el equilibrio correspondiente a ésta quedase una cierta concentración de

estos iones en disolución. Con objeto de confirmar o deshechar esta hipótesis, se realizaron espectros de puromicina en presencia de los iones paramagnéticos más comunes. En general, los desplazamientos químicos de los protones no sufren modificaciones apreciables salvo en el caso de Ni^{2+} y Co^{2+} en los que las señales se desdoblan debido al efecto de las interacciones de contacto entre los iones paramagnéticos y los grupos de la puromicina que actúan como ligandos. Las anchuras de las señales protónicas de la puromicina y las de los componentes del "buffer" sí se afectan sensiblemente, aumentando al aumentar la concentración de los iones implicados. Para cada uno de los iones paramagnéticos Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+} se realizaron cuatro medidas a distintas concentraciones. Como nuestro interés está centrado en obtener un índice cualitativo del ensanchamiento selectivo que sufre cada uno de los protones, los excesos de anchura se refirieron a los que sufre el protón H2, para cada ión paramagnético. Los excesos relativos que figuran en la Tabla 41 son las medias pesadas correspondientes a las cuatro medidas, utilizando como factor de peso el exceso de anchura del protón H2 en cada caso. En dicha Tabla se incliyan también los excesos relativos correspondientes a la adición de ribosomas.

Como puede deducirse de la consideración de los números de la Tabla 41, ninguno de los iones paramagnéticos incluidos en ella muestra una correlación en sus efectos con los producidos por la adición de ribosomas. El ión Mn^{2+}

afecta grandemente a la anchura de H_{meta} y a las del ACO^- y Tris del "buffer", no produciendo, en cambio, el ensanchamiento en la señal de H8 que producen los ribosomas. Tampoco sucede esto último con el ión Cu^{2+} , el cual produce, además un gran ensanchamiento en la señal del "Tris", que sólo es ligeramente afectada por los ribosomas. El ión Fe^{2+} origina un ensanchamiento muy homogéneo tanto de las señales del antibiótico como de las del ACO^- y "Tris" del "buffer". El ión Ni^{2+} afecta mayoritariamente a esta última señal, y por idénticas razones, pueden descartarse el Co^{2+} , Fe^{3+} y Cr^{3+} como responsables de reproducir los ensanchamientos relativos observados con la adición de ribosomas.

Como conclusión de lo discutido en esta sección, puede afirmarse que el ensanchamiento observado en las señales protónicas de la puromicina al añadir ribosomas no se debe a la presencia de ninguno de los iones paramagnéticos examinados, más comunes, que pudieran haber sido introducidos en la disolución por los ribosomas. Los ensanchamientos observados se deben, pues, a los propios ribosomas, lo que no excluye que la interacción secundaria observada de la puromicina con los ribosomas se produzca a través de un centro paramagnético ligado a éstos.

II.5.6.- Efecto de la viscosidad.

La viscosidad afecta al tiempo de correlación en cualquier modelo de movimiento de difusión rotacional. A su vez, el tiempo de correlación interviene en la expresión

TABLA 41

Comparación de los excesos de anchuras de algunas señales (relativos al de H₂) de puromicina producidos por adición de ribosomas con los producidos por adición de distintos iones paramagnéticos.

	Rib.	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Fe ²⁺
H1	1,4	0,9	-	-
H _{orto}	1,3	1,2	1,0	1,1
H _{meta}	1,6	2,5	1,6	1,0
H ₂	1	1	1	1,0
H ₈	1,9	0,8	1,0	0,7
ACO ⁻	0,0	2,0	0,0	0,7
Tris	0,4	1,6	1,7	0,6
N(CH ₃) ₂	-	0,3	0,3	0,8
OCH ₃	-	0,3	0,2	0,8

de los tiempos de relajación de spin nuclear T₁ y T₂. Es de esperar que un cambio en la viscosidad del medio afecte a la anchura de las señales (1/πT₂) y éste es tal que para un incremento de la viscosidad se produce un aumento de la anchura.

Una dispersión de ribosomas en agua muestra una mayor viscosidad que el agua pura. Así, las medidas realizadas en un viscosímetro Ostwald para una disolución 6,1.10⁻⁶ M en ribosomas, a 26°C, dieron una viscosidad re-

lativa de $\eta/\eta_0=1,14$. La máxima concentración de ribosomas utilizada fue de $9,1 \cdot 10^{-6} M$, lo que corresponde a una viscosidad de $\eta=1,06$ c.p. ($26^\circ C$).

La variación de anchuras de las señales de antibiótico en presencia de concentraciones crecientes de ribosoma podría pues, en principio, atribuirse al incremento de viscosidad de las disoluciones. Que ello no es así se demostró midiendo la variación de las anchuras del antibiótico en medios (agua+glicerina) de distinta viscosidad relativa (1,0 a 1,7). Los resultados de esas medidas para puromicina se dan en la Tabla 42. Como puede observarse, las variaciones de anchura obtenidas son muy pequeñas (del orden de 0,6 Hz en todo el intervalo). Las repercusiones en las anchuras de las señales del antibiótico que puedan tener los incrementos de viscosidad producidos por la disolución de ribosomas, que se encuentran comprendidos dentro de un intervalo mucho más pequeño, ($\eta=0,9-1,1$ c.p.), son inferiores al error experimental.

Al variar la temperatura, cambia también la viscosidad. Al objeto de interpretar correctamente el efecto de la temperatura sobre la interacción antibiótico-ribosoma es importante conocer el efecto sobre las anchuras del cambio concurrente de la viscosidad. Para ello, se realizaron medidas de anchuras para una disolución de viscosidad $\eta=1,30$ c.p. ($26^\circ C$) a distintas temperaturas. Los resultados se dan en la Tabla 43. Como puede observarse, las variaciones medidas son pequeñas y, en todo caso, son

asimilables a las obtenidas al variar la temperatura en ese intervalo para una disolución del antibiótico en agua.

TABLA 42

Anchuras de las señales de algunos protones de la puromicina en disoluciones en D₂O de distinta viscosidad (1,2.10⁻²M, pH 2,5 26°C)

Glice- rina %	η(cp)	w(Hz)					
		H2	H8	H _{orto}	H _{meta}	H1'	ACO ⁻
0	0,87	1,3	1,5	1,6	1,6	1,5	1,1
5	0,99	1,2	1,2	1,8	1,5	1,5	1,1
10	1,13	1,5	1,8	2,4	2,2	2,2	1,5
15	1,30	1,2	1,5	2,1	2,1	1,8	1,2
20	1,51	1,5	1,8	2,4	2,2	2,1	1,5

TABLA 43

Anchuras de las señales de algunos protones de la puromicina en disolución 1,2.10⁻²M en (85% D₂O, 15% Glicerina, η₂₆ 1,30) a distintas temperaturas.

T (°C)	η (cp)	w(Hz)					
		H2	H8	H _{orto}	H _{meta}	H1'	ACO ⁻
26	1,30	1,3	1,5	1,6	1,6	1,5	1,1
35	1,15	0,7	1,4	1,5	1,4	1,2	0,6
40	1,05	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	0,9
45	0,98	0,9	1,3	1,5	1,4	1,2	0,8

II.5.7.- Interacción puromicina-t-RNA.

Se han medido los excesos de anchura de las señales H₂, H₈, H_{1'}, H_{orto} y H_{meta} de la puromicina que resultan al añadir a una disolución del antibiótico libre, en una concentración de $4,5 \cdot 10^{-3}$ M, ácido nucleico de transferencia, t-RNA, obtenido de levadura de panadería, en concentraciones de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M y $2,0 \cdot 10^{-4}$ M. El t-RNA utilizado en estos experimentos nos ha sido cedido gentilmente por el Dr. E. Gallego, del Instituto de Química Física "Rocasolano". En la Tabla 43a se dan los excesos de anchura absolutos, que se han obtenido así como los excesos de anchura relativos al protón H₂, que se comparan con los obtenidos para la adición de ribosomas. Como puede comprobarse, existe una marcada analogía entre ambos sistemas.

TABLA 43a

Excesos de anchura de las señales del espectro protónico de puromicina ($[A_0] = 4,5 \cdot 10^{-3}$ M) en presencia de t-RNA. Comparación de los excesos relativos a H₂ con los obtenidos para ribosomas

	Excesos de anchura (Hz) [t-RNA] ₀		Excesos de anchura relativos a H ₂	
	$1,0 \cdot 10^{-4}$ M	$2,0 \cdot 10^{-4}$ M	tRNA	Ribosomas
H _{1'}	2,7	5,3	1,3	1,4
H _{orto}	2,4	4,9	1,2	1,3
H _{meta}	3,4	6,4	1,6	1,6
H ₂	2,1	3,9	1	1
H ₈	2,8	5,6	1,4	1,9
ACO ⁻	0,1	0,6	0,1	0,0
TRIS	1,0	2,3	0,8	0,4

II.5.8.- Resultados.

El programa descrito en una sección anterior se aplicó a las medidas experimentales obtenidas para excesos de anchuras de señales protónicas de puromicina y gougerotina, en presencia de ribosomas. Como ya se había adelantado, estas medidas experimentales no dependen de los parámetros k_1 y n_1 correspondientes al equilibrio de interacción de los antibióticos con el centro peptidil-transferasa del ribosoma.

Los excesos de anchura experimentales se ajustaron pues a los parámetros correspondientes al segundo equilibrio k_2 , n_2 y Δ_2 . Como se vio en la sección II.5.1. estos parámetros no son independientes y es preciso proceder al ajuste fijando de antemano alguno de ellos. En la Tabla 44 se da el valor de la desviación standard obtenida en cada ajuste al fijar k_2 y n_2 a sucesivos múltiplos de 10. Puede observarse, por ejemplo, que los valores de k_2 y n_2 tienen un límite superior bien definido, pero que entre esos valores y los correspondientes a $n_2=1$ y $k_2=1$, la calidad del ajuste es prácticamente equivalente. La magnitud que está bien determinada es el producto $n_2\Delta_2k_2$, cuyos valores para los distintos protones de puromicina y gougerotina se dan en la Tabla 45. El valor de k_2 en puromicina parece estar centrado hacia $k_2=150 \text{ M}^{-1}$, mientras que en gougerotina es de un orden menor $k_2 \sim 10 \text{ M}^{-1}$. Asimismo, parece haber un pequeño mínimo para ambos antibióticos en las proximidades de $n_2 \sim 1000$, si bien cualquier valor de n_2 comprendido entre 1 y 10^3 proporciona prácticamente el mismo ajuste. Para romper la correlación de n_2 y Δ_2 es necesario tener información de otra fuente acerca de sus valores individuales.

TABLA 44

Desviación estandar de los excesos de anchura observados (Hz) resultantes del ajuste mediante el programa descrito en II.5.2

Puromicina

n_2/k_2	10^0	10^1	10^2	10^3
10^0	0,70	0,68	0,60	1,08
10^1	0,70	0,68	0,60	1,07
10^2	0,70	0,68	0,60	1,04
10^3	0,70	0,68	0,59	0,68
10^4	0,70	0,71	0,91	1,43.

Gougerotina

n_2/k_2	10^0	10^1	10^2	10^3
10^0	0,61	0,59	0,99	1,80
10^1	0,61	0,58	0,96	1,72
10^2	0,61	0,58	0,92	1,65
10^3	0,61	0,57	0,70	0,94
10^4	0,61	0,65	1,09	1,38

TABLA 45

Valores del producto $k_2 n_2 \Delta_2$ correspondientes a los distintos protones medidos para puromicina y gougerotina, resultantes del ajuste - realizado con el programa RIBO de los excesos de anchura observados al añadir ribosomas

Puromicina			
	$n_2 k_2 \Delta_2$	$n_2 \Delta_2 (k_2=150)$	$\Delta_2 (k_2=150, n_2=10^3)$
H8	$4,0 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^4$	27
H2	$2,2 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^4$	15
H _{meta}	$3,3 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^4$	22
H _{orto}	$2,5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^4$	17
H1'	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^4$	20
Gougerotina			
	$n_2 k_2 \Delta_2$	$n_2 \Delta_2 (k_2=10)$	$\Delta_2 (k_2=10, n_2=10^3)$
H6	$7,8 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$	78
H5	$5,8 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^4$	58
NCH ₃	$1,9 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^4$	19

**III. INTERPRETACION DE RESULTADOS Y
DISCUSION**

III.1. Estructura y conformación molecular de puromicina

La estructura cristalina del dihidrocloruro de puromicina ha sido obtenida recientemente por Sundaralingam y Arora (49). El mismo grupo ha realizado un estudio (50) de las conformaciones posibles de esta molécula por métodos mecánicos de energía potencial en el que se han tenido en cuenta interacciones torsionales, electrostáticas y de van der Waals. El espectro de RMN del ^1H del dihidrocloruro de puromicina, a 60 y 100 MHz ha sido descrito en (30) y (31), en donde se obtienen algunas características conformacionales. El propósito de la presente discusión es el de utilizar convergentemente toda la información procedente de nuestro estudio de los espectros de ^1H y ^{13}C con el objeto de describir la conformación molecular preferida de la puromicina en disolución y comparar nuestras conclusiones con las obtenidas en estudios precedentes.

La conformación molecular que presenta el dihidrocloruro de puromicina en estado cristalino, según se deduce de su estudio por difracción de Rayos X, se ilustra en la figura 19, en donde se ha señalado la nomenclatura de los ángulos diedros utilizados en la descripción de su conformación. Las rotaciones en torno a los enlaces $\text{C}3'-\text{N}3'$, $\text{C}2''-\text{C}1''$, $\text{C}2''-\text{C}3''$ y $\text{C}3''-\text{C}4''$ se designan con los símbolos ϕ , ψ , χ_1 y χ_2 , respectivamente. El valor del ángulo de torsión $\phi=0^\circ$ corresponde a la conformación en la que los enlaces $\text{C}2'-\text{C}3'$ y $\text{N}3'-\text{C}1''$ están eclipsados;

para $\psi=0^\circ$ el enlace N3'-C1" eclipsa al enlace C2"-C3"; $\chi_1=0^\circ$ corresponde a la conformación en la que C1"-C2" eclipsa a C4"-C3" y $\chi_2=0^\circ$ a aquella en que C2"-C3" y C4"-C5" están eclipsados. El ángulo de torsión glicosídico, χ , se define de forma que $\chi=0^\circ$ cuando el enlace C8-N9 eclipsa al enlace O-C1' del anillo de ribosa. El signo de la rotación se define como positivo, cuando mirando en la dirección del enlace para el que se considera la rotación, el enlace más alejado gira en el sentido de las agujas del reloj respecto al enlace más cercano.

La conformación dada en la figura 19, viene definida por los siguientes valores de los ángulos de torsión: $\chi=18^\circ$, $\phi=110^\circ$, $\psi=257^\circ$, $\chi_1=74^\circ$ y $\chi_2=73^\circ$

Los resultados de los cálculos de energía potencial torsional revelan que el número de conformaciones favorables energéticamente para la puromicina, son muy limitadas y que la mayor flexibilidad a la rotación es la mostrada por el enlace C2"-C3" del resto aminoácido. Los rasgos conformacionales para esta parte de la molécula son similares a los encontrados en los aminoácidos aromáticos libres o a los de éstos incorporados en proteínas, lo que indica que la conformación del nucleósido no ejerce sobre ella un efecto significativo.

En nuestra discusión consideraremos por separado las distintas partes de la molécula de puromicina, deteniéndonos con más detalle en los rasgos conformacionales cuyo estudio es más accesible por la técnica de RMN.

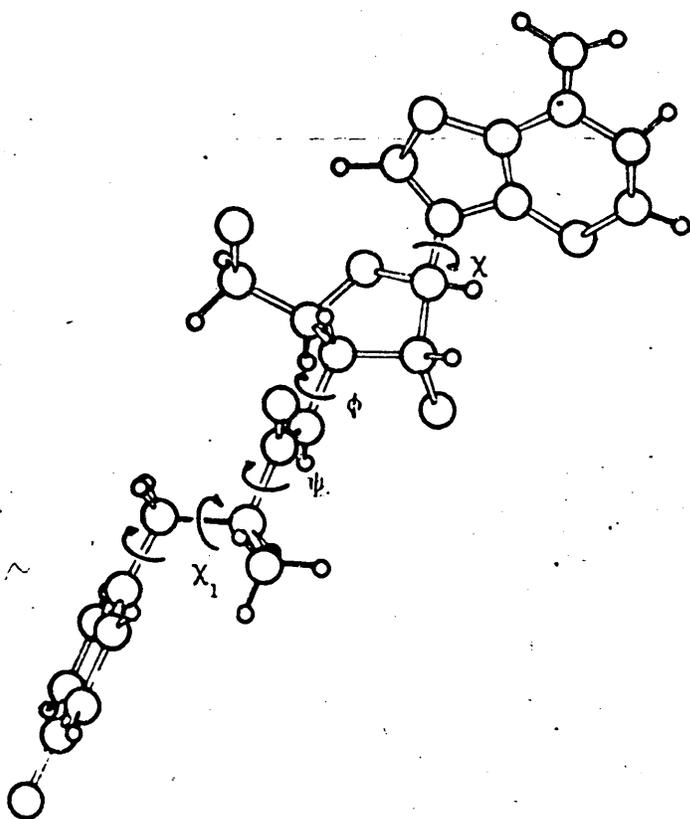
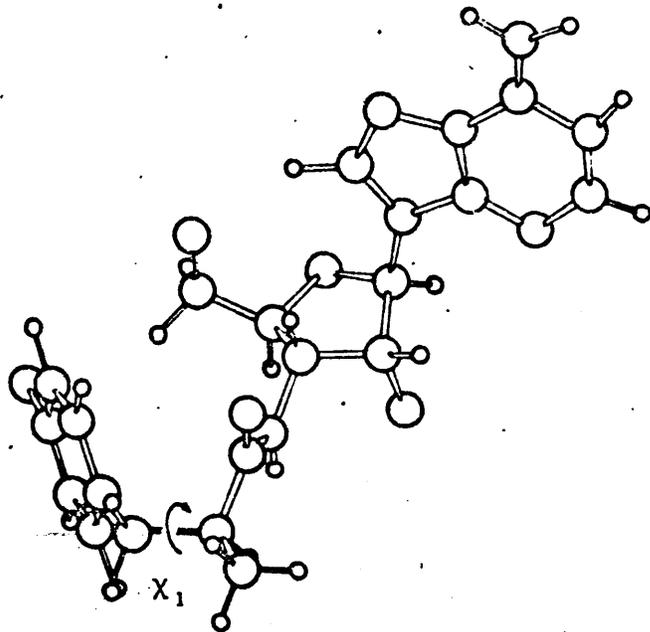


Figura 19. Dos posibles conformaciones de la puromicina: parte superior, $\chi_1=60^\circ$; parte inferior, $\chi_1=180^\circ$.

III.1.1.- Conformación del anillo de furanosa.

Recientemente, Altona y Sundaralingam (51) han propuesto una descripción de la conformación del anillo de ribosa basada en el concepto de pseudorotación, introducido en 1947 por Kilpatrick, Pitzer y Spitzer (52), para discutir la conformación del ciclopentano. La descripción propuesta por Altona y Sundaralingam es mucho más apropiada que la utilizada con anterioridad, pues, aparte de ser más simple, es más rigurosa y lleva implícito el concepto de la existencia de un continuo de conformaciones dentro de un mismo pozo de potencial.

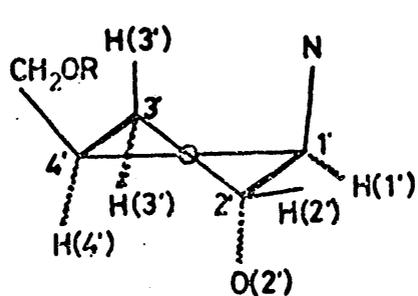
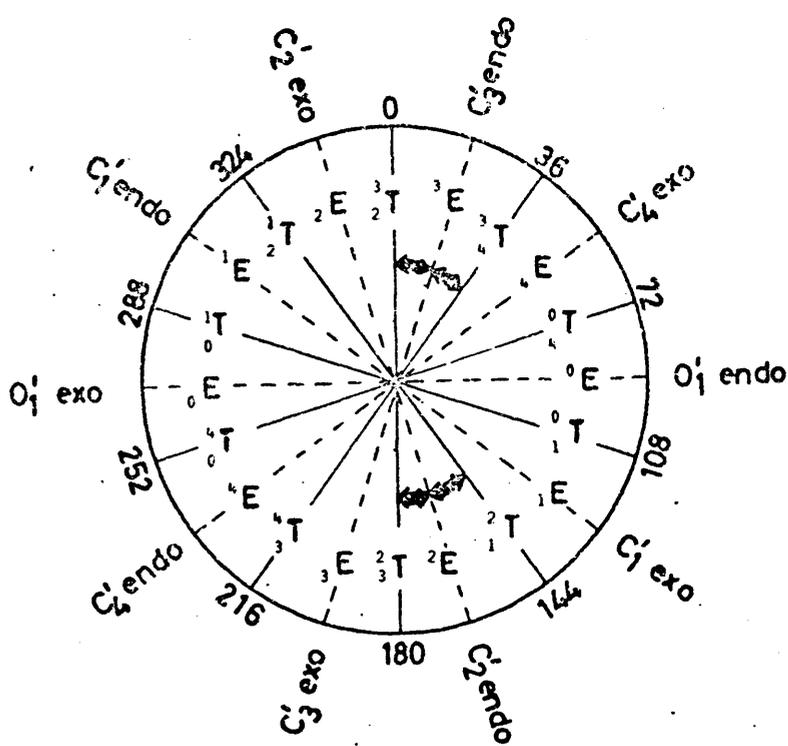
Un anillo pentagonal, como lo es el de furanosa, presenta dos modos de vibración en una dirección perpendicular al plano medio de la molécula. Para definir una conformación plegada (cualquier deformación del anillo en la que éste no sea plano) bastan, pues, dos coordenadas. Altona y Sundaralingam eligieron dos, el ángulo máximo de torsión (θ_m) y el ángulo de fase de pseudorotación (P), que se relacionan con los cinco ángulos de torsión del anillo por la expresión:

$$\theta_j = \theta_m \cos(P+j\delta) \quad \text{\{III.1.1\}}$$

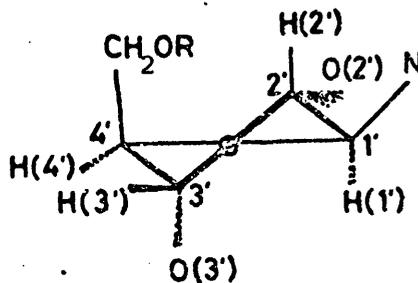
en donde $j=0-4$ y $\delta=144^\circ$. Para $j=0$ la ecuación anterior se reduce a:

$$\theta_0 = \theta_m \cos P \quad \text{\{III.1.2\}}$$

Cualquiera de las infinitas conformaciones del circuito pseudorotacional (figura 20) puede pues describirse me-



Tipo N
P = 0°



Tipo S
P = 180°

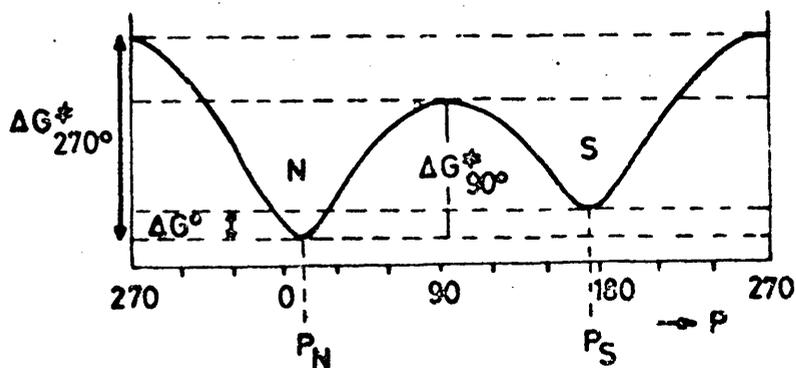


Figura 20. Arriba: Circuito pseudorrotacional del anillo de furanosa en puromicina. Centro: conformeros tipo N y S. Abajo: Variación de ΔG^\ddagger con el ángulo de pseudorrotación.

diante los correspondientes valores θ_m y P. Conocidos éstos y aplicando las ecuaciones {III.1.1} y {III.1.2}, pueden calcularse las torsiones θ_j , determinando así la conformación particular a que corresponden. Inversamente conocida ésta, y una vez determinados los ángulos de torsión, pueden encontrarse θ_m y P. Con este objeto, es útil la expresión, deducida de {III.1.1}

$$\text{tg } P = \frac{(\theta_2 + \theta_4) - (\theta_1 + \theta_3)}{2\theta_0 (\text{sen } 36 + \text{sen } 72)}$$

Como ejemplo, a la conformación de sobre en la que los cuatro carbonos se encuentran en un plano y el oxígeno está desplazado por encima del anillo ($^{\circ}\text{E}$), le corresponde un valor de $P=90^{\circ}$. Para el valor $P=0^{\circ}$ se elige la conformación característica por una torsión máxima positiva del ángulo de torsión $\text{C1}'\text{-C2}'\text{-C3}'\text{-C4}'$, conformación denominada ${}^3\text{T}_2$ o $\text{C2}'\text{exo - C3}'\text{endo}$ simétrica en anteriores descripciones del anillo de ribosa.

La utilidad del concepto de pseudorotación en la descripción de la conformación de ciclos pentagonales, reside en el hecho de que el problema vibracional (fuera del plano) puede separarse en términos de estas dos coordenadas, resultando, por un lado, una verdadera vibración en torno al valor de mínima energía de θ_m y, por otro, una "pseudorotación" o rotación libre del ángulo de fase. De este modo, la interconversión conformacional no tiene lugar por una modificación de θ_m , es decir, pasando a través de la conformación plana (que presenta la máxima ener-

gía en ciclos saturados), sino por una modificación del ángulo de fase, P . En el ciclopentano, la barrera a la pseudorotación es muy pequeña. Para ciclos con heteroátomos (furanosa) y con sustituyentes, aparecen barreras a la pseudorotación que, no obstante, suelen ser pequeñas y permiten seguir utilizando el tratamiento. Así, de la comparación de datos de Rayos X de 63 derivados de nucleósidos y nucleótidos de purina y pirimidina, Altona y Sundaralingan concluyen que el anillo de ribosa de estas moléculas normalmente ocupa sólo dos intervalos relativamente pequeños del circuito pseudorotacional: los de tipo N (parte NORTE del circuito) con valores de $P=2-14^\circ$ y los de tipo S (SUR) con valores de $P=139-174^\circ$ (valores para β -ribósidos de purina). Ello implica la existencia de dos barreras de potencial (que se oponen a la pseudorotación) a valores de $P=90^\circ$ y $P=270^\circ$. En la figura 20 se ilustran las conformaciones con $P=0^\circ$ (tipo N) y $P=180^\circ$ (tipo S) y un diagrama de la energía potencial en función de P .

En disolución, los datos experimentales existentes indican que el anillo de furanosa no presenta una única estructura rígida, sino que refleja la existencia de un equilibrio dinámico rápido entre, al menos, dos conformaciones plegadas, una del tipo N y otra del tipo S. El problema que se nos presenta es, pues, el de determinar a partir de los acoplamientos medidos en el espectro $J_{1,2}$, $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$, los valores de P_N , θ_m^N , P_S y θ_m^S

que caracterizan las conformaciones N y S preferidas, así como la constante de equilibrio $K(\chi_N/\chi_S)$ correspondiente a la interconversión conformacional ($N \rightleftharpoons S$). Los valores de los primeros cuatro parámetros están correlacionados (${}^N J_{1,2} = {}^S J_{3,4}$ y ${}^N J_{3,4} = {}^S J_{1,2}$) a través de la ecuación de Karplus que se utiliza para relacionar las constantes de acoplamiento vecinales con los ángulos diedros, $\phi_{i,j}$, entre los correspondientes enlaces CH_i y CH_j , por lo que es posible obtener valores individuales para los 5 parámetros.

Siguiendo las aproximaciones y métodos descritos por Altona y Sundaralingam (51), se han obtenido para puromicina y su dihidrocloruro los valores de P_N , ${}^N \theta_m$, P_S , ${}^S \theta_m$ y $K(\chi_N/\chi_S)$. La ecuación de Karplus utilizada, cuyos coeficientes se han obtenido a partir de un análisis estadístico de anillos de ribosa, basándose en la independencia de $J_{2,3}$ y $(J_{1,2} + J_{3,4})$ respecto a la posición del equilibrio $N \rightleftharpoons S$, es la dada por dichos autores:

$$J = 10,5 \cos^2 \phi_{HH} - 1,2 \cos \phi_{HH}$$

Asimismo, la relación entre los ángulos diedros ϕ_{ij} y los de torsión del anillo θ_j es la dada en la tabla III de la referencia (51). Las constantes $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ se han corregido por el efecto de la sustitución del -OH en C3' por el grupo aminoacil de acuerdo con la expresión

$$J^{corr} = J^{obs} (1 - m\Delta E)$$

en donde ΔE es la diferencia de electronegatividad entre

el 0 y el N (0,5) (53) y m se ha tomado como 0,1. En la tabla 45 se dan los valores de las constantes de acoplamiento observadas y corregidas y los valores de $K(\chi_N/\chi_S)$ y ΔG para puromicina a $\text{pH}=2,5, 10,5$ y $12,5$. En la tabla 47 se dan los valores obtenidos para $P_N, {}^N\theta_m, P_S$ y ${}^S\theta_m$ junto con los de algunos ángulos de torsión, θ_j , ángulos diedros entre enlaces CH, ϕ_{ij} , y constantes de acoplamiento calculadas para las formas N y S, todos ellos parámetros intermedios en el cálculo de $K, P_N, {}^N\theta_m, P_S$ y ${}^S\theta_m$.

Como puede verse en la tabla 46, el anillo de furanosa en puromicina se presenta preferentemente en la conformación de tipo N, a diferencia de lo que sucede en la adenosina y en los tres adenosin-mono-fosfatos (2'-AMP, 3'-AMP y 5'-AMP) en los que el equilibrio está desplazado hacia la forma S.

La conformación en estado cristalino es también la N, lo que conduce a la conclusión de que los efectos que la determinan son fundamentalmente intramoleculares y que éstos predominan sobre los de solvatación (disolución) y los de empaquetamiento cristalino (sólido). No es fácil señalar alguna interacción concreta que determine la adopción preferente de esta conformación. Sin embargo, la que aparece como más razonable es la interacción de van-der-Waals entre el protón en C1' y el sustituyente en C3'.

La interacción 1,3-diaxial en ciclohexano para -OH y -NH₂ es respectivamente, 0,7 y 1,8 Kcal/mol (53). Una

TABLA 46

Constantes de equilibrio $K(x_N/x_S)$ de interconversión $N \rightleftharpoons S$ para puromicina y valores de los acoplamientos utilizados en el cálculo

	pH 2,5 0,18 M	pH 10,5 $1,4 \cdot 10^{-2} M$	pH 12,0 $\sim 5 \cdot 10^{-3} M$
$K(x_N/x_S)$ (26°C)	3,3	2,4	1,6
ΔG (cal/mol)	-715	-530	-340
x_N	0,77	0,71	0,64
x_S	0,23	0,29	0,36
$J_{1'2'}^{obs} (J_{1'2'}^{corr})$, Hz	2,5 (2,5)	3,1 (3,1)	3,8 (3,8)
$J_{2'3'}^{obs} (J_{2'3'}^{corr})$, Hz	6,0 (5,8)	6,0 (5,8)	5,8 (5,6)
$J_{3'4'}^{obs} (J_{3'4'}^{corr})$, Hz	8,0 (7,6)	7,5 (7,1)	6,8 (6,4)

TABLA 47

Parámetros pseudorotacionales y otros
datos geométricos para puromicina.

	Forma N		Forma S
P	21°	(3°) ^a	160°
θ_m	33°	(40°) ^a	36°
$J_{1'2'}$ (Hz)	0,4		9,7
$J_{3'4'}$ (Hz)	9,7		0,4
$\phi_{1'2'}$	104°		154°
$\phi_{2'3'}$	37°		- 37°
$\phi_{3'4'}$	161°		- 96°
θ_0	31°		- 34°
θ_1	- 32°		20°
θ_4	- 18°		35°

a Valores deducidos de la estructura
de Rayos X.

diferencia análoga en el anillo de tetrahidrofurano podría explicar cualitativamente la diferencia en la conformación preferida del anillo de furanosa en puromicina (tipo N) y en la adenosina, 2'-AMP, 3'-AMP y 5'-AMP (tipo S).

Es también significativo el hecho de que a medida que nos desplazamos a pH alto, el equilibrio N \rightleftharpoons S va desplazándose hacia la forma S, si bien este desplazamiento es relativamente pequeño. Ello indica la existencia de factores de atracción o repulsión electrostáticos que contribuyen también a determinar la conformación del anillo de furanosa.

Los valores encontrados para los parámetros pseudorotacionales en disolución, difieren de los determinados en el cristal. Los determinados por RMN han de considerarse con precaución, debido a las aproximaciones del método, principalmente a la elección de los coeficientes de la ecuación de Karplus. De todos modos, sí parece existir un desplazamiento del ángulo de fase de pseudorotación, P, hacia valores mayores que los encontrados en el cristal, lo que supone un desplazamiento desde la forma C3'endo-C2'exo (cristal) (P=0) hacia la C3'endo-C4'exo (P=36°) en disolución. Asimismo se observa significativamente una reducción del ángulo máximo de torsión, θ_m , desde 40° (cristal) a 33° (disolución) lo que significa un mayor grado de plegamiento que el normal (38°) en el cristal y un relativo aplanamiento (33°) de dicho anillo en disolución. Para la estructura de mínima energía de

tipo S se obtienen valores muy similares a los obtenidos para moléculas análogas.

Es, por último, digno de destacar que la conformación del anillo de furanosa en puromicina no sufre variaciones significativas ni con la temperatura, ni con la concentración, ni incluso con el cambio de disolvente ($D_2O + DMSO$), como lo demuestra la constancia de $J_{1,2}$, $J_{2,3}$ y $J_{3,4}$ respecto a dichas variables. En el primer caso (temperatura), ello indica que la diferencia de energía libre encontrada entre las conformaciones de tipo N y S son más bien debidas al término entrópico. En los otros casos, se confirma la dependencia de la conformación de efectos intramoleculares que predominan sobre los de asociaciones moleculares (concentración) y solvatación u otro efecto del medio.

III.1.2.- Conformación del grupo exocíclico $-CH_2OH$.

Los estudios por difracción de Rayos X de un gran número de nucleósidos y nucleótidos en estado cristalino, muestran que las conformaciones preferidas del grupo exocíclico $-CH_2OH$ respecto a la rotación en torno al enlace $C4'-C5'$ son las tres "alternadas" y, de entre ellas, la denominada gg (figura 21). En disolución, está bien establecida la existencia de una rotación rápida en torno a dicho enlace, de forma que las constantes de acoplamiento medidas, $J_{4,5^g}$ y $J_{4,5^h}$ han de interpretarse como un promedio de los valores que ellas presentan en los conformeros individuales.

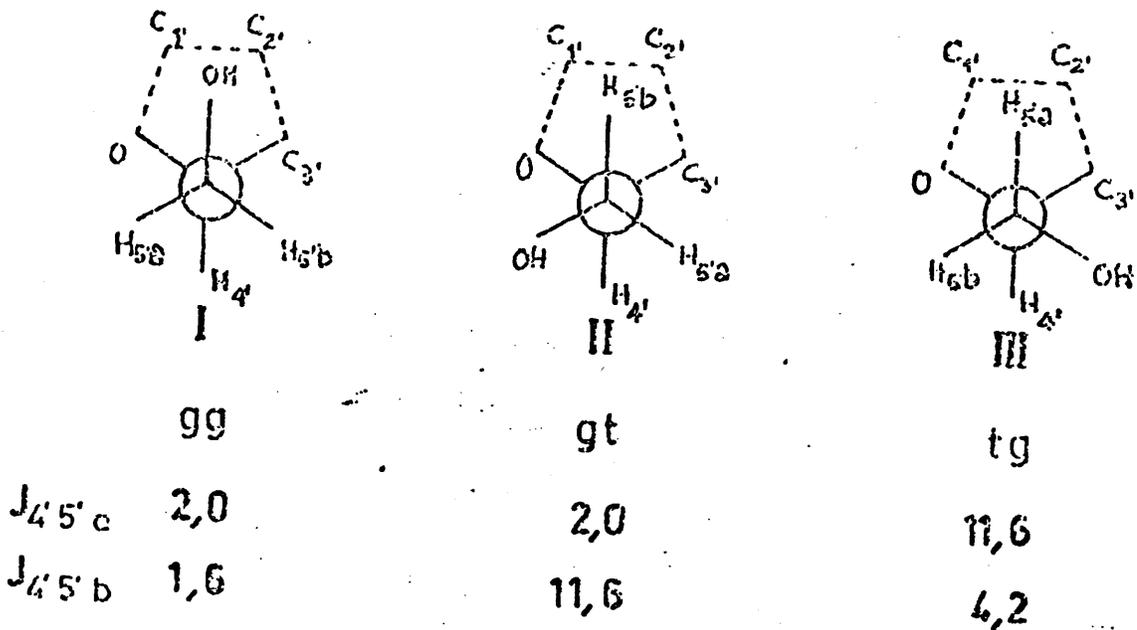


Figura 21. Rotámeros alternados en torno al enlace C4'-C5' en puromicina.

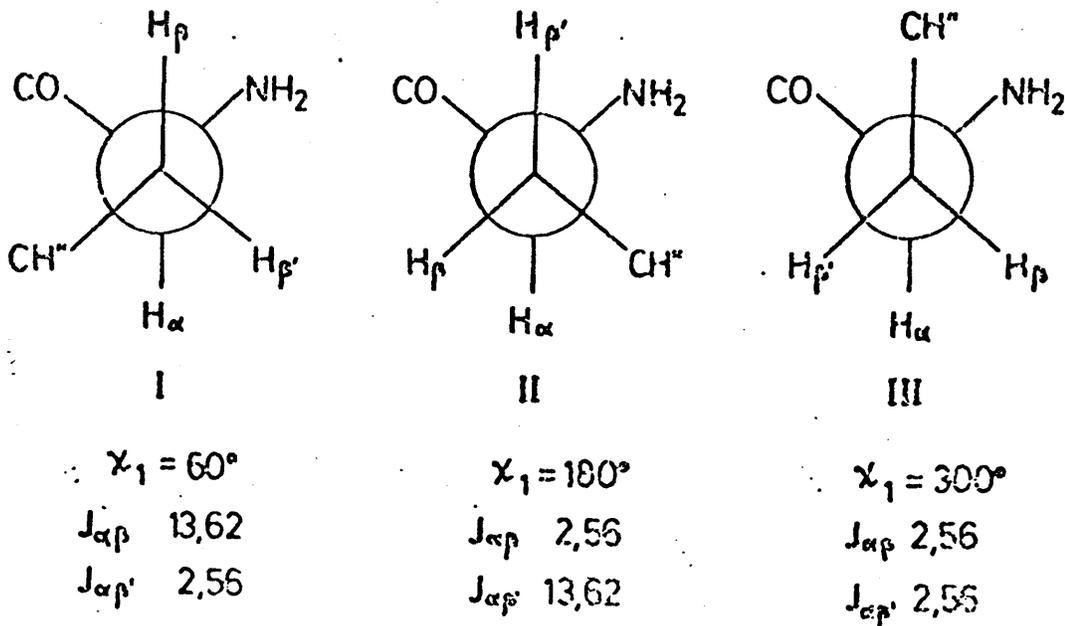


Figura 22. Rotámeros alternados en torno al enlace C2''-C3'' en puromicina.

No se dispone estrictamente de las constantes de acoplamiento de los confómeros I, II, III. Sin embargo, existe una gran cantidad de información acerca de los valores de estas constantes en una gran variedad de compuestos que cubren distintos intervalos dentro del rango en el que puede desplazarse el equilibrio, así como valores de compuestos modelo cíclicos que pueden asimilarse con alguna de las conformaciones indicadas.

Los valores de estas constantes que se dan en la figura se han tomado de (54) y cumplen con todas las dependencias respecto a ángulos diedros y electronegatividad y orientación de sustituyentes determinadas empíricamente. Aceptando pues, que

$$J_{4'5'a} = x_I J_{Ia} + x_{II} J_{IIa} + x_{III} J_{IIIa}$$

$$J_{4'5'b} = x_I J_{Ib} + x_{II} J_{IIb} + x_{III} J_{IIIb}$$

es posible calcular las fracciones molares correspondientes a los tres rotámeros, a partir de las constantes observadas $J_{4'5'i}$ y $J_{4'5'h}$, una vez que las señales observadas H5'l y H5'h se asignen a los protones H5'a y H5'b. En estudios análogos para nucleósidos y nucleótidos (55) esa asignación no puede hacerse inequívocamente. En el caso de la puromicina, sin embargo, sí es posible hacerlo. Se verá en una sección posterior que estos protones están apantallados por el anillo bencénico del resto O-Me-tirosinil, lo que conduce a la conclusión de que la conformación preferida en disolución es la que corresponde a la estructura

de Rayos X (figura 19). La magnitud de este apantallamiento, respecto a la del aminonucleósido es de 0,50 ppm (Hh) y 0,39 (Hl). La posición de los protones H5'a y H5'b respecto al anillo bencénico es tal que es de esperar un mayor apantallamiento para el primero, suponiendo, como luego se comprobará, que la conformación preferida es la gg. Ello conduce a asignar la señal Hl ($J_{4,5,l} = 2,3$) a H5'b, y la señal Hh ($J_{4,5,h} = 4,0$) a H5'a. Con esta asignación y las ecuaciones anteriores puede hallarse que para la puromicina (dicatión) las fracciones molares correspondientes a las distintas conformaciones son $x_I = 0,74$, $x_{II} = 0,23$ y $x_{III} = 0,03$.

Igualmente, para la puromicina neutra ($J_{4,5,a} = 2,72$ y $J_{4,5,b} = 4,2$) se halla $x_I = 0,69$, $x_{II} = 0,24$ y $x_{III} = 0,07$. Para el dicatión a 90°C ($J_{4,5,a} = 2,5$ y $J_{4,5,b} = 4,5$), las fracciones molares tienden a igualarse, $x_I = 0,67$, $x_{II} = 0,28$ y $x_{III} = 0,05$, como es de esperar.

La conclusión de que la puromicina, en sus distintos estados de ionización, muestra una acusada preferencia por la conformación gg, concuerda con lo obtenido para la generalidad de nucleósidos y nucleótidos y con la conformación que el dihidrocloruro adopta en el cristal. La mayor población de gt respecto a tg, en las conformaciones minoritarias es un hecho en línea con la influencia de la configuración del sustituyente en C3', determinada en derivados de glucosa, así como con las conclusiones que podrían derivarse de considerar la interacción de van der Waals entre O5' y los átomos del resto

OMe-tirosimil, en la conformación preferida en torno a $C_{\alpha}-C_{\beta}$.

Es interesante destacar que el pequeño desplazamiento del equilibrio que tiene lugar al pasar del dicatión a la forma neutra, por el que la población de gg se reduce, es un hecho que confirma la correlación que ha sido sugerida por Hruska (56) entre la conformación del carbinol exocíclico y la del anillo de furanosa. Según ella, la forma S desestabiliza la conformación gg, hecho que tiene lugar para la molécula de puromicina.

III.1.3.- Conformación en torno al enlace glicosídico.

En recientes estudios (57 y 58) sobre la conformación de nucleósidos y nucleótidos de adenina por RMN y difracción de Rayos X, se ha llegado a una serie de conclusiones respecto al punto concreto de la conformación de la base en torno al enlace N9-C1', descrita por el ángulo de torsión χ . (Figura 19). Según ellas, la conformación preferida por todos estos compuestos es la anti (χ 0°-120°), estando limitado el intervalo de variación de este ángulo a zonas bien delimitadas dependiendo de la conformación del anillo de furanosa (χ 0-30° para conformaciones de tipo N y χ 30-50° para las de tipo S). En disolución, no se excluye la posibilidad de la existencia de un equilibrio de interconversión entre las formas sin y las formas anti. Análogas conclusiones se deducen de la aplicación de métodos mecánicos de energía potencial (59) a las moléculas

de adenosina, y 5'-AMP. La posición anti es la favorecida en estas moléculas (χ 50° para conformaciones tipo S y χ 10° para las de tipo N). La conformación sin es sólo preferida para derivados sustituidos en C8 con grupos voluminosos. Este problema ha sido también abordado por la medida del efecto Overhauser nuclear (NOE) (60) y por la medida de tiempos de relajación de protón en adenosina y 5'-AMP con H8 sustituido por deuterio (61). Las conclusiones, en este caso, son que estas moléculas se muestran flexibles en su rotación en torno al enlace glicosídico y ninguna de las conformaciones sin o anti dan cuenta de los hechos experimentales, por lo que hay que admitir la existencia de un equilibrio conformacional entre ambas formas.

Este equilibrio no parece ser independiente de la existencia de otros rasgos conformacionales y, así, está establecida (62) la existencia de una correlación por la que la forma sin provoca una disminución de la población relativa de la conformación gg (en torno a C4'-C5'), con el consiguiente aumento de alguna de las formas gt ó tg.

Uno de los parámetros que más información puede proporcionar a este respecto, si bien su utilización no ha sido aún suficientemente explotada es el tiempo de relajación T_1 de los protones H2 y H8. Como puede verse en la Tabla 16 (capítulo II.2), los T_1 medidos para estos protones en el dicatión de puromicina, difieren muy notablemente (T_1 (H2)=2,62 s y T_1 (H8)=0,78 s). Si se supone

que el mecanismo de relajación imperante es el de acoplamiento dipolo-dipolo intramolecular y se realizan cálculos de T_1 para la conformación de Rayos X y la correspondiente con la base en posición sin (utilizando un tiempo de correlación obtenido a partir de los T_1 de ^{13}C), se observa que cualitativamente, la diferencia experimental entre los T_1 de H2 y H8 se explica sólo con la primera de ellas. Este es, a nuestro juicio, una de las pruebas experimentales más rotundas para certificar que la puromicina (dicatión) muestra una preferencia en disolución por la conformación anti.

Al aumentar el pH y disociarse de la base el protón en N1, los valores de los tiempos de relajación de H2 y H8 se hacen más iguales, lo que podría interpretarse, en principio, como un desplazamiento del equilibrio sin \rightleftharpoons anti hacia la primera de las formas. Los desplazamientos químicos de los protones de la ribosa H2', H3', H4', H5'a y H5'b sufren pequeñas modificaciones en uno y otro sentido al producirse la disociación. Sin embargo, los corrimientos observados son pequeños respecto a los que habría que esperar (59) para un cambio sustancial en el equilibrio sin \rightleftharpoons anti y no se producen, además, en el mismo sentido. Lo mismo ocurre con los desplazamientos químicos de ^{13}C . Por otro lado, la posición del equilibrio de los rotámeros gg, gt y tg no se modifica sustancialmente. Lo que sí puede deducirse fácilmente de los datos de variación con la concentración, y de la diferen-

cia de los corrimientos por protonación a distintas concentraciones, es la existencia de una asociación intermolecular por apilamiento (Stacking) por encima del pK correspondiente a la desprotonación de la base, proceso que, por debajo de dicho pK, estaba impedido por repulsión electrostática entre las bases. Este hecho, que lleva consigo la proximidad entre los protones H2 de distintas moléculas, es, a nuestro juicio, la causa del incremento de relajación que sufre este protón al cambiar el estado de ionización de la base. En medidas de tiempo de relajación a distintas temperaturas del 5'-AMP a pH fisiológico, se ha llegado, muy recientemente (63) a la conclusión de que la relajación de H2 es fundamentalmente de naturaleza intermolecular.

Por otro lado, utilizando la dependencia establecida (64) entre la constante de acoplamiento vecinal ${}^3J_{13C-1H}$ con el ángulo diedro, que se discute con más detalle en III.2.2., a partir del valor observado para ${}^3J_{C8-H1'}$ de 4Hz pueden calcularse valores de ϕ (ángulo diedro entre los planos C8NC1' y NC1'H1' de $\pm 20^\circ$ y $\pm 140^\circ$, que conducen a los siguientes valores de $\chi = 220^\circ, 260^\circ, 20^\circ$ y 100° , los dos primeros en el intervalo sin y los dos últimos en el intervalo anti. Es digno de destacar que uno de los valores calculados de χ en el intervalo anti ($\chi=20^\circ$) coincide prácticamente con el valor que este ángulo presenta en el cristal.

En conclusión, la posición de la base en puromicina es preferentemente anti, y la posición del equilibrio sin \pm anti no sufre alteraciones notables al cambiar el estado de ionización de sus diferentes grupos.

III.1.4.- Conformación en torno al enlace C3'-N3'

(torsión ϕ).

El exámen del mapa conformacional (ϕ, ψ) resultante de los estudios de energía potencial (50), muestra que las conformaciones que son energéticamente posibles están confinadas a una sola región de dicha superficie y que el mínimo de energía potencial aparece a $(\phi, \psi) = (110^\circ, 290^\circ)$. Dicho mínimo no es muy profundo y la línea de nivel a 0,5 Kcal se extiende a la región comprendida entre $\phi = 110^\circ \pm 30^\circ$ (el ángulo $\phi = 120^\circ$ corresponde a la orientación en la que el enlace N-H se sitúa en posición antiperiplanar respecto al enlace C3'-H3'). El ángulo ϕ en la conformación de Rayos X muestra un valor de 110° .

Por otro lado, del estudio de la estructura de Rayos X de distintos 3'-nucleótidos, se deduce que, para aquellos compuestos que muestran una conformación del anillo de ribosa C3'-endo, el ángulo ϕ , análogo al que consideramos (identificando el enlace P=O con el C=O) es de $97^\circ \pm 21$.

Bystrov y col. (65) han propuesto, sobre la base de los datos experimentales existentes, una ecuación de Karplus aplicable al fragmento peptídico -NH-CH-. Esta

ecuación es:

$${}^3J_{\text{NHCH}} = 9,4 \cos^2 \theta - 1,1 \cos \theta + 0,4$$

en donde θ es el ángulo diedro entre los enlaces CH y NH.

El valor medido para esa constante en DMSO (en D_2O el NH intercambia por deuterio) es de 6,8 Hz. Resolviendo la ecuación anterior se encuentran para $\cos \theta$ valores de 0,888 y -0,771 correspondientes a ángulos θ ($0 < \theta < 180^\circ$) de 28° y 141° . Los valores del ángulo de torsión ϕ correspondientes a estos últimos son de ($218^\circ, 262^\circ$) y de ($81^\circ, 159^\circ$). De estos cuatro ángulos posibles, el más cercano al que presentan los distintos 3'-nucleótidos en Rayos X y la propia puromicina, así como al valor derivado del estudio de energía potencial es el de $\phi = 81^\circ$.

Es claro que no se puede adscribir demasiada significación al valor del ángulo ϕ así calculado, debido a las aproximaciones utilizadas, así como al hecho de haber sido medida la constante ${}^3J_{\text{NHCH}}$ en DMSO y no en D_2O . Sin embargo, los restantes parámetros que pueden medirse en los dos disolventes indican que no existen cambios notables en la conformación de puromicina al cambiar de disolvente. El valor de la constante medida es, además, reflejo de la media pesada correspondiente al equilibrio de la conformación de ribosa $\text{N} \rightleftharpoons \text{S}$. Muy probablemente el valor de ϕ para la conformación de mínima energía no sea el mismo para la forma N que para la S, siendo además razonable el hecho de que para esta última el valor de ϕ sea menor (interacción de van der Waals entre $\text{N1}'$ y $\text{H1}'$), lo

que contribuiría a explicar la diferencia encontrada para dicha torsión en el cristal y en disolución. Aun teniendo en cuenta el efecto del equilibrio $N \neq S$, un desplazamiento del valor de ϕ en la forma N hacia valores menores de 110° sigue siendo necesario para satisfacer la ecuación anterior.

III.1.5.- Conformación del resto O-Me-tirosimil.

La estructura cristalina de la puromicina (49) muestra que, en ella, el resto OMetirosimil presenta una conformación caracterizada por los valores de 257° , 74° y 73° para los ángulos de torsión ψ , χ_1 y χ_2 , respectivamente. El grupo peptido $-NH-CO-$ es plano y el enlace $-NH$ está en posición trans respecto al CO, como es regla general en aminoácidos y péptidos. En el estudio de la energía potencial (50), a partir de los mapas conformacionales (ψ, χ_1) y (ψ, ϕ) se obtiene para ψ un sólo mínimo de energía potencial, con un valor de este ángulo comprendido en el intervalo $(240-300^\circ)$. Cuando se tiene en cuenta la influencia de los átomos de la parte nucleosídica, el mínimo global en el mapa (ψ, χ_1) aparece a valores de $(250^\circ, 50^\circ)$, si bien existen, además, otros dos mínimos para el mismo valor aproximado de ψ y valores de χ_1 de $\sim 180^\circ$ y 300° . En conclusión los dos tipos de estudio coinciden en señalar como la conformación más estable del resto aminoacil es aquella en que ψ y χ_1 adoptan los valores (estandarizados con referencia a las conformaciones alternadas) de 240° y 60° , respectivamente.

En disolución, existen principalmente, dos tipos de argumentos, basados en datos de RMN, para obtener información acerca de la conformación del resto aminoacil. Uno de ellos, es el desplazamiento químico a alto campo que sufren los protones H4'-H5'a y H5'b de la puromicina respecto a su amino nucleósido. Los correspondientes corrimientos de los protones del resto ribosil se dan en la Tabla 48.

TABLA 48

Desplazamientos químicos (ppm) relativos de los protones del resto ribosil (puromicina a-aminonucleósido de puromicina) ($2,7 \cdot 10^{-2} M$, pH 7,1)

$$\Delta\delta = (\delta_{\text{Pur}} - \delta_{\text{aminonucleósido}})$$

H1'	-0,06
H2'	+0,11
H4'	-0,27
H5'a (H5' _h)	-0,50
H5'b (H5' _l)	-0,39

El hecho de que los protones H4', H5'a y H5'b muestren un corrimiento sustancial hacia alto campo, mientras que los protones H2' y H1' sufran una variación menor y de distinto signo en el caso del primero, es prueba de que el anillo aromático del resto OMe-tirosimil está situado hacia la

parte C3'-C4'-O del anillo de ribosa (ψ 180-360°) y en una posición tal que los protones H4', H5'a y H5'b queden por encima o por debajo del plano definido por el anillo aromático y no en las proximidades de dicho plano.

La segunda pieza de información útil en la descripción conformacional del resto aminoacilo, son las constantes de acoplamiento $J_{\alpha\beta h}$ y $J_{\alpha\beta l}$. El hecho de que una de ellas ($J_{\alpha\beta h}=9,5$ Hz) alcance un valor cercano al esperado para una orientación antiperiplanar de los protones H_α y $H_{\beta h}$, indica, en principio, de modo cualitativo que las conformaciones con un ángulo de torsión $\chi_1=300^\circ$ han de estar poco pobladas. Este hecho, junto con el anteriormente descrito referente a los desplazamientos químicos, reduce drásticamente el rango de posibles valores de (ψ, χ_1) . Ciertamente, sólo los valores cercanos a $(240^\circ, 60^\circ)$ cumplen con las dos condiciones.

De acuerdo con esta conclusión, las señales protónicas denominadas $H_{\beta h}$ y $H_{\beta l}$ han de asignarse, respectivamente, a los protones H_β y $H_{\beta'}$ (véase Fig. 22). Utilizando los valores de $J_{\alpha\beta}$ y $J_{\alpha\beta'}$, para los tres conformeros más estables (alternadas) correspondientes a una rotación en torno $C_\alpha-C_\beta$, dados por Pachler (66), es posible obtener las poblaciones de cada uno de ellos, mediante las siguientes expresiones:

$$p_I = (J_{\alpha\beta}^{obs} - J_g) / (J_t - J_g)$$

$$p_{II} = (J_{\alpha\beta'}^{obs} - J_g) / (J_t - J_g)$$

$$p_{III} = 1 - p_I - p_{II}$$

en donde J_t y J_g son los valores modelo para las constantes vecinales trans y gauche que son de 13,62 y 2,56 Hz, respectivamente. En la Tabla 49 se dan los valores de las constantes medidas a temperatura ambiente y a la de 92°C, para pH 1,5 y 10,5, y los valores de p_I , p_{II} y p_{III} calculados con las anteriores expresiones.

TABLA 49

Poblaciones de las conformaciones I, II y III a distintas condiciones de pH y temperatura.

	pH=1.5		pH=10.5	
	T=26°C	T=92°C	T=26°C	T=92°C
$J_{\alpha\beta}$	9,4	8,8	9,2	8,3
$J_{\alpha\beta'}$	6,4	6,3	6,2	6,0
p_I	0,62	0,56	0,60	0,52
p_{II}	0,35	0,34	0,33	0,31
p_{III}	0,03	0,10	0,07	0,07

Como puede verse, la población de la conformación III ($\alpha_1=300^\circ$), es muy minoritaria en todos los casos, mientras que las de I ($\alpha_1=60^\circ$) y II ($\chi_1=180^\circ$) son grandes, resultando favorecida la I en consonancia con los resultados de la estructura de Rayos X. Las pequeñas variaciones observadas para distintos pH, están incluídas dentro de los errores de las constantes. Sin embargo, la variación de las pobla-

ciones con la temperatura es significativa y sigue la tendencia de que se igualen las poblaciones, lo que es consecuente con lo que habría que esperar. En DMSO, sólo es posible medir la suma de $J_{\alpha\beta}$ y $J_{\alpha\beta'}$, lo que permite unicamente evaluar los valores de (p_I+p_{II}) y de p_{III} , resultando ser de 0,76 y 0,24, respectivamente, lo que supone un notable incremento de la población de la conformación con $\chi_1=300^\circ$ en este disolvente respecto a la que se obtiene en D_2O .

De acuerdo con el modelo de Johnson y Borey (67) para el cálculo del apantallamiento producido por las corrientes de anillo del benceno y utilizando los datos geométricos de la conformación de puomicina, se han evaluado estos efectos para los protones $H4'$, $H5'a$ y $H5'b$, resultando ser de: -0,44, -0,13 y -0,11, respectivamente. Estos valores no reproducen ciertamente los observados (Tabla 48), pero sí indican cualitativamente el sentido del corrimiento de los desplazamientos químicos. Además de la simplicidad del modelo, hay que tener en cuenta que dentro de la conformación de Rayos X, pequeñas modificaciones del ángulo de torsión χ_2 puede tener efectos notables sobre los corrimientos calculados para estos protones. En la conformación "extendida" ($\psi=180^\circ$), los corrimientos debidos al anillo bencénico son despreciables.

III.2. Estructura y conformación molecular de gougerotina

Para la molécula de gougerotina no existen, hasta el momento, estudios de Rayos X del cristal ni estudios conformacionales por métodos mecánicos de energía potencial. Ello limita en alguna medida el alcance de la discusión que, sobre la estructura y conformación de gougerotina, se realiza en este capítulo con base en los datos obtenidos de sus espectros de RMN. Es posible, sin embargo, obtener información acerca de algunos aspectos conformacionales de esta molécula, los cuales se discuten separadamente.

En la fig. 23, se ha representado una de las posibles conformaciones de la gougerotina, en donde se ilustra la nomenclatura de los distintos ángulos de torsión utilizados en la discusión. Las rotaciones en torno a los enlaces N-C2", C2"-C3", C2"-C1", N-C4' y C1'-N se designan con los símbolos ϕ_1 , χ_1 , ψ , ϕ_2 y χ , respectivamente. El valor de $\phi_1=0$ corresponde al ángulo en que el enlace NH eclipsa al C2"-C1"; para $\psi=0$, los enlaces N-C2" y C1"-O están eclipsados; $\chi_1=0$ corresponde al rotámero en el que el enlace C3"-O eclipsa al C2"-C1"; $\phi_2=0$ cuando los enlaces C3'-C4' y N-C1" están eclipsados y, por último, por analogía con la citidina, $\chi=0$ para la conformación en que el enlace N1-C6 de la base eclipsa al C1'-O del azúcar. El signo de la rotación se define como positivo, cuando mirando en la dirección del enlace para el que se considera la rotación, el enlace más alejado gira en el sentido de las agujas del reloj.

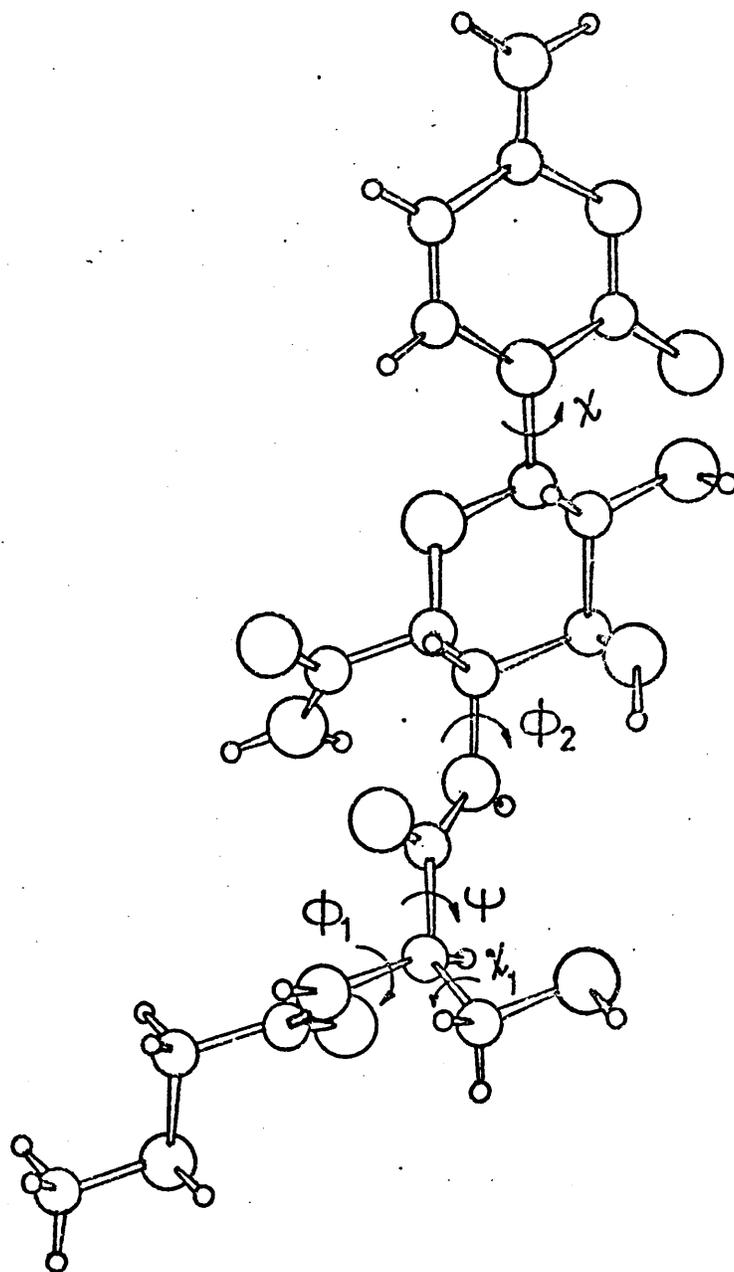


Figura 23. Una conformación posible de gougertina.

III.2.1.- Conformación del anillo de piranosa.

La estructura de la gougerotina ha sido establecida en una serie de trabajos, por H. Iwasaki y por J.J. Fox y col. (68,69,70) por métodos químicos y espectroscópicos. En el último trabajo (70) se demuestra que la configuración del azúcar es gluco y no galacto, como se había establecido en un trabajo anterior (69). Para ello, Fox y col. se basan en los espectros de RMN e IR de un producto de degradación de la gougerotina.

El análisis del espectro protónico del anillo de azúcar de la gougerotina, llevado a cabo por nosotros, muestra claramente que todas las constantes de acoplamiento vecinales son del orden de 9 Hz, lo que implica una relación axial-axial para todos los protones del anillo. Ello determina que la conformación del anillo es la silla 4C_1 (la representada en la fig. 23) y resuelve automáticamente el problema de la configuración del átomo de carbono C4', para el que el sustituyente amino acil queda en posición ecuatorial, confirmando que la configuración del anillo es gluco. Esta determinación es mucho más directa que la realizada por Fox y col., ya que las conclusiones estructurales y conformacionales se obtienen del espectro de la propia sustancia y no de un producto de degradación.

La conformación del azúcar no sufre variación ninguna con la temperatura, con la concentración, con el pH ni con el cambio de disolvente ($D_2O \rightarrow DMSO$).

III.2.2.- Conformación en torno al enlace glicosídico.

La conformación en torno al enlace glicosídico, definida por el ángulo de torsión χ , en citidina y, en general, en β -nucleósidos de pirimidina, ha sido objeto de un gran número de estudios, tanto teóricos (métodos semiempíricos de CM y métodos mecánicos de energía potencial) como experimentales (IR, CD, ORD, NMR, difracción de Rayos X, etc.) (para una revisión, véase (71)). Parece existir un acuerdo general en que las conformaciones en el intervalo anti (χ -30° , 150°) son preferidas respecto a las del intervalo sin (χ 150° , 330°), debido principalmente a las interacciones estéricas desfavorables que se establecen en este último caso entre el oxígeno del grupo 2-ceto de la base y los sustituyentes del anillo de furanosa. Ello se confirma en estado cristalino, en el que un gran número de β -nucleósidos de pirimidina muestran un ángulo χ comprendido entre 0° - 80° . La conformación del anillo de azúcar, influye sobre el valor de χ , obteniéndose para la conformación C2'-endo valores de χ comprendidos entre 40° - 80° y para la C3'-endo valores de χ entre 0° - 40° .

En el caso de la gougertina, el anillo de azúcar es de piranosa y no de furanosa como en los nucleósidos, lo que puede introducir en principio, algunas modificaciones respecto a la conformación en torno al enlace glicosídico. El desplazamiento químico del protón H6, que es uno de los parámetros que más podrían afectarse por un cambio del ángulo χ , es muy similar, sin embargo, al observado en la citidina. Los parámetros que más información pueden proporcio-

nar a este efecto, son las constantes vecinales ${}^3J_{13C-1H}$ entre los carbonos C2 y C6 de la base y el protón H1' del azúcar. Para estas constantes se han medido valores de 4,0 y 4,5 Hz, respectivamente. En recientes estudios (72 y 64) se ha puesto de manifiesto la existencia de una relación de tipo Karplus, análoga a la que tiene lugar para protones, para el acoplamiento vecinal ${}^{13}C-{}^1H$. Lemieux y col. (64), han obtenido empíricamente una curva de dependencia del valor de ${}^3J_{13C-1H}$ con el ángulo de torsión para nucleósidos de pirimidina, utilizando el acoplamiento entre el núcleo ${}^{13}C_2$ de la base y el protón anomérico H1'.

Para el valor observado de ${}^3J_{13C_2-1H1'}$ en gougero-tina se obtienen valores de ϕ (ángulo diedro entre los planos C2-N-C1' y NC1'H1') de $\pm 20^\circ$ y $\pm 140^\circ$, que corresponden a los siguientes valores del ángulo de torsión glicosídico $\chi = 40^\circ, 80^\circ, 200^\circ$ y 280° , los dos primeros en el intervalo anti y los dos últimos en el intervalo sin. Si suponemos que existe la misma relación entre la constante ${}^3J_{13C_6-H1'}$ y el ángulo de torsión ϕ' (ángulo diedro entre los planos C6-N-C1' y N-C1'-H1'), a partir del valor experimental de 4,5 Hz obtendríamos valores de ϕ' de $\pm 10^\circ$ y $\pm 150^\circ$ que corresponden a valores de χ de $250^\circ, 230^\circ, 30^\circ$ y 90° . Las soluciones correspondientes a las parejas (ϕ, ϕ') de $(20^\circ, -150^\circ)$ y $(-20^\circ, 150^\circ)$, proporcionan mejores soluciones que las otras dos posibles, determinando ángulos medios χ de 35° y 85° , respectivamente. Ambas soluciones se encuentran en el intervalo anti. Con sólo los datos de RMN

no es posible elegir entre estas dos soluciones. La aplicación de este método está, por otra parte, restringido al caso de que exista una conformación única o muy favorecida, no siendo aplicable si existe un equilibrio dinámico entre varias conformaciones.

III.2.3.- Conformación en torno a los ángulos ϕ_1 y ϕ_2 .

Como puede verse en la fig. 23, ϕ_1 y ϕ_2 son ángulos de torsión en torno a enlaces $-N-C_\alpha-$ de restos aminoacil comparables a los definidos (73) en estudios de péptidos. Para la determinación de la conformación en torno a estos enlaces, según se vio en el capítulo III.1.4., son de utilidad las constantes de acoplamiento vecinales entre el protón N-H y el correspondiente protón $C_\alpha-H$. Desgraciadamente, esta constante no puede medirse en disolución de D_2O , debido a que el protón N-H intercambia con deuterio. En DMSO, sí puede medirse esta constante que, según se discutió en II.2.5., alcanza los valores de 7,8 y 8,2 Hz para los restos serinil y aminoglucosil respectivamente.

A partir de estos valores y utilizando la ecuación, análoga a la de Karplus para el protón, propuesta por Brystov y col. (66) se encuentran para $\cos \theta_1$ valores de 0,971 y -0,854 que corresponden a valores de θ_1 de 14° y 149° , respectivamente. El ángulo θ_1 es el ángulo diedro entre los planos $H-N-C2''$ y $H2''-C2''-N$ ($0^\circ < \theta_1 < 180^\circ$). Los cuatro posibles valores de ϕ_1 correspondientes a estos valores de θ_1 son, $\phi_1 = 106^\circ, 134^\circ, 269^\circ$ y 331° . Un valor de $\phi_1 = 120^\circ$ corresponde a la conformación en la que el enlace N-H eclipsa al enlace $C2''-H2''$. Los valores obtenidos de

106° y 134° son desviaciones de $\pm 14^\circ$ respecto a dicha conformación. Asimismo, un valor de $\phi_1 = 300^\circ$ corresponde a la conformación en la que el enlace N-H se sitúa en una posición anti-periplanar respecto a C2"-H2" y los valores de $\phi_1 = 269^\circ$ y 331° son desviaciones de $\pm 31^\circ$ respecto a dicha conformación. De la consideración de modelos moleculares puede deducirse que en las conformaciones en las que ϕ_1 vale 106° ó 134° existen desfavorables interacciones estéricas entre el O del grupo carboxilo del resto sarcosilo y el O del carboxilo del resto serinil, así como con alguno de los átomos sustituyentes del C3", que hacen que estas conformaciones sean menos probables que las otras dos. Estas consideraciones se aplican para un valor de $\psi = 300^\circ$, pero otras análogas rigen para cuando $\psi \sim 120^\circ$, que es otra de las conformaciones que puede considerarse como probable. Con base en este tipo de consideraciones, no es posible distinguir entre la mayor o menor probabilidad de las conformaciones definidas por $\phi_1 = 269^\circ$ y 331° , concluyéndose que la conformación de gougerotina en torno al enlace -N-C2"- está en el intervalo en que C2"-H2" y N-H están en una posición antiperiplanar y que el ángulo ϕ puede adoptar un valor de 269° o bien de 331°, siendo también aceptable que exista un equilibrio dinámico entre estas dos conformaciones.

Utilizando el valor de $J_{\text{NH-C}^4\text{H}^4} = 7,8 \text{ Hz}$, se encuentran para $\cos \theta_2$ valores de 0,876 y -0,812, que corresponden a valores de θ_2 de 29° y 144°. El ángulo θ_2 es el ángulo diedro entre los enlaces H-N-C4' y N-C4'-H4' ($0^\circ < \theta_2 < 180^\circ$).

Los cuatro posibles valores de ϕ_2 correspondientes a estos valores de θ_2 son $\phi_2=84^\circ, 156^\circ, 270^\circ$ y 330° . Los dos primeros corresponden al rango antiperiplanar de los enlaces C4'-H4' y NH, y los dos últimos al rango sinperiplanar. Del examen de modelos moleculares, puede claramente inferirse que las conformaciones en el rango antiperiplanar son más favorables que las del rango sinperiplanar, debido a la existencia, en este último caso, de desfavorables interacciones estéricas entre el O del grupo carboxilo del resto D-serinil con los átomos H3' y H5'. Asimismo, en la conformación definida por $\phi_2=156^\circ$, el mismo átomo de O del grupo carboxilo del resto D-serinil presenta interacciones desfavorables con los átomos del grupo -CONH₂ unido a C5', por lo que concluimos que la conformación más probable en torno al enlace -N-C4'- es la definida por el ángulo $\phi_2=84^\circ$. Es digno de destacar que para la puromicina se obtuvo un resultado análogo.

III.2.4.- Conformación en torno al ángulo de torsión χ_1 .

Las tres conformaciones alternadas que puede adoptar el grupo hidroximetilo del resto D-serinil en la gougérotina, se ilustran más abajo y vienen definidas por los valores del ángulo χ_1 de $60^\circ, 180^\circ$ y 300° . Como en casos análogos, la determinación de las poblaciones correspondientes a estas tres conformaciones, exige disponer de los valores observados de $^3J_{H2'H8}$ y $^3J_{H2'H8'}$, así como de los valores correspondientes a cada una de las tres conformaciones (I), (II) y (III). Recientemente, Feeney (74) ha propuesto un conjunto de valores para estos acoplamientos deducidos de compuestos modelo en los que aparecen bloqueadas las correspondientes conformaciones (I), (II) y (III). Esas constantes

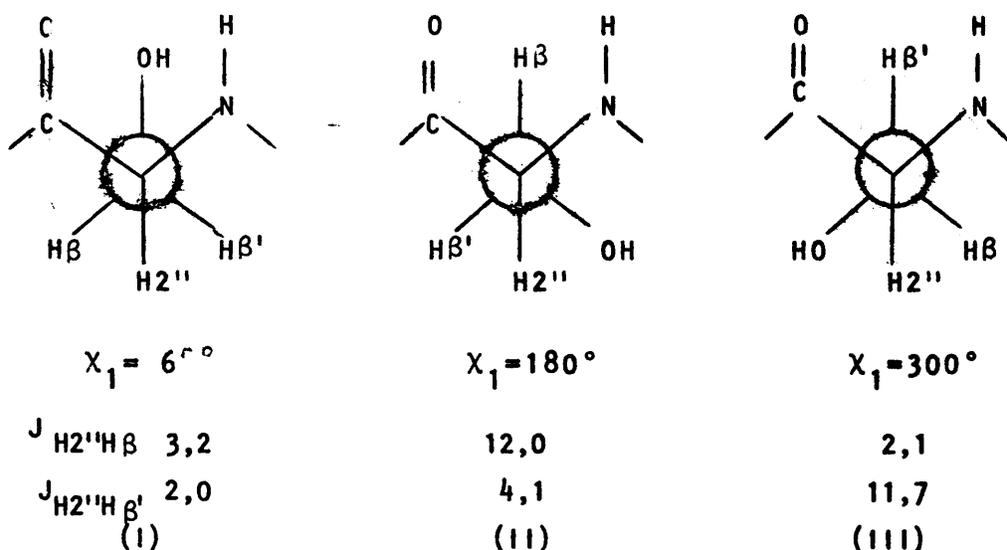


Figura 24. Rotaciones alternadas en torno al enlace C2''-C3'' en gougerotina son aplicables al caso en que el sustituyente en C β es un átomo de carbono.

En el caso de la serina, dichos valores han de corregirse por el efecto del sustituyente -OH, principalmente en los casos en que el enlace C3''-O adopte una orientación antiperiplanar respecto al enlace C2''-H2''.

Disminuyendo, en esos casos, los valores dados por Feeney en un 30% se consigue que $J_{H2''H\beta}$ (I) sea menor que $J_{H2''\beta}$ en (II) de acuerdo con reglas empíricas bien establecidas. De este modo, el conjunto de constantes de acoplamiento modelo que se adopta es el dado en la figura 24.

El valor medido para la suma ($J_{H2''\beta} + J_{H2''\beta'}$) es de 10,9 Hz. Aunque su determinación no es tan segura como la de la suma, es posible evaluar los valores individuales de $J_{H2''\beta}$ y $J_{H2''\beta'}$, que resultan ser de 8,4 y 2,5 Hz, si bien su asignación concreta no puede determinarse. Acep-

tando la asignación $J_{H_2''\beta} = 8,4$ y $J_{H_2''\beta'} = 2,5$, se obtienen fracciones molares de $x_I = 0,49$, $x_{II} = 0,58$ y $x_{III} = -0,07$, y si se acepta la inversa se obtiene $x_I = 0,34$, $x_{II} = 0,00$ y $x_{III} = 0,66$. Esta última elección parece más razonable por no obtenerse fracciones molares negativas, si bien estas pueden estar afectadas de un error de $\pm 0,10$ debido a la incertidumbre en los valores modelo de los acoplamientos. En conclusión, una de las dos conformaciones (II) o (III), más probablemente la primera, no está poblada. Por otro lado, no parece confirmarse la existencia de enlace de hidrógeno entre el -OH y el -CO del resto serinil, sugerida en (75), pues ello conduciría a una población muy mayoritaria para la conformación (I).

III.2.5.- Otros rasgos conformacionales.

La conformación en torno al ángulo de torsión ψ es particularmente importante, porque define la posición relativa del resto sarcosilo respecto al anillo de piranos. Desgraciadamente, no disponemos de ningún parámetro magnético que pueda proporcionar información directa respecto a la conformación en torno a dicho ángulo. Sin embargo, en los trabajos de Scheraga (73) sobre el cálculo por métodos mecánicos de la conformación de polipéptidos se concluye que para péptidos pequeños (dipéptidos), los valores más probables del ángulo de torsión ψ son de 120° y de 300° . El valor de 120° corresponde a la conformación en la que el enlace CO está eclipsado con el enlace $C_\alpha H$, y el de 300° a aquella en la que estos enlaces están en posición anti-periplanar. Esta última es la representada

en la fig. 23, y resulta ser ligeramente favorable a la anterior, por lo que se ha mantenido fija en la discusión precedente. Conviene, sin embargo, tener en cuenta, la posibilidad de que la molécula se encuentre en la conformación con $\psi=120^\circ$.

De la conformación del grupo $\text{CH}_3\text{-NH-CH}_2\text{-CO-}$ perteneciente al resto sarcosilo, tampoco es posible obtener información precisa con base en los espectros de RMN. El valor obtenido para NT_1 , donde T_1 es el tiempo de relajación ^{13}C y N el número de átomos de hidrógeno directamente unidos al anterior, para el grupo $\text{CH}_3\text{-}$ terminal es un orden mayor que el de los restantes carbonos de la molécula, lo que indica un grado mucho mayor de movilidad para ese grupo que para los restantes. Ello es consecuente con que la cadena del grupo sarcosilo muestre una libertad muy grande de movimientos, estando pobladas por igual todas las posibles conformaciones alternadas.

III.3. Interacción de puromicina y gougerotina con ribosomas de E. Coli por espectroscopía de RMN

III.3.1.- Interacción de puromicina y gougerotina con el centro peptidil-transferasa.

Las constantes de asociación de los antibióticos puromicina y gougerotina con ribosomas de E. Coli, han sido medidas utilizando antibióticos marcados por el método de ultracentrifugación, por Fernández Muñoz (47) y Barbacid y Vazquez (48), respectivamente. Los valores resultantes a una temperatura de 0°C fueron: $K_A=1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para puromicina y $K_A=6,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ para gougerotina.

La aplicación de la técnica de RMN a la medida de estas interacciones requiere la utilización de concentraciones de antibiótico de uno a tres órdenes de magnitud mayores que las empleadas en las determinaciones aludidas más arriba. Ello es un requisito impuesto por la sensibilidad relativamente pequeña del método. La utilización de estas concentraciones relativamente grandes ($A_0 \sim 10^{-2} - 10^{-3} \text{ M}$) presenta serias desventajas. En primer lugar, las medidas no se realizan en el intervalo óptimo de concentraciones recomendable para la extracción de valores precisos para los parámetros termodinámicos del equilibrio de interacción. En segundo lugar, a esas concentraciones pueden ponerse de manifiesto otros equilibrios de interacción de menor afinidad, que afectan a los parámetros espectrales que se utilizan para extraer la información del primer equilibrio, oscureciendo los efectos de éste e impidiendo por tanto, su estudio.

Ignorando la posible existencia de estos equilibrios secundarios, que en principio no pueden preverse, la situación y las posibilidades del estudio de la interacción de puromicina y gougertina con el centro peptidil-transferasa ribosómico por la técnica de RMN, se presentaban de acuerdo con lo que se describe a continuación. El exceso de anchura de las líneas del antibiótico debido a la interacción viene expresado ({II.5.1} y {I.3.15}) por el producto de la fracción molar de antibiótico unido y el factor de relajación transversal. Para los valores de K_A ($>10^4 \text{ M}^{-1}$) que caracterizan estos equilibrios de interacción, la fracción molar de antibiótico unido es $P_M = R_o/A_o$ ($\approx 10^{-2}$ como máximo), luego para obtener un exceso de anchura medible (10 seg^{-1}), el valor del factor de relajación habría de ser, como mínimo, de 10^3 seg^{-1} . El exceso de anchura viene dado por una expresión complicada ({I.3.15}) en la que intervienen la cinética de relajación transversal del antibiótico ligado, $(1/T_{2M})$, la cinética de disociación del complejo $(1/\tau_M)$ y la diferencia entre las frecuencias de resonancia de las señales del antibiótico libre y ligado, $\Delta\omega_M$. Según se vio en el capítulo I, la expresión {I.3.15} puede simplificarse con resultados diferentes dependiendo éstos de los valores relativos de los tres parámetros. Es útil, por tanto, hacer una evaluación del orden de magnitud que pueden alcanzar éstos últimos.

La contribución intramolecular (mecanismo de relajación dipolar) a $(1/T_{2M})$ para un núcleo de una molécula

rígidamente unida al ribosoma, puede evaluarse a partir de {I.2.20}, tomando como tiempo de correlación el calculado para el ribosoma mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$\tau_c = 4\pi\eta a^3 / 3KT$$

que proporciona el tiempo de correlación de difusión isotrópica rotacional para una esfera rígida de radio a , que se mueve en un medio de viscosidad η . Se obtiene así un $\tau_c = 3,3 \cdot 10^{-6}$ seg y, para los protones H_{meta} (cuyas distancias a otros protones están mejor definidas), se obtiene un valor de $(1/T_{2M}) = 6,9 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$. Si se supone, por otra parte, que la velocidad de formación del complejo está controlada por difusión, puede evaluarse, teniendo en cuenta el tamaño del ribosoma, que $K_{+1} \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ (76). Para las constantes de asociación medidas, $K_A \geq 10^4 \text{ M}^{-1}$, resulta, pues, que la constante cinética de disociación del complejo es $K_{-1} \leq 10^3 \text{ seg}^{-1}$. El valor del término $\Delta\omega$, para protones no involucrados en enlaces de hidrógeno, es máximo cuando en el complejo existe una interacción por apilamiento entre bases nucleosídicas o entre restos aromáticos, en cuyos casos alcanza un valor típico de $3 \cdot 10^2 \text{ seg}^{-1}$ (0,5 ppm a 90 MHz). Es razonable, en primera aproximación, despreciar la contribución de este término en la expresión {I.3.15} frente a las evaluaciones realizadas para $(1/T_{2M})$ y $K_{-1} (\approx 1/\tau_M)$, que resultan ser del mismo orden aproximado. La variación de los excesos de anchura con la temperatura mostraría inequívocamente la predominancia de uno u otro término, pues, si éstos aumentan, el factor de relajación está dominado por la cinética de intercambio (intercambio lento,

$K_{-1} \ll (1/T_{2M})$) y, si disminuyen, el factor de relajación está dominado por la relajación del antibiótico ligado (intercambio rápido, $(1/T_{2M}) \ll K_{-1}$). Si se hubieran cumplido las suposiciones que se han introducido hasta aquí, a partir del estudio por RMN de la interacción de antibióticos con el centro peptidil-transferasa, hubiera sido posible obtener información acerca de la constante de asociación (si $K_A \approx 10^4 \text{ M}^{-1}$) así como del valor de $(1/T_{2M})$ (en el caso de intercambio rápido, siempre que $(1/T_{2M}) \geq 10^3 \text{ seg}^{-1}$), o bien del valor de la constante cinética de disociación del complejo (en el caso de intercambio lento, siempre que $K_{-1} \geq 10^3 \text{ seg}^{-1}$).

A continuación vamos a considerar cual sería la situación en caso de que fallara o se modificara alguna de las hipótesis aceptadas. Si la ligadura del antibiótico al ribosoma es rígida, es posible que la relajación no sea sólo intramolecular, sino que al estar algunos de sus protones suficientemente próximos a otros protones del ribosoma, sea efectiva la relajación por interacción dipolar intermolecular. Ello significaría que el valor de $(1/T_{2M})$ sería mayor que 10^3 seg^{-1} , lo que no alteraría los anteriores razonamientos más que para aumentar la posibilidad de que el equilibrio se situase en la zona de intercambio lento. Si, por el contrario, la ligadura del antibiótico no es completamente rígida, sino que alguna de las partes de la molécula conserva algún grado de libertad de rotación interna, la efectividad de la interacción dipolar que ori-

gina la relajación se reduce y, por tanto, $(1/T_{2M})$ puede ser menor que 10^3 seg^{-1} . Con ello, se aumenta la posibilidad de que el equilibrio de interacción se sitúe en el intervalo de intercambio rápido y se reduce la de observar excesos de anchura que puedan medirse experimentalmente.

Si la cinética de formación del complejo es más lenta que la determinada por la difusión, debido a la existencia de alguna barrera de activación adicional, K_{-1} , la cinética de disociación ha de ser consecuentemente menor del límite obtenido anteriormente. Con ello, se aumenta la posibilidad de que el equilibrio de interacción se sitúe en el intervalo de intercambio lento y se reduce la de observar excesos de anchura medibles. Este es, a nuestro juicio, una de las más serias circunstancias que puede hacer peligrar la posibilidad de estudiar la interacción de antibióticos con el centro peptidil-transferasa por la técnica de RMN. En el caso improbable de que la diferencia de la frecuencia de resonancia del sitio libre y del ligado sea mucho mayor que la relajación en este último y que la constante de disociación, es decir, $\Delta\omega \gg (1/T_{2M})$, K_{-1} , el factor de relajación sería K_{-1} , con lo que estaríamos en el intervalo de intercambio lento, rigiendo las mismas limitaciones que se han visto más arriba, y si $\Delta\omega \ll (1/T_{2M})$, K_{-1} , dispondríamos de un término adicional de relajación que aumentaría las posibilidades de detectar excesos de anchuras medibles. En el caso de la gougerotina, para la que $K_A \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$, sólo podría confirmarse que $K_{-1} \gg 10^4 \text{ M}^{-1}$, ya

que $|A_0| \gg (1/K_A)$ ({{II.5.4}}). Igualmente y, dado que en este caso $K_{-1} \ll 10^1 \text{ seg}^{-1}$, aumentarían las posibilidades de que el equilibrio se situase en el intervalo de intercambio lento y se reducirían las de observar excesos de anchura medibles. Este era, pues, el panorama completo del estudio de la interacción de puromicina y gougerotina con el centro peptidil-transferasa ribosómico, en ausencia de otras interacciones secundarias.

Los resultados experimentales del estudio de la interacción antibiótico-ribosoma que se describen en el capítulo II.5.7 y, concretamente, su análisis mediante el programa RIBO, muestran claramente que lo que se está detectando por la técnica de RMN son equilibrios de asociación de afinidad relativamente baja, obteniéndose para puromicina, $K_A \ll 10^3 \text{ M}^{-1}$ y para gougerotina, $K_A \ll 10^2 \text{ M}^{-1}$, que no concuerdan con las obtenidas por otros métodos para el equilibrio de interacción de puromicina y gougerotina con el centro peptidil-transferasa ribosómico, aun teniendo en cuenta que las determinaciones se han realizado a distintas temperaturas. Ello ya podía deducirse, de modo cualitativo, de la consideración de las figuras 17 y 18, pues, para las constantes de interacción con el centro peptidil-transferasa habrían de haberse obtenido rectas que pasaran por el origen o, para el caso de la puromicina, de al menos una pendiente mucho mayor. Por otra parte, los valores relativos de las constantes de afinidad para puromicina y gougerotina que se deducen de los resultados medidos, son contrarios a los determinados para la interacción con el

centro peptidil-transferasa. En consecuencia, puede concluirse que para las condiciones de nuestro estudio y, especialmente, debido a la concentración relativamente grande de ligando que es preciso emplear, los antibióticos puromicina y gougerotina se unen, además de al centro peptidil transferasa, a otro u otros centros del ribosoma con una constante de más baja afinidad. Los efectos de este equilibrio sobre los parámetros espectrales oscurecen los debidos al de interacción con el centro peptidil-transferasa, impidiendo obtener información directa acerca de éste. A partir del hecho reseñado en (II.5.7) de que los resultados obtenidos pueden analizarse sólo en función de los parámetros n_2 , k_2 y Δ_2 correspondientes al equilibrio de interacción secundario y no dependen de los del de interacción con el centro peptidil-transferasa, es posible, sin embargo, establecer un límite máximo para el factor de relajación, $\Delta_1^* = \pi \Delta_1$, correspondiente a este último. En efecto, de acuerdo con {II.5.11}, $\Delta_1^* \ll 9,0 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$ para la puromicina y $\Delta_1^* \ll 1,4 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$ para la gougerotina. En el caso probable de que este equilibrio se sitúe en el intervalo de intercambio lento, el factor de relajación se identifica con la constante cinética de disociación, es decir, $\Delta_1^* = k_{-1}$. Los valores de $9,0 \cdot 10^3$ y $1,4 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$ son, pues, los valores máximos que pueden adoptar las constantes de disociación del complejo para el caso de puromicina y gougerotina. Un valor por encima de los anteriores afectaría a la anchura de las señales para la disolución de mínima concentración en A_0 . Los valores máximos así obtenidos para k_{-1} son con-

sistentes con las características descritas más arriba del equilibrio de interacción de puromicina y gougerotina con el centro peptidil-transferasa ribosómico.

III.3.2.- Interacción secundaria de puromicina y gougerotina con ribosomas.

En la sección anterior se ha concluido que la interacción que se detecta por RMN entre puromicina o gougerotina con ribosomas de E. Coli, no es la que tiene lugar con el centro peptidil-transferasa ribosómico, cuyo estudio era uno de los objetivos del presente trabajo. Es conveniente, sin embargo, para el planteamiento de futuros trabajos sobre el tema, intentar caracterizar en lo posible la interacción secundaria detectada, de menor afinidad.

Los experimentos realizados con los sistemas adenosina-ribosomas y puromicina-tRNA, en los que se obtienen excesos de anchura análogos a los del sistema puromicina-ribosomas, permiten confirmar la conclusión expuesta en el párrafo anterior, así como establecer cualitativamente que la interacción secundaria observada puede quedar incluida dentro del marco de las interacciones nucleósido-nucleótido. En la revisión de Ts'o(71) se discuten con algún detalle estas interacciones, tanto al nivel de monómero-monómero como al de monómero-polímero. Especialmente interesante, por las analogías que presentan con nuestro problema, es el caso de la interacción, clasificada como específica, de adenosina con poli-U. En el estudio por RMN de ^1H de este sistema (78), se observan ensanchamientos

análogos a los observados en nuestros sistemas de las señales de H8 y H2 del resto adenil de la adenosina al añadir poli-U. El tratamiento que hacen estos autores no es cuantitativo y no permite extender las comparaciones.

Como se vio en la sección de resultados, el parámetro correspondiente a estas interacciones que está bien determinado, es el producto $(n_2 k_2 \Delta_2)$, en donde n_2 es el número de sitios de ligadura que presenta el ribosoma, k_2 es la constante de ligadura del antibiótico a uno de esos sitios y Δ_2 es el factor de relajación. La constante de asociación presenta un límite superior bien definido, que es de 10^3 M^{-1} para puromicina y de 10^2 M^{-1} para gougierotina. Asimismo, puede considerarse razonable la existencia de un límite inferior para ese parámetro, $k_2 \gg 1 \text{ M}^{-1}$. En efecto, si k_2 adoptan valores menores que dicho límite, el valor de Δ_2 , para valores razonables de n_2 , sería mucho mayor que el calculado en la sección anterior a partir de {I.2.20}. La variación con la temperatura de los excesos de anchura (II.5.4) indica que el equilibrio está situado en la región de intercambio rápido, lo que resulta razonable, ya que, si $k_2 < 10^2 \text{ M}^{-1}$, puede evaluarse que $k_{-1} \approx 10^5 - 10^6 \text{ seg}^{-1}$, que es mucho mayor que el valor evaluado para $(1/T_2) \approx 7 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$. El valor de k_2 podría haberse obtenido con mayor precisión si se hubieran utilizado concentraciones de antibiótico uno o dos órdenes de magnitud mayores que las empleadas, las cuales se escogieron en función del primer equilibrio. Sin embargo, ello no es posible porque, a poco

que se aumenten las concentraciones empleadas, se alcanza el límite de solubilidad de estos antibióticos, al pH en que se estudia el sistema. A los efectos de continuar la discusión, adoptaremos los valores de $k_2=150 \text{ M}^{-1}$ (puromicina) y $k_2=10 \text{ M}^{-1}$ (gougerotina) que son los que proporcionan un mejor ajuste de los datos experimentales.

En esas circunstancias, se obtienen, para el producto $n_2\Delta_2$, valores del orden de 10^4 Hz para ambos antibióticos. A partir del ajuste de datos experimentales, se obtienen también límites superiores para los valores del número de sitios de ligadura, $n_2 < 10^4$ (puromicina) y $n_2 < 10^5$ (gougerotina). Es razonable suponer, sin embargo, que el número de estos sitios ha de ser mucho menor. En efecto, teniendo en cuenta el peso molecular de los ácidos ribonucleicos ribosómicos, 5S, 16S y 23S, puede evaluarse que el número total de nucleótidos del ribosoma según los estudios de Van Holde y Hill (13), es de ~ 5200 . Si se supone que éstos están uniformemente distribuidos en el volumen de una esfera equivalente al calculado a partir de las dimensiones del ribosoma, el número de nucleótidos en la superficie es del orden de 900. Es muy probable que grandes zonas de la superficie estén cubiertas por las proteínas ribosómicas ocluyendo a gran número de los nucleótidos que se encuentran en ella. Por otra parte, es de considerar el propio tamaño del antibiótico, que al ocupar un área media aproximadamente igual o mayor que la de un nucleótido, haría improbable que los nucleótidos vecinos se cons-

tituyesen también en centros de ligadura. Con todo ello, el número máximo de centros de ligadura no sea probablemente mayor que 10^2 .

El factor de relajación, Δ_2 , que para el intervalo de intercambio rápido se identifica con $(1/\pi T_{2M})$, se ha evaluado en la sección anterior, para el caso de ligadura rígida, en $2,2 \cdot 10^3$ Hz (contribución intramolecular). A la vista de los valores obtenidos para las constantes de interacción y de las energías libres correspondientes ($\Delta G = -3,0$ Kcal/mol para puromicina y $\Delta G = -1,4$ Kcal/mol para gougerotina), que no son muy superiores a la energía térmica de traslación o rotación, no es probable que la unión sea rígida, sino que, por el contrario, la molécula de antibiótico ligada conserve alguno de sus grados de libertad de rotación. Ello reduce la posibilidad de que exista relajación intermolecular y establece el valor anterior como el límite máximo que puede alcanzar el factor de relajación. Para el caso concreto de que el antibiótico unido conserve sólo un grado de libertad de rotación (en torno al eje de unión entre el ligando y la superficie del ribosoma) y, si el tiempo de correlación de rotación interna, τ_R , es mucho menor que el del ribosoma, el tratamiento de Wallach (79) y su revisión por Marshall, Schmidt y Sykes (77), predice que la velocidad de relajación transversal se reduce, respecto a la de ligadura rígida en un factor de $(1/4)$. Según ello, si el factor de relajación queda limitado a valores comprendidos entre $2,2 \cdot 10^3$ y $0,55 \cdot 10^3$ Hz, para que el producto $n_2 k_2$ alcance un valor de $2,2 \cdot 10^4$ Hz

(protones H_{meta} de la puromicina), el valor de n_2 ha de estar comprendido entre $10 < n_2 < 40$, que es un resultado razonable y de acuerdo con nuestras anteriores hipótesis. Si, por el contrario, la unión del antibiótico al ribosoma en el complejo presenta una flexibilidad mayor, el factor de relajación es, consecuentemente, menor y, por tanto, n_2 podría ser mayor que el valor señalado más arriba.

Desgraciadamente, con los datos actuales no es posible profundizar más de lo realizado hasta ahora en la caracterización de esta interacción secundaria antibiótico-ribosoma, reconociendo, incluso, que algunas de las hipótesis de partida empleadas son especulativas. Tampoco es posible decidir acerca de la naturaleza de esta interacción secundaria, es decir, si es una interacción entre las bases del antibiótico y las de los nucleótidos del r-RNA, bien por apilamiento (intercalación) o por enlace de hidrógeno o, por otro lado, por formación de un complejo metálico con el Mg^{2+} , quien a su vez se encuentra ligado al fosfato nucleotídico. Decidir sobre estas cuestiones requeriría la realización de un trabajo especialmente enfocado a ello y que alcanzaría una envergadura análoga al descrito en la presente Memoria. Tal trabajo podría, sin embargo, ser de utilidad pues, además de contribuir a la caracterización de esta interacción secundaria con el propósito de neutralizarla, tendría interés por sí mismo, pues contribuiría a obtener alguna información sobre la distribución de nucleótidos en la superficie del ribosoma.

233

III.3.3.- Perspectivas futuras del estudio de la interacción de antibióticos con el centro peptidil-transferasa ribosómico, por espectroscopía de RMN.

Como se ha visto, el mayor inconveniente que presenta el estudio por RMN de la interacción de antibióticos con el centro peptidil-transferasa ribosómico, interacción responsable de su actividad como inhibidores de biosíntesis de proteínas, es la existencia de una interacción secundaria (para puromicina y gougerotina) que oscurece los efectos que sobre los observables espectrales pueda tener la primera interacción.

Naturalmente, una primera solución sería la de realizar una prueba entre todos aquellos antibióticos que interaccionan con el centro peptidil-transferasa para seleccionar a los que no presentan la interacción secundaria y limitar a ellos el estudio. Tal solución no es muy satisfactoria, debido a la pérdida de generalidad que ella entraña.

Aceptando, pues, la existencia concurrente de una interacción secundaria, el problema puede discutirse mejor con referencia a la expresión {II.5.10}, que reproducimos aquí:

$$\Delta\omega = \frac{[R_0]}{[A_0]} \Delta_1 + \frac{n_2 [R_0]}{K_{D2}} \Delta_2$$

Esta expresión proporciona, en buena aproximación, el valor del exceso de anchura, $\Delta\omega$, de las señales de antibiótico, en una concentración inicial de A_0 , en presencia de

ribosomas en una concentración de R_0 , en función de éstas y del número de sitios, n_2 , la constante de disociación, K_{D2} , del complejo secundario, y los factores de relajación, Δ_1 y Δ_2 , correspondientes, respectivamente, al primer y segundo equilibrio de interacción.

El primer y el segundo término del segundo miembro son las contribuciones al exceso de anchura de uno y otro equilibrio. El objetivo es, pues, el de buscar las condiciones en las que prevalezca el primer término sobre el segundo.

Resulta inmediatamente aparente la necesidad de trabajar a concentraciones de A_0 lo más baja posible, al menos hasta el límite $A_0 \approx K_{D1}$, que fija la validez de la expresión {II.5.10}. Esta necesidad ha sido agotada con la instrumentación de que disponemos. Utilizando conjuntamente un instrumento con imán superconductor que trabajase a 270 MHz, para protón con tubos muestra de 10 mm. de diámetro sería posible teóricamente disminuir en 20 veces la concentración mínima de A_0 utilizada por nosotros, llegando a concentraciones del orden de $6 \cdot 10^{-5}$ M. Ello equivale, naturalmente, a ponderar en 20 veces más la influencia del primer equilibrio sobre el exceso de anchura observado. Una representación gráfica de $(1/\Delta\omega)$ frente a A_0 ({II.5.11}) mostraría una curva compuesta fundamentalmente de dos tramos rectos, cuyas pendientes e intersecciones con el eje X definirían los parámetros de ambos equilibrios.

De la consideración de la expresión {II.5.10} es

posible también deducir que, a los efectos que se prosiguen, no es de utilidad aumentar la concentración de ribosoma, R_0 , a menos que el número de sitios de ligadura, n_2 , sea tan grande como para que el producto $n_2 R_0$ no sea despreciable frente a K_{D2} y contribuya a aumentar el denominador del segundo término. El factor de relajación, Δ_1^* ($\equiv \pi \Delta_1$), en el caso de intercambio lento, se identifica con K_{-1} , la constante de disociación del complejo primario. Conviene, por tanto, realizar las medidas a temperaturas mayores de 26°C , para las cuales K_{-1} es consecuentemente mayor. La supervivencia de los ribosomas no aconseja, sin embargo, elevar la temperatura por encima de $40-45^\circ\text{C}$. Como ya hemos indicado, es este factor, $\Delta_1^* = k_{-1}$, el elemento crítico que va a determinar la posibilidad del estudio por RMN de la interacción entre antibióticos y el centro peptidil-transferasa ribosómico, pues a poco que se reduzca la constante de formación del complejo respecto a la determinada por difusión, la cinética de disociación se hará tan pequeña, que su efecto sobre la anchura de las señales del antibiótico libre será despreciable.

Centrándonos sobre las posibilidades de disminuir el efecto del segundo término, es fundamental, en principio, caracterizar mejor la interacción secundaria para poder actuar en consecuencia sobre los parámetros n_2 , K_{D2} y Δ_2 . Para determinar la naturaleza de esta interacción secundaria, sería preciso estudiar paralelamente la interacción de los antibióticos con homo-oligonucleótidos

o polinucleótidos, como por ejemplo, poli-U, poli-C, poli-G y poli-A, lo que proporcionaría información acerca de la naturaleza y especificidad de la interacción. Asimismo, habría de considerarse la posibilidad de que la interacción con el ribosoma fuese con los grupos fosfatos a través de cationes metálicos, para lo que sería útil el estudio de sistemas antibiótico-ribosoma-Mn²⁺. Una vez caracterizada esta interacción secundaria y, mediante el uso de estos sistemas modelo, habrían de explorarse las condiciones que diesen lugar a una disminución efectiva de n_2 o K_{D2} . Una de ellas podría ser, por ejemplo, la adecuada selección de un competidor que saturase los n_2 sitios de ligadura secundaria.

El factor de relajación, Δ_2 , para el caso de intercambio rápido en el que se encuentra la interacción secundaria, se identifica con $(1/\pi T_{2M})$, la relajación en el sitio unido, que disminuye con la temperatura, por lo que conviene trabajar a temperaturas mayores de 26°C, con las limitaciones expuestas anteriormente.

El estudio de la interacción de estos antibióticos con la unidad mayor ribosómica, la denominada 50S, en la que radica el centro peptidil-transferasa, presentaría algunas ventajas, si bien no del todo decisivas. Por una parte, es muy probable que persista la interacción secundaria (caracterizada hasta el momento como una interacción con el RNA). La reducción en $\Delta_2 (=1/\pi T_{2M})$, como consecuencia del menor volumen de la partícula, no sería, por otra parte, lo suficientemente grande como para disminuir sig-

nificativamente la prevalencia del segundo término de {II.5.10} sobre el primero.

El estudio de la interacción de estos antibióticos con la proteína o proteínas de la subunidad mayor, responsables de la actividad peptidil-transferasa, sí sería perfectamente adecuado para su estudio por espectroscopía de RMN.

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El trabajo que se describe en esta Memoria fue realizado con los siguientes propósitos: en primer lugar, describir detalladamente la conformación en disolución de los antibióticos puromicina y gougerotina, con el objetivo final de inferir los requisitos estructurales que el sitio aceptor (o los subsitios correspondientes) del centro peptidil-transferasa impone sobre sus ligandos; en segundo lugar, explorar las posibilidades de la espectroscopía de RMN en el estudio de la interacción de estos antibióticos con el centro peptidil-transferasa ribosómico y obtener la pertinente información estructural, termodinámica, cinética y microdinámica.

Con estos fines, se han obtenido y analizado los espectros de resonancia magnética de ^1H de muestras comerciales de puromicina y gougerotina en disolución de D_2O . Como resultado de estos análisis, se han obtenido los valores de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento y se han asignado estos parámetros a protones concretos de estas moléculas. Se ha realizado asimismo un estudio completo de la variación de los espectros protónicos de estos antibióticos con la temperatura, con la concentración y con el pH. El estudio de la variación de los parámetros espectrales respecto a las dos primeras se ha realizado para cada uno de los estados de ionización (dicación, catión y molécula neutra) en que pueden encontrarse estas moléculas, dependiendo del pH. Se han medido también los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , de los protones de estas moléculas.

Se han obtenido asimismo los espectros de ^{13}C con irradiación de ^1H de puromicina y gougerotina en dos de sus estados de ionización, así como los correspondientes espectros acoplados de ^{13}C , lo que ha permitido determinar la multiplicidad de cada señal, respecto a los acoplamientos directos $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, y algunos desdoblamientos debidos a protones geminales y vecinales. Estos datos, junto con los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , de los núcleos de ^{13}C en el espectro desacoplado han permitido realizar una asignación de las señales observadas.

Se ha realizado un trabajo de revisión y puesta al día acerca del estudio por espectroscopía de RMN de interacciones entre moléculas pequeñas y biomacromoléculas. En él se describen las bases teóricas por las que, a partir de los excesos de anchura de las señales de la molécula pequeña debidos al intercambio químico entre el sitio ligado y el sitio libre, es posible obtener información acerca de la constante de disociación del complejo o de la relajación en el sitio de ligadura, según que el intercambio sea lento o rápido, respectivamente, para la escala de tiempos involucrada en la técnica de RMN.

Se ha planteado el caso particular de la dependencia de los excesos de anchura de las señales de resonancia respecto a las concentraciones iniciales de antibiótico y ribosoma para el supuesto de la existencia conjunta de dos equilibrios de interacción: uno de alta afinidad con un solo sitio de ligadura y otro de baja afinidad con

un número variable de sitios, que se consideran equivalentes e independientes. Para el tratamiento de los datos experimentales de relajación o de frecuencia, se ha escrito un programa de cálculo, en FORTRAN IV, por el que es posible obtener en casos favorables, por un proceso iterativo, los valores óptimos de los parámetros que caracterizan ambos equilibrios (constantes de equilibrio y número de sitios de ligadura), así como los factores de relajación para cada una de las señales del antibiótico que se introduce en el ajuste.

Se han medido los excesos de anchura de 5 señales protónicas de puromicina ($H_{1'}$, H_{orto} , H_{meta} , H2 y H8) y de 3 señales protónicas de gougerotina (H5, H6 y $-NCH_3$) en presencia de concentraciones variables de ribosomas de E. Coli, que se obtuvieron de acuerdo con lo descrito en el capítulo referente a materiales y métodos. Las medidas de los excesos de anchura se llevaron a cabo por un método numérico de ajuste por mínimos cuadrados del contorno espectral, que ha sido puesto a punto por nosotros y en el que se han introducido algunas innovaciones (relaciones entre incógnitas) que facilitan el tratamiento de los datos.

El programa de cálculo descrito más arriba se ha aplicado a las medidas experimentales de excesos de anchura de señales protónicas de puromicina y gougerotina, en presencia de ribosomas. Para el rango de concentraciones utilizado, no es posible obtener información de los parámetros del equilibrio de alta afinidad, apareciendo, además,

correlaciones entre los correspondientes a la interacción de baja afinidad. Consecuentemente, se han explorado los resultados a que conduce el programa, cuando se fijan los valores de alguna de las incógnitas.

Se ha investigado el efecto de la temperatura sobre los excesos de anchura resultantes de la interacción, al objeto de definir el rango dinámico del intercambio químico en que está situado. Asimismo, para definir si los excesos de anchura observados eran debidos a una interacción con los ribosomas o a algún efecto de éstos sobre la disolución se ha estudiado la variación de las anchuras de los antibióticos con la viscosidad y con la presencia, en distintas concentraciones, de los iones paramagnéticos más comunes. Por último, con el objeto de caracterizar la interacción secundaria se han estudiado los sistemas adenosina-ribosomas y puromicina-tRNA.

Como resultado de estos estudios se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- La conformación que preferentemente adopta la molécula de puromicina en disolución de D_2O es la misma, salvo pequeñas modificaciones en algunos ángulos de torsión, que la que dicha molécula adopta en el estado cristalino (figura 19, parte superior). Esta conformación preferida se encuentra en rápido equilibrio dinámico de interconversión con otras conformaciones menos favorecidas.

2.- El anillo de furanosa de puromicina no presenta en disolución una única estructura rígida, sino que se encuentra en rápido equilibrio de interconversión entre, al menos, dos conformaciones plegadas, una del tipo N y otra del tipo S, caracterizadas por los parámetros pseudorotacionales ($P_N=21^\circ$, $^N\theta_m=33^\circ$) y ($P_S=160^\circ$, $^S\theta_m=36^\circ$). La constante del equilibrio de interconversión para la forma neutra, es $K(26^\circ\text{C})=(x_N/x_S)=2,4$, y las fracciones molares, $x_N=0,71$ y $x_S=0,29$. Estas poblaciones conformacionales del anillo de furanosa no sufren variaciones significativas con la temperatura, con la concentración ni con el cambio de disolvente ($\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{DMSO-d}_6$). El equilibrio N \rightleftharpoons S se desplaza ligeramente, sin embargo, hacia la forma S a medida que se aumenta el pH.

3.- Las poblaciones conformacionales de los rotámeros en torno al enlace exocíclico C4'-C5', para la molécula neutra de puromicina, son $x_{gg}=0,69$, $x_{gt}=0,24$ y $x_{tg}=0,07$ (figura 21). A diferencia de otros compuestos análogos (adenosina, 3'-AMP o 5'-AMP), la presencia del resto OMe-tirosinil permite asignar inequívocamente los protones H5'_a y H5'_b, lo que a su vez permite distinguir entre las conformaciones gt y tg. Las poblaciones conformacionales así determinadas, no sufren variaciones significativas con la concentración ni con el pH, si bien al aumentar la temperatura ellos tienden a igualarse.

- 4.- Los valores de los tiempos de relajación, T_1 , de H8 y H2 y los de la constante de acoplamiento ${}^3J_{13C8-1H1}$, conducen a concluir que en la puromicina, en su forma de dicatión, la conformación en torno al enlace glicosídico es preferentemente anti, si bien no se excluye la presencia de una cierta población en la conformación sin, en equilibrio con la anterior. Las pequeñas variaciones observadas en los desplazamientos químicos de 1H y ${}^{13}C$, así como en la posición de equilibrio de los rotámeros gg, gt y tg, con el cambio en los estados de ionización de la molécula, indican que el equilibrio sin~~†~~anti no sufre con este cambio alteraciones notables. Las variaciones observadas para los tiempos de relajación, T_1 , de H8 y H2, para la molécula neutra son debidas a efectos intermoleculares.
- 5.- A partir del valor obtenido para la constante de acoplamiento vecinal ${}^3J_{NH-CH_3}$ (en disolución de DMSO- d_6) se obtienen cuatro posibles valores para el ángulo de torsión, ϕ_1 , en torno al enlace que une el resto aminoacil con la parte nucleosídica. Los cálculos de energía potencial señalan como el más favorable el valor de $\phi=81^\circ$, que ha de considerarse como una media ponderada de los valores que adopta dicho ángulo en las conformaciones N y S del anillo de furanosa.
- 6.- El apantallamiento relativo que muestran los protones H4', H5'_a y H5'_b permite elegir el valor del ángulo de torsión $\psi=240^\circ$ (estandarizado) como el más probable,

ya que, para esa conformación, se obtiene el efecto máximo de la corriente de anillo del resto aromático del grupo O-Me-tirosinil sobre el desplazamiento químico de dichos protones. Ello permite, a su vez, una asignación inequívoca de los protones H_β y $H_{\beta'}$. Esta asignación, junto con los valores de las constantes de acoplamiento, $^3J_{\alpha\beta}$ y $^3J_{\alpha\beta'}$, determinan las poblaciones relativas de las tres conformaciones alternadas respecto al ángulo de torsión χ_1 , que, para la forma neutra de la puromicina, a 26°C, resultan ser: $x_I=0,60$, $x_{II}=0,33$ y $x_{III}=0,07$ (figura 22). Estas poblaciones no cambian significativamente con la concentración ni con el pH, y sí lo hacen con la temperatura, tendiendo a igualarse, y con el cambio de disolvente, creciendo, en DMSO- d_6 , la población relativa de x_{III} .

- 7.- El grupo N-diMe del resto N-di-Me-adenil de la puromicina en su forma de dicatión, presenta una rotación impedida en torno al enlace exocíclico C6-N6, cuyos parámetros de activación son, a 26°C, $\Delta G^\ddagger=14,8$ Kcal/mol, $\Delta H^\ddagger=13,5$ Kcal/mol y $\Delta S^\ddagger=-4,4$ u.e., deducidos de la variación de la anchura de la señal correspondiente con la temperatura. Tanto para el dicatión como para la molécula neutra, los cambios observados en los espectros al aumentar esta última variable pueden racionalizarse con base en el desplazamiento de poblaciones conformacionales en torno al ángulo de torsión χ_1 . Para la molécula neutra se observan coeficientes de

temperatura mayores para H2, H1' y -N(CH₃)₂, compatibles con la existencia de asociación intermolecular por "apilamiento" de las bases, lo que se confirma también por los valores que alcanzan, para esos protones, los coeficientes de variación de los desplazamientos químicos con la concentración.

- 8.- Los pKs de la puromicina y los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C debidos a cambios en el estado de ionización de los dos grupos básicos de estas moléculas son los dados en las Tablas 14 y 30. El pK más bajo (4,4 a una concentración 6,6.10⁻³M), corresponde a la protonación de la base en N1 y el más alto (6,1) a la del grupo amino del resto OMe-tirosinil. La existencia de un tercer pK a 12,5 parece cierta y debe corresponder al equilibrio de disociación del protón peptídico o bien al del grupo hidroxilo en C2'. Los valores de los dos pK más bajos dependen de la concentración y su dependencia es compatible con la existencia de una asociación intermolecular en la que estén involucrados ambos grupos ionizables.
- 9.- La conformación que preferentemente adopta la molécula de gougerotina en disolución, principalmente en lo que se refiere al anillo de piranosa y a los ángulos de torsión señalados, es la representada en la figura 23.
- 10.- El anillo de piranosa de gougerotina adopta exclusivamente la conformación de silla ⁴C₁, como puede dedu-

cirse de los valores que, para las constantes de acoplamiento vecinales de dicho anillo, se han obtenido por análisis completo de su espectro protónico. Ello supone la automática conformación de la configuración del átomo de carbono C4', sin recurrir a una degradación química del producto.

11.- A partir de los valores medidos para los acoplamientos ${}^3J_{{}^{13}\text{C}2-\text{H}1'}$ y ${}^3J_{{}^{13}\text{C}6-\text{H}1'}$ se obtienen dos posibles valores para el ángulo de torsión glicosídico de la gougerotina, χ , que son 35° y 85° . Ambas soluciones se encuentran en el intervalo correspondiente a la conformación anti.

12.- Las constantes de acoplamiento ${}^3J_{\text{NH}-\text{CH}}$ medidas en disolución de DMSO- d_6 determinan cuatro valores posibles para cada ángulo de torsión, ϕ_1 y ϕ_2 , en la gougerotina. En el primer caso, teniendo en cuenta las interacciones estéricas existentes para cada conformación, concluimos que el ángulo de torsión ϕ_1 (rotación en torno al enlace $-\text{N}-\text{C}_\alpha-$ del resto serinil) se encuentra en el intervalo en que los enlaces $-\text{NH}$ y $-\text{CH}_\alpha$ están en una orientación antiperiplanar ($\phi_1=300^\circ$), desviándose respecto a ésta en un valor de $\pm 31^\circ$. De modo análogo, se determina que el ángulo de torsión ϕ_2 (rotación en torno al enlace que une el grupo peptidil al aminoglucósido) es de 84° .

13.- La población de rotámeros de la gougerotina del grupo hidroximetil del resto serinil en torno al enlace

$C_{\alpha}-C_{\beta}$ es, probablemente, la siguiente: $x_I=0,34$, $x_{II}=0,00$ y $x_{III}=0,66$ (figura 24) si bien también podría admitirse la alternativa siguiente: $x_I=0,49$, $x_{II}=0,58$ y $x_{III}=-0,07$ (las fracciones molares están afectadas por un error de $\pm 0,10$).

- 14.- Los parámetros magnéticos protónicos de la gougerotina, en sus distintos estados de ionización, no sufren variaciones significativas con la temperatura ni con la concentración, lo que sugiere la ausencia de desplazamientos notables de poblaciones conformacionales, así como la no existencia de interacciones moleculares.
- 15.- Los pKs de la gougerotina y los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C debidos a cambios en el estado de ionización de los dos grupos básicos de la molécula son los dados en las Tablas 25 y 34. El pK más bajo (4,3) corresponde a la protonación del resto citosilo, que tiene lugar en el átomo de nitrógeno N3 de dicho ciclo. El pK más alto (7,5) corresponde a la protonación del átomo de N del resto sarcosilo.
- 16.- En las condiciones experimentales en que se han realizado nuestras medidas, el estudio por RMN de la interacción entre puromicina (o gougerotina) con ribosomas de E. Coli, pone de manifiesto la existencia de una interacción cuyas constantes de equilibrio de asociación son $K_A \leq 10^3 \text{ M}^{-1}$ para puromicina y $K_A \leq 10^2 \text{ M}^{-1}$ para gougerotina, que no coinciden ni en su magnitud ni en su valor relativo con las constantes medidas por otros

métodos para la interacción de estos antibióticos con el centro peptidil-transferasa ribosómico.

- 17.- Los efectos de esta interacción secundaria entre puromicina (o gougerotina) con ribosomas de E. Coli sobre los parámetros espectrales que se utilizan como sondas, oscurecen los debidos a la interacción con el centro peptidil-transferasa ribosómico, para la que unicamente es posible determinar límites máximos para la constante de disociación de los correspondientes complejos, que resultan ser: $k_{-1} \leq 9,0 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$ (para puromicina) y $k_{-1} \leq 1,4 \cdot 10^3 \text{ seg}^{-1}$ (para gougerotina).
- 18.- La interacción secundaria, detectada por nuestros estudios por espectroscopía de RMN, es una interacción real de los antibióticos con los ribosomas y los efectos observados no son debidos a alteraciones de la viscosidad del medio o a la introducción en la disolución de iones paramagnéticos por parte de los ribosomas.
- 19.- Los experimentos realizados con los sistemas adenosina-ribosomas y puromicina-tRNA, permiten caracterizar la interacción secundaria como una interacción del tipo nucleósido-nucleótido, por lo que se concluye que la interacción tiene lugar entre los antibióticos y el RNA ribosómico. Los valores obtenidos para los productos $n_2 k_2 \Delta_2$ para cada protón y para cada antibiótico son los dados en la Tabla 45. A partir de algunas consideraciones en torno al valor de la relajación nuclear en el sitio unido y de la distribución de

nucleótidos en la superficie del ribosoma, se propone para el número de sitios de ligadura de la interacción secundaria un valor de $1 < n_2 < 100$.

20.- Para intentar con éxito el estudio de la interacción entre antibióticos y el centro peptidil-transferasa ribosómico, habría que abordar y dar solución a los siguientes problemas:

- a) Reducir al máximo la concentración de antibiótico, lo que podría conseguirse utilizando campos mayores (imanes superconductores) y tubos de mayor diámetro.
- b) Realizar las medidas a temperaturas por encima de la de la sonda (26°C), siempre que ello sea compatible con la supervivencia funcional de los ribosomas.
- c) Caracterizar en detalle la interacción secundaria con el objetivo de disponer de los medios para bloquearla.
- d) Medir la constante cinética de formación del complejo entre el antibiótico y el centro peptidil-transferasa ribosómico, con lo que podría disponerse de una evaluación fiable de la constante de disociación, lo que, a su vez, permitiría predecir si sus efectos sobre los parámetros magnéticos podrían ser susceptibles de ser medidos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ABRAGAM, A.; "The principles of nuclear magnetism". Clarendon Press, Oxford (1961).
- (2) POPLE, J.A., SCHNEIDER, W.E. y BERNSTEIN, H.J.; "High resolution nuclear magnetic resonance". McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto y London (1959).
- (3) BECKER, E.D.; "High resolution N.M.R.". Academic Press. New York (1969).
- (4) FARRAR, T.C. y BECKER, E.D.; "Pulse and Fourier Transform N.M.R.". Academic Press, New York y London (1971).
- (5) BLOCH, F.; Phys. Rev., 70, 460(1946).
- (6) BLOCH, F., HANSEN, W.W. y PACKARD, M.; Phys. Rev., 70, 474(1946).
- (7) BLOEMBERGEN, N., PURCELL, E.M. y POUND, R.V.; Phys. Rev., 73, 679(1948).
- (8) BLOCH, F.; Phys. Rev., 102, 104(1956).
- (9) HUBBARD, P.G.; Phys. Rev., 109, 1153(1958).
- (10) Mc CONNELL, H.M.; J. Chem. Phys., 28, 430(1958).
- (11) SWIFT, T.J. y CONNICK, R.E.; J. Chem. Phys., 37, 307(1962).
- (12) DWEK, R.A.; "N.M.R. in Biochemistry". Clarendon Press. Oxford (1973).
- (13) "Ribosomes", editado por Nomura, M., Tissieres, A. y Lengyel, P. Cold Spring Harbor Laboratory (1974).
- (14) LUCAS-LENARD, J. y LIPMANN, F.; Annual Review of Biochemistry, 40, 409(1971).
- (15) MODOLELL, J. y VAZQUEZ, D.; Polipeptide Chain Elongation and Termination. MTP International Review of Science. Biochemistry, serie one. Vol. 7. HRV. Arnstein Ed. (1975).

- (16) WITMANN, H.G., STOFFER, G., HINDENNOCH, I., KURLAND, C.G., RANDAL-HAZCHBAUER, L., BIRGE, E.A., NOMURA, N., KALTSCHNUDT, E., MIZUSHIMA, S., TRANT, R.R. y BICKLE, T.A.; *Mol. Gen. Genetics*, 111, 327(1971).
- (17) HILL, W.E., ANDEREGG, J.W., VAN HOLDE, K.E.; *J. Mol. Biol.*, 53, 107(1970).
- (18) BOLLEN, A., DAVIES, J., OZAKI, M. y MIZUSHIMA, S.; *Science*, 165, 85(1969).
- (19) SCHAUP, H.W., GREEN, M. y KURLAND, C.G.; *Mol. Gen. Genetics*, 112, 1(1971).
- (20) STOFFER, G., DAYA, L., RAK, K.H., GARRET, R.A.; *J. Mol. Biol.*, 62, 411(1971).
- (21) CHARLES R. CANTOR, PELLEGRINI, M. y HELER, O. en *Ribosomas*, pág. 573. Cold Spring Harbor Laboratory (1974).
- (22) RESTKA, S.; *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 487(1971).
- (23) VAZQUEZ, D.; *FEBS Letters Vol. 40S*, 563(1974).
- (24) HARRIS, R.J. y SYMONS, R.H.; *Bioorganic Chemistry*, 2, 286(1973), y *Bioorganic Chemistry*, 2, 266(1973).
- (25) GESTELAND, R.F.; *J. Mol. Biol.*, 18, 356(1966).
- (26) LENNOX, E.S.; *Virology*, 1, 190(1955).
- (27) BARBACID, M.; "Tesis Doctoral". Facultad de Ciencias. Univ. de Madrid (1973).
- (28) DUERST, R. y MERBACH, A.; *Res. Sci. Inst.*, 36, 1896 (1965).
- (29) JARDETZKY, C.D. y JARDETZKY, D.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 222(1960).
- (30) JARDETZKY, D.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 1823(1963).
- (31) JOHNSON, L.F. y BHACCA, N.S.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 3700(1963).
- (32) BOTHNER-BY, A.A. y CASTELLANO, S.M.; Q.C.P.E. programa 111.

- (33) PHIL PITNER, T. y GLICKSON, J.D.; *Biochemistry*, 14, 3083(1975).
- (34) GUTOWSKY, H.S. y HOLM, C.H.; *J. Chem. Phys.*, 25, 1228(1956).
- (35) REMIN, M. y SHUGAR, D.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 8146 (1973).
- (36) STOTHERS, J.B.; "Carbon-13 NMR Spectroscopy". Academic Press, New York (1972).
- (37) DORMAN, D.E. y ROBERTS, J.D.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 65, 19(1970).
- (38) LEVY, G.C. y NELSON, G.L.; "Carbon-13 NMR for Organic Chemists". Wiley-Interscience (1972).
- (39) READ, J.M. y GOLDSTEIN, J.H.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 3440(1965).
- (40) THORPE, M.C., COBURN, W.C., MONTGOMERY, J.A.; *Journal of Magnetic Resonance*, 15, 98(1974).
- (41) JONES, A.J., GRANT, D.M., WINKLEY, M.W., ROBINS, R.K.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 92, 4079(1970).
- (42) BOCK, K. y PEDERSEN, C.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 293(1974).
- (43) PERLIN, A.S. y CASU, B.; *Tetrahedron Letters*, 34, 2921(1969).
- (44) ALLERHAND, A., DODDRELL, D. y KOMOROSKI, R.; *J. Chem. Phys.*, 55, 189(1971).
- (45) ERNESTO DIEZ VILLANUEVA; "Tesis Doctoral". Facultad de Ciencias. Univ. de Madrid (1970).
- (46) CERNA, J., RYCHLIK, I., KRAYEVSKY, A.A. y GOTTIK, B.P.; "Ribosomes and RNA Metabolism 2". Ed. J. Zelinka y J. Balan. Bratislava (1970).
- (47) FERNANDEZ-MUÑOZ, R.; "Tesis Doctoral". Facultad de Farmacia. Univ. de Madrid (1971).
- (48) BARBACID, M. y VAZQUEZ, D.; *Eur. J. Biochem.*, 44, 445(1973).

- (49) SUNDARALINGAM, M. y ARORA, S.K.; J. Mol. Biol., 71, 49(1972).
- (50) YATHINDRA, N. y SUNDARALINGAM, M.; Biochimica et Biophysica Acta, 308, 17(1973).
- (51) ALTONA, C. y SUNDARALINGAM, M.; J. Amer. Chem. Soc., 95, 2333(1973).
- (52) KILPATRICK, J.E., PITZER, K.S. y SPITZER, R.; J. Amer. Chem. Soc., 64, 2483(1947).
- (53) ELIEL, E.L., ALLINGER, N.L., ANGYAL, S.G. y MORRISON, G.A.; "Conformational Analysis". Interscience Pub. N.Y. (1965).
- (54) RICO, M. y SANTORO, J.; Organ. Magn. Res., 8, 49 (1975).
- (55) REMIN, M. y SHUGAR, D.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 636(1972).
- (56) HRUSKA, F.E., SMITH, A.A. y DALTON, J.E.; J. Amer. Chem. Soc., 93, 4334(1971).
- (57) DAVIES, D.B., DANYLUK, S.S.; Biochemistry, 14, 543 (1975).
- (58) SUNDARALINGAM, M.; Biopolymers, 7, 821(1969).
- (59) SARMA, R.H., CHE-HUNG LEE, EVANS, F.E., YATHINDRA, N. y SUNDARALINGAM, M.; J. Amer. Chem. Soc., 96, 7337 (1974).
- (60) HART, P.A. y DAVIS, J.P.; J. Amer. Chem. Soc., 91, 512(1969).
- (61) AKASAKA, K., IMOTO, T., SNIBATA, S. y HATANO, H.; J. Magn. Res., 18, 328(1975).
- (62) CHE-HUNG LEE, EVANS, F.E. y SARMA, R.H.; J. Biol. Chem., 250, 1290(1975).
- (63) IMOTO, T., AKASAKA, K. y HATONO, H.; Chem. Phys. Lett. 32, 86(1975).

- (64) LEMIEUX, R.U., MAGABHUSHAN, T.L. y PAUL, B.; Can. J. of Chem., 50, 773(1972).
- (65) BYSTROV, V.F. IVANOV, V.T., PORTANOVA, S.L., BALASHOVA, T.A. y DUCHIMNIKOV, Yu; Tetrahedron, 29, 873(1973)
- (66) PACHLER, K.E.R.; { Spectrochim. Acta, 19, 2085(1963).
" " " 20, 581 (1964).
- (67) JOHNSON, C.E. y BOVEY, F.A.; Chem. Phys., 29, 1012 (1958).
- (68) IWASAKI, H.; Yakugaku Zasshi, 82, 1358(1962).
- (69) FOX, J.J., KUWADA, Y., WATANABE, K.A., UEDA, T. y WHIPPLE, E.B.; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 518(1964).
- (70) FOX, J.J., KUWADA, Y. y WATANABE, K.A.; Tetrahedron Letters, 57, 6029(1968).
- (71) Ts'o, P.O.P., FASMAN, G.D. y TIMASHEFF, S.N.; "Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids", Marcel Dekker, Nueva York, 1970, pag. 49.
- (72) SCHWARZ, J.A. y PERLIN, A.S.; Can. J. Chem., 50, 3667(1972).
- (73) SCHERAGA, H.A.; Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103(1968).
- (74) FEENEY, J.; J. Magn. Resonance, 21, 473(1976).
- (75) LICHTENHALER, F.W. y TRUMMLITZ, G.; FEBS Letters, 38, 237(1974).
- (76) GUTFREUND, H.; "Enzymes: Physical Principles". Wiley Interscience (1972), pag. 159.
- (77) MARSHALL, A.G., SCHMIDT, P.G. y SYKES, B.D.; Biochemistry, 11, 3875(1972).
- (78) Ts'o, P.O.P. y SCHWEIZER, M.P.; Biochemistry, 7, 2963(1968).
- (79) WALLACH, D.; J. Chem. Phys., 47, 5258(1967).