

UCH-FC
DOC-BMCN
P438
C-1



Correlación de estructura y función en proteínas priónicas de mamíferos y anfibio

**Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias
por**

Daniel Roberto Pérez Lagos

Septiembre, 2006



Directores de Tesis:
Dr. Octavio Monasterio
Dr. Kurt Wüthrich

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

DANIEL ROBERTO PÉREZ LAGOS

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 7 de Septiembre de 2005.

Director de Tesis

Dr. Octavio Monasterio

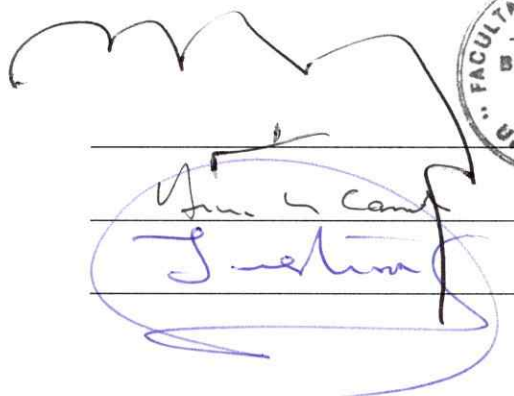


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Jorge Babul

Dr. Bruce Cassels

Dr. Nivaldo Inestrosa



Dedicado a mi madre
y a la memoria de mi padre





Nací el 7 de Diciembre de 1970 y crecí en una sociedad donde la discrepancia y los debates públicos constituían un peligro para la integridad física. Por esa razón, mi padre y mi madre, él taxista y ella secretaria, decidieron que lo mejor era que desarrollara mi curiosidad infantil en nuestro jardín en lugar de ir a conocer las redes sociales del barrio. Fue en ese lugar, entre los bichos del jardín y los motores de taxis desarmados, que nació mi interés en saber como funciona la naturaleza. Este interés creció durante la enseñanza primaria, donde la escasez de una escuela pública nunca fue excusa para un grupo de maestros dedicados a incentivar mentes frescas, y se consolidó más tarde durante mis estudios secundarios en el Instituto Nacional. Ahí, el apego estricto a la escuela reduccionista motivó mi elección de estudiar Bioquímica, como una forma de entender el fenómeno de la vida. Cursé estudios en la Universidad de Chile y en la Católica. Luego me interesó la neurociencia, dediqué algunos años a estudiar cómo el plegamiento y las interacciones entre proteínas determinan la Enfermedad de Alzheimer. Finalmente, entré al programa de doctorado en ciencias de la Universidad de Chile. Durante los últimos años mi principal interés académico ha sido estudiar las relaciones entre estructura y función en proteínas. En este campo realicé estudios con la proteína priónica mediante NMR en el Instituto Tecnológico Federal de Suiza, trabajo que presento en la siguiente tesis.

Agradecimientos

Agradezco al profesor Kurt Wüthrich por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender la técnica de resonancia magnética nuclear.

Al profesor Octavio Monasterio por su ayuda durante el desarrollo y la escritura de la tesis, por la generosidad, energía y entusiasmo con que comparte sus conocimientos, invaluable guía para el estudio de la estructura de proteínas, y muy especialmente por la honestidad, la rectitud y el respeto que muestra hacia sus aprendices.

A la profesora Rosalba Lagos por enseñarme los trucos y destrezas en el manejo de los polinucleótidos.

Al Dr. Fred Damberger por su excelente disposición para enseñar todo lo relacionado a la adquisición, el procesamiento y análisis de datos de NMR, más todo lo referente al trabajo y mantención de los espectrómetros.

A Pascal Bettendorf por sus extensas charlas de estrategia y teoría de NMR.

A Veniamin Gallius, por esas incontables cesiones de café de media tarde, compartiendo su amistad y la fascinación por los alcances del estudio de proteínas mediante NMR.

A mi esposa Alexandra, primero por su invaluable ayuda durante la tesis, donde exploró conmigo los caminos de la mecánica cuántica, ayudándome así a entender la teoría que hay detrás de la danza de los espines en NMR. Y más importante aún, por ser mi compañera de viaje en momentos difíciles, y simplemente por darme lo mejor de mi vida.

A mi madre, por su amor incondicional y apoyo a toda prueba, y porque además sin ella:
n.a.



Indice de Materias

Dedicatoria.....	ii
Autobiografía.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Indice.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Encefalopatías espongiformes transmisibles.....	5
2.2. El agente infeccioso.....	7
2.3. La proteína priónica.....	9
2.4. Función de PrP ^C	13
2.5. Barrera inter especie.....	17
2.6. Estructura función y conversión PrP ^C a PrP ^{SC}	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Clonamiento de la proteína priónica de <i>Equus caballus</i> PrP (ecPrP).....	23



3.2. Clonamiento de la proteína priónica de <i>Xenopus laevis</i> PrP (xlPrP).	25
3.3. Mutagénesis sitio-dirigida a mmPrP	25
3.4. Expresión y purificación de PrP recombinante	26
3.5. Espectroscopia de NMR.	28
3.5.1. Experimentos de triple resonancia.	28
3.5.2. Experimentos de correlación	30
3.5.3. Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser (NOESY).	32
3.6. Asignación de resonancias de ecPrP	34
3.7. Asignación de resonancias de xlPrP.	37
3.8. Cálculo de la estructura.	39
4. RESULTADOS.	43
4.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> PrP.	43
4.1.1. Introducción	43
4.1.2. Objetivos.	46
4.1.3. Resultados.	48
4.1.3.1. Bioquímica.	48
4.1.3.1.1. Expresión y purificación.	48
4.1.3.1.2. Replegamiento de fragmentos de xlPrP.	51
4.1.3.1.3. Remoción del péptido de 6 histidinas.	52
4.1.3.1.4. Solubilidad de proteínas purificadas.	55



4.1.3.2. Estudios estructurales.	58
4.1.3.2.1. Dinámica y predicción de estructura secundaria.	58
4.1.3.2.2. Restricciones de distancia y cálculo de estructura.	60
4.1.3.2.3. Análisis de la estructura.	62
4.1.3.2.4. Búsqueda de sitios funcionales.	68
4.1.4. Discusión.	70
4.1.4.1. Conservación de la secuencia en la región N-terminal	70
4.1.4.2. Comparación de los dominios globulares.	72
4.1.4.3. Arquitectura de las proteínas priónicas.	74
4.1.4.4. Secuencia funcional en el dominio globular de PrP ^C	74
4.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE <i>EQUUS CABALLUS</i> PrP.	77
4.2.1. Introducción.	77
4.2.2. Objetivos.	80
4.2.3. Resultados	82
4.2.3.1. Espectroscopia y asignación de resonancias	82
4.2.3.1.1. Estrategias de asignación	82
4.2.3.1.2. Asignación de resonancias	90
4.2.3.2. Cálculo de la estructura de ecPrP.	93
4.2.3.3. Estudios de relajación.	97
4.2.3.4. Dependencia de temperatura de corrimientos químicos ¹ H.	97
4.2.4. Discusión.	105



4.2.4.1. Estados excitados de baja energía	105
4.2.4.2. Comparación con PrP de otros mamíferos	109
4.3. VARIANTES DE <i>MUS MUSCULUS</i> PrP EN EL <i>LOOP</i> β2-α2	112
4.3.1. Introducción.	112
4.3.2. Objetivos	115
4.3.3. Resultados	116
4.3.3.1. Bioquímica.	116
4.3.3.2. Estabilidad del <i>loop</i> β 2- α 2. Mutación Y169G	119
4.3.3.2.1. Cambios en los corrimientos químicos	119
4.3.3.2.2. Flexibilidad de la mutante Y169G	123
4.3.3.3. Intercambio conformacional. Sustituciones equinas en mmPrP.	126
4.3.3.4. Determinación de la estructura de mmPrP_SK.	129
4.3.3.5. Intercambio conformacional del <i>loop</i> β 2- α 2 en mmPrP_SK.	133
4.3.4. Discusión.	135
4.3.4.1 Estabilidad del <i>loop</i> β 2- α 2.	135
4.3.4.2. Intercambio conformacional del <i>loop</i> β 2- α 2	136
5. REFERENCIAS.	140
APENDICE I. <i>Revisión teórica de resonancia magnética nuclear (NMR)</i>.	149
APENDICE II. <i>Valores de parámetros de adquisición</i>.	196
APENDICE III. <i>Asignación de resonancias</i>	202



Lista de Figuras

Figura 1	Curso histórico de la investigación de enfermedades priónicas.	6
Figura 2	Organización del gen Prnp y biosíntesis de la proteína madura PrP.	12
Figura 3	Principales características de las dos conformaciones de la proteína priónica. .14	
Figura 4	Comparación de las regiones de <i>loop</i> $\beta 2-\alpha 2$ de priones de distintas especies. .21	
Figura 5	Esquema de secuencia de pulsos de HNCA.	29
Figura 6	Esquema de secuencia de pulsos de HC(C)H-TOCSY.	31
Figura 7	Esquema de secuencia de pulsos de [^1H , ^1H]-NOESY editado en ^{15}N	33
Figura 8	Estrategia de asignación para las resonancias de ecPrP.	35
Figura 9	Estrategia de asignación <i>de novo</i> de las resonancias de xlPrP.	38
Figura 10	Alineamiento esquemático y distancia evolutiva en proteínas priónicas.	44
Figura 11	Esquema general de purificación de proteínas priónicas.	48
Figura 12	Perfil cromatográfico de xlPrP.	50
Figura 13	Dicroísmo Circular (CD) de xlPrP.	53
Figura 14	Ensayo de corte de xlPrP (121–227) con trombina.	54
Figura 15	Espectro 1D- ^1H de NMR de xlPrP (121–227).	56
Figura 16	Espectro 1D- ^1H NMR de 1 mM xlPrP (99–226)	57
Figura 17	Dinámica y predicción de estructura secundaria para xlPrP.	59
Figura 18	Restricciones de distancia para el cálculo de la estructura de xlPrP.	61
Figura 19	Datos de entrada para el cálculo de estructura por NMR de xlPrP (99–226) . 63	
Figura 20	Estructura NMR de xlPrP (99–226)	64
Figura 21	Patrón de señales NOE para la hoja β plegada de xlPrP.	66
Figura 22	Señal NOE de puente de hidrógeno $\text{H}^{\text{N}}\text{-Y162 O}\gamma\text{-S185}$ de xlPrP.	67
Figura 23	Conservación de secuencia y núcleo hidrofóbico en xlPrP.	69
Figura 24	Alineamiento de las secuencias de proteínas priónicas.	71
Figura 25	Superposición de los esqueletos carbonados de xlPrP, ggPrP, trPrP, y hsPrP. 73	
Figura 26	Modelo de la estructura mínima de PrP ^C	75



Figura 27 Alineamiento de secuencias de priones de mamíferos.	79
Figura 28 Espectro [^1H , ^{15}N]-COSY de ecPrP, cePrP, y fcPrP.	83
Figura 29 Espectro [^1H , ^{15}N] HSQC de cePrP.	85
Figura 30 Comparación de resolución de NOESY para ecPrP, cePrP, y FcPrP.	87
Figura 31 Comparación de señal/ruido para NOESY de ecPrP, cePrP y fcPrP.	89
Figura 32 HNCA de ecPrP (121–230) y xlPrP (90–230).	91
Figura 33 Desviaciones de corrimientos químicos de carbonos α para ecPrPy xlPrP. ...	92
Figura 34 Restricciones de distancia para el cálculo de estructura de ecPrP.	95
Figura 35 Estructura NMR de ecPrP (121–230).	96
Figura 36 Movilidad interna de ecPrP (121–230).	98
Figura 37 Espectro [^{15}N , ^1H]- COSY en función de la temperatura de ecPrP.	99
Figura 38 Residuales del ajuste lineal del cambio en los corrimientos químicos.	101
Figura 39 Coeficiente de segundo orden (B_2) en función de la temperatura.	102
Figura 40 [^{15}N , ^1H]-COSY en función de temperatura de I139.	103
Figura 41 Dependencia de la temperatura de resonancias del <i>loop</i> $\alpha 2$ - $\beta 2$ y F175.	104
Figura 42 Dinámica y estados conformacionales alternativos en ecPrP.	107
Figura 43 Sustituciones en la secuencia del <i>loop</i> $\beta 2$ - $\alpha 2$ del prión de ratón mmPrP. ...	114
Figura 44 Concentración de proteínas variantes de mmPrP.	117
Figura 45 Espectros ^1H 1D NMR de mutantes de mmPrP.	118
Figura 46 Cambios en los corrimientos químicos en la mutante Q168E.	121
Figura 47 Cambios en los corrimientos químicos en la mutante Y169G.	122
Figura 48 [^1H , ^1H]-NOE editado en ^{15}N .de mmPrP_[D167S,N173K]	124
Figura 49 [^1H , ^1H]-NOE editado en ^{15}N . de mmPrP_[D167S,Y169G,N173K]	125
Figura 50 $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear de ecPrP.	127
Figura 51 Espectros [^1H , ^{15}N]-COSY de mmPrP y cinco mutantes de mmPrP.	128
Figura 52 Restricciones de distancia del cálculo de estructura mPrP_[D167S,N173K].	132
Figura 53 Población de conformeros del <i>loop</i> $\beta 2$ - $\alpha 2$ dependiente de la temperatura. ...	134
Figura 54 Modelo del intercambio conformacional en el <i>loop</i> $\beta 2$ - $\alpha 2$	138



Lista de Tablas

Tabla 1 Caracterización de las enfermedades priónicas en humanos.	8
Tabla 2 Mutaciones en la región codificante del gen de la proteína priónica humana. .	10
Tabla 3 Funciones propuestas para la forma celular de PrP.	15
Tabla 4 Condiciones de replegamiento de xIPrP (97-227).	51
Tabla 5 Datos de entrada para el cálculo estructural de <i>Equus caballus</i> PrP.	94
Tabla 6 Variantes de la PrP de ratón.	116
Tabla 7 Datos de entrada para el cálculo de estructura de mmPrP_SK (120—232). . . .	131
Tabla A1 Experimentos de triple resonancia en ecPrP y xIPrP.	198
TablaA2 Calibración de parámetros de experimentos de correlación.	199
TablaA3 Parámetros de [¹ H- ¹ H]TOCSY, H(C)CH-TOCSY, y H(C)CH-COSY.	200
Tabla A4 Valores ajustados para experimentos NOESY.	201
Tabla A5 Asignación de resonancias de NMR para ecPrP.	206
Tabla A6 Asignación de resonancias de NMR para xIPrP.	210



Abreviaturas y simbología

ATNOS	programa de localización automática de señales NOESY (<i>automated NOESY peak picking</i>)
BPI	inserción de pares de bases (<i>base pair insertion</i>)
BSE	encefalopatía espongiiforme de bovino (<i>bovine spongiform encephalopathie</i>)
CANDID	localización automática de señales NOESY y cálculo de estructura
CARA	asignación de resonancias asistida por computador (<i>computer-aided resonance assignment</i>)
CD	dicroísmo circular (<i>circular dichroism</i>)
CJD	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>)
fCJD	variante familiar de CJD.
nvCJD	nueva variante de CJD.
COSY	espectroscopia de correlación (<i>correlation spectroscopy</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DQ	coherencia cuántica doble (<i>double quantum coherence</i>)
DYANA	algoritmo dinámico para aplicaciones de NMR (<i>dynamics algorithm for NMR applications</i>)
dNTP	deoxi nucleótido trifosfato (<i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
FID	decaimiento libre de la inducción (<i>free induction decay</i>)
FFI	insomnio familiar fatal (<i>fatal familial insomnia</i>).
GdmCl	cloruro de guanidinio (<i>guanidinium chloride</i>).
GPI	glicofosfatidil inositol (<i>glycophosphatidyl inositol</i>).
GSS	síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker.
HSQC	coherencia cuántica simple heteronuclear (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
INEPT	mejoramiento de señales de núcleos insensibles por transferencias de

	polarización (<i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>)
MWCO	corte de peso molecular (<i>molecular weight cutoff</i>)
NMR	resonancia magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>).
NOE	efecto nuclear Overhauser (<i>nuclear Overhauser enhancement</i>)
NOESY	espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
POF	formalismo de operador de producto (<i>product operator formalism</i>)
PFG	pulso con gradiente de campo (<i>pulse field gradient</i>)
PrP	proteína priónica (<i>prion protein</i>)
PrP ^C	PrP celular
PrP ^{SC}	PrP scrapie
ecPrP	PrP de caballo (<i>Equus caballus</i>)
xlPrP	PrP de rana (<i>Xenopus laevis</i>)
cePrP	PrP de ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)
fcPrP	PrP de gato doméstico (<i>Felis catus</i>)
btPrP	PrP de bovino (<i>Bos taurus</i>)
mmPrP	PrP de ratón (<i>Mus musculus</i>)
rf	radiofrecuencia
r.m.s.d.	desviación cuadrática media (<i>root mean square deviation</i>)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SQ	coherencia cuántica simple (<i>single quantum coherence</i>)
TSE	encefalopatía espongiformes transmisibles (<i>transmissible spongiform encephalopathies</i>)
TOCSY	espectroscopia de correlación total (<i>total correlation spectroscopy</i>)
UV	ultravioleta
ZQ	coherencia cero cuántica (<i>zero quantum coherence</i>)

$\langle A \rangle$	valor esperado de un operador A
B_0	campo magnético estático
B_1	campo magnético transversal
$\Delta\delta(I)$	cambio en el corrimiento químico del espín
γ	constante giromagnética
\hat{H}	operador Hamiltoniano de interacciones de espín
\hbar	constante de Planck dividida por 2π
I	operador de momento angular de espín
J_{IS}	acoplamiento escalar entre espines S e I
k_B	constante de Boltzmann
\vec{L}	momento angular
$\hat{\mu}$	momento dipolar magnético microscópico
\vec{M}	magnetización total
N	número de Avogadro
Ψ	función de onda
R_{II}	constante de auto-relajación
R_{IS}	constante de relajación cruzada
R_z	operador de rotación
σ	operador de densidad
\vec{T}	torque
τ	tiempo de mezcla
T_1	tiempo de relajación longitudinal
T_2	tiempo de relajación transversal
τ_C	constante de correlación
U	propagador de evolución del operador de densidad
ω_0^*	frecuencia de Larmor
ω_f	radiofrecuencia
Ω	frecuencia de desintonía

1. RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) se desarrollan sólo en organismos que expresan la forma celular de la proteína priónica (PrP^C). Se desconoce la función fisiológica de esta proteína en organismos sanos. Con el objetivo de identificar regiones conservadas que no están involucradas en la mantención de la estructura del polipéptido, y que por tanto podrían tener un rol fisiológico, el grupo de K. Wüthrich se embarcó en un proyecto tendiente a resolver la estructura de proteínas priónicas distantes en la evolución. Durante esta tesis se determinó la estructura por NMR del fragmento xPrP(99–226) de la proteína priónica de *Xenopus laevis* (Calzolari *et al.*, 2005), para la cual se obtuvo la asignación de resonancias de NMR casi completa (Pérez & Wüthrich, 2005). La estructura muestra el mismo plegamiento global que el observado en PrP de mamíferos, aves y reptiles. Consiste en un N-terminal flexible, entre los residuos 99–124, y un dominio globular que comprende los residuos 125–225. El dominio estructurado posee tres hélices α (residuos 145–156, 174–193, y 202–224) y una hoja β entre los residuos 125–133 y 161–166 que resulta inusualmente larga al ser comparada con la observada en PrP de mamíferos. Todos los residuos conservados en el dominio globular de xPrP participan en la mantención de la estructura de la proteína. En contraste, los segmentos polipeptídicos que han sido propuestos como posibles sitios funcionales en mamíferos, aves y reptiles (Calzolari *et al.*, 2005), no están conservados, lo que sugiere que un cambio o pérdida de función tuvo lugar en PrP de anfibio.

Se han determinado las estructuras tridimensionales de varias PrPs recombinantes de mamíferos, y aunque todas ellas comparten el mismo plegamiento global, existe gran variabilidad entre especies en la observabilidad de las resonancias provenientes del *loop* β 2- α 2 (residuos 166–172) y su definición estructural. Este *loop* está involucrado en interacciones específicas que influyen la transición conformacional de PrP relacionada con las TSE (Kaneko *et al.*, 1997a). En este trabajo se resolvió la estructura de PrP de caballo (ecPrP). En ella se observa que el *loop* β 2- α 2 no exhibe polimorfismo conformacional. Al ser comparada con toda la familia, la secuencia de ecPrP tiene la sustitución única D167S, y al ser comparada sólo con la proteína priónica de ratón (mmPrP) la secuencia de ecPrP muestra además otras dos sustituciones, E168Q y N173K. Con el objetivo de investigar la importancia de las diferencias aminoacídicas en esta región, se realizaron estudios de NMR de varias mutantes de mmPrP. Se encontró que la modificación D167S fue suficiente para conferir rigidez al *loop*. Las sustituciones E168Q y N173K por sí solas no confieren rigidez a esta región. Pero en presencia de D167S, la sustitución N173K induce un intercambio conformacional suficientemente lento, lo que permite ver las señales NMR de cada estado conformacional por separado. Finalmente, se encontró que Y169 cumple una función esencial en la estabilización de la estructura del *loop* β 2- α 2. En total en este trabajo se clonó, purificó y resolvió la estructura tridimensional de tres proteínas priónicas, y se estudió el comportamiento por NMR de otras 12 mutantes de mmPrP. El trabajo ha producido dos publicaciones, un manuscrito y dos presentaciones a congreso en que el autor de esta tesis figura en primera autoría.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) have been shown to develop only in organisms that express the cellular form of the prion protein (PrP^C). A physiological function of PrP^C in the healthy organism has not yet been identified. The Wüthrich group has started a project of solving the NMR structure of prion proteins from species that are distant in evolution, with the aim to identify conserved regions that are not involved in maintaining the polypeptide fold, and which might therefore have a role in a conserved function.

Here we present the NMR structure of the fragment xIPrP(99-226) of the *Xenopus laevis* prion protein (Calzolari *et al.*, 2005). Nearly complete NMR assignments have been obtained (Pérez & Wüthrich, 2005). The structure shows the same global features as observed in mammalian, avian and reptile prion proteins. It consists of a flexible N-terminal tail spanning residues 99-124, and a globular domain with residues 125 to 225. The structured domain consists of three α helices (residues 145-156, 174-193, and 202-224), and an antiparallel β sheet made up of the residues 125-133 and 161-166, unusually long when compared with the mammalian PrPs. All the conserved residues in the globular domain of xIPrP participate in the polypeptide fold conservation. In contrast, polypeptide segments that have been proposed as possible functional sites in mammalian, avian and reptile PrP^C (Calzolari *et al.*, 2005) are not conserved, suggesting a change or loss of function in the amphibian PrP.

The 3D-structures of several recombinant mammalian prion proteins (PrPs) have been solved. Although they all show the same global fold, the NMR observability of the residues in the loop $\beta 2\text{-}\alpha 2$, comprising residues 166-172, and its structural definition, have been found to show high species variability. This loop is involved in specific interactions involved in the PrP conformational transition related with TSE (Kaneko *et al.*, 1997a). Here we solved the structure of *equus caballus* PrP (ecPrP). In this protein the loop $\beta 2\text{-}\alpha 2$ exhibits no detectable conformational polymorphism. When compared with all the known PrP sequences, the ecPrP sequence contains the unique amino acid substitution D167S, and when compared only with the mouse PrP (mmPrP), that has a disordered loop region, the ecPrP sequence also has the substitutions D168Q and N173K. In order to address the structural importance of these amino acid changes, we perform NMR studies with several mutants of mmPrP. The mutant mmPrP(121-231)[D167S] was found to be sufficient to confer rigidity to the loop. The substitutions D168Q and N173K alone do not confer rigidity of this region. We further discovered that N173K, in the presence of D167S (double mutant mmPrP[D167S_N173K]) induces a conformational exchange slow enough to observe one NMR signal for each conformer. Finally, we found that the Y169 plays an essential role in determining the structure stability of the loop region. During the present thesis work we clone, purify, and solve the structure of three prion proteins, and we characterised the structural behaviour of 12 mmPrP mutants by NMR. So far, this thesis has generated two publications, one manuscript, and two congress presentations in which the author of this thesis is in the first place.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) o enfermedades priónicas son enfermedades neurodegenerativas fatales presentes en varias especies animales incluido el hombre. Su transmisión se observa en el ambiente natural y es reproducible en el laboratorio. Los síntomas de TSE son variados, incluyen ataxia en animales e incapacidad motora con trastornos de personalidad en humanos. El principal trastorno histopatológico consiste en microvacuolación neuronal, el tejido cerebral presenta una apariencia similar a esponja, característica que da el nombre a la enfermedad (Prusiner *et al.*, 1998).

La patología más común del grupo es scrapie, una afección de cabras y ovejas reconocida tempranamente en 1730 (Kimberlin, 1986). Variadas contribuciones han llevado a postular al menos dos hipótesis para explicar el mecanismo con que se propaga la enfermedad (**figura 1**)

En humanos se presentan como el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker GSS (Gerstmann, 1928); insomnio familiar fatal; y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Creutzfeldt, 1920) esta última con versiones hereditaria esporádica, iatrogénica e

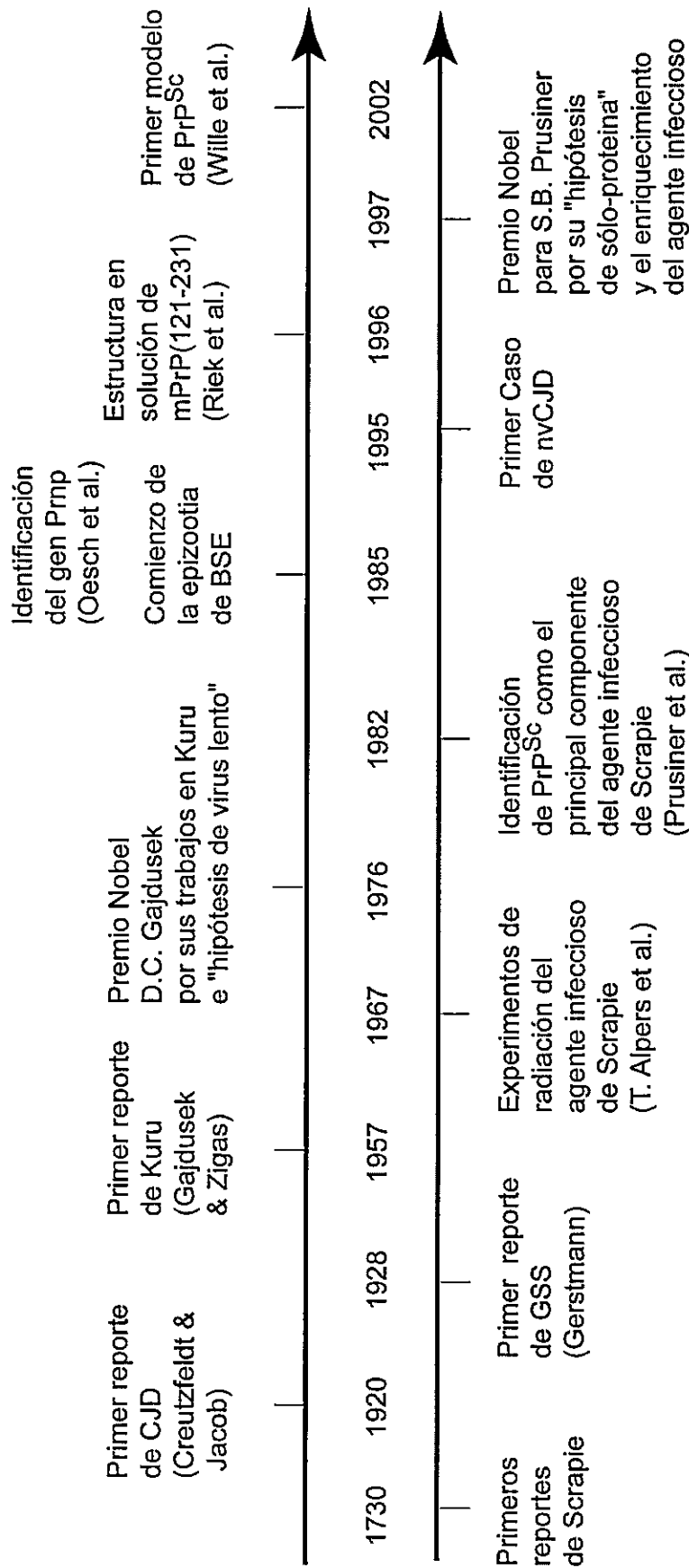


Figura 1. Eventos de mayor influencia en el curso histórico de la investigación de enfermedades priónicas.

infecciosa, todas variantes de baja prevalencia en la población (**Tabla 1**).

La variante que ha causado mayor preocupación en la población es la aparición en los años 1990 de la epizootia de vacas BSE (encepatía espongiiforme bovina o 'enfermedad de las vacas locas'). Esta epizootia causó en Gran Bretaña más de 180.000 casos reportados, y aunque la propagación de la BSE fue detenida, se ha descrito un número creciente de adultos jóvenes en la población humana como portadores de CJD relacionado con BSE, en lo que se constituye como una nueva variante de la enfermedad (vCJD) y que muestra el traspaso de la barrera interespecie entre bovinos y humanos (Bruce *et al.*, 1997).

2.2. El agente infeccioso

En 1967 el radiólogo Alper y sus colegas demostraron que el agente responsable de scrapie es extremadamente resistente a tratamientos que normalmente destruyen ácidos nucleicos, como UV y radiaciones ionizantes, y por lo tanto sugirieron que el agente infeccioso debía carecer de ácidos nucleicos. Ello representa el primer choque con el dogma que los patógenos convencionales no pueden replicarse en ausencia de ácidos nucleicos (Alper, 1967).

Estos resultados junto al hallazgo previo de que la masa molecular mínimo para mantener infectividad (20 KDa), es demasiado pequeño para ser un virus o cualquier otro tipo de agente infeccioso conocido hasta ese momento (Alper, 1967b), llevaron a Griffith a proponer que el material responsable de transmisión de la enfermedad era una proteína que tiene la sorprendente habilidad de autoreplicarse en el organismo (Griffith, 1967). Ese fue el comienzo de la hipótesis llamada "sólo-proteína" de la propagación de TSE. A partir de 1980

Nombre	Etiología	Sigla	Inicio de la enfermedad (edad promedio)	Duración Promedio (meses)	Síntomas clínicos	Porcentaje
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Esporádica	sCJD	66	7	Triada neuropatológica: cambios espongiformes, pérdida neuronal, gliosis. Síndrome atáxico-cognitivo	85 – 90%
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Familiar	fCJD	55	17	Triada neuropatológica: cambios espongiformes, pérdida neuronal, gliosis.	10 – 15%
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheincker	Familiar	GSS	46	55	Presencia de extensas placas amiloides multicéntricas en el cerebro.	< 1%
Insomnio Familiar Fatal	Familiar	FFI	49	12	Pérdida neuronal, gliosis, disfunción del sistema autónomo, insomnio.	< 1%
Inserción de pares de bases	Familiar	BPI	38	70	Tinción positiva para príon en el cerebelo. Síntomas psiquiátricos: desordenes de personalidad, agresividad, comportamiento antisocial y suicida.	escasos
Kuru	Ingestión oral	Kuru	Cualquiera	6	Ataxia cerebelar, incapacidad motora	escasos
Nueva Variante	Ingestión oral	vCJD	26	15	Placas amiloides, Síntomas psiquiátricos: depresión y ansiedad.	escasos

Tabla 1. Caracterización de las enfermedades priónicas en humanos. Lista de inicio promedio, duración y síntomas clínicos para enfermedades priónicas humanas (Gajusek, 1977; Hauw *et al.*, 2000; Kovacs *et al.*, 2002) Las inserciones de pares de bases dentro del segmento de repeticiones (BPI) son tratados como una enfermedad independiente debido a sus síntomas únicos. La estadísticas de Kuru provienen de la epidemia que tuvo lugar entre los años 1950 y 1970. No han sido reportados nuevos casos de Kuru en los últimos 10 años. sCDJ da cuenta de 85% de todas las enfermedades de TSE humanas.

el grupo de Stanley Prusiner ha liderado la investigación en base a la hipótesis de “sólo-proteína” acuñando el término ‘prión’ para referirse al pequeño agente infeccioso proteico que transmite la enfermedad. En esa línea de investigación se logró aislar la proteína priónica (PrP) a un nivel al que ningún otro componente es detectable. La infectividad copurifica con PrP, donde la concentración de esta proteína es proporcional al título de infectividad. Esta infectividad es neutralizada por agentes que destruyen la estructura proteica y por anticuerpos anti PrP. Por otra parte, estudios genéticos han demostrado que la mayoría, si no todos los casos de TSE familiares están ligados a mutaciones en el gen PrP (Aguzzi, 1999).

Otra línea de evidencia que sustenta la hipótesis de “sólo-proteína” proviene de estudios con ratones *knock-out* para PrP que son resistentes a la infección de scrapie y no generan nuevas partículas infecciosas, siendo incapaces de desarrollar la enfermedad (Bueler *et al.*, 1993). Estos experimentos sugirieron por primera vez un mecanismo de replicación priónica, y establecieron la necesidad de que el huésped exprese PrP para que la enfermedad se pueda propagar.

2.3. La proteína priónica

El análisis de secuencia de la proteína priónica aislada de cerebros infectados permitió aislar el gen de PrP (*Prnp*). Mutaciones ligadas a las enfermedades espongiiformes no hacen más que corroborar la directa participación del producto de este gen en la génesis de las enfermedades priónicas (ver **Tabla 2**).

El gen *Prnp* se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 (Prusiner, 1991), no

Polimorfismos Silentes	Influenciales	Mutaciones		Inserciones
		Puntuales		
P68P	M129V	<u>P102L</u>	T188A	24bp
A117A	N171S	<u>P105L</u>	T188K	48bp
G124G	E219K	<u>A117V</u>	E196K	96bp
V161V	delección de 24bp	<u>G131V</u>	<u>F198S</u>	120bp
N173N		I138M	E200K	144bp
T188T		G142S	<u>D202N</u>	168bp
D202D		Y145s	V203I	<u>192bp</u>
Q212Q		Q160s	R208H	216bp
R228R		D178N-129V	V210I	
S230S		<i>D178N-129M</i>	E211Q	
		V180I	<u>Q212P</u>	
		V180I+M232R	<u>Q217R</u>	
		T183A	M232R	
		H187R	<u>M232T</u>	
		T188R	P238S	

Tabla 2. Mutaciones en la región codificante del gen de la proteína priónica humana. En negrita las mutaciones vinculadas con fCJD, subrayadas las vinculadas con GSS, y en itálica las vinculadas con FFI. Las otras mutaciones no están suficientemente caracterizadas, o tienen fenotipos inusuales y no pueden ser categorizadas en alguno de los tres grupos de enfermedades priónicas humanas (Kovacs *et al.*, 2002).

contiene intrones y codifica un producto de 253 aminoácidos (figura 2). La secuencia proteica contiene cinco repeticiones de un octapéptido en la región N-terminal, dos sitios de glicosilación y un puente disulfuro entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Además, posee dos secuencias señales en los extremos amino y carboxilo que son removidos durante el procesamiento, y una secuencia de unión de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la posición 230, que ancla la proteína a la superficie externa de la membrana celular (Harris, 1999).

La región más conservada de la secuencia corresponde al segmento hidrofóbico entre los residuos 113 y 128. En esta región además se localiza el fragmento mínimo de la proteína que es capaz de agregarse en forma de amiloide (residuos 106–126). La estructura tridimensional de PrP^C en solución acuosa ha sido determinada por NMR para varias especies (Riek *et al.*, 1998), en los que el fragmento 121–230 corresponde al dominio globular de la proteína. Este dominio consta de tres hélices α (residuos 145–155, 174–192, y 200–224 respectivamente) y una hoja β pequeña que conecta los residuos 130 y 160 (Billeter *et al.*, 1997).

El gen PrP es expresado constitutivamente en el cerebro y otros tejidos de animales sanos. Para diferenciar la proteína normal de la encontrada en cerebros infectados se ha llamado PrP^C a la proteína priónica celular no infecciosa y PrP^{SC} a la proteína priónica asociada a scrapie, respectivamente. Las dos proteínas tienen secuencia idéntica y el mismo patrón de glicosilación (Prusiner, 1998b), pero se diferencian al ser sometidas a un tratamiento parcial con proteasas. PrP^C es completamente degradada, en cambio PrP^{SC} es digerida sólo parcialmente dejando un fragmento de 27–30 KDa que

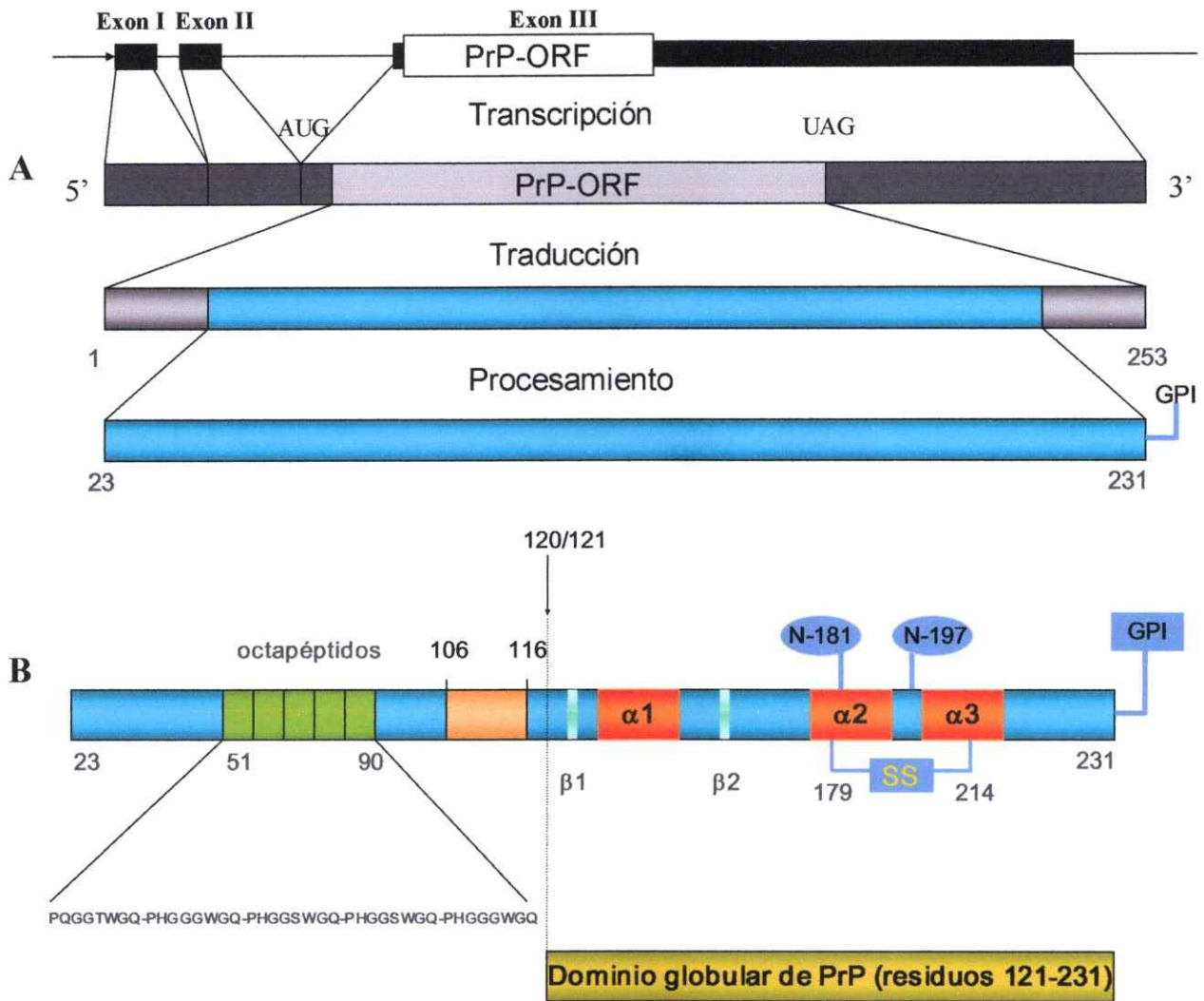


Figura 2. Organización del gen Prnp y biosíntesis de la proteína madura PrP. **A.** Transcripción, traducción y primera parte del procesamiento postraduccional de PrP. El segmento azul muestra la región correspondiente a la proteína madura (30–35KDa), obtenida luego del corte del péptido señal de destinación a retículo endoplásmico (amino terminal), y de la señal de glicosilación en el carboxilo terminal. **B.** Principales características de la proteína madura: en verde las repeticiones ricas en prolina, en anaranjado el segmento hidrófobo conservado, en celeste las dos pequeñas hebras β , en rojo las tres hélices α . N181 y N197 indican los sitios de glicosilación, SS el puente disulfuro y GPI el sitio de anclaje a membrana.

corresponde al fragmento que se obtiene al purificar la proteína desde cerebro infectado con scrapie (Bolton *et al.*, 1982). Pese a ser químicamente equivalentes (Stahl *et al.*, 1993), presentan marcadas diferencias en su conformación y comportamiento en solución. PrP^C es una proteína con un alto contenido de estructura alfa, escasa hoja β y muy soluble, mientras que PrP^{SC} es rica en hojas β y muy insoluble (**figura 3**), forma agregados en el parénquima de cerebros infectados y tiende a agregarse *in vitro* formando fibras de amiloide.

2.4. Función de PrP^C

Aunque sólo se han descrito TSEs en especies de mamíferos, también se han identificado PrP en una amplia variedad de organismos superiores, en mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Strumbo *et al.*, 2001; Oesch *et al.*, 1985; Wopfner *et al.*, 1999; van Rheede *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 1991; Gabriel *et al.*, 1992; Simonic *et al.*, 2000). En un contraste aparente con el alto nivel de conservación de secuencia entre mamíferos, una gran variedad de funciones ha sido propuesta para la forma celular de PrP (**Tabla 3**), sin que hasta ahora se haya encontrado una respuesta satisfactoria para la función fisiológica de la forma celular de PrP que se encuentra en organismos sanos (PrP^C).

En vista del papel esencial en TSEs, se han determinado experimentalmente un número de estructuras de PrP de mamíferos (Riek *et al.*, 1996; James *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000; López *et al.*, 2000; Calzolari *et al.*, 2000; Haire *et al.*, 2004; Gossert *et al.*, 2005; Lysek *et al.*, 2005) con secuencias idénticas en un 90%, las estructuras mostraron tener la arquitectura proteica de la proteína priónica celular PrP^C

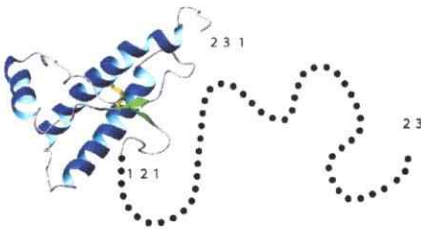
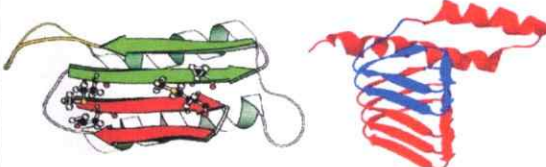
PrP ^C	PrP ^{SC}
Conformación benigna	Agente infeccioso de TSEs
Alto contenido de hélice α	Aumento de contenido de hoja β
Monómero	Oligómero ordenado
Soluble en detergentes no desnaturalantes	Agregados insolubles
Sensible a proteinasa K	Parcialmente resistente a proteasas
Localizada en la superficie celular	Se acumula en el cerebro de individuos infectados
Estructura por NMR	Sólo modelos tentativos
	

Figura 3. Principales características de las dos conformaciones de la proteína priónica, denominadas: celular PrP^C y scrapie PrP^{SC}. Abajo a la izquierda se muestran la estructura de PrP de ratón determinada por NMR. El segmento amino-terminal de estructura desordenada se muestra con línea punteada. Abajo a la derecha se muestran dos modelos tentativos de PrP^{SC} (Huang *et al.*, 1996; Wille *et al.*, 2002). Ambos muestran un alto contenido de hojas β .

Función propuesta	Referencia	
Receptor de membrana	<p>Shyng <i>et al.</i>, 1993 Schmitt-Ulms, 2001 Keshet <i>et al.</i>, 2000 Gauczynski <i>et al.</i>, 2001</p>	
Proteína transportadora o de unión a cobre	<p>Whittal <i>et al.</i>, 2000 Jackson <i>et al.</i>, 2001 Kramer <i>et al.</i>, 2001 Hasnain <i>et al.</i>, 2001</p>	<p>Lee <i>et al.</i>, 2001 Pauly & Harris, 1998 Perera & Hooper, 2001 Cereghetti <i>et al.</i>, 2001</p>
Efectores en mecanismos de transducción de señales	<p>Herms <i>et al.</i>, 2000 Chiarini <i>et al.</i>, 2002 Zanata <i>et al.</i>, 2002 Colling <i>et al.</i>, 1996</p>	<p>Mouillet-Richard <i>et al.</i>, 2000 Spielhaupter & Schatzl, 2001</p>
Regulador de transmisión sináptica	<p>Colling <i>et al.</i>, 1996 Tobler <i>et al.</i>, 1996 Mallucci <i>et al.</i>, 2002 Nishida <i>et al.</i>, 1997</p>	<p>Fournier <i>et al.</i>, 1995 Collinge <i>et al.</i>, 1994 Askanas <i>et al.</i>, 1993 Whittington <i>et al.</i>, 1995</p>
Regulador de apoptosis	<p>Chiarini <i>et al.</i>, 2002 Zanata <i>et al.</i>, 2002 Bounhar <i>et al.</i>, 2001</p>	
Factor de transcripción	<p>Pfeifer <i>et al.</i>, 1993 Nandi & Leclerc, 1999 Oesch <i>et al.</i>, 1994</p>	<p>Gabus <i>et al.</i>, 2001a Rybner <i>et al.</i>, 2002 Gabus <i>et al.</i>, 2001b</p>

Tabla 3. Funciones propuestas para la forma celular de PrP y lista de referencias que las apoyan.

(Hornemann *et al.*, 2004).

Considerando lo anterior se planteó lo siguiente:

HIPÓTESIS 1

"Los residuos involucrados en la función de la PrP son residuos conservados en homólogos lejanos de la familia priónica, y que no están necesariamente involucrados en mantener la estructura de la proteína."

Para abordar esta hipótesis se plantea:

OBJETIVO 1.

"Resolver la estructura en solución de la proteína priónica de *Xenopus laevis*."

Gracias a su bajo grado de identidad respecto a las proteínas de mamíferos, una vez que se cuente con la estructura, se realizarán búsquedas basadas en la comparación de estructuras tridimensionales, de todos aquellos residuos que mantienen el plegamiento de la proteína, y más importante aún, se identificarán aquellos residuos conservados sin un aparente papel en la mantención de la estructura y que por lo tanto podrían tener participación en la función fisiológica aún desconocida de PrP^C.

2.5. Barrera interespecies

Las conformaciones de PrP^{SC} provenientes de distintas especies son diferentes y se denominan 'cepas'. En un estudio realizado *in vitro* con el fragmento 145stop de PrP (ausencia del extremo C-terminal comenzando en el residuo 145) se demostró que para que una cepa A (PrP^{SC} de especie A) sea capaz de gatillar la transformación de PrP^C a PrP^{SC} de una especie B, el homólogo PrP de la especie B debe poder agregarse no sólo como conformación PrP^{SC}-tipo B, sino que además debe ser capaz de agregarse en una forma similar, cercana o compatible en estructura con PrP^{SC}-tipo A (Vanik *et al.*, 2004). Esto es, B debe agregarse como cepa B y como cepa A indistintamente. Sólo en el caso de que PrP-B sea capaz de agregarse como cepa A, la cepa A podrá gatillar la agregación de B.

Si A gatilla la agregación de B, no significa necesariamente que B pueda gatillar la agregación de A. Eso dependerá de qué especies se trate.

Las relaciones de compatibilidad fueron estudiadas en ensayos *in vitro*, y simulan bastante bien la dinámica observada cuando se intenta infectar una especie con muestras de cerebros infectados de otra especie. La transferencia sólo es posible entre ciertos pares de especies. En otros casos se encuentra una barrera y la infección no es posible. Es el caso de la transferencia entre ratones y hámster (Scott *et al.*, 1989). Ratones inoculados con muestras de PrP^{SC} de hámster no desarrollan la enfermedad, pero ratones transgénicos que expresan una proteína PrP quimérica, donde se sustituye la parte central de la secuencia correspondiente a ratón (residuos 96–167) por la secuencia correspondiente a hámster, una vez que son inoculados con PrP^{SC} de hámster, sí

desarrollan la enfermedad. El experimento concluye que la parte central del PrP es esencial para la unión de PrP^{SC} a PrP^C y la transformación de este último a la forma patogénica.

Estudios posteriores demuestran que para que se produzca la infección es necesaria la participación de un tercer factor codificado por el huésped. Como hasta ahora no ha podido ser identificado se le denomina factor X (Telling *et al.*, 1995). Ratones inoculados con PrP^{SC} humano muestran una baja tasa de infección (menor al 10%). Basados en los resultados previos de transferencia entre ratón y hámster, es esperable que ratones transformados para producir PrP humano sean susceptibles a infección con inóculos humanos, pero ese no es el caso. La transferencia sólo es posible cuando se inoculan ratones que expresan el PrP humano y que además tienen el gen de PrP de ratón anulado. Por otro lado, al estudiar ratones transgénicos con PrP quimérica en que se sustituye la región central del gen de PrP de ratón (96–167) por la secuencia correspondiente a PrP humano, una vez que son inoculados con PrP^{SC} humano, estos animales desarrollan la enfermedad. En este caso el resultado de la transferencia es positivo independientemente de si los ratones transgénicos expresan o no el gen PrP endógeno. La explicación más razonable para estos resultados es la existencia de un factor codificado en el huésped que interactúa con PrP^C para mediar su conversión a PrP^{SC}. En el primer caso, de ratones que expresan PrP humano y de ratón, el PrP de ratón posee mayor afinidad y por tanto secuestra todo el factor X. Luego el PrP^C humano no es susceptible de ser transformado por no poder unirse a dicho factor. En el segundo caso, al usar ratones que expresan PrP quimérico, los especímenes son susceptibles debido a

que la región C-terminal del PrP quimérico que codifica la secuencia de ratón sí puede unir el factor X. Este complejo luego se une a PrP^{SC} humano a través de la región central que codifica la secuencia de PrP humano y luego es transformado en PrP^{SC}. De esta forma, este factor actuaría como chaperona sobre PrP^C induciendo la formación de una especie reactiva denominada PrP* que es capaz de interactuar con PrP^{SC} y luego convertirse en la forma patogénica. Una vez transformado en PrP^{SC}, el factor desconocido perdería afinidad quedando libre para realizar un nuevo ciclo y propagar la transformación.

El trabajo con ratones transgénicos que expresan variantes del prión quimérico (extremos N- y C-terminal con secuencia de ratón y segmento 96–167 con secuencia humana), en que se reemplazan uno a uno los residuos del C-terminal por los correspondientes a la secuencia del prión humano, muestran que el sitio de unión del factor X en la proteína priónica constituye un epítipo discontinuo formado por los residuos 168 y 172 en el *loop* β 2- α 2, y los residuos 215 y 219 en la hélice α 3 (Kaneko *et al.*, 1997).

2.6. Estructura, función, y conversión de PrP^C a PrP^{SC}

De la evidencia acumulada hasta ahora se concluye que el segmento 96–167 participa en el reconocimiento de PrP^{SC} por PrP^C, que la interacción entre la región C-terminal y el factor X del huésped es necesaria para la conversión de PrP^C y que una vez producida la conversión, la región entre los residuos 90 a 120 queda oculta a la interacción con anticuerpos (Peretz *et al.*, 1997). En la búsqueda de regiones de la

proteína que puedan ser relevantes para el mecanismo de conversión se han realizado estudios de dinámica por NMR de PrP de hámster, midiendo los tiempos de relajación mediante la utilización del método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (Luz & Meiboom, 1963). Estos estudios muestran movimiento en la escala de milisegundos para las hélices 2 y 3 de PrP^C (Kuwata *et al.*, 2004.), compatibles con la mayor inestabilidad para esa misma región determinada por NMR de alta presión (Kuwata *et al.*, 2002). Movimientos en la escala de milisegundos y fluctuaciones conformacionales lentas también se pueden observar en la región de la hoja β en PrP^C (Liu *et al.*, 1999; Viles *et al.*, 2001).

La participación de la región C-terminal en la conversión de PrP ha quedado establecida, sin embargo, el campo de estudio de priones requiere estudios estructurales comparativos entre especies, que describan diferencias estructurales y que puedan dar cuenta del mecanismo de la barrera interespecies. En ese contexto el grupo del Dr. Wüthrich se embarcó en el proyecto de resolver estructuras de priones en solución acuosa. De los estudios comparativos con priones de mamíferos se concluye que la única región con diferencias estructurales significativas es la región del *loop* β 2- α 2 (**figura 4**)

Para abordar este problema, se planteó lo siguiente:

HIPÓTESIS 2.

"La barrera interespecie en la propagación de la infectividad priónica está relacionada con diferencias estructurales observables en la región del *loop* β 2- α 2 entre proteínas priónicas provenientes de distintas especies animales"

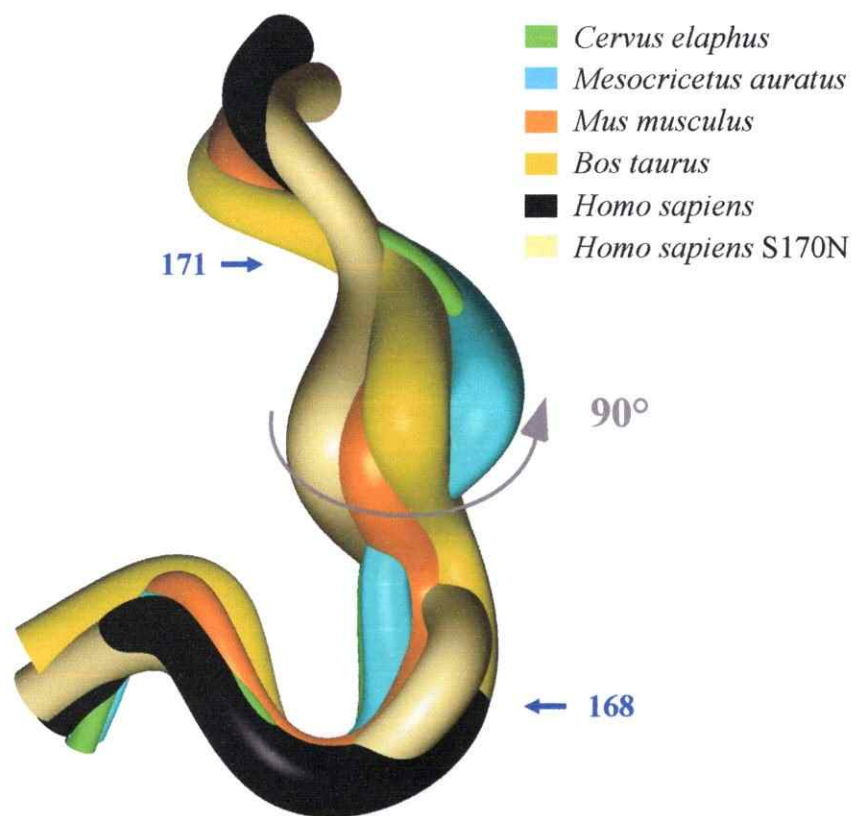


Figura 4. Comparación de las regiones de *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ de priones de distintas especies. Se alinean segmentos de proteínas priónicas provenientes de las especies: *Cervus elaphus* (verde), *Mesocricetus auratus* (celeste), *Mus musculus* (anaranjado), *Bos taurus* (amarillo), *Homo sapiens* (negro) y la variante S170N de *Homo sapiens* (kaki). Para cada especie, se aisló el segmento comprendido entre las posiciones 165 a 173 en los 20 estados conformacionales, y se alineó para el mejor ajuste de r.m.s.d., obteniendo de esta forma una estructura media. Las estructuras medias de cada especie fueron alineadas entre sí resultando el valor mínimo de r.m.s.d. 0,71. Los segmentos son representados por una función *spleen*, donde el grosor del tubo es proporcional a la desviación promedio de los 20 estados conformacionales respecto a la estructura media.

Para trabajar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO 2.

Resolver la estructura del prión de caballo (ecPrP), y comparar la estructura del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ con aquella obtenida en PrP de otras especies de mamíferos.

OBJETIVO 3.

Generar variantes de la proteína priónica de ratón (mmPrP) que produzcan un *loop* $\beta 2-\alpha 2$ de características estructurales y dinámicas similares a las encontradas en ecPrP

ecPrP posee sustituciones únicas en la región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Luego, de esta parte del trabajo, se esperaba primero describir las características únicas de esta región de la proteína, y luego, por medio de las variantes en mmPrP, postular un mecanismo que explicara estas características, y adquirir conocimiento acerca de las propiedades de una región de la proteína priónica que se planteó como relevante en la generación de la barrera interespecies.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Clonamiento de *Equus caballus* PrP

El DNA genómico de caballo fue purificado de sangre de caballo de carrera de la cepa "Pura Sangre", utilizando una matriz de gel de sílica (QIAamp DNA Blood Maxi Kit10, QIAGEN). Se procesaron 5 ml de sangre ($3,5 \cdot 10^7$ leucocitos), obteniendo 108 μ g DNA. El gen ecPrnp se amplificó usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando Taq DNA polimerasa y los partidores descritos abajo. El PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l que contenía: 1x amortiguador PCR; 200 μ M de cada dNTP; 7 mM MgSO₄; 0.1 U/ μ l Taq DNA pool; 200 μ M de cada partidor; y ~70 ng DNA. El ciclo de PCR que se utilizó fue: 95 °C, 45 s; 60 °C, 2 min; 72 °C, 2 min por 25 ciclos.

El DNA genómico se calentó a 95 °C durante 2 min previo a la adición de la mezcla PRC. Los partidores se diseñaron para amplificar: la secuencia de la proteína madura (ecPrP 23–230), el fragmento resistente a tratamiento con proteasas (ecPrP 90–230) y el fragmento del dominio globular (ecPrP 121–230). Las secuencias de los partidores, su largo (L) y su temperatura de fusión (T_m) fueron:

23sentido 5' C GGA TCC AAG AAG CGA CCG AAG CCT GGA GG 3'
L:30 Tm:72.7 °C
90sentido 5' C GGA TCC GGT CAA GGT GGC TCC CAT GGT C 3'
L:29 Tm:71.4 °C
121sentido 5' C GGA TCC GTG GTT GGG GGC CTC GGC 3'
L:25 Tm:72.9 °C
230antisentido 5' G GAA TTC TTA GCT CGC CCC TCT TTG TTG AAA AGC C 3'
L:35 Tm:71.6 °C

Todos los partidores fueron obtenidos en MICROSYNTH, Suiza. El producto de amplificación fue aislado por electroforesis en gel de agarosa y purificado por filtración en gel de sílica (QIAquick Gel Extraction Kit, QUIAGEN).

Análisis de secuencia de DNA de ecPrP: El producto de PCR purificado desde gel de agarosa se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* en un volumen total de 40 µl. La digestión se detuvo por inactivación enzimática a 85 °C durante 20 min. El producto se aisló por electroforesis, se purificó desde Agarosa por filtración en gel de sílica (QIAquick Gel Extraction Kit, QUIAGEN) y se ligó mediante T4 ligasa (QUIAGEN) con el vector pRSET (INVITROGEN), previamente digerido con *EcoRI* y *BamHI*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α para amplificar el plasmidio y posteriormente secuenciarlo. Se realizó el análisis de secuencia de DNA en las dos hebras del plasmidio utilizando el método de la sonda terminadora deoxi, en un equipo secuenciador automático (310 Genetic Analyzer, ABI PRISM).

3.2. Clonamiento del prión de *Xenopus laevis* (xlPrP)

El gen xlPrnp fue aislado de una librería de cDNA de cabeza de *Xenopus laevis*. La librería fue donada por el Dr. John Gurdon del Instituto "The Wellcome Trust of Cancer Research, UK". 20 µg de cDNA fueron suspendidos en agua a una concentración de 0,5 µg/µl. La mezcla de PCR que se utilizó contenía: 1x amortiguador PCR, 200 µM de cada dNTP, 4 mM MgSO₄, 2,5 U Taq DNA pol, 200 µM de cada partidor, y ~100 ng cDNA. El ciclo utilizado en el termociclador fue: 95 °C, 45 s; 60 °C, 1.5 min; 72 °C, 1 min / 32 ciclos.

Se amplificó la secuencia correspondiente a la proteína madura (PrP 23–230), el fragmento resistente a proteasa (PrP 90–230), y dominio globular (PrP 121–230). La secuencia de los partidores utilizados, sus largos (L) y sus temperaturas de fusión (T_m) fueron:

23sentido 5' C GGA TCC AAG AAG AGC GGT GGT GGG AAA AGT AAA AC 3'

L36 T_m71 °C

90sentido 5' C GGA TCC GGT TAT AAC AAG CAA TGG AAA CCT CCC AAG TC3'

L39 T_m71.4 °C

121sentido 5' G GGA TCC GCT GCT GGT GCT ATT GGA GGC TAC ATG 3'

L34 T_m73 °C

230antisentido 5' C GAA TTC TTA CGA TCC TCT CCT GTA CTC GGT GAT GC 3'

L36 T_m71.9 °C

3.3. Mutagénesis sitio-dirigida a mmPrP

Se generaron dos variantes de mmPrP en las que se sustituyeron uno o los dos residuos del *loop* β2-α2 por los correspondientes a la secuencia de ecPrP. La primera variante es la mutante simple D167S, y la segunda la doble mutante D167S-N173K. Las

mutaciones se realizaron utilizando los reactivos de mutagénesis Stratagene (QuikChange® kit). Los partidores utilizados fueron:

D167S 5'-GTGTACTACAGGCCAGTGAGCCAGTACAGCAACCAGAAC-3' 78.6 °C

Antisentido 5'-GTTCTGGTTGCTGTACTGGCTCACTGGCCTGTAGTACAC-3'

La segunda variante contenía dos sustituciones D167S y N173K

N174K 5'-TACAGCAACCAGAACAAAGTTCGTGCACGACTGC-3' 79.1 °C

Antisentido 5'-GCAGTCGTGCACGAACTTGTCTGGTTGCTGTA-3'

El codón destacado en la secuencia corresponde a la modificación introducida.

3.4. Expresión y purificación de PrP recombinante

En líneas generales se siguió el procedimiento descrito por Zahn *et al.*, 1997, con modificaciones. Células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) recién transformadas se utilizaron como inóculos para cultivos en medio Luria Broth (LB) que contenían 100 µg/ml de ampicilina. A una densidad óptica de 0,7 los cultivos fueron inducidos con isopropil β-D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Para la marcación isotópica se utilizó medio mínimo (MM) que contenía 1 g/L [¹⁵N]cloruro de amonio, 2 g/L [¹³C] glucosa, y un cóctel de vitaminas (5 mg/L tiamina, 1 mg/L D-biotina, 1 mg/L cloruro de colina, 1 mg/L ácido fólico, 1 mg/L niacinamida, 1 mg/L ácido D-pantoténico, 1 mg/L clorhidrato de piridoxal, y 0,1 mg/l riboflavina).

La expresión en medio mínimo se indujo a D.O. 1. Las células fueron cosechadas luego de 8 h de inducción, centrifugadas, suspendidas en 150 ml de amortiguador G (6M GdmCl, 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂PO₄, 10 mM glutatión reducido, pH 8) y luego procesadas para la purificación de PrP de la siguiente forma: primero se sonicaron las

células (30 min en hielo con pulsos de 100 ms/seg, poder 100%), y luego se centrifugaron (10 min, 7500 rpm, y rotor GS3 en centrifuga Sorvall RC-5B), la fracción de proteína soluble se mezcló con 25 ml de resina de níquel-ácido nitrilotriacético agarosa (NTA-QIAGEN) y se agitó durante 10 min en hielo. La resina fue colocada en una columna y lavada con 120 ml de amortiguador G. Se aplicó una gradiente de 200 ml de amortiguador G a B (10 mM Tris-HCl, 100 mM Na₂PO₄, pH 8) a la proteína inmovilizada en la columna. La proteína se liberó con amortiguador A (10 mM Tris, 100 mM Na₂PO₄, 500 mM imidazol, pH 5.8).

Después de lavar la resina con 30 ml de amortiguador G, se repitió el replegamiento oxidativo y la elución con imidazol para obtener una segunda alícuota de proteína priónica soluble. El PrP fusionado con el tallo de histidina se dializó contra amortiguador D (10 mM Na₂PO₄, pH 5,8) y después contra agua. El tallo de histidinas fue removido de la proteína utilizando trombina (Sigma) (4 U/μmol para ecPrP, y 100 U/μmol para xlPrP). La reacción de corte se efectuó incubando 16 h a 20 °C en amortiguador E (10 mM Tris-HCl pH 8,5) a una concentración de 1 mg/ml en el caso de ecPrP, y 16 h a 20 °C en amortiguador F (Tris-HCl 10 mM pH 7,2, urea 2 M), a una concentración de 100 μg/ml en el caso de xlPrP. Después de la incubación, la proteasa se inactivó y removió con benzamidina-celita (1 mg celita/500 U Trombina). La benzamidina celita se retiró por centrifugación en un paso (25000 x gmin). Una vez digerida, la proteína se dializó contra agua. Luego ecPrP se liofilizó y suspendió en agua para concentrarla hasta 1 mM. En cambio xlPrP se concentró con CENTRIPREP hasta 1

mM. Finalmente, las muestras se dializaron contra amortiguador de medición de NMR (acetato de Na 10 mM, pH 4,5, 10% D₂O).

3.5. Espectroscopia de NMR

3.5.1. Experimentos de triple resonancia: La asignación de señales de resonancia del esqueleto carbonado se llevó a cabo mediante dos estrategias distintas para ecPrP y para xIPrP. De esta forma, el conjunto de experimentos de triple resonancia requeridos fue diferente en ambos casos.

En ecPrP la asignación se basó en el conocimiento de la asignación de corrimientos químicos de espectroscopia NOE (efecto nuclear Overhauser) para el prión de bovino. Por lo tanto, sólo se determinaron los espectros de triple resonancia HNCA (Kay *et al.*, 1990; Grzesiek *et al.*, 1992; Yamazaki *et al.*, 1994), HNCO y HN(CA)CO (Grzesiek *et al.*, 1993): Estos espectros se utilizaron con el único objetivo de confirmar la asignación del esqueleto carbonado basada en espectroscopia NOESY, y para su medición se utilizó la proteína doblemente marcada ¹⁵N, ¹³C-ecPrP.

En cambio, la asignación de resonancias de xIPrP se determinó *de novo*. Para asignar las señales del esqueleto carbonado se registraron los siguientes espectros de triple resonancia: HNCA, HN(CO)CA (Grzesiek *et al.*, 1992), HN(CA)CO, HNCO, HNCACB (Kay *et al.*, 1990; Bax & Ikura, 1991; Grzesiek & Bax, 1992) , y CBCA(CO)NH (Grzesiek & Bax, 1993)

Los detalles teóricos de la evolución del operador de densidad durante la secuencia de pulso se encuentran en el **APÉNDICE I**. Los valores utilizados en la calibración de

parámetros para la adquisición de éste y todos los experimentos de triple resonancia medidos se muestran en el **APÉNDICE II**.

A modo gráfico se muestra el esquema de la secuencia de pulsos para el experimento HNCA:

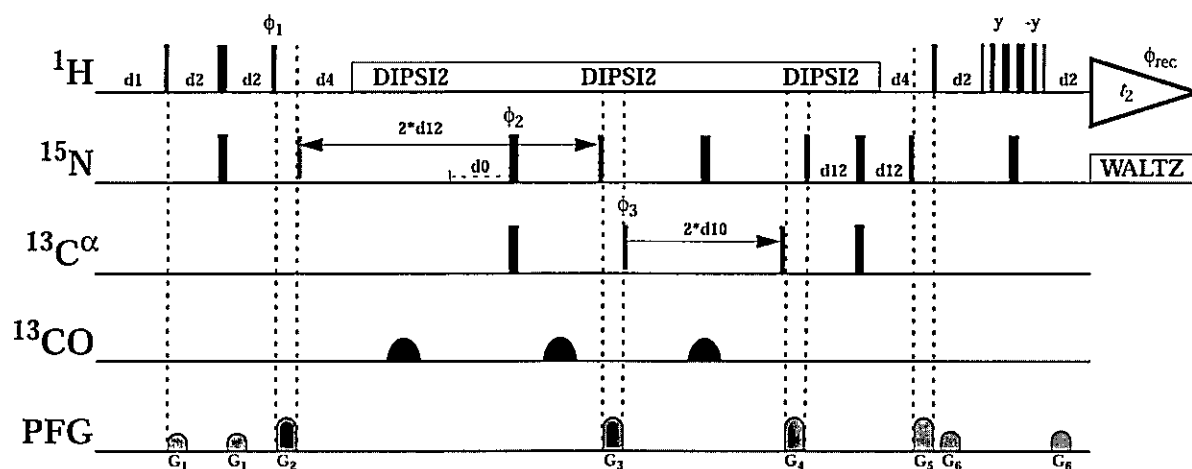


Figura 5. Esquema de secuencia de pulsos de HNCA

El esquema muestra los cuatro canales lógicos de frecuencia utilizados, más el canal de gradientes (última línea). El experimento comienza con un periodo de retardo d_1 para permitir que el sistema alcance el equilibrio luego de la secuencia de pulso anterior. El primer pulso $(\pi/2)_x$ genera la coherencia ^1H en el plano x,y . Luego, el sistema evoluciona sin incrementos bajo el Hamiltoniano de corrimiento químico y de acoplamiento escalar $J_{^1\text{H}^{15}\text{N}}$, el pulso π en ^1H reenfoca la evolución del corrimiento químico, y el pulso π en ^{15}N permite la evolución del acoplamiento escalar. Calibrando d_2 a $1/4 J_{^1\text{H}^{15}\text{N}}$ (2,3ms) la coherencia es transformada a la antifase $^1\text{H}^x^{15}\text{N}^z$. Un pulso $(\pi/2)$ en ^1H y otro en ^{15}N transforma la antifase a $^1\text{H}^z^{15}\text{N}^x$. Esta transferencia de magnetización se denomina INEPT (ver **APÉNDICE I**). La magnetización antifase activa en ^{15}N es transformada en

coherencia en-fase mediante el retardo d4. Esta coherencia en ^{15}N evoluciona bajo tiempo constante $2*d12$ con incremento d0. Durante este período los protones se desacoplan con un tren de pulsos DIPSI2, y un pulso π en ^{13}C permite la evolución de ^{15}N bajo el acoplamiento escalar $J_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}}$. Al final del periodo de evolución en ^{15}N la magnetización se transfiere vía INEPT a ^{13}C con una frecuencia portadora correspondiente a carbono α , donde una segunda evolución con incremento d10 termina con la magnetización marcada en frecuencia ^{15}N y ^{13}C . La magnetización se transfiere de vuelta hasta ^1H para su detección previo tratamiento de la señal de H_2O mediante "water gate 3-9-19". La detección en ^1H se realiza desacoplando ^{15}N mediante el tren de pulsos WALTZ.

3.5.2. Experimentos de correlación:

Se registraron los siguientes espectros de correlación:

i) Experimentos 2D de coherencia cuántica simple heteronuclear [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-COSY (Mori *et al.*, 1995) y [$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$]-COSY (Muhandiram *et al.*, 1993). La descripción detallada de la evolución del operador de densidad bajo esta secuencia de pulsos se encuentra en el

APÉNDICE I.

ii) Experimentos 3D de coherencia cuántica múltiple homonuclear [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-TOCSY editado en ^{15}N y HC(C)H-TOCSY (Bax *et al.*, 1990b).

iii) Experimento 3D de coherencia cuántica simple homonuclear H(C)CH-COSY (Ikura *et al.*, 1991b; Gehring & Ekiel, 1998).

La calibración de los parámetros de medición para todos los experimentos mencionados arriba se muestra en el **APÉNDICE II**.

El tratamiento teórico más detallado de los experimentos de correlación se muestra en el **APÉNDICE I**. A modo ilustrativo, se muestra el esquema de HC(C)H-TOCSY:

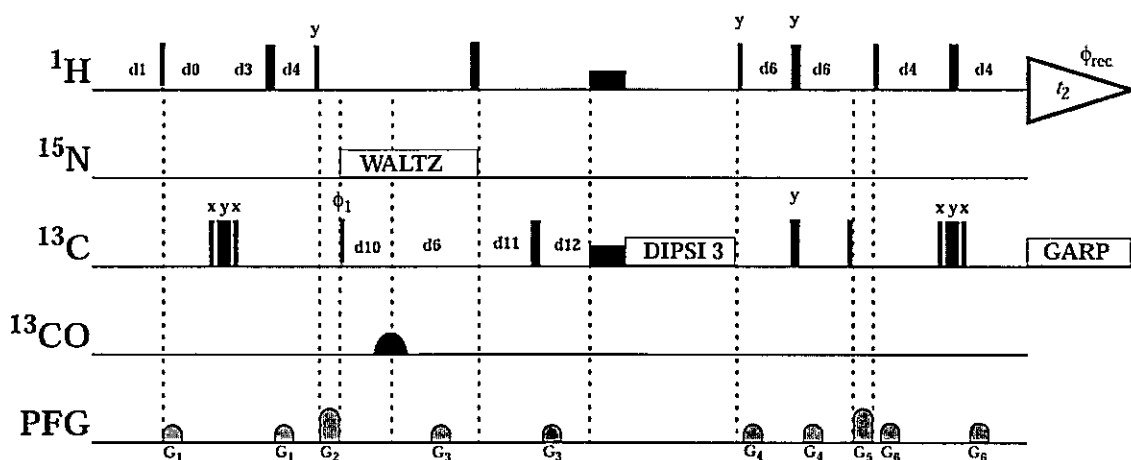


Figura 6. Esquema de secuencia de pulsos de HC(C)H-TOCSY

donde d_1 es el tiempo de retardo para equilibrar el sistema después de una secuencia de pulsos previa. Luego del primer pulso ($\pi/2$) en ^1H , sigue la primera evolución con incremento simultaneo de d_0 y d_3 . El incremento es compensado con el decremento de d_4 , de forma tal de lograr una evolución total igual a $1/4 J_{^1\text{H}^{13}\text{C}}$ (3,2 ms) y preparar la transferencia de magnetización mediante INEPT de ^1H a ^{13}C . Durante esta primera evolución, el pulso π en ^1H anula el efecto del Hamiltoniano de corrimiento químico en ^1H , y el pulso compuesto de inversión ^{13}C permite la evolución del operador transversal de ^1H bajo el Hamiltoniano de acoplamiento escalar entre ambos núcleos. Gracias a su amplio perfil de excitación, el pulso compuesto permite la transferencia de magnetización desde ^1H a ^{13}C en toda la gama de carbonos alifáticos. Una vez

transferida, la magnetización con marca de frecuencia de ^1H , evoluciona en ^{13}C con incremento d10, d11, y decremento de d6 y d12, bajo la interacción del corrimiento químico. La magnetización termina siendo marcada con la frecuencia de ^{13}C en una evolución de tiempo total constante. Durante esta evolución de ^{13}C , la magnetización es desacoplada de los siguientes núcleos: ^{15}N (mediante el uso de WALTZ), protones (mediante un pulso de inversión en ^1H s), y carbonos de carbonilos (mediante un pulso específico de Gauss). Luego de ser marcada con la frecuencia de ^{13}C , sigue la mezcla para correlación total con el uso de la secuencia DIPSI 3 (para una descripción del pulso básico y análisis teórico de TOCSY ver **APÉNDICE I**). Una vez mezclada, la magnetización es transferida de vuelta a ^1H para su detección con desacople de ^{13}C mediante la secuencia de pulsos GARP. Como resultado de este esquema de pulsos, la dimensión directa y de mayor resolución de ^1H corresponde a la salida de la mezcla TOCSY, siendo la dimensión indirecta de ^1H la que da cuenta del corrimiento químico de estos núcleos.

3.5.3. Espectroscopia de NOESY:

Se registraron los siguientes experimentos de espectroscopia de transferencia de magnetización longitudinal (NOESY): Un [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY 3D editado en ^{15}N (Fesik & Zuiderweg, 1988; Marion *et al.*, 1989), y dos [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESYs 3D editados en ^{13}C , el primero con la frecuencia portadora en la región alifática y el segundo en la región aromática (Fesik, *et al.*, 1988; Muhandiram, *et al.*, 1993).

Los valores ajustados para los parámetros de medición de estos experimentos NOESY se muestran en el **APÉNDICE II**.

La descripción teórica de los experimentos NOESY se encuentra en el APÉNDICE I. A modo ilustrativo, a continuación se muestra el esquema de la secuencia de pulsos de $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$ -NOESY 3D editado en ^{15}N .

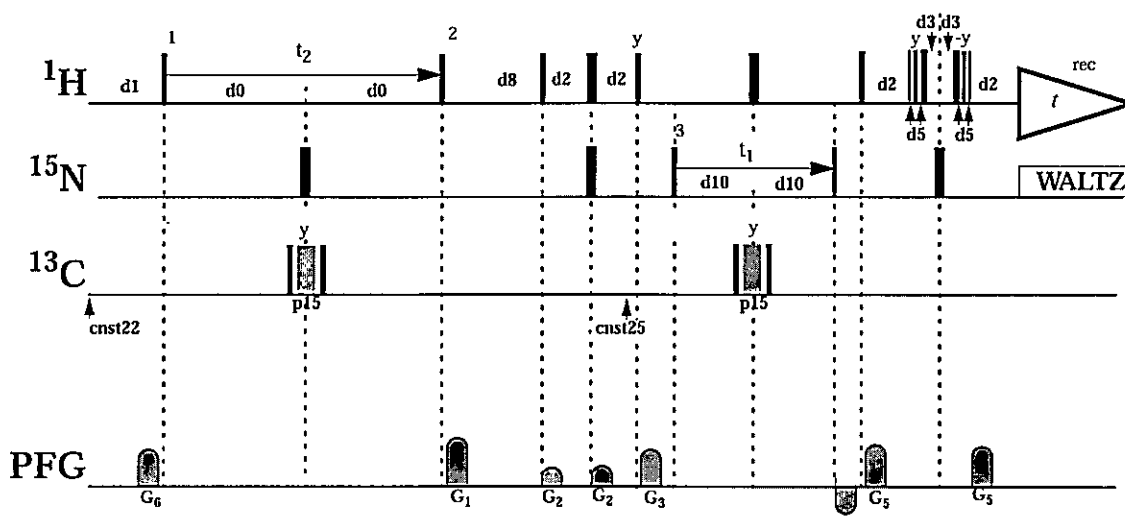


Figura 7. Esquema de secuencia de pulsos de $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$ -NOESY editado en ^{15}N .

La primera parte en el canal de protones corresponde a la secuencia básica de NOESY, donde d_1 es el tiempo de preparación, t_2 el de evolución y d_8 el tiempo de mezcla (para una descripción de la evolución del operador de densidad en estos tres periodos ver APÉNDICE I). El pulso de inversión aplicado sobre ^{15}N durante la evolución de ^{15}N , tiene por objetivo eliminar la contribución de $J_{\text{}^1\text{H}^{15}\text{N}}$ a la evolución de ^1H . Asimismo, el pulso compuesto de inversión en ^{13}C desacopla este núcleo del espín de ^1H , y la frecuencia portadora ($cnst22$) se ajusta para invertir y desacoplar carbonos alifáticos y aromáticos simultáneamente. Una vez terminada la transferencia homonuclear de magnetización vía NOE, una secuencia INEPT transfiere la polarización a ^{15}N donde evoluciona con un incremento d_{10} para ser marcada con la frecuencia de

^{15}N . Durante la evolución en ^{15}N , se aplica un pulso de inversión en ^{13}C , con frecuencia portadora ajustada para desacoplar los carbonos α unidos al grupo amida del esqueleto carbonado (cnst25). La magnetización es finalmente trasferida de vuelta a los protones para su detección, previo tratamiento de la señal de H_2O para su atenuación. Los gradientes de campo estático en el eje Z, aplicadas en el canal PFG, tienen por objetivo evitar la detección de magnetizaciones generadas en forma espuria en el plano x,y durante el tren de pulsos.

3.6. Asignación de resonancias de ecPrP

La asignación de resonancias del prión de caballo así como de la mayor parte de los priones de mamíferos se lleva a cabo haciendo uso de las resonancias previamente asignadas de PrPs de otras especies. Con ello se logra disminuir considerablemente el tiempo requerido para el proceso de asignación. El esquema del procedimiento se muestra en la **figura 8**.

2D [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-COSY: La lista de posiciones de picos de 3D [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY editado en ^{15}N (Fesik & Zuiderweg, 1988; Marion *et al.*, 1989) proveniente del prión de *Bos taurus* (btPrP) (López-García *et al.*, 2000) se lee en 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-COSY de ecPrP. Los corrimientos químicos de los picos son asignados en forma tentativa a las resonancias de las amidas del espectro, esto se realiza mediante ajuste visual de los picos a las resonancias más cercanas encontradas en el espectro. Luego, la lista de posiciones de picos que contienen los corrimientos químicos ajustados, se convierte nuevamente a una lista de 3D [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY editado en ^{15}N mediante la adición de la coordenada adicional de la dimensión indirecta de ^1H .

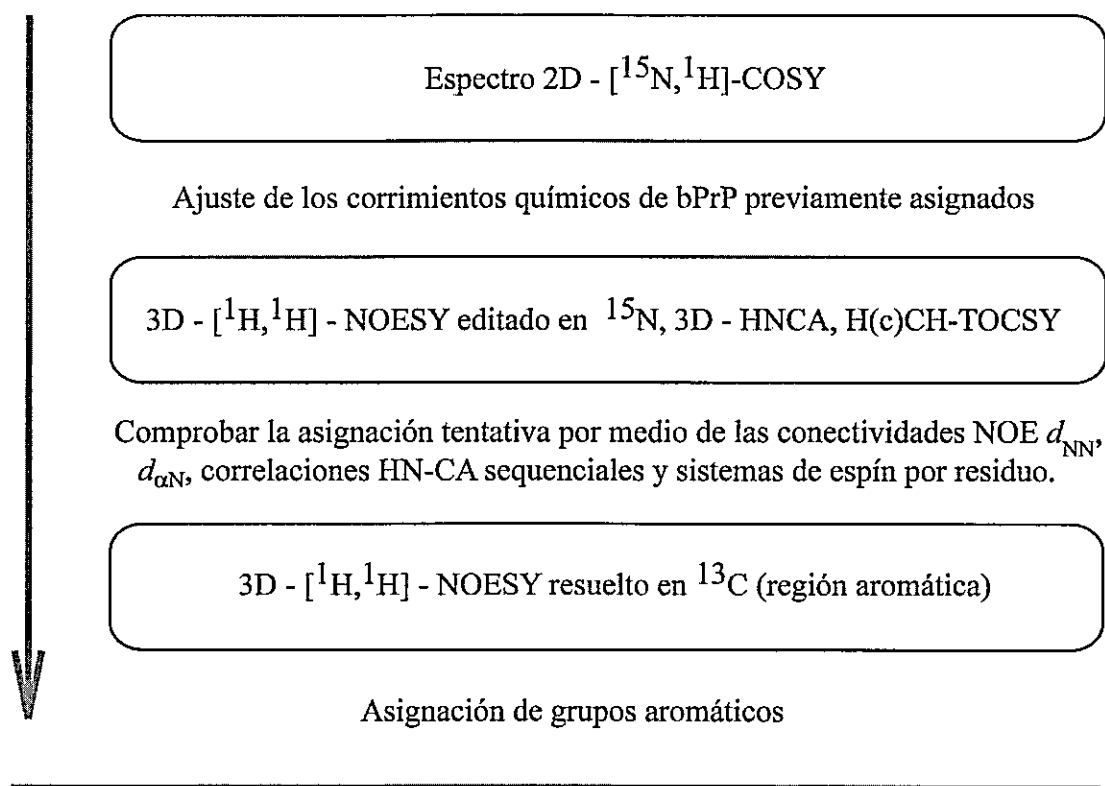


Figura 8. Estrategia de asignación para las resonancias de *Equus caballus* PrP (ecPrP). La asignación se basó en los corrimientos químicos previamente asignados de PrP de *Bos taurus*, proteína homóloga con alto grado de identidad de secuencia respecto a ecPrP. Los espectros usados se muestran enmarcados, y entre ellos se señalan las etapas de asignación interactiva utilizadas.

3D [¹H,¹H] NOESY editado en ¹⁵N: La lista de posiciones de los picos se lee en el espectro 3D [¹H,¹H] NOESY editado en ¹⁵N y las asignaciones son revisadas mediante la búsqueda de señales NOE H_N-H_N y H_N-H_α secuenciales (Wüthrich, 1986) y los patrones de picos cruzados NOEs con resonancias alifáticas y aromáticas. Las resonancias que son asignadas erróneamente en la primera etapa tentativa, ahora son corregidas. Al final de esta etapa se obtiene una asignación correcta en un 75%.

HNCA: Se utiliza la muestra marcada con ¹⁵N y ¹³C para medir HNCA (Kay *et al.*, 1990) y verificar la asignación.

3D [¹³C,¹³C]-TOCSY: El primer paso de la asignación de resonancias alifáticas es similar al utilizado para los grupos amida. Sin embargo, debido al alto grado de superposición de las señales en 2D[¹³C,¹H]-COSY (Bodenhausen *et al.*, 1980), el error es más grande que el observado para las resonancias de los grupos amida. Por tanto se utiliza el experimento 3D [¹³C,¹³C]-TOCSY (Bax *et al.*, 190b) antes que la nueva lista de posiciones de picos sea leída en el espectro [¹H,¹H]-NOESY editado en ¹³C. En 3D [¹³C,¹³C]-TOCSY, los sistemas de espín (Wüthrich, 1986) pueden ser identificados y luego las resonancias que pertenecen a un mismo residuo pueden ser agrupadas sin ambigüedad. Además, los corrimientos químicos de carbonos α se verifican en el espectro HNCA. De esta forma y con excepción de pocas señales, la asignación de las resonancias alifáticas se completa en forma correcta.

3D [¹H,¹H]-NOESY editado en ¹³C: La lista de posiciones de los picos que fue ajustada en 3D [¹³C,¹³C]-TOCSY se lee en 3D [¹H,¹H]-NOESY editado en ¹³C (Fesik *et al.*, 1988; Muhandiram *et al.*, 1993). Los picos son sujetos a un pequeño ajuste debido a

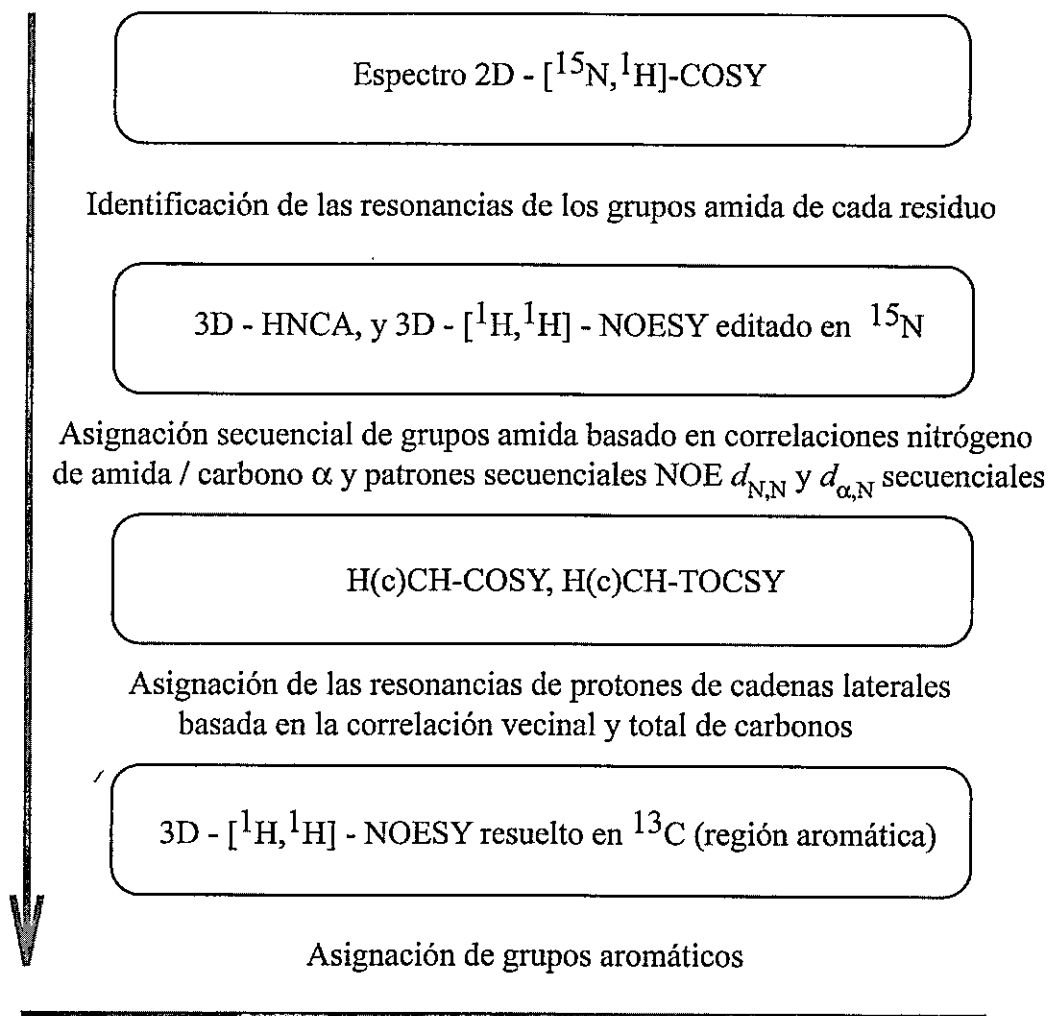
las diferencias en los corrimientos químicos entre los espectros TOCSY (Wider *et al.*, 1984) y NOESY (Kumar *et al.*, 1980; Macura & Ernst, 1980). Las ambigüedades restantes, después de analizar la lista de posiciones de picos con 3D [^{13}C , ^{13}C]-TOCSY, pueden ser resueltas mediante la inspección de los patrones de picos en 3D [^1H , ^1H]-NOESY editado en ^{13}C . Como verificación y corrección finales, las asignaciones de las señales alifáticas en el espectro 3D [^1H - ^1H] NOESY editado en ^{15}N son comparados con las asignaciones en el espectro 3D [^1H , ^1H]-NOESY editado en ^{13}C , corrigiendo la región en el 3D [^1H - ^1H] NOESY editado en ^{15}N que contiene picos cruzados NOE con núcleos alifáticos.

Antes de calcular la estructura, se debe asignar las resonancias de grupos aromáticos. Debido al bajo número de resonancias, la asignación sólo puede ser completada revisando la compatibilidad entre el patrón de resonancias NOE y las posiciones de la lista de picos proveniente del príon de bovino y ajustada como se describe previamente.

3.7. Asignación de resonancias de xIPrP

La asignación de resonancias (figura 9) se realizó aplicando la estrategia de asignación *de novo*.

Las resonancias de ^1H , ^{13}C , y ^{15}N del esqueleto carbonado se asignan utilizando las señales secuenciales encontradas mediante la inspección simultánea de los espectros de triple resonancia HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, y HNCACB (Bax & Grzesiek, 1993) y espectroscopia 3D [^1H , ^1H]-NOE editada en ^{15}N (Marion *et al.*, 1989). La asignación de resonancias para las cadenas laterales se logra mediante la inspección de los espectros 3D [^{13}C , ^{13}C]-TOCSY (Bax *et al.*, 1990) y 3D [^1H , ^1H]-NOESY editado en



Cálculo de Estructura

Figura 9. Estrategia de asignación *de novo* de las resonancias de *Xenopus laevis* PrP (xlPrP). Enmarcados se muestran los espectros usados, y entre ellos se señalan las etapas de asignación interactiva utilizadas, previo al cálculo de la estructura.

^{13}C (Muhandiran *et al.*, 1993). Se utilizó el paquete de programas CARA (*computer-aided resonance assignment*) para desplegar los espectros, buscar las resonancias secuenciales, e identificar los sistemas de espines.

3.8. Cálculo de la estructura

La asignación de los picos cruzados de NOE, la extracción de las restricciones de distancia usadas para el cálculo del modelo estructural (Wüthrich, 1986) derivadas de los espectros 3D [^1H , ^1H]-NOESY, y el cálculo de la estructura, se llevaron a cabo mediante el uso del programa ATNOS-CANDID-DYANA (Herrmann *et al.*, 2002). El procedimiento requiere como datos de entrada la secuencia y la asignación completa de las señales de ^1H de la proteína. En una primera etapa el programa determina las posiciones de los picos en los espectros NOEs en forma automática y genera una asignación preliminar de los picos cruzados basado en los corrimientos químicos de ^1H s, aceptando una o más asignaciones por señal NOE. Con esta primera asignación se calcula un modelo preliminar de estructura y la información proveniente de este modelo se utiliza para mejorar la asignación. Esta operación se repite en siete ciclos iterativos para obtener el modelo final de estructura. En cada ciclo la asignación se revisa evaluando la contribución generalizada al volumen total de la señal (V_k) para cada asignación:

$$V_k = \frac{C_k \min(T_k O_k N_k, S_{\max}) D_k}{\sum_{i=1}^n C_i \min(T_i O_i N_i, S_{\max}) D_i}$$

El parámetro V_k es modificado por varios factores que en su conjunto determinan la calidad de la asignación. Entre estos factores C_k pondera el ajuste del pico al corrimiento químico asignado para protones y queda determinado por

$$C_k = C_{\alpha,\beta}^p = \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^D \left(\frac{\omega_i^p - \Omega_{\alpha_i}^s}{\Gamma \max(\Delta\omega_i^p, \Delta\Omega_{\alpha_i}^s)}\right)^2\right)$$

con ω_i^p ($i = 1, 2, \dots, D$): coordenadas del pico,

$\Omega_{\alpha_i}^s = (\alpha_1=\alpha, \alpha_2=\beta, \alpha_3=h(\alpha), \alpha_4=h(\beta))$: corrimientos químicos de las asignaciones iniciales,

$\max(\Delta\omega_i^p, \Delta\Omega_{\alpha_i}^s)$: rango de tolerancia.

Otro término que contribuye al volumen del pico es T_k que pondera la presencia de picos cruzados relacionados por simetría de la siguiente forma:

Dada la asignación inicial para el pico p ($\alpha, \beta, h(\alpha)$), se define el pico p^* en la posición $(\omega_1^{p^*}, \omega_2^{p^*}, \omega_3^{p^*})$ como la posición transpuesta del pico p si y solo si:

$$|\omega_i^{p^*} - \Omega_{\alpha_i}^s| \leq \max(\Delta\omega_i^{p^*}, \Delta\Omega_{\alpha_i}^s) \quad (i = 1, 2, 3)$$

con $\alpha_1=\beta, \alpha_2=\alpha, \text{ y } \alpha_3=h(\beta)$.

La secuencia primaria de la proteína determina la aparición de señales de NOE entre todos aquellos protones que, debido a su cercanía en la estructura covalente no están a una distancia menor a 5\AA . O_k favorece las asignaciones que dan cuenta de este tipo de NOEs, y su valor será mayor cuanto más se aproxime el pico cruzado a la posición esperada de resonancias NOE determinadas por la estructura covalente.

Otro factor que modifica V_k es la contribución al volumen basado en el modelo de estructura generado en cada ciclo D_k , y queda determinado por:

$$D_k = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M (d_{\alpha_k \beta_k}^{(j)} / \bar{d}^{(j)})^{-\eta}$$

con

$$\bar{d} = \left(\sum_{k=1}^n d_{\alpha_k \beta_k}^{-6} \right)^{-(1/6)}$$

donde $\alpha_k \beta_k$ es la asignación k ésima del pico p , $d(j)$ la distancia en Angstrom (Å) encontrada para la asignación k en la estructura j ésima dentro de los 20 conformeros, y \bar{d} el valor obtenido entre todas las distancias de la asignación múltiple del pico p . Las ecuaciones favorecen aquellas asignaciones que se encuentran más cerca en el modelo de estructura generado en cada ciclo al determinar un mayor valor para D_k .

Finalmente, N_k da cuenta de la convergencia entre la asignación k , y la red auto consistente de señales cruzadas NOE. Esta red se observa cada vez que se tiene un conjunto de señales NOE bien asignadas en el contexto de la estructura proteica. La red se establece porque cada vez que se tenga una señal que dé cuenta de la distancia entre los átomos α y β , existirán otros átomos γ que presentaran señales cruzadas con α y β simultáneamente. Entre más átomos γ se encuentren, mayor será la densidad de la red y mayor la contribución del parámetro N_k al volumen del pico p para la asignación $\alpha\beta$.

Con cada ciclo se refina el conjunto de asignaciones para cada señal NOE, y se calculan las restricciones de distancia en base a la intensidad de las señales. La calibración de la relación intensidad-distancia se realiza para cada espectro utilizado por separado y está basado en el conocimiento previo de las distancias promedio esperadas para ciertos pares de átomos en el polipéptido.

Al final de cada ciclo se calcula el modelo de estructura que mejor satisface las restricciones de distancia obtenidas con el conjunto de asignaciones previas. El cálculo de estructura se realiza mediante el modulo DYANA, que utiliza los ángulos de torsión como modelo proteico para generar las estructura en ciclos sucesivos de hibridación simulada.

Al final de los siete ciclos se cuenta con una asignación inambigua de picos cruzados NOE, y con esta asignación se calcula la estructura final.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE

XENOPUS LAEVIS PrP

4.1.1. Introducción

Una variedad de funciones han sido propuestas para la forma celular de la proteína priónica. Sin embargo, las distintas aproximaciones experimentales usadas no han dado una respuesta definitiva al respecto.

Entre proteínas homólogas distantes en la escala evolutiva, los residuos son conservados cuando mantienen la estructura o cuando participan de la función. Con el objeto de estudiar PrPs distantes en la evolución, se decidió trabajar con la proteína priónica de la rana africana con dedos de garra (*Xenopus laevis*; xIPrP) y resolver su estructura tridimensional. La **figura 10A** muestra un alineamiento esquemático con las posiciones relativas de los segmentos más conservados en la secuencia. Destaca la conservación del péptido-sígnal de destinación al retículo endoplásmico en la región N-

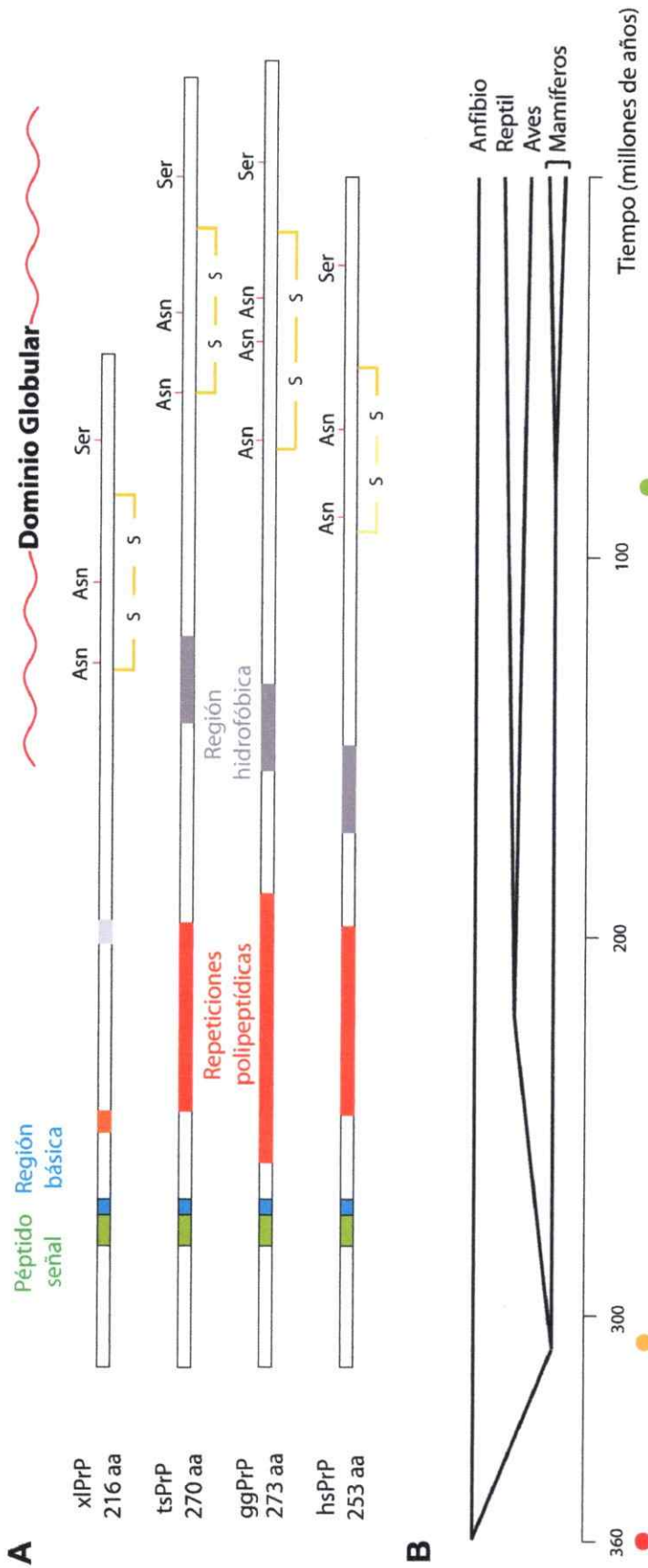


Figura 10. (A) Alineamiento esquemático y distancia evolutiva en proteínas priónicas. Se muestra un alineamiento esquemático de las secuencias de priones humano (*Homo sapiens*; hsPrP), de gallo (*Gallus gallus*; ggPrP), de tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta*; tsPrP), y rana africana de patas con garras (*Xenopus laevis*; xlPrP), donde hsPrP representa la proteína priónica "tipo mamífero". Los dominios polipeptídicos están representados como segmentos enmarcados de distintos colores. Las posiciones de la serina indican sitios de anclaje de GPI, las de asparagina los sitios de glicosilación, y S-S indica puente disulfuro. **(B)** Escala de tiempo evolutiva que muestra el momento en que comenzó la divergencia entre las especies. El punto verde indica el momento en que comenzó la divergencia de los mamíferos, el amarillo el punto de comienzo de la divergencia entre reptiles y aves, y el punto rojo el momento en que comenzó la divergencia de los anfibios.

terminal. Toda esta región, incluyendo el segmento hidrofóbico, corresponde a una zona de estructura desordenada en mamíferos. Otra región plenamente conservada es la que ha sido identificada como señal de internalización. En contraste, el segmento involucrado en la unión a cobre y la región hidrófoba están conservadas en mamíferos reptiles y aves, pero no en este anfibio.

Respecto a la región carboxilo terminal, correspondiente al dominio globular de mamíferos, se observa conservación de las posiciones del puente disulfuro, de la secuencia de unión de GPI, y de las secuencias de glicosilación. En qué medida el plegamiento está o no conservado es materia de estudio de este trabajo.

En la escala evolutiva, la secuencia de xIPrP es la más distante de mamíferos con que se cuenta en la actualidad (**figura 10B**).

La estructura de xIPrP permitirá comparar las secuencias con el objeto de localizar en la estructura aquellas posiciones conservadas en anfibios y mamíferos. Entre los residuos conservados se diferencian aquellos que están directamente involucrados en la conservación del plegamiento de aquellos que no lo están. El bajo nivel de identidad entre anfibios (xIPrP) y mamíferos, convierte al segundo grupo de residuos, aquellos conservados que no participan en la estabilización de la estructura, en buenos candidatos para cumplir un rol funcional.

4.1.2. Objetivos

"Obtención, purificación y caracterización estructural de la proteína priónica de *Xenopus laevis* (xlPrP) expresada en forma heteróloga"

i) Expresión en bacteria y purificación.

- El cDNA del prión de *Xenopus laevis* (xlPrP) se obtiene a partir de una librería de cDNA de cabeza de *Xenopus laevis*.
- Se expresan y purifican los fragmentos xlPrP (99–227) y xlPrP (121–227) de la secuencia priónica utilizando el sistema de expresión heteróloga de *Escherichia coli*.

ii) Registro de los espectros de resonancia:

- Obtención de los espectros de correlación cuántica simple (HSQC), ^1H - ^{15}N -COSY, y ^{13}C HSQC para las regiones alifática y aromática.
- Obtención de los espectros de triple resonancia: HNCQ, HNCACO, HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, y HNCOCA. Para este trabajo se utilizará una muestra de mmPrP doblemente marcada con ^{15}N y ^{13}C .
- Espectroscopia NOESY: Se registran los espectros [^1H , ^1H] NOE editados en: ^{15}N , ^{13}C alifáticos y ^{13}C aromáticos.
- Registro de espectros de correlación cuántica múltiple: HCcH-TOCSY y ^{15}N -TOCSY.

iii) Asignación.

La secuencia de *Xenopus laevis* PrP no posee homólogos con alto grado de identidad que tengan espectros de resonancia previamente asignados. Por lo tanto, se debe proceder con la estrategia de asignación *de novo*. La asignación se lleva a cabo utilizando el programa CARA de asistencia para asignación de resonancias.

iv) Cálculo de estructura tridimensional.

El modelo de estructura tridimensional se genera mediante el paquete de programas ATNOS-CANDID-DYANA para la localización automática de picos cruzados NOE, asignación de los mismos y cálculo de la estructura por medio de las restricciones de distancias determinadas a partir de la intensidad de las señales NOE.

v) Refinamiento de la estructura

vi) Análisis de la estructura

4.1.3. Resultados

4.1.3.1. Bioquímica

4.1.3.1.1. Expresión y purificación

En esta parte del trabajo experimental se aborda el estudio de dos fragmentos: xIPrP (121–227) correspondiente al dominio globular, y xIPrP (99–227), fragmento correspondiente al dominio resistente a proteasas de PrP^{Sc} en mamíferos (PrP 27–30). A continuación se describe el procedimiento para la obtención de xIPrP.

El protocolo de purificación de proteínas priónicas se muestra en el siguiente esquema general de la **figura 11** y se detalla en Materiales y Métodos.

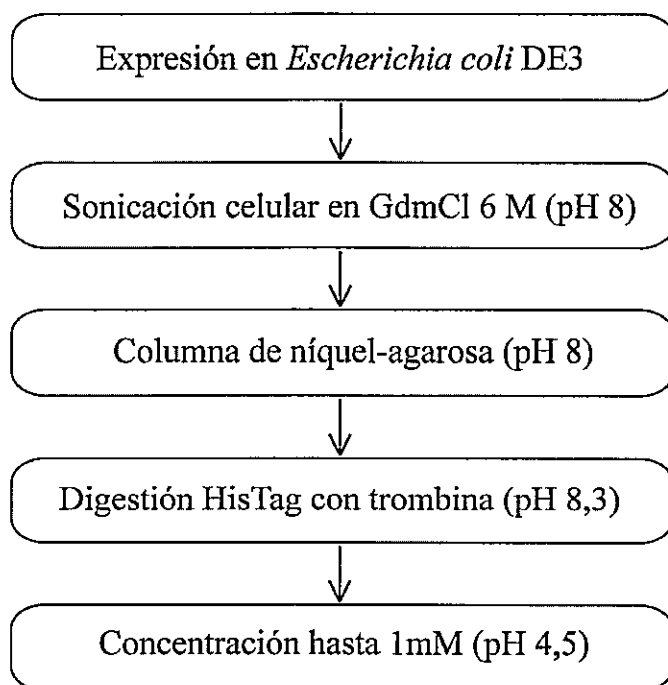


Figura 11. Esquema general de purificación de proteínas priónicas

La pella del cultivo sometido a sobreexpresión de PrP se sonica en GdmCl 6M, y luego se centrifuga. El líquido sobrenadante se carga en una columna de níquel-agarosa para ciclos sucesivos de replegamiento en columna por dilución en gradiente del agente caotrópico (ver Materiales y Métodos).

En esta etapa el comportamiento del prión varía de especie en especie. Después de aplicar la gradiente para retirar el GdmCl se aplicó el amortiguador de elución que contenía imidazol 500 mM. En este punto, el comportamiento esperado de una proteína que contiene un grupo de histidinas, es que se libere replegada y monomérica de la columna junto con el imidazol. En cambio, xIPrP (99–227) quedó retenido en la columna y se liberó al comienzo del siguiente ciclo con la aplicación de GdmCl. Por otra parte, xIPrP (121–227) quedó unida a la columna y sólo fue posible soltarla con urea 8 M en presencia de imidazol. Los dos fragmentos de xIPrP se obtienen con alto grado de pureza pero desplegados.

En la **figura 12A** se muestra el perfil de elución de xIPrP (99–227) seguido por absorbancia a 280 nm en cinco pasos sucesivos de elución de la columna. La variación de la línea basal se debe a la absorbancia a 280 nm de los amortiguadores utilizados. Los picos de elución de proteína se presentan luego de aplicar el amortiguador con imidazol. Las elipses azules destacan los principales picos de elución de la proteína. Estos picos aparecen al comienzo de cada ciclo en amortiguador que contiene GdmCl. Sólo una pequeña fracción de la proteína eluye con imidazol 0,5 M/ Na_3PO_4 . La **figura 12B** muestra la purificación de xIPrP (121–227). Después de aplicar imidazol 0,5 M en Na_3PO_4 20 mM, la columna se equilibró con urea 8 M y la proteína se eluyó con

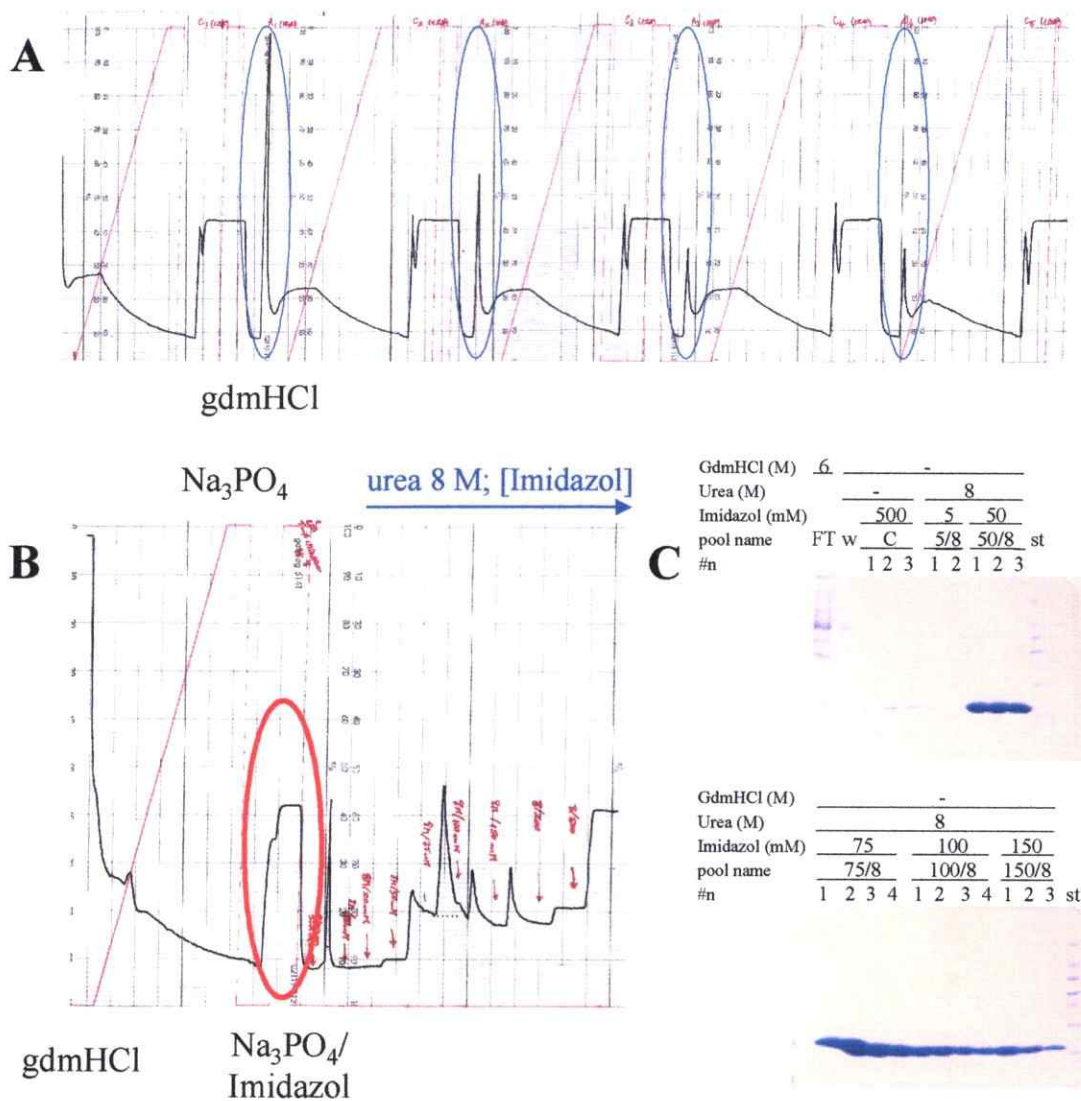


Figura 12. Perfil cromatográfico de xlPrP (99–227) (A), y xlPrP (121–227) (B). Los perfiles de elución desde columna de níquel-agarosa corresponden a la absorbancia a 280 nm vs. tiempo. En **A** se indican los cinco ciclos de replegamiento. Las líneas rojas indican el cambio en la composición de solvente en cada ciclo, primero una gradiente desde gdmCl 6 M a Na₃PO₄ 100 mM, luego el cambio a Na₃PO₄ 100 mM / imidazol 500 mM, y finalmente la vuelta a gdmCl 6 M del ciclo siguiente. Las elipses azules muestran los picos de elución de la proteína. En **B** la elipse roja destaca la ausencia de proteína en las fracciones eluidas con imidazol/Na₃PO₄, y escritas sobre el gráfico se muestran las concentraciones de imidazol utilizadas para liberar la proteína en presencia de urea 8 M. En **C** se muestran dos geles de SDS-PAGE de las fracciones de elución de xlPrP (99–227), (FT) frente de elución, (w) lavado, (C) imidazol 0,5 M en Na₃PO₄, y con urea 8 M a distintas concentraciones de imidazol como se indica en la leyenda sobre la figura.

concentraciones crecientes de imidazol como se indica en la **figura 12**.

4.1.3.1.2. Replegamiento de los fragmentos de xIPrP

Se ensayaron varias condiciones de replegamiento para ambos fragmentos de xIPrP. La **tabla 4** muestra las condiciones utilizadas para replegar xIPrP (99–227). Los resultados son evaluados en forma cualitativa. La presencia de agregados se indica como resultado negativo. El mayor rendimiento se obtuvo acidificando la solución inicial en GdmHCl a pH 3 y por dilución en H₂O. El replegamiento de xIPrP (121–227) se obtiene mediante dilución desde urea 8 M en H₂O.

Condición inicial	Condición final	Rendimiento ^a
urea 8 M	en H ₂ O pH 7	-
urea 8 M	en H ₂ O pH 3	-
gdmHCl 6 M	en H ₂ O pH 7	-
gdmHCl 6 M	en Arg 0,5 M pH 10,5	-
gdmHCl 6 M	en H ₂ O pH 3	+++
gdmHCl 6 M	imidazol 0,5 M/Na ₃ PO ₄	+

Tabla 4. Condiciones de replegamiento de xIPrP (97-227). El replegamiento se lleva a cabo por dilución del agente caotrópico mediante diálisis 1:100 3X de 10ml de solución 20µM de xIPrP (99–227). Con excepción del último experimento de la lista, se utilizó una bolsa de diálisis (MWCO 3,5 KDa). El rendimiento se evaluó por la cantidad de proteína soluble al final del procedimiento y se expresa en forma cualitativa. ^a El signo menos indica la presencia de agregados, y el signo más la proporción de proteína solubilizada.

La necesidad de llevar la solución a pH 3 para mantener la solubilidad hizo necesario determinar hasta qué pH se mantiene la estructura de la proteína priónica. Con este objetivo se determinó el espectro de dicroísmo circular (CD) para una solución 10 μM de xIPrP (90–227) a distintos pHs. En la **figura 13** se observa que el espectro no varía significativamente, y por tanto el contenido de estructura secundaria se mantuvo. A valores más ácidos la proteína se desnaturalizó.

4.1.3.1.3. Remoción del péptido de 6 histidinas

Las condiciones óptimas de corte con trombina varían de caso a caso y dependen principalmente de la tendencia a la agregación que presente la proteína con que se trabaja.

En la **figura 14** se muestra la búsqueda de condiciones óptimas de corte para la proteína xIPrP (121–227) con trombina. Se muestran los geles de acrilamida SDS-PAGE de las electroforesis de los productos de digestión de xIPrP (121-227).

La condición óptima de corte de xIPrP (121–227) 8 μM , fue con 100 U/ μmol de trombina, 16 h a temperatura ambiente, en amortiguador TrisHCl 10 mM pH 7,2. En el caso de xIPrP (99–227) se debió agregar urea 1 M a la mezcla de digestión para mantener la proteína soluble. La digestión se realizó con 5 μM de proteína, durante 16 h a temperatura ambiente, TrisHCl 10 mM pH 7,65, y utilizando 20 U de trombina por μmol de proteína. ecPrP se corta en forma óptima en 16 h a temperatura ambiente, y en TrisHCl pH 8,3.

La trombina se retiró de la solución con celita-benzamidina. La proteína digerida se pasó

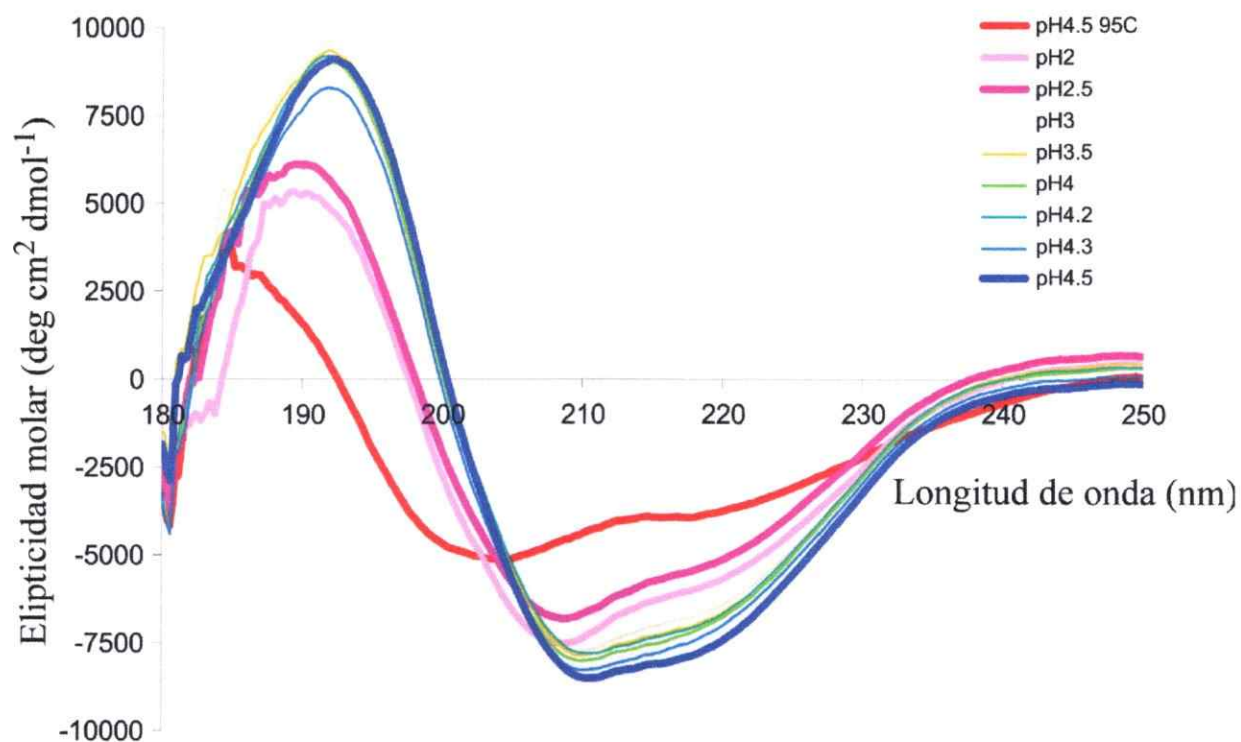


Figura 13. Dicroísmo Circular (CD) de xIPrP (99–227) 10 μM en acetato de Na 10 mM, a distintos pHs. Los ensayos se realizaron a 20 °C a excepción del control de desnaturación (curva roja) que se determinó a 95 °C. Para ello se utilizó una solución de xIPrP (99–227) 20 μM .

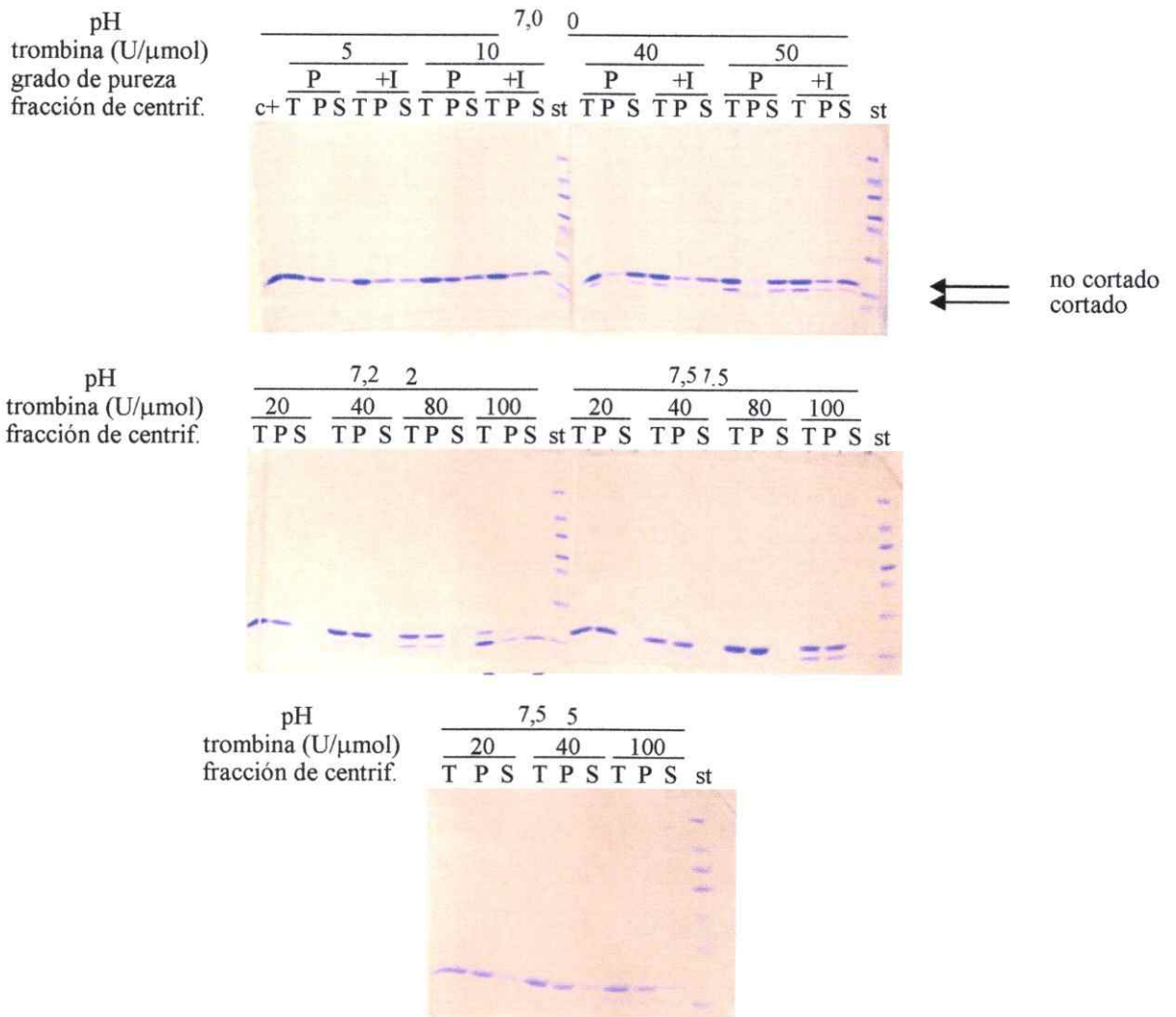


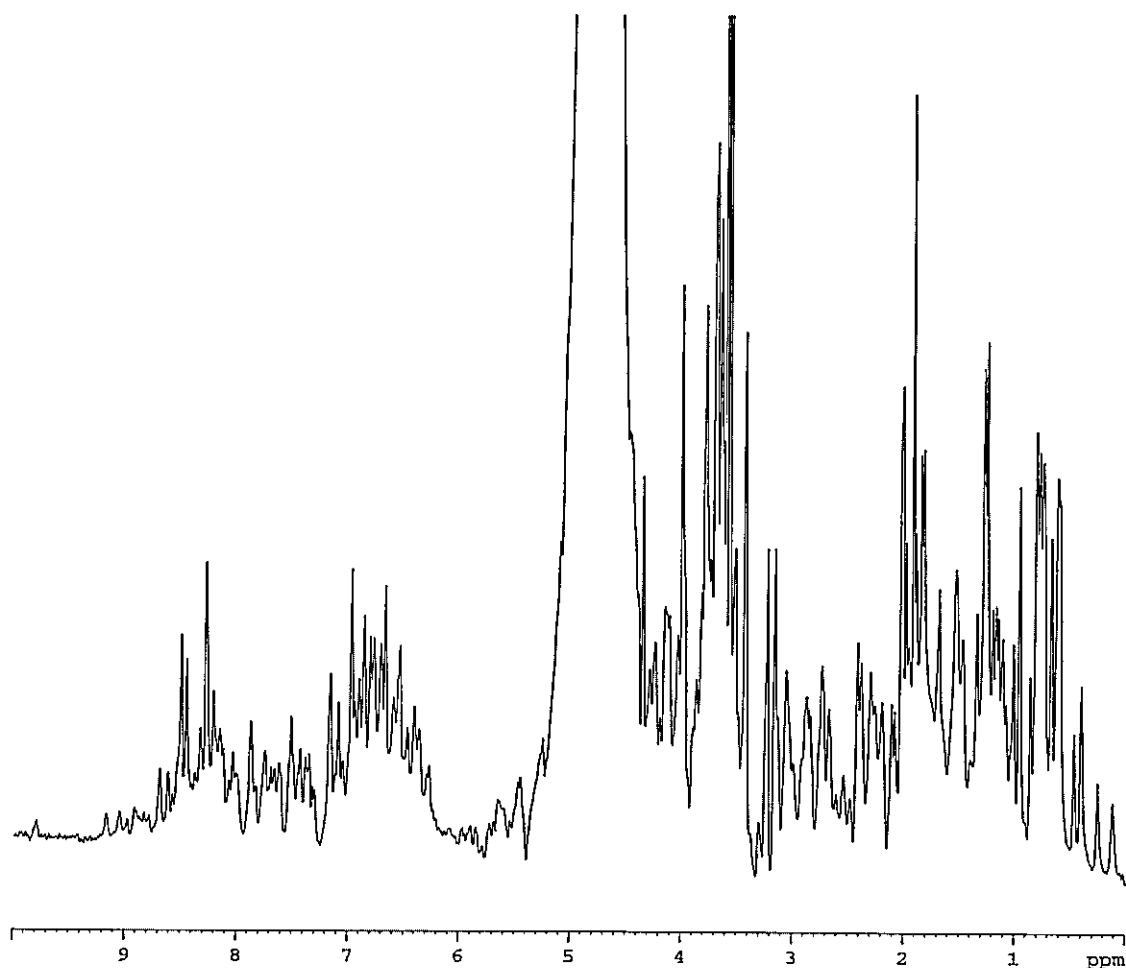
Figura 14. Ensayo de corte de xlPrP (121–227) con trombina. La reacción se llevó a cabo a pH 7,0 7,2 y 7,5 con diferentes concentraciones de trombina y con dos conjuntos de fracciones de proteína, uno de alta pureza (P) y un segundo con impurezas remanentes (I). Después de la incubación se separó una alícuota (T) y el resto de la solución se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min, se cargó la pella (P) y el líquido sobrenadante (S) por separado a un gel de SDS-PAGE. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 16 h, y se utilizó 0,244 mg de xlPrP (121–227) en cada ensayo.

por la columna de níquel-agarosa para retirar la fracción no cortada y se dializó contra acetato de Na 10 mM pH 4, y se concentró por filtración en un CENTRIPREP. Las muestras para NMR se dializaron contra amortiguador acetato de Na 10 mM pH 4.5, y D₂O 10%.

4.1.3.1.4. Solubilidad de las proteínas purificadas

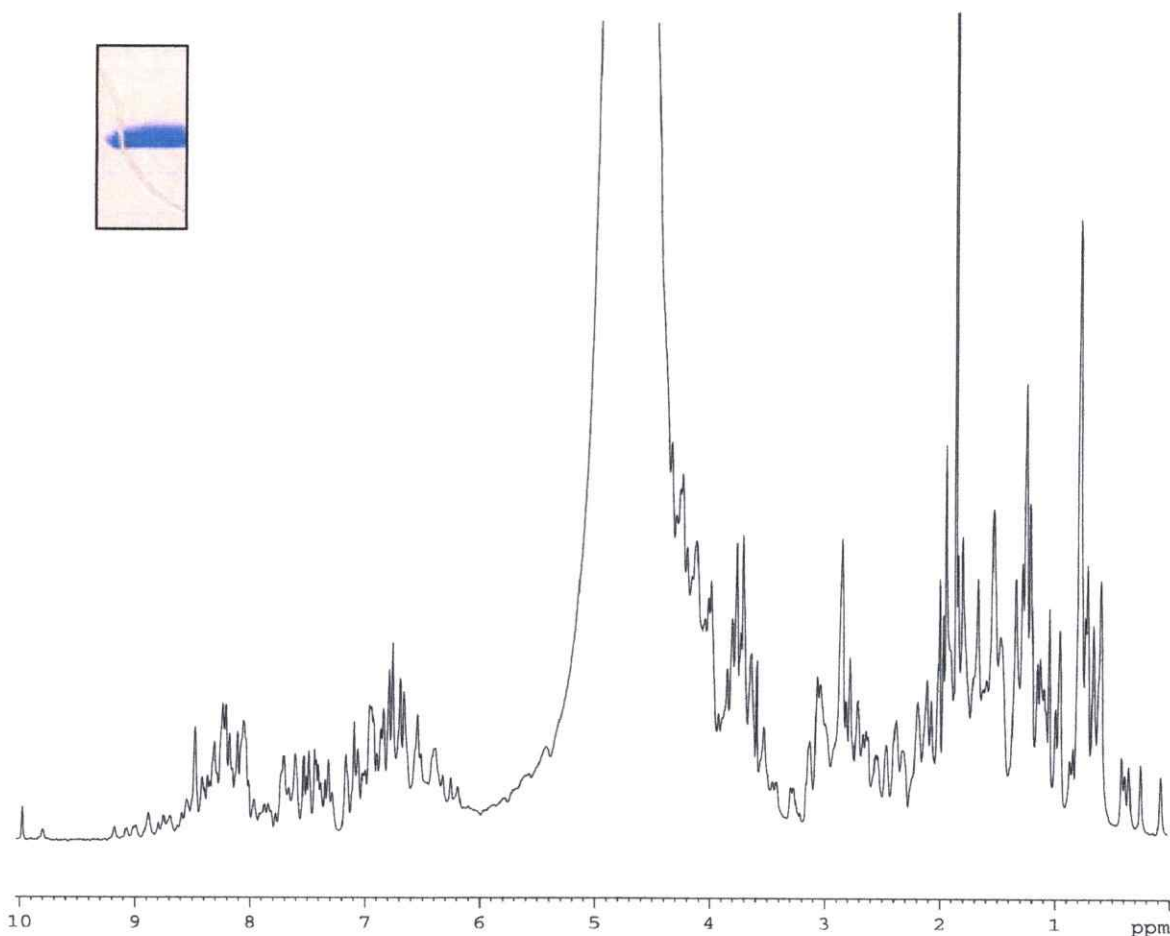
En la **figura 15** se muestra el espectro de resonancia 1D ¹H para xIPrP (121–227), la dispersión de corrimientos químicos de las resonancias de protones muestra que la proteína se obtuvo en forma replegada. Sin embargo presenta baja solubilidad cinética y termodinámica. Es posible concentrar la muestra hasta 200 μM, condición metaestable que se mantiene hasta 10 min a temperatura ambiente. La condición de solubilidad resulta ser dependiente del pH, y la mayor solubilidad termodinámica posible de alcanzar es de 40 μM, considerada insuficiente para realizar estudios de NMR tendientes a resolver la estructura 3D.

La inclusión del segmento 99–120 en la secuencia del dominio globular resultó en un incremento significativo de la solubilidad, ello probablemente debido a la repulsión de carga ejercida entre las cinco lisinas que incluye esta parte de la secuencia. La **figura 16** muestra el espectro de protones de xIPrP (90–227) con la dispersión propia de las de las proteínas plegadas. En esta misma figura se muestra una tabla con los resultados solubilidad para los distintos fragmentos de xIPrP. Como se muestra en la tabla, la mantención del *tag* de histidinas en el extremo amino terminal también se traduce en un aumento notable de la solubilidad, lo que refuerza la hipótesis que es la repulsión de



pH	Tiempo de latencia para 100 μM PrP (h)	Solubilidad Cinética ($\mu\text{M}/\text{tiempo de latencia}$)	Solubilidad Termodinámica (μM)
4,5	3	100/3 h	3
4,0	5	140/30 min	20
3,5	16	200/10 min	40

Figura 15. Espectro 1D- ^1H de NMR de xIPrP (121–227) 140 μM en acetato de Na 10 mM pH 4,0 a 20 °C. La tabla muestra los resultados de ensayos de solubilidad con muestras concentradas mediante filtración por centrifugación. Tiempo de latencia para 100 μM se determinó por incubación a 20° y los pH indicados. Solubilidad cinética, se prepararon soluciones a las concentraciones y los pH indicados, se incubaron a 20 °C. En ambos parámetros se muestran los tiempos en que se comenzó a observar turbidez en la solución. La solubilidad termodinámica se determinó luego de una semana de incubación a 20 °C.



	Rendimiento (mg/6 L)	Solubilidad termodinámica (mM)
xIPrP (121-226)	45	0,003
xIPrP (121-226) + His <i>Tag</i>	70	hasta 1
xIPrP (99-226)	25	hasta 1
xIPrP (90-226) + His <i>Tag</i>	74	hasta 1

Figura 16. Espectro 1D- ^1H NMR de 1 mM xIPrP (99-226) en acetato de Na 10mM pH 4,5. En la esquina izquierda se muestra la banda de proteína obtenida por SDS-PAGE. La tabla contiene los valores de solubilidad al equilibrio con los fragmentos de xIPrP estudiados. Los ensayos se llevaron a cabo en amortiguador acetato de Na 10 mM pH 4,5 a 20 °C.

cargas la responsable del incremento de solubilidad.

4.1.3.2. Estudios estructurales

4.1.3.2.1. Dinámica y predicción de la estructura secundaria

En la **figura 17A** se muestra la relación entre los valores de la razón entre la intensidad de $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear y la de un espectro de referencia para xIPrP (99–227), y la secuencia. Se distinguen dos regiones: La primera en el extremo N-terminal, comprende los residuos 99 a 125, y presenta valores negativos de $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear, lo que indica que esta región es altamente flexible. Este segmento corresponde a los residuos necesarios para mantener la proteína soluble. La segunda región que se distingue en el estudio de dinámica, es la región entre los residuos 125 y 226, con un valor promedio positivo de $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear. El resultado indica que el segmento es de flexibilidad reducida lo que sugiere que se trata del dominio globular. Este dominio globular posee un segmento más flexible en la región correspondiente al *loop* β 2- α 2 en mamíferos. En la **figura 17** en el eje de las abscisas se muestra la secuencia de xIPrP (99–227), bajo ella un esquema con los elementos de estructura secundaria presentes en la proteína de mamíferos, en rojo las hélices α y en celeste las hebras β . El gráfico en la **figura 17B** muestra la diferencia entre el corrimiento químico observado para los $\text{C}\alpha_s$ y sus valores esperados para las conformaciones en ovillo aleatorio. Las desviaciones positivas indicativas de hélices coinciden con la posición de las hélices observadas en mamíferos.

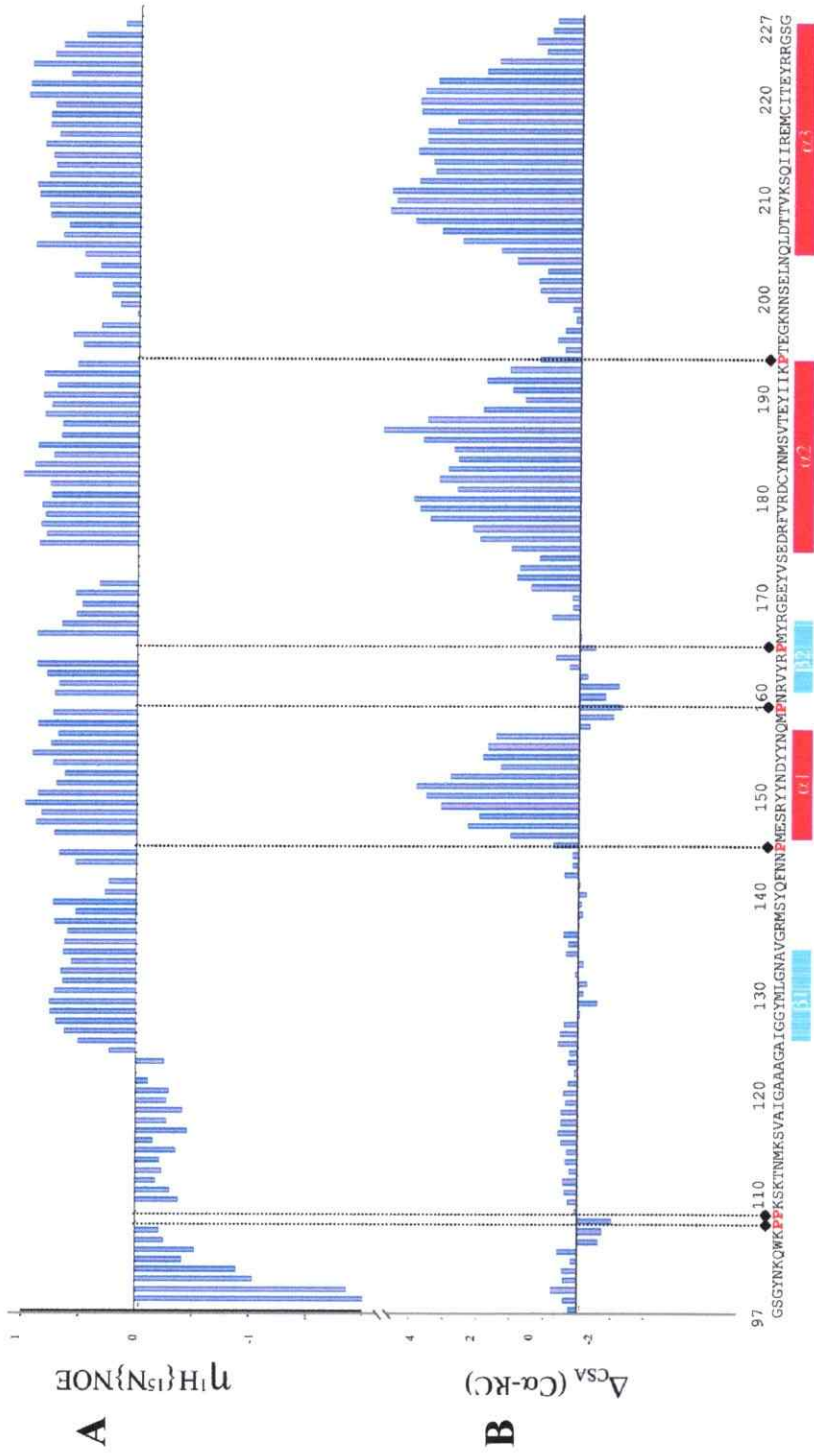


Figura 17. Dinámica y predicción de estructura secundaria para xIPrP. (A) $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear vs. secuencia para xIPrP (99–226). Los espectros se midieron con una muestra de xIPrP 1mM, acetato de Na 10mM pH 4,5, 293,1 K. Los núcleos ^1H fueron saturados durante 3 seg, y el aumento de magnetización de ^{15}N por relajación cruzada fue calculado midiendo $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear y un espectro de referencia en forma intercalada. La secuencia de pulso de referencia consiste en excitación directa del núcleo ^{15}N , con detección en protones. Los resultados se expresan como la razón entre la intensidad observada en $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear y las intensidades de los picos en el espectro de referencia. (B) Diferencia del corrimiento químico para carbonos alfa respecto a los valores esperados para ovillo estadístico. Bajo la secuencia se muestra la localización de los elementos de estructura secundaria regular determinados después del cálculo de la estructura. Las líneas negras indican la posición de los residuos de prolina en la secuencia (hélices- α en rojo y hebras- β en azul).

4.1.3.2.2. Restricciones de distancia y cálculo de estructura

La **figura 18** muestra el conjunto de restricciones de distancia de alcance corto y medio que se obtiene del análisis de los espectros NOESY. No se muestra el extremo N-terminal (residuos 99–124), pues no presenta restricciones de alcance medio. La secuencia aminoacídica muestra las restricciones de corto alcance esperadas cuando la asignación de las resonancias es correcta ($d_{NN}(i,i+1)$; $d_{\alpha N}(i,i+1)$; $d_{\beta N}(i,i+1)$). Además, se observan las restricciones de alcance medio características de hélices α ($d_{NN}(i,i+2)$, $d_{\alpha N}(i,i+2)$, $(i,i+3)$, y $(i,i+4)$, y $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$), estas restricciones se presentan entre los segmentos 144 a 156, 175 a 195, y 199 a 226. Se observó acuerdo entre las conectividades típicas de hélices α descritas arriba, y las regiones que presentaron desviaciones de los corrimientos químicos de carbonos α mostrados en la **figura 17B**.

En un primer intento, el análisis de los espectros NOESY y el cálculo de la estructura se llevó a cabo en forma automática utilizando los programas ATNOS-CANDID (Herrmann *et al.*, 2002) incluido en el programa de dinámica de ángulos de torsión DYANA (Güntert *et al.*, 1997). Este paquete localiza y asigna las señales NOE, extrae las restricciones de distancia y las utiliza para calcular la estructura. El resultado obtenido fue una estructura con el plegamiento esperado, correspondiente a las estructuras priónicas de los homólogos. Sin embargo, el valor de la desviación cuadrática media (r.m.s.d.) para las posiciones de los átomos del esqueleto carbonado fue de 1,1, valor que da cuenta de una pobre definición de la estructura. En vista del magro resultado en la definición del conjunto de estructuras calculadas, se decidió realizar la identificación, localización y asignación de las señales NOE en forma manual, para luego incluir esta

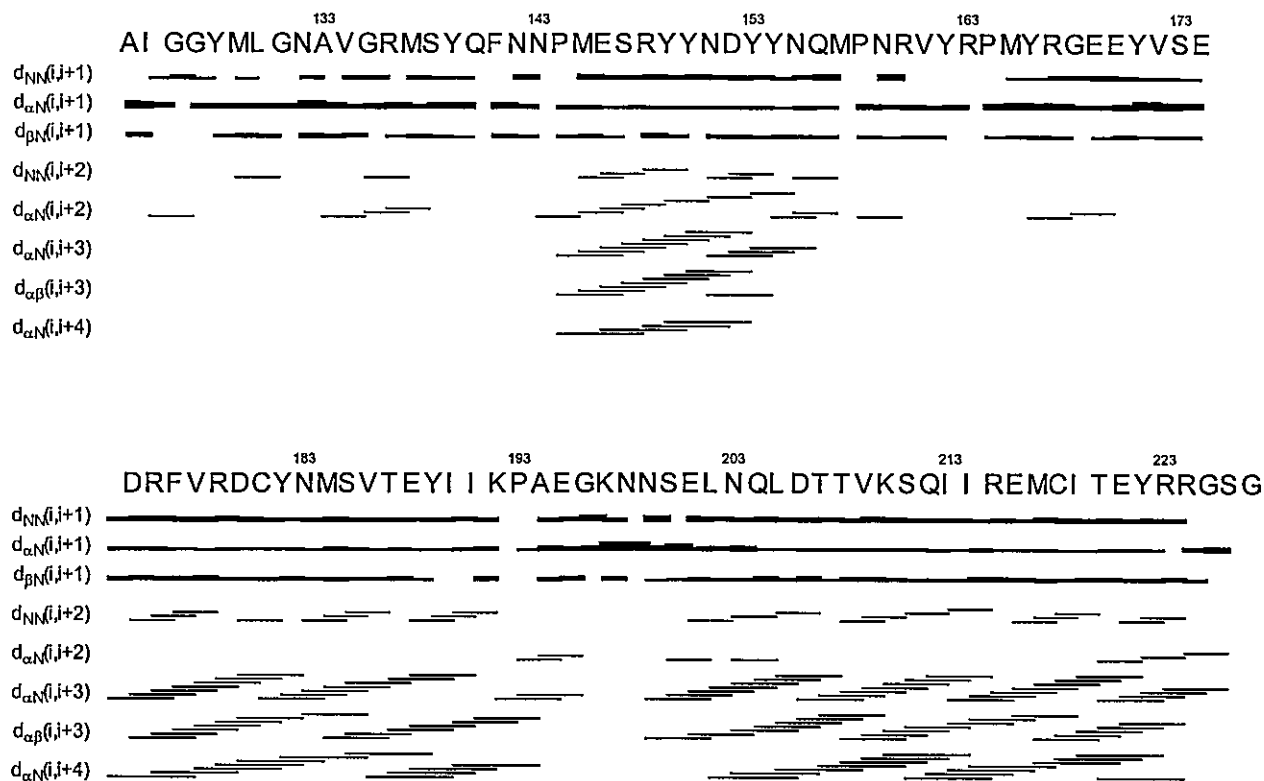


Figura 18. Restricciones de alcance medio y corto para el cálculo de la estructura de xlPrP. Las barras y líneas negras se ubican bajo los residuos en que se observaron conectividades por NOE. Las conexiones observadas involucran protones: de grupos amida en el esqueleto carbonado (d_{NN}); alfa y amida del esqueleto carbonado ($d_{\alpha N}$); beta y amida del esqueleto carbonado ($d_{\beta N}$). Las conexiones fueron observadas entre residuos contiguos ($i,i+1$), y a uno ($i,i+2$), dos ($i,i+3$), tres ($i,i+3$), y cuatro ($i,i+4$) residuos de distancia.

información directamente en el programa de dinámica de ángulos de torsión DYANA y de esta forma obtener la estructura. Los 20 estados conformacionales con menor función blanco (TF) calculados con DYANA fueron sometidos a minimización con el programa OPALp (Luginbühl *et al.*, 1996), programa que utiliza la definición de campo de fuerza AMBER (Cornell *et al.*, 1995).

La tabla de la **figura 19** muestra los valores de entrada para el cálculo de las estructuras, y los valores de los parámetros más importantes de la estructura minimizada. La estructura fue calculada usando un total de 2283 restricciones relevantes de distancia. Se calculan 100 estructuras y de ellas se extraen las 20 con menor valor de función blanco de DYANA (valor inversamente proporcional al número de restricciones de distancia violadas en la estructura). El valor promedio de la función blanco es de 1,99 para las 20 estructuras elegidas. La **figura 19B** muestra el conjunto de 20 estructuras con menor valor de la función blanco de DYANA. Las estructuras fueron ajustadas para minimizar la r.m.s.d. respecto a la estructura promedio hasta un valor de 0,75, en el ajuste sólo se consideraron los residuos 125 a 226. El segmento 99–124 presenta estructura desordenada, resultado acorde con la alta flexibilidad determinada para este segmento.

4.1.3.2.3. Análisis de la estructura

El dominio globular de la proteína xIPrP (125–227) posee estructuras secundarias regulares que se muestran en la **figura 20**. El plegamiento global corresponde al observado en sus homólogos de mamíferos, con tres hélices α , hélice- α 1 en el segmento

A

Cantidad	Valor
Restricciones superior NOE	2283
Función blanco residual (\AA^2)	$1,99 \pm 0,19$
Distancia residual	
Violación de restricciones	
Número $> 0,1\text{\AA}$	24 ± 4
Máximo (\AA)	$0,14 \pm 0,01$
Energías Amber, kcal/mol	
Total	-5215 ± 60
van der Waals	-244 ± 17
Electrostática	-6032 ± 59
RMSD de las coordenadas promedio (\AA)	
bb (125–226)	$0,75 \pm 0,13$
ha (125–226)	$1,19 \pm 0,12$

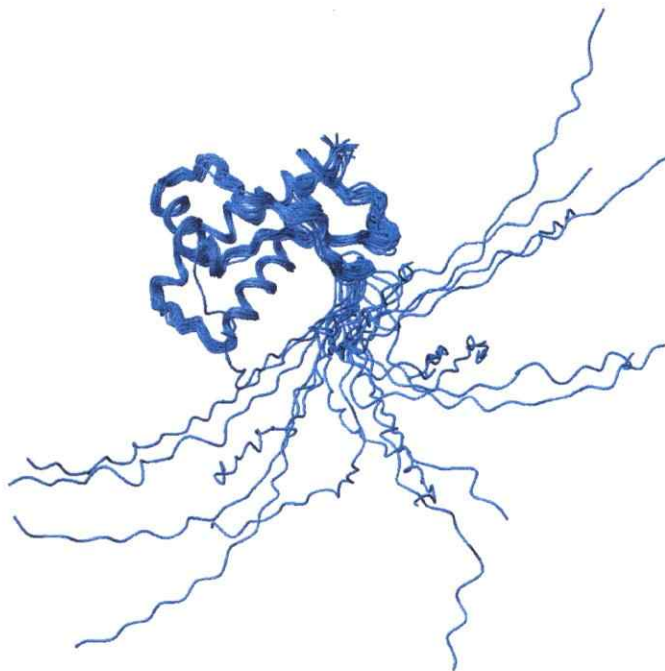
B

Figura 19. Estructura NMR de xIPrP (99–226) y tabla de datos de entrada para el cálculo y caracterización de la estructura energéticamente minimizada. **A** Con la excepción de las dos primeras entradas, la tabla muestra el promedio para los 20 estados conformacionales energéticamente minimizados con los residuales más bajos de la función blanco de DYANA y la desviación estándar entre ellos. bb indica los átomos del esqueleto carbonado N, $C\alpha$, C' ; ha indica todos los heteroátomos. Los números entre paréntesis indican los residuos para los que se calcula la r.m.s.d. **B** Estructura NMR de xIPrP (99–227). Se muestra el esqueleto carbonado del conjunto de 20 estados conformacionales con el valor más bajo de función blanco de DYANA. Los estados conformacionales fueron alineados para el mejor ajuste de los heteroátomos del esqueleto carbonado de los residuos 125–226, con una r.m.s.d. de $0,75 \text{\AA}$.

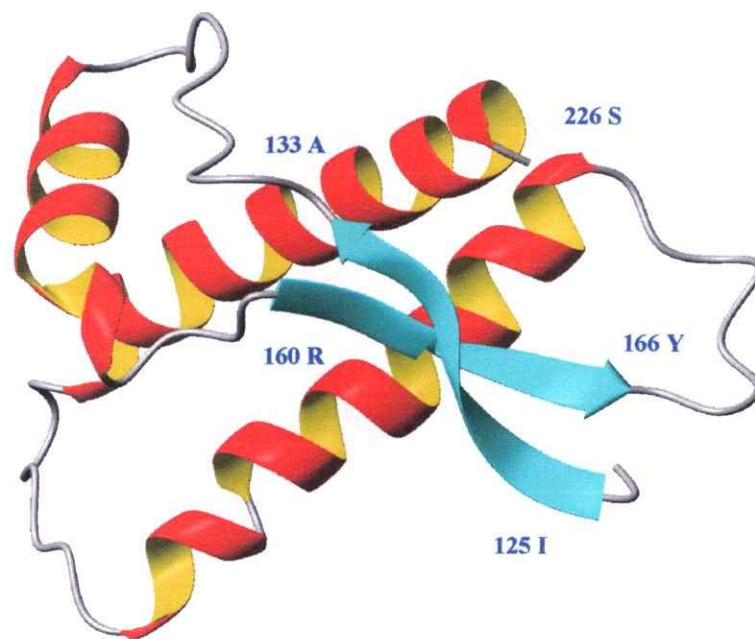


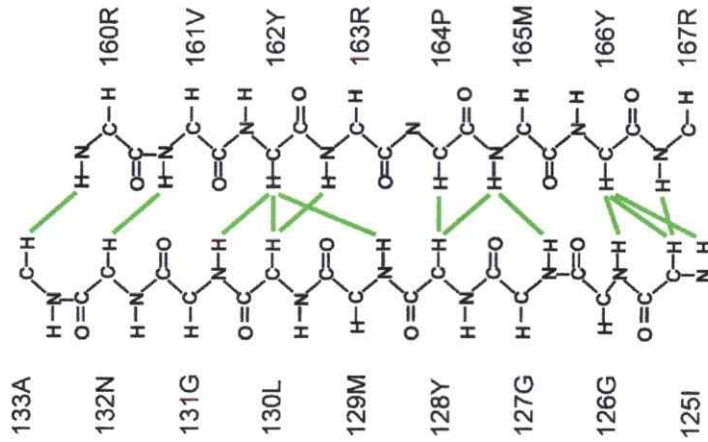
Figura 20. Estructura NMR de xPrP (99–226) donde sólo se muestran los residuos ordenados 125–226. Representación de cinta de la estructura con el valor de función de blanco menor entre los 20 conformeros. Las tres hélices alfa, α_1 , α_2 , y α_3 están coloreadas en rojo y amarillo, las hojas β en celeste, y los segmentos del dominio con estructura no regular en gris. Se indican los residuos N y C-terminal, más los residuos de los extremos de la hoja beta plegada. Esta figura fue preparada con el programa Molmol (Koradi *et al.*, 1996). El plegamiento global consiste en tres hélices α que comprenden los residuos 145–156, 174–193, y 202–224, y una hoja β inusualmente larga que comprende los residuos 125–133 y 160–166 para las hebras β_1 y β_2 , respectivamente.

segmento 144–155, hélice- α_2 , en el 174–196, y hélice- α_3 en el 203–224, más una hoja beta que comprende los residuos 127–133 para la hebra- β_1 , y 160–165 para la hebra β_2 . Al compararla con los homólogos de mamíferos, la hoja beta de xIPrP resulta inusualmente larga. En la **figura 21** se destaca con elipsoides las señales NOE que sustentan la hoja β . En ella se muestra el espectro [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY resuelto en ^{15}N que contiene las conexiones ^1H de grupo amida de una hebra y $^1\text{H}\alpha$ de la hebra contigua. Se muestra también el espectro [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOESY resuelto en ^{13}C con las conexiones NOE entre $^1\text{H}\alpha$ pertenecientes a ambas hebras. En este último espectro las señales son negativas porque la región de frecuencias de $\text{C}\alpha$ está doblada en el espectro. A modo de resumen esquemático, a la izquierda de esta figura se muestra con líneas verdes todas las conexiones ^1H - ^1H entre los esqueletos carbonados de ambas hebras, condición que explica la extensión de la hoja beta en el cálculo estructural, hasta una región que corresponde al *loop* β_2 - α_2 en las proteínas homólogas de mamífero.

La hélice α_2 y la hebra β_2 se encuentran unidas a través de un puente de hidrógeno que se muestra en la **figura 22**. El puente se establece entre el grupo amida de Y162 en la hebra β_2 , y el grupo OH γ de S185 en la hélice α_2 . Las resonancias provenientes de los grupos OH por lo general no son observables por el alto nivel de intercambio con H_2O . La interacción que involucra el protón del OH γ en S185 disminuye el intercambio con H_2O , lo que hace posible observar su resonancia. La **figura 22** a la derecha muestra la señal NOE proveniente de este protón de hidroxilo en la banda de señales NOE del grupo amida del mismo residuo. En la banda de la derecha se muestra la señal NOE de este protón OH γ de la hélice α_2 hacia el protón del grupo amida del residuo Y162

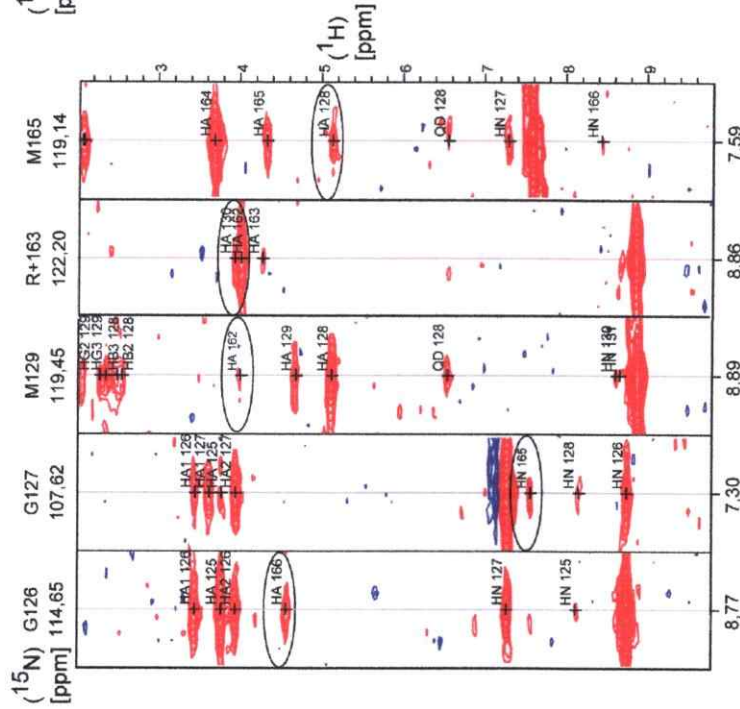
A

Patrón NOE para la region de hoja-β



B

3D ¹H-¹H NOESY resuelto en ¹⁵N



3D ¹H-¹H NOESY resuelto en ¹³C

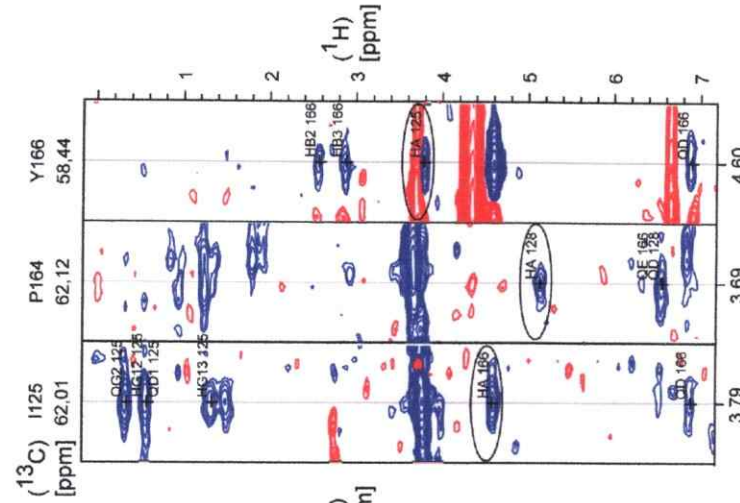


Figura 21. Patrón de señales NOE para la hoja β plegada de xPrP. (A) Representación esquemática de las señales NOE entre átomos del esqueleto carbonado en la región de la hoja β. Las líneas verdes conectan los átomos para los cuales se observaron picos cruzados NOE. (B) Bandas de señales de [¹H, ¹H]-NOESY resuelto con heteronúcleos. Se destacan en elipses aquellas señales entre núcleos del esqueleto carbonado en ambas hebras en la región en que la hoja beta se extiende dentro de la zona correspondiente al *loop* α2-β2 en mamíferos.

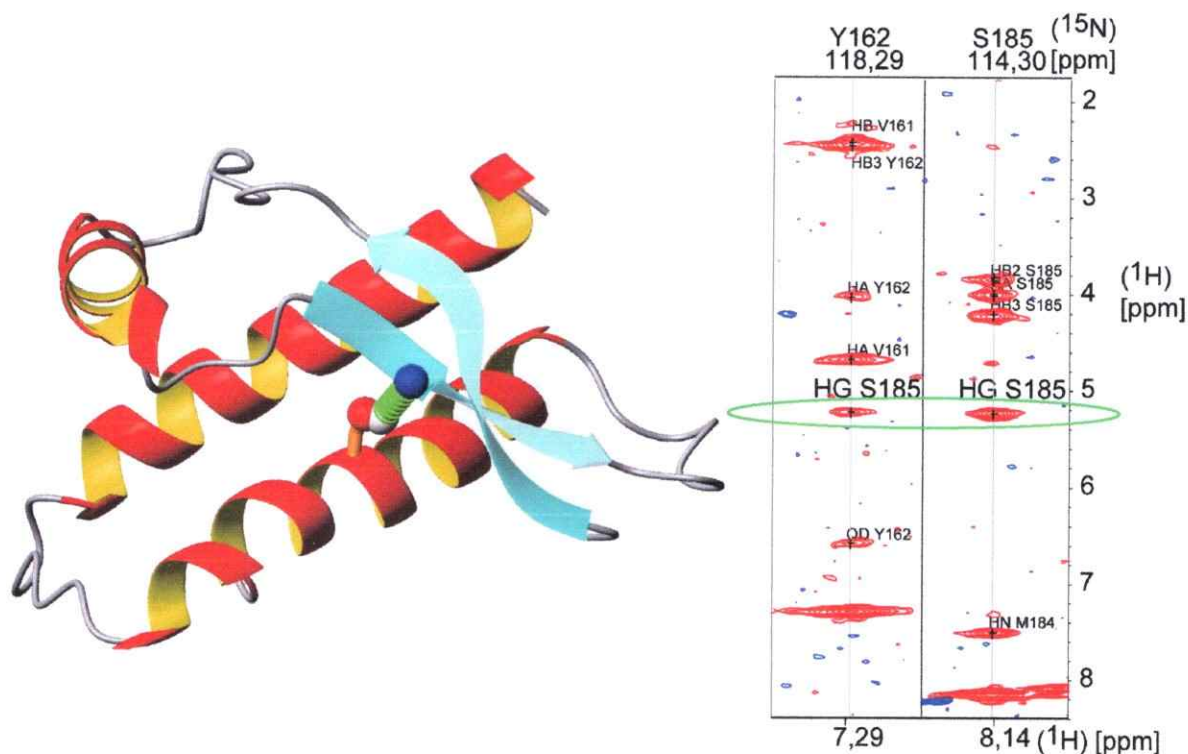


Figura 22. Señal NOE de puente de hidrógeno H^N -Y162 $O\gamma$ -S185 de xIPrP. A la izquierda se muestra la estructura NMR de xIPrP. Las hebras beta se dibujan semitransparentes para mostrar el átomo de ^{15}N (esfera azul) perteneciente a la hebra $\beta 2$. En línea verde discontinua se muestra el puente de hidrógeno entre H^N -Y162 (localizado en la hebra $\beta 2$) y $O\gamma$ -S185 (localizado en la hélice $\alpha 2$). En anaranjado se muestra parte de la cadena lateral de S185. La esfera roja corresponde al átomo $O\gamma$ de S185, la blanca y la azul a los átomos de hidrógeno y nitrógeno, respectivamente, que pertenecen al grupo amida del residuo Y162. A la derecha se muestran dos bandas de la dimensión ^{15}N de un espectro $[^1H, ^1H]$ -NOESY editado en ^{15}N . La banda izquierda corresponde a las señales NOE hacia el grupo amida de Y162 y la de la derecha al grupo amida de S185. En óvalo verde se destacan la señal NOE inter-residual desde $H\gamma$ S185 a H^N Y162 (banda derecha), y la señal NOE intra-residual desde $H\gamma$ de S185 a H^N (banda derecha). El espectro 1H - 1H NOESY resuelto en ^{15}N fue medido usando una muestra de xIPrP 1 mM, acetato Na 10 mM pH 4,5, 90% H_2O , 10% 2H_2O . Se muestran las bandas de señales NOE para los grupos amida de los residuos Y162 y S185.

localizado en la hebra $\beta 2$.

4.1.3.2.4. Búsqueda de sitios funcionales

La **figura 23** muestra el alineamiento de las secuencias de proteínas priónicas provenientes de mamífero, ave, reptil y anfibio. Los residuos conservados en los cuatro grupos (destacados en rojo en las secuencias) son localizados en la estructura tridimensional de x1PrP, y sus cadenas laterales se muestran en naranja. Se observa que todos ellos se encuentran en la zona hidrófoba del dominio globular, y participan de una u otra forma en la estabilización de la estructura. De esta forma, el núcleo hidrófobo se encuentra completamente conservado con la excepción de la posición 210 que en x1PrP es sustituida por un residuo cargado positivamente (K210). Esta sustitución no es desestabilizante por cuanto es compensada con la formación de un puente salino con el residuo D206. Con esta interacción ambos residuos permanecen en el núcleo hidrófobo. El segmento de secuencia enmarcado en el alineamiento muestra en azul dos residuos que son conservados hasta aves/reptiles en la evolución. Tales residuos no se encuentran en el núcleo hidrófobo y fueron por tanto postulados como posibles sitios funcionales. Junto a las posiciones hidrófobas 149 y 150, estos residuos constituyen un motivo similar al encontrado en la cadena $\alpha 2$ de laminina. Cualquiera sea la relevancia del motivo, éste no se encuentra conservado en el anfibio.

A

128	140	150	160	170	180	190	200	210	220
xlPrP	YMLGNAVGRMSYQFNPNPME	SRYYNDYINQMPNRVYRPMYRGE	EVSEDRFVDCYNNM	SVTEYIIKPAEGKN	-----	NSELNQLD	DTTVKSQII	IREMCITEYRRG	-----
ggPrP	YAMGRVMSGMVYHFDSPDE	YRWWSENSARYPNRVYRDYSS	--PVQDVFVADCFNI	TVTEYSIGPAACKNTSE	VAANAQTEVEMENK	VVTKVI	IREMCVQQ	REYRLA	-----
tsPrP	YALGSAMSGMRMNFDRPEE	EQWNNENSNRYPNQVYYKE	YNDR-SVPEGRFVRDCLN	NTVTEYKIDPNEQ	-----	NVTQVEVR	--VMKQVI	QEMCMQQYQYOLA	-----
hsPrP	YVLGSAMSRPIIHFGSDYE	DRYYRENMHRYPNQVYRPMDE	--YSNQNNFVHDCVNI	TIKQRTVTTTKGE	-----	NFTETDVK	--MMERVVEQMCITQ	IERESQAYYQRGS	

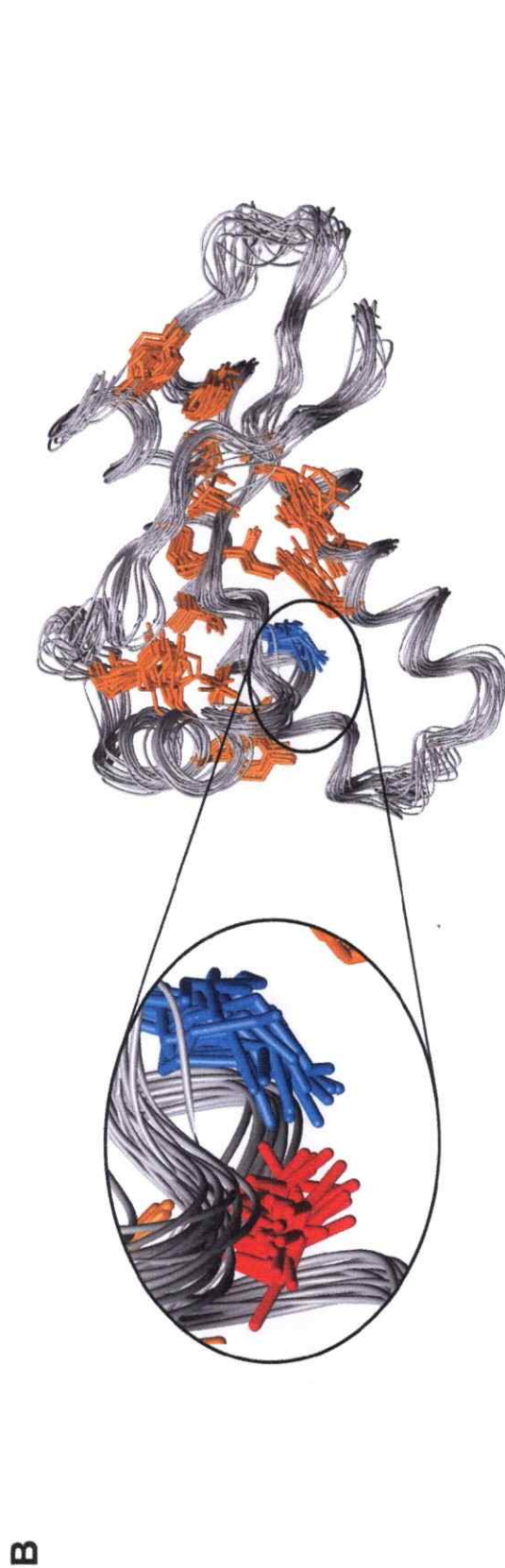


Figura 23. Conservación de secuencia y núcleo hidrofóbico en xlPrP. (A) Alineamiento de secuencia de xlPrP (rana), ggPrP (pollo), tsPrP (tortuga), y hsPrP (humano). Los residuos altamente conservados se muestran en rojo. En azul se muestran aquellos residuos que sólo cambian en xlPrP. En marco negro se destaca un segmento polipeptídico de secuencia similar a la del motivo de la cadena $\alpha 2$ de laminina. Este motivo está conservado en todas las especies con la excepción de xlPrP y cuya conservación no puede ser explicada por la sola mantención del plegamiento. (B) Localización de los residuos conservados en la evolución en la estructura tridimensional. Los heteroátomos de las cadenas laterales de los residuos conservados de los 20 estados conformacionales se muestran en anaranjado. K210 se muestra en azul. Una vista detallada del residuo K210 lo muestra haciendo un puente salino con el residuo D206, característica observada solamente en xlPrP.

4.1.4. Discusión

4.1.4.1. Conservación de la secuencia en la región N-terminal

En esta sección se establecerán las posibles correlaciones entre la secuencia aminoacídica, la estructura tridimensional, y las propiedades funcionales de las proteínas priónicas. Para ello se considerarán la estructura determinada para el anfibio (*Xenopus laevis*; xlPrP), más las estructuras disponibles de mamífero (*Homo sapiens*; hsPrP), aves (*Gallus gallus*; ggPrP), y reptiles (*Trachemys scripta*; tsPrP).

En la primera parte de este capítulo se analizó la región N-terminal no estructurada de las proteínas priónicas, en búsqueda de las zonas conservadas en anfibio respecto a sus homólogos lejanos. Brevemente, se identificó que la estructura del anfibio conserva algunas regiones del extremo N-terminal (**figura 24**). La conclusión más segura que se puede sacar se refiere al tráfico celular de PrP^C, pues los elementos estructurales que se sabe son importantes para el tráfico celular están altamente conservados en las secuencias de PrP y en las estructuras tridimensionales. Ellas son la secuencia N-terminal de destinación al retículo endoplásmico, la secuencia entre los aminoácidos 23–42 que dirige la proteína a la vía de internalización celular, y por lo tanto controla la endocitosis de la proteína (Gilch *et al.*, 2004), y finalmente la secuencia C-terminal que une un GPI de anclaje a la membrana, y lo dirige a las balsas lipídicas (Harris, 1999). Las asignaciones funcionales tentativas que se han propuesto para estas regiones también se han validado por los estudios estructurales, por cuanto en todas las especies analizadas éstas se localizan en la zona de estructura desordenada que esta 100%

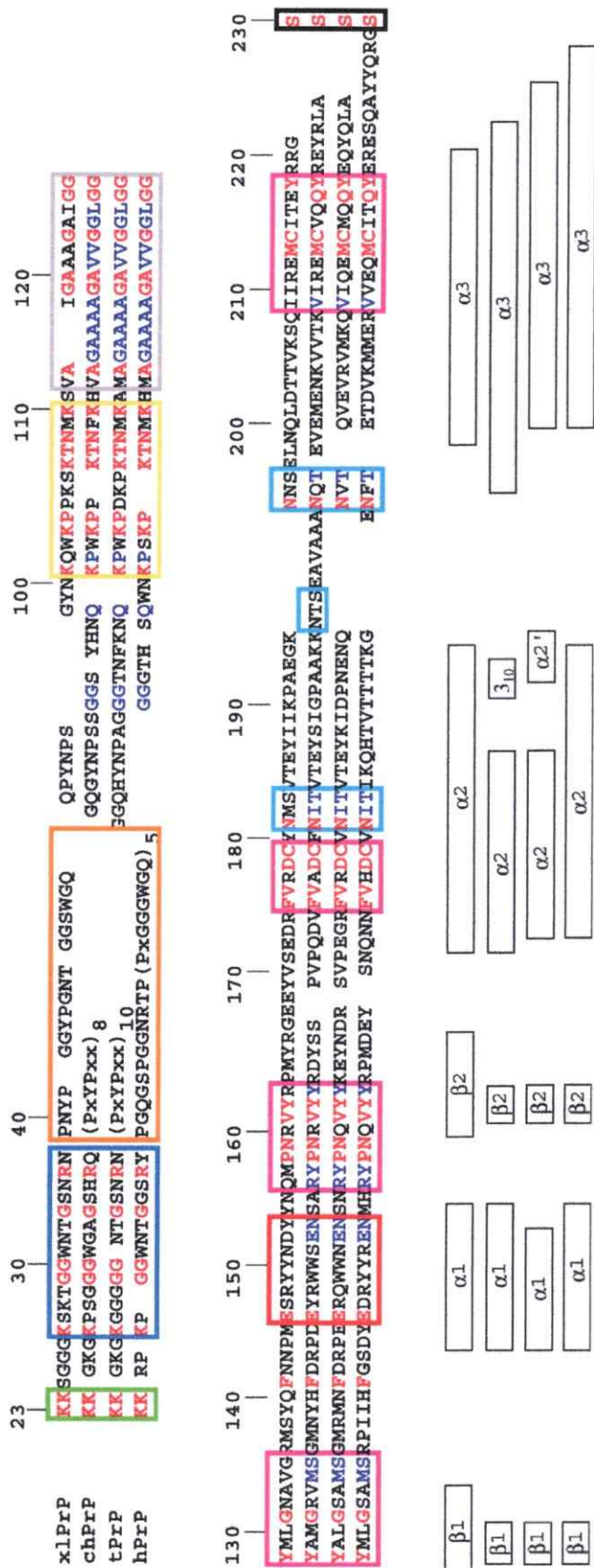


Figura 24. Alineamiento de las secuencias de priones humano (*Homo sapiens*; hsPrP), de gallo (*Gallus gallus*; ggPrP), tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta*; tsPrP), y rana africana de patas con garras (*Xenopus laevis*; xPrP), donde hsPrP representa la proteína priónica "tipo mamífero". En la parte superior del alineamiento se muestra la numeración de residuos de hsPrP. En rojo se muestran los aminoácidos conservados en todas las especies, en azul se muestran aquellos conservados en ggPrP, tsPrP y hsPrP. El segmento enmarcado en negro muestra la región que contiene el polipéptido repetido y que no fue alineado. El sitio de anclaje por GPI se indica con marco verde, y el sitio de glicosilación con el marco celeste. El marco naranja indica los segmentos con mayor identidad y que no tienen un rol en la estabilización de la estructura de PrP y que por ende pudo ser conservada por razones funcionales. Estas regiones incluyen el segmento 23–42, que contiene el sitio de corte del péptido señal N-terminal, el que ha sido propuesto como el péptido señal para la internalización de PrP (Nunziante *et al.*, 2003), un sitio de unión a SH3 de residuos 100–110 (Spielhauer *et al.*, 2001), el segmento 113–128 que es predicho como hélice transmembrana, (Hedge, 1998), y el segmento 146–155 en hsPrP, ggPrP y tsPrP que guarda algún nivel de similitud con la cadena $\alpha 2$ de laminina. Los marcos rosados indican segmentos con alto grado de identidad que parecen estar relacionados con la mantención del plegamiento de PrP. Abajo, las estructuras secundarias regulares del dominio globular para las cuatro especies. Para el dominio globular (121–230), el alineamiento fue basado en una inspección visual de las estructuras tridimensionales

accesible al solvente.

4.1.4.2. Comparación de los dominios globulares

Las estructuras tridimensionales de los dominios globulares de PrP de hsPrP(121–230) (Zahn *et al.*, 2000), ggPrP(121–225), tsPrP(121–225) y xIPrP(125–226) (Calzolari *et al.*, 2005) muestran evidentes similitudes. La **figura 25** muestra la localización de las estructuras secundarias regulares, la disposición tridimensional de los elementos de estructura secundaria regulares, y la coincidencia en el núcleo hidrófobo de cadenas laterales con baja accesibilidad al solvente.

Al prescindir de la hélice $\alpha 1$ en el proceso de ajuste de las estructuras mostradas en la **figura 25**, se obtiene una superposición de las estructuras secundarias regulares bastante ajustada en las cuatro proteínas. Aplicando este procedimiento, los heteroátomos del esqueleto carbonado de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y de la hoja β se sobreponen, para cualquier par de las cuatro proteínas priónicas, con una r.m.s.d. igual o menor a 1,1 Å. Luego, el 30% de identidad de secuencia que comparten es suficiente para conservar el empaquetamiento del núcleo hidrófobo. Sin embargo, los *loops* que unen los elementos de estructura secundaria regular, así como la orientación de la hélice $\alpha 1$, varían significativamente entre las especies estudiadas. Esta variabilidad estructural es acorde con el bajo nivel de conservación de secuencia observada para estas zonas del dominio globular. Algunas de estas variaciones podrían ser consideradas como características estructurales distintivas de los diferentes grupos evolutivos de PrPs. Un primer ejemplo es el *loop* 166–173. Esta región muestra desorden dinámico en hsPrP (Zahn *et al.*, 2000),

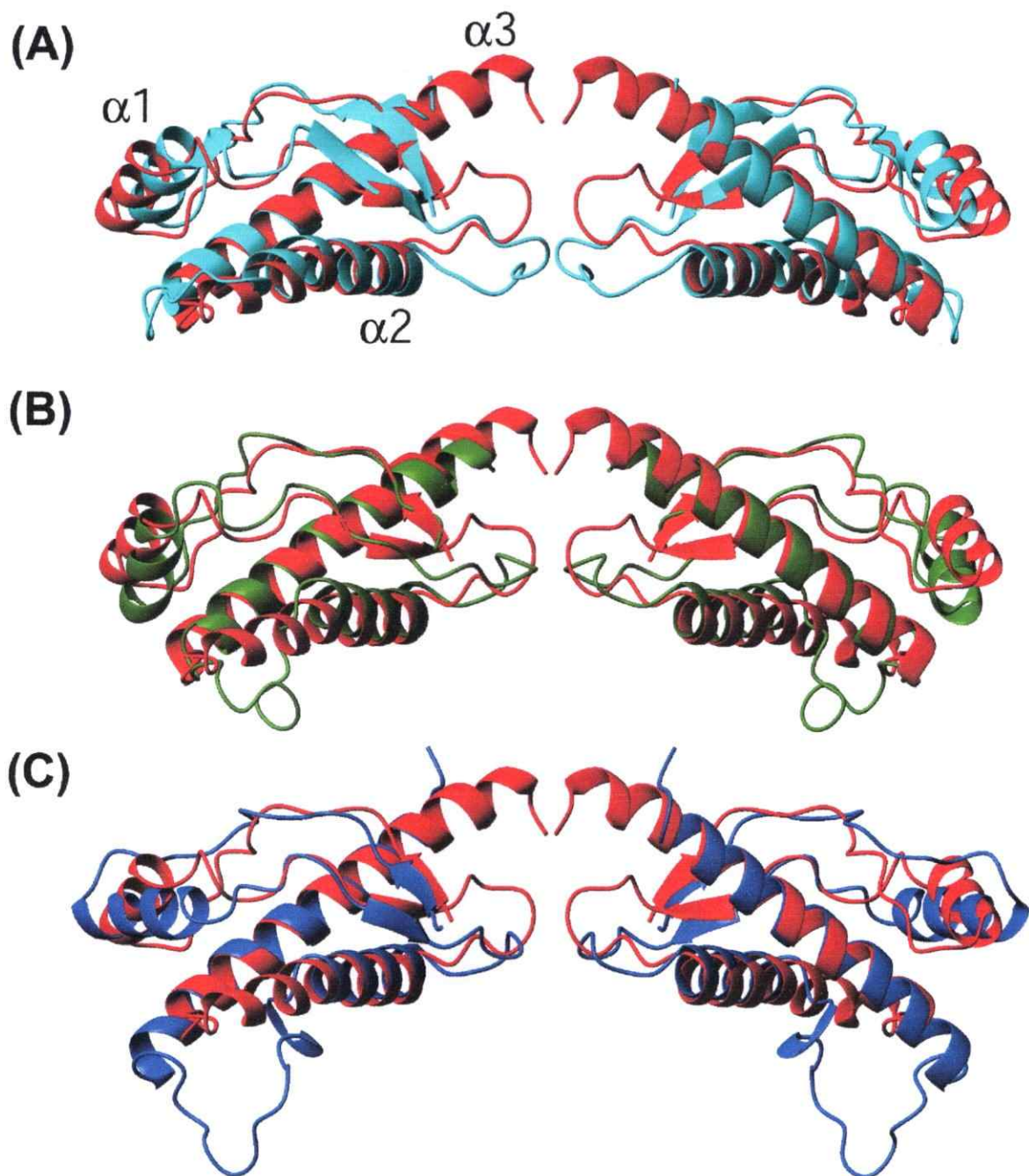


Figura 25. Superposición de los esqueletos carbonados de (A) xlPrP (125–226) (celeste) y hsPrP (121–230) (rojo), (B) trPrP (121–225) (verde) y hsPrP (121–230) (rojo), y ggPrP (121–225) y hsPrP (121–230) (rojo) Las proteínas fueron alineadas en los siguientes segmentos 128–131, 161–164, 173–187, y 201–223. Las vistas de la derecha se obtienen rotando las de la izquierda en 180° alrededor del eje vertical.

pero está definida con mayor precisión en las otras tres especies. En tsPrP, el *loop* 166–173 parece estar definido por interacciones de largo alcance entre V171 y Y222, por la inserción de una prolina en ggPrP, y por una inserción de dos aminoácidos en xlPrP. Otra característica estructural distintiva se encuentra en el extremo C-terminal de la hélice α_2 , esta región cuenta con un segmento de cuatro treoninas en hsPrP, con hélices 3–10 en ggPrP y tsPrP, y se encuentra interrumpida en xlPrP. Otra característica distintiva para ggPrP es una inserción entre las hélices α_2 y α_3 , que forma un *loop* flexible, y la elongación de la hélice α_3 (Wopfner *et al.*, 1999).

4.1.4.3. Arquitectura de las proteínas priónicas

Las comparación de estructuras de proteínas priónicas indican que los siguientes elementos están presentes en todas ellas y forman el andamiaje que estabiliza el tipo de plegamiento de PrP^C: La disposición de las dos largas hélices α_2 y α_3 , su conexión por puente disulfuro y el empacamiento de la hoja β contra de las hélices α_2 y α_3 ., reforzado por un puente de hidrógeno entre O^γ de T(S)183 y H^N de Y162, y el anclaje de la hélice contra el núcleo proteico mediante dos tirosinas o triptofanos en las posiciones 149 y 150. La **figura 26** muestra el andamiaje conservado de PrP^C. En ella se observan los elementos estructurales presentes en la familia y la orientación variable de la hélice α_1 .

4.1.4.4. Secuencia funcional en el dominio globular de PrP^C

La mayoría de los aminoácidos conservados en las proteínas priónicas aparentemente juegan un papel importante en la estructura de PrP, pero hay residuos altamente

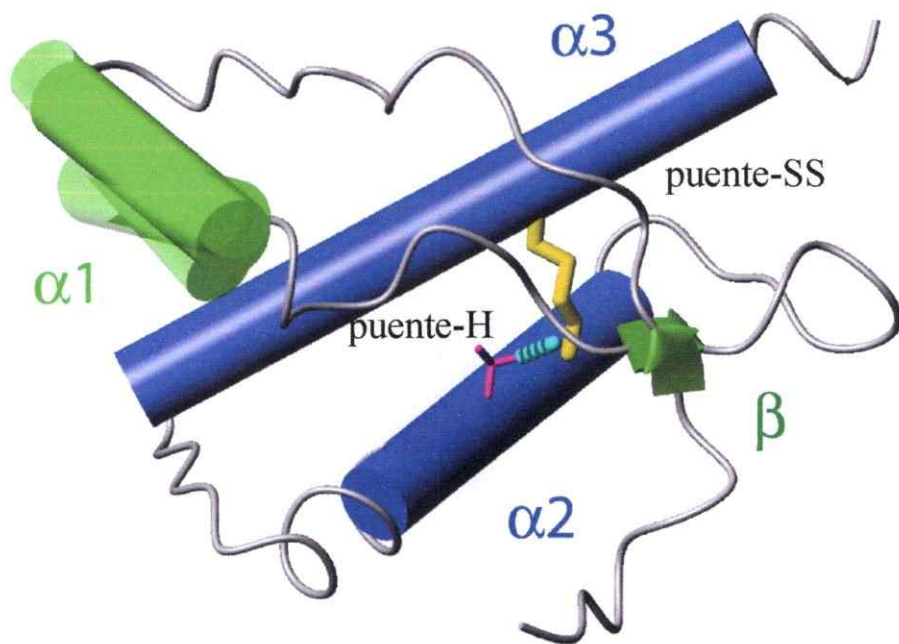


Figura 26. Modelo de la estructura mínima de PrP^C. Las hélices α se muestran como cilindros, la hélice α -1 en verde y las hélices α 2 y α 3 en azul, las hebras β son representadas como flechas verde oscuras. El puente disulfuro se muestra en amarillo y el puente de hidrógeno entre O γ de T183 y el protón de amida del esqueleto carbonado de Y162 como línea punteada celeste. Los segmentos del esqueleto carbonado que unen los elementos de estructura secundaria son mostrados como un tubo gris a través de las posiciones de C α . Si los elementos estructurales son superpuestos para el mejor ajuste, la hélice α 1 adopta diferentes orientaciones en proteínas priónicas de anfibio, reptiles, aves y mamíferos.

conservados en la hélice $\alpha 1$ de mamíferos, aves y reptiles que difícilmente podrían ser considerados como elementos estabilizantes de la estructura. La secuencia entre los aminoácidos 146–153 fue utilizada para buscar en la base de datos de secuencia de proteínas con una función conocida. Se encontró una relación significativa entre este segmento de la hélice $\alpha 1$ y la secuencia EECYYDEN, de la región 351–358 de la cadena $\alpha 2$ de la laminina humana. Este motivo funcional putativo en la hélice $\alpha 1$ de PrP^C resulta interesante debido a que el receptor de laminina ha sido propuesto previamente como un posible ligando de PrP^C (Gauczynski *et al.*, 2001). Sin embargo, este motivo funcional putativo del dominio globular se pierde en x1PrP, en correspondencia con la pérdida de motivos que se observa en la región N-terminal desordenada.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE *EQUUS CABALLUS* PrP

4.2.1. Introducción

La hipótesis de "sólo proteína" sugiere que la causa de las enfermedades espongiformes transmisibles es el cambio de conformación de la proteína priónica (PrP). En este contexto, las restricciones impuestas por la barrera interespecies para la transmisión de la enfermedad pueden estar relacionadas con variaciones de la estructura de PrP entre las distintas especies. Es por ello que ha sido motivo de mucho interés la obtención de las estructuras NMR de distintas especies (Riek *et al.*, 1998). La pertinencia de esta aproximación experimental queda de manifiesto con la demostración que la proteína recombinante de PrP tiene el mismo plegamiento global que PrP^C (Eberl *et al.*, 2004; Hornemann *et al.*, 2004). La falta de modificaciones post-traduccionales en PrP, expresada en *Escherichia coli*, tiene cuando mucho un efecto local muy limitado en la arquitectura molecular de la proteína. (Hornemann *et al.*, 2004).

Hasta ahora han sido descritas las estructuras NMR de PrP^Cs provenientes de las especies mamíferas: ratón (mmPrP) (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1998), hamster sirio (maPrP) (James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999), humano (hsPrP) (Zahn *et al.*, 2000), bovino (btPrP) (López-García *et al.*, 2000), porcino (scPrP), canino (cdPrP), felino (fcPrP) (Lysek *et al.*, 2005), y ciervo (cePrP) (Gossert *et al.*, 2005).

Estas proteínas muestran un plegamiento global muy similar caracterizado por la presencia de un tallo flexible no estructurado de 100 residuos en el extremo N-terminal,

unido a un dominio globular en el C-terminal que muestra variabilidad estructural restringida a ciertas zonas entre las distintas especies. Una de las regiones que muestra diferencias entre las distintas especies es el *loop* entre los residuos 167–171, que une la hoja $\beta 2$ con la hélice $\alpha 2$, el cual varía en el grado de definición estructural. La región del *loop* permanece expuesta al solvente incluso en presencia de los azúcares unidas post-traduccionalmente (Rudd *et al.*, 2001), y ha sido identificada como posible epítotope para una interacción determinante en la transmisión de la enfermedad, con un factor hasta ahora desconocido codificado por el huésped denominado "factor X" (Kaneko *et al.*, 1997a). Este factor ha sido propuesto como mediador de la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, y está involucrado en la barrera interespecies (Telling *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997b).

En ciervo, dos sustituciones en la secuencia del *loop* (S170N, N174T) dan cuenta de un *loop* que tiene su estructura bien definida (**figura 27**), y para el cual todas las resonancias del esqueleto carbonado son observables (Gossert *et al.*, 2005). En contraste, un desorden estructural pronunciado en este *loop* se observa en la PrP^C de otras especies de mamíferos (Riek *et al.*, 1996; López-García *et al.*, 2000; Zahn *et al.*, 2000; Lysek *et al.*, 2005), donde se pierde un número de resonancias de NMR del esqueleto carbonado.

En esta parte del trabajo se resuelve la estructura NMR de la forma celular de la proteína priónica de caballo (*Equus caballus*; ecPrP) a 25 °C, y se describe la existencia de conformaciones alternativas o estados excitados de baja energía. Se postula un modelo para explicar el comportamiento del *loop* $\alpha 2$ - $\beta 2$, proponiendo un método para caracterizar en mayor detalle su estructura y dinámica.

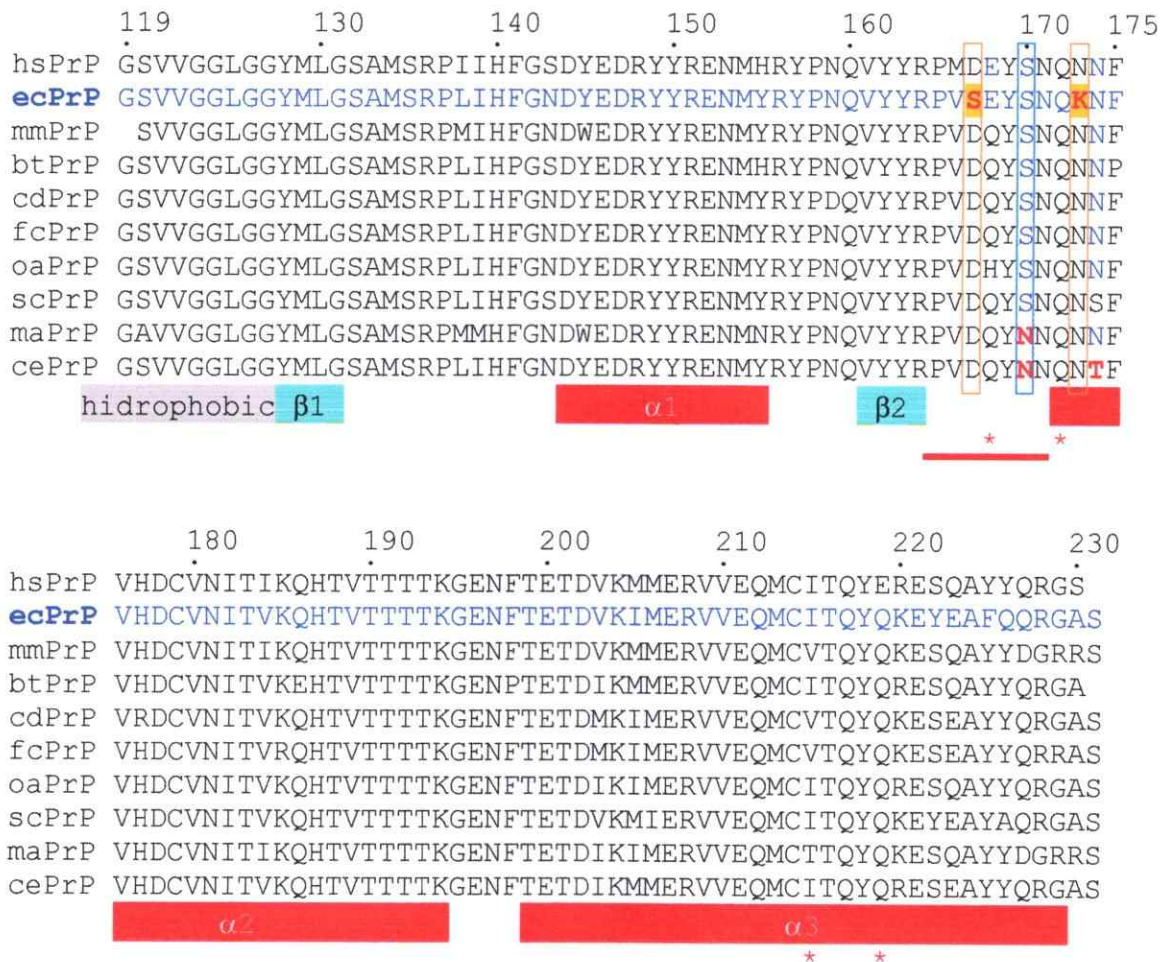


Figura 27. Alineamiento de secuencias del dominio globular de priones de mamíferos. Se muestra el alineamiento del segmento globular de proteínas priónicas provenientes de: humano (*Homo sapiens*; hsPrP), equino (*Equus caballus*; ecPrP), ratón (*Mus musculus*; mmPrP), bovino (*Bos taurus*; btPrP), can (*Canis domesticus*; cdPrP), felino *Felis catus* (fcPrP), ovino (*Ovis aries*; oaPrP), porcino (*Sus scrofa*; scPrP), hamster (*Mesocricetus auratus*; maPrP), ciervo (*Cervus elaphus*; cePrP). En la parte superior se muestra la numeración utilizada para *Equus caballus* PrP. La secuencia de *Equus caballus* se destaca en azul. Enmarcadas en rojo se indican las posiciones donde *Equus caballus* presenta sustituciones únicas. Enmarcada en azul se indica la posición en que maPrP y cePrP difieren del resto de las secuencias alineadas. Bajo el alineamiento de secuencias se muestran esquemáticamente: las regiones de hélices alfa en rojo, las hebras beta en celeste, y el segmento hidrofóbico en gris. La barra roja indica la región del loop $\alpha 2$ - $\beta 2$. Los asteriscos indican las posiciones postuladas como posibles sitios de unión del factor X.

4.2.2. Objetivos

Obtención, purificación y caracterización estructural de la proteína priónica de *Equus caballus* (ecPrP) expresada en forma heteróloga

i) Expresión y purificación:

- Clonamiento de PrP cDNA de *Equus caballus* (ecPrP): Se clonó el cDNA del fragmento correspondiente a los 121–230 de ecPrP a partir de sangre de caballo. El cDNA de ecPrP se subclonó en el vector de expresión pRSET y se transformó en la bacteria *Escherichia coli* BL21 para sobreexpresar la proteína como cuerpos de inclusión.

- Purificación: Se utilizaron cultivos de *E coli* BL21 para la obtención de ecPrP no marcada, marcada con ^{15}N , y doblemente marcada con ^{15}N y ^{13}C . Cada muestra se purificó, concentró a 1 mM y equilibró en el amortiguador apropiado para las determinaciones de NMR.

ii) Medición de espectros NMR.

- Registro de espectros de correlación cuántica simple (HSQC): [^1H , ^{15}N]-COSY, y [^1H , ^{13}C] COSY para las regiones alifática y aromática. Estos espectros bidimensionales se usaron como plataforma de guía en el trabajo con espectros tridimensionales.

- Registro de espectros de triple resonancia HNCO, HNCACO, y HNCA. Estos espectros se utilizaron luego para corroborar la asignación del esqueleto carbonado.

- Registro de espectros de NOE: [^1H , ^1H] NOE editados en: ^{15}N , ^{13}C alifáticos y ^{13}C aromáticos. La información proveniente de estos espectros se utilizó posteriormente en el cálculo de la estructura tridimensional de la proteína.

- Registro de espectros de correlación cuántica múltiple HCcH-TOCSY y ^{15}N -TOCSY. Estos espectros se utilizaron para asignar las señales provenientes de las cadenas laterales.

iii) Procesamiento y asignación de resonancias.

Los espectros en el dominio temporal se procesaron para transformarlos al dominio de frecuencia. Se asignaron las resonancias NMR a los distintos núcleos de la proteína usando la estrategia de asignación para espectros de proteínas que tienen homólogos con resonancias previamente asignadas.

iv) Cálculo de la estructura tridimensional

Con la asignación completa de las resonancias de protones se procedió al cálculo semi-automatizado de la estructura tridimensional por medio del paquete de programas ATNOS-CANDID-DYANA.

v) Refinamiento de la estructura.

Se usó la información obtenida en el primer cálculo de estructura, en la corrección de las asignaciones erróneas y se volvió a preparar los datos de entrada para un nuevo cálculo. El procedimiento se repitió en forma iterativa hasta obtener un resultado satisfactorio en cuanto al número de restricciones de distancia máxima por residuos y al número de violaciones a estas restricciones que se obtuvo con el cálculo de la estructura.

vi) Análisis de la estructura.

4.2.3. Resultados

4.2.3.1. Espectroscopia y asignación de resonancias

4.2.3.1.1 Estrategias de asignación

Comparación de espectros de ecPrP y otros mamíferos

Corrimientos químicos de grupos amida:

La primera parte del análisis de datos en NMR consistió en asignar las señales NMR a los núcleos de ecPrP. En el laboratorio se disponía de la estructura y de la asignación de espectros de otros priones de mamíferos resueltos por NMR. Esta situación resultó ventajosa puesto que, en términos generales, permitió evaluar la relación ente la calidad de las estructuras obtenidas mediante NMR y las características de los espectros utilizados, y en términos particulares, permitió evaluar la viabilidad del uso de la información proveniente de la asignación previa de homólogos para asignar una nueva muestra como ecPrP. La importancia de este último punto radica en que, de ser posible usar la información de asignación previa de homólogos, esto permite ahorrar una cantidad importante de tiempo en la obtención de la estructura.

En la **figura 28** se muestra la superposición de las señales de los espectros de correlación heteronuclear simple [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-COSY provenientes de priones de *Equus caballus* (ecPrP), *Cervus elaphus* (cePrP) y *Felis catus* (fcPrP). Las estructuras de estas últimas proteínas están disponibles junto a sus espectros NMR, y se tomaron como

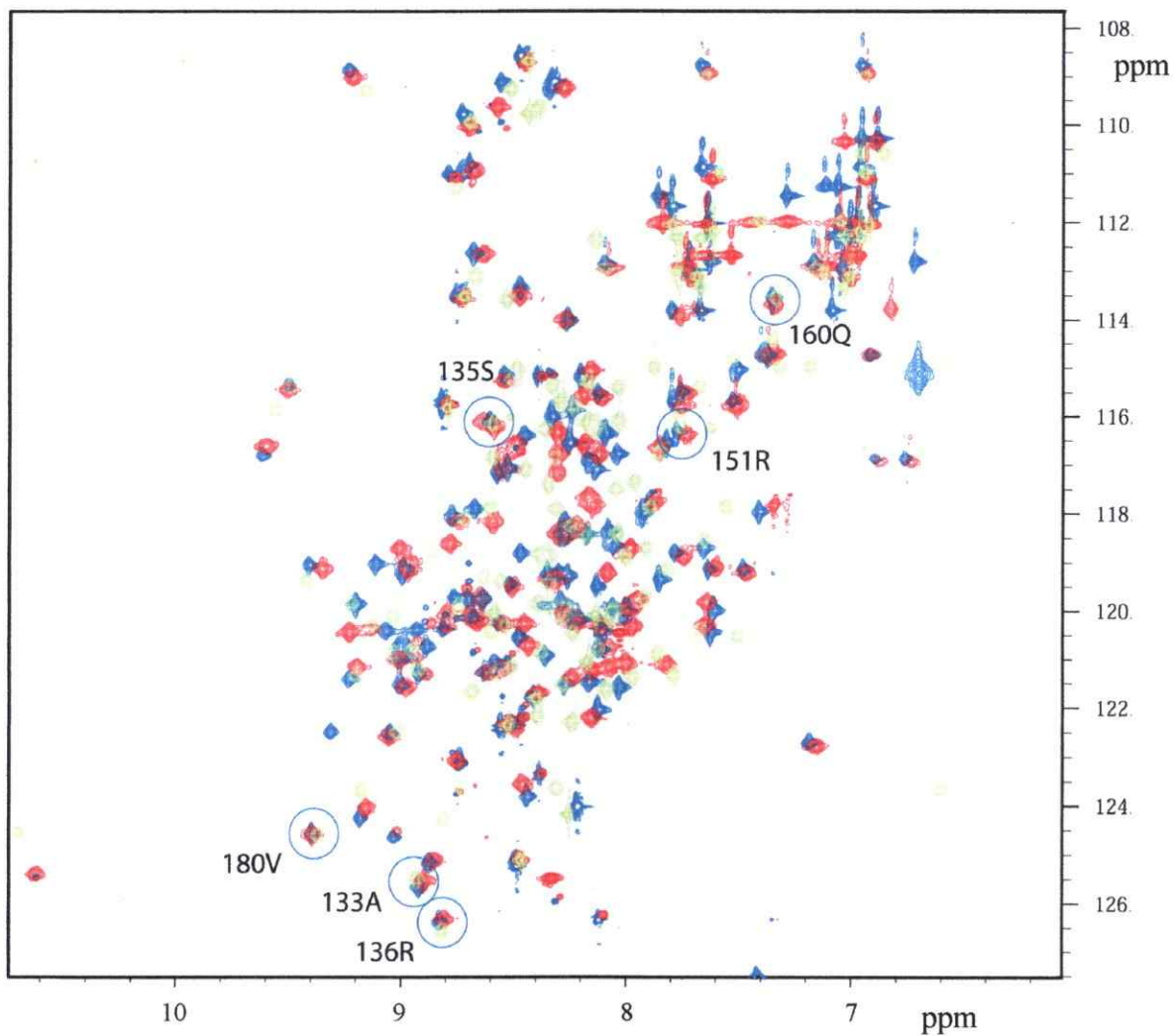


Figura 28. Espectro $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -COSY de ecPrP (señales en azul), cePrP (señales en verde), y fcPrP (señales en rojo). Los experimentos fueron medidos en acetato de Na 10 mM pH 4,5, 10% D_2O y 20 °C. Con un círculo se destacan seis de las señales con corrimientos químicos altamente conservados.

referencia en este trabajo debido a que representan dos extremos en relación a la definición de la estructura global y a la observabilidad de las resonancias provenientes del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. En la **figura 29** se muestra el espectro [^1H , ^{15}N]-COSY de cePrP, donde se observan todas las resonancias provenientes del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ (residuos 165–175) aunque la señal proveniente de los residuos 170 y 175 está ensanchada debido a un intercambio conformacional. La estructura en solución acuosa de cePrP posee una r.m.s.d de 0,57 para el esqueleto carbonado de los 20 estados conformacionales calculados. Por otro lado, la estructura de fcPrP se obtuvo con una r.m.s.d. de 0,87 para el esqueleto carbonado de los 20 estados conformacionales calculados, y la estructura del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ está completamente indefinida debido a la ausencia de señales para los residuos 167, 168, 169, 171, y 175. En el caso de ecPrP estudiado en esta tesis, todas las resonancias resultan observables.

El alto grado de identidad que poseen las secuencias de ecPrP, cePrP, y fcPrP se ve reflejado en el patrón similar de distribución de corrimientos químicos para los grupos amida. La **figura 28** muestra la superposición de las resonancias de grupos amida para las tres proteínas. La conservación de los corrimientos químicos es especialmente notable para los residuos 129M, 130L, 133A, 135S, 136R, 151R, 180V y 217Q.

La conservación de los corrimientos químicos para estas señales se utilizó para realizar la primera asignación preliminar en el procedimiento de asignación de resonancias (ver Materiales y Métodos) y es una propiedad extendida a todos los homólogos de prión de mamíferos. El bajo nivel de identidad de secuencia con priones provenientes de especies no mamíferas determina corrimientos químicos completamente

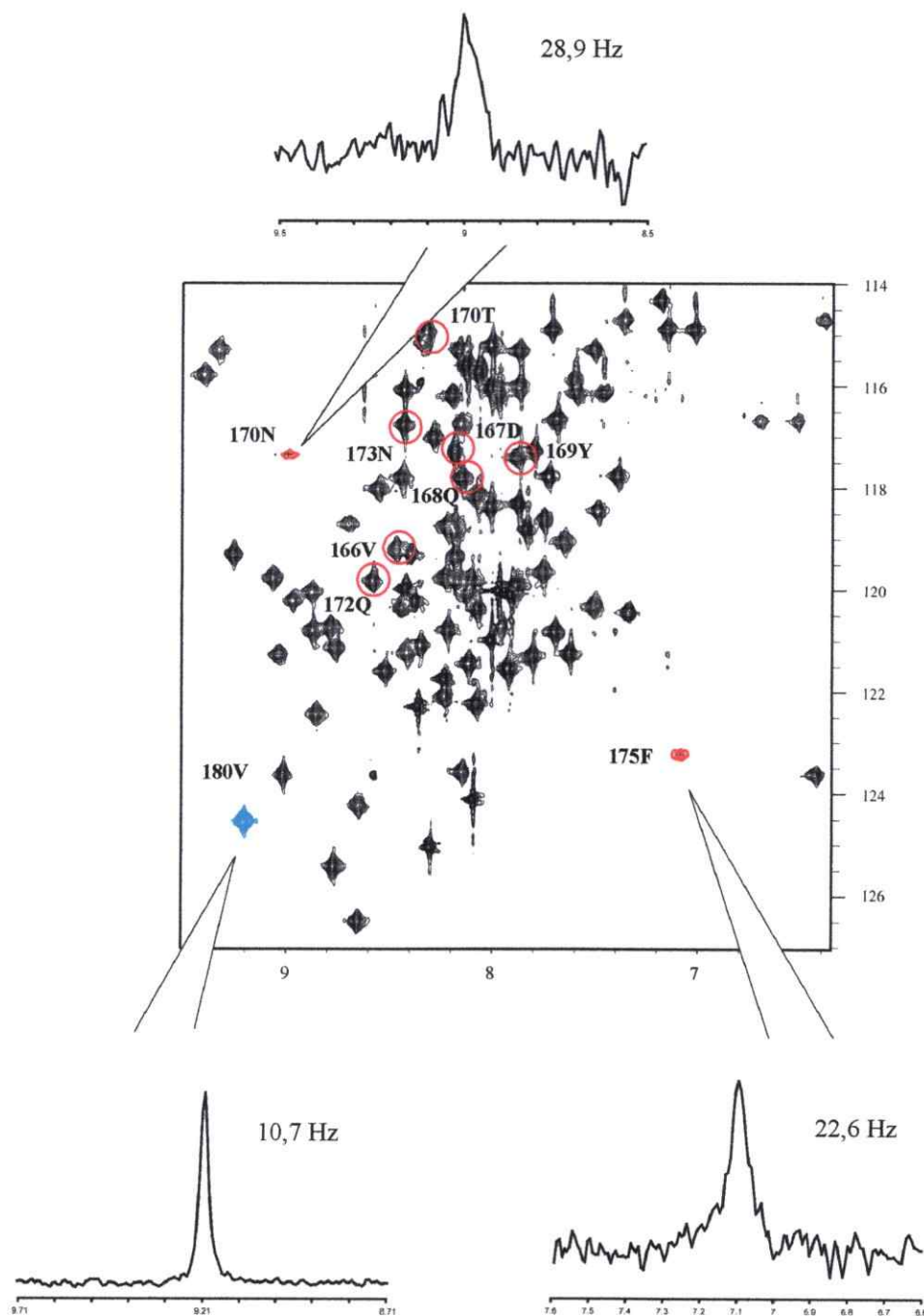


Figura 29. Espectro $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ HSQC de cePrP. El espectro se midió en una solución 1 mM de cePrP, acetato de Na 10 mM pH 4,5 y 10% D_2O . Con círculos rojos se destacan las resonancias del esqueleto carbonado de los residuos del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$. En rojo la resonancia del residuo F175 y en azul la del residuo V180. El ancho de línea para las señales de los residuos 170, 175 y 180 se midió como la mitad del ancho a la mitad de altura del pico.

distintos que no permiten analizar los datos en la forma en que se hace con homólogos de alta identidad.

Ancho de señales espectrales NOESY:

Un parámetro de comparación importante en los espectros es el ancho de la señal. Diversos factores pueden afectarlo, como aquellos que afectan el *tumbling* molecular, por ejemplo el peso molecular, la existencia de asociación oligomérica en la solución o dinámicas conformacionales locales.

Debido a que los espectros utilizados para extraer la información estructural fueron los espectros NOESY, se utilizó el espectro [$^1\text{H}, ^1\text{H}$] NOESY editado en ^{15}N para comparar el ancho de señal de cePrP, fcPrP, y ecPrP. Por su alto grado de conservación de corrimiento químico entre homólogos, se eligió la señal del residuo 180V (**figura 28**) para trabajar. Entre todas las señales NOE de la banda del residuo 180V, se eligió la señal cruzada NOE entre H_N 180V y H_N 181N (**figura 30**) para medir el ancho de la señal, ello debido a que V180 se encuentra en medio de la hélice α_2 , y en general la señal cruzada $\text{H}_{\text{Ni}}-\text{H}_{\text{Ni}+1}$ es una señal bien conservada en este tipo de estructura secundaria regular. El ancho de la señal tiene un valor comparable en la dimensión directa. Sin embargo la dimensión indirecta de ^1H mostró marcadas diferencias entre los espectros analizados. El ancho de señal en esta dimensión para ecPrP fue más del doble que el observado en cePrP y fcPrP.

El ancho de señal obtenido en ecPrP dice relación con el tiempo de evolución total (o tiempo de adquisición) en la dimensión indirecta de protones con que se midió el

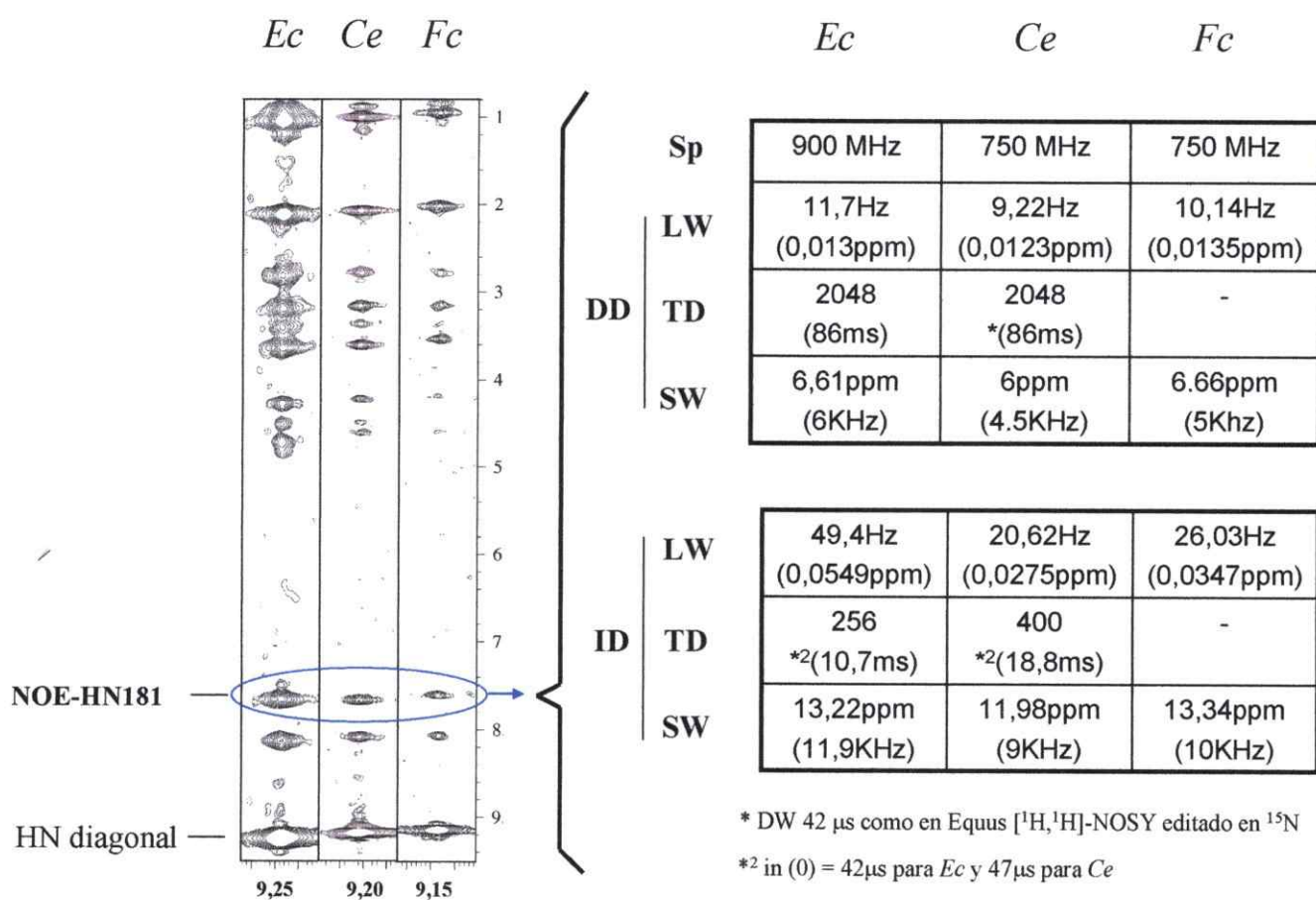


Figura 30. Comparación de resolución de NOESY para ecPrP, cePrP, y fcPrP. Las bandas de espectroscopia [$^1\text{H}, ^1\text{H}$] NOESY editada en ^{15}N corresponden a los corrimientos químicos de la señal de protones de amida del residuo 180V de las proteínas priónicas ecPrP, cePrP, y fcPrP. Los espectros fueron registrados en soluciones de acetato de Na 10 mM pH 4,5, en 10% D_2O a 20 °C. DD es la dimensión directa de protones, ID la dimensión indirecta, Sp es la frecuencia en protones del espectrómetro utilizado, LW el ancho de la señal, TD el dominio temporal en puntos complejos, y SW el barrido espectral.

experimento. El tiempo de adquisición mínimo en cualquier dimensión es aquél que permite registrar el decaimiento de la inducción libre (FID) hasta un valor igual o menor a A_0/e , donde A_0 es la intensidad inicial de la señal. El tiempo mínimo requerido corresponde a $1/(2\pi \text{lw})$, donde lw es el ancho natural de la señal y se determina en la dimensión directa. Para ecPrP el valor de $1/(2\pi \text{lw})$, correspondió a 11,7 Hz, y por lo tanto el tiempo mínimo de registro fue 13,6 ms. Sin embargo, el tiempo efectivo que se registró en el experimento fue de 10,75 ms. Así, el ancho de señal para ecPrP en la dimensión indirecta de protones, resultó ser el doble del obtenido para cePrP y fcPrP, ello debido a que el tiempo de evolución total utilizado fue inferior al mínimo requerido para no perder información y evitar un truncamiento fuerte de la señal, donde el truncamiento obtenido fue tratado con una función de ventana de \cos^2 .

Relación señal/ruido en espectroscopia NOESY:

Un parámetro importante que determina la sensibilidad con que serán detectadas las señales NOE es obviamente la relación de señal/ruido. La **figura 31** muestra el análisis realizado sobre los picos cruzados observados en el protón de amida del residuo 217Q en la hélice α_3 . Se observa que la razón señal/ruido en los espectros obtenidos para fcPrP es menos de la mitad de la razón señal/ruido obtenida para ecPrP y cePrP.

Como resultado final del análisis espectral se concluye que en las proteínas priónicas, debido al alto grado de identidad entre homólogos mamíferos, es posible tomar la información de asignación previa obtenida para una proteína del grupo mamífero, y utilizarla para asignar las resonancias de una segunda proteína del mismo grupo.

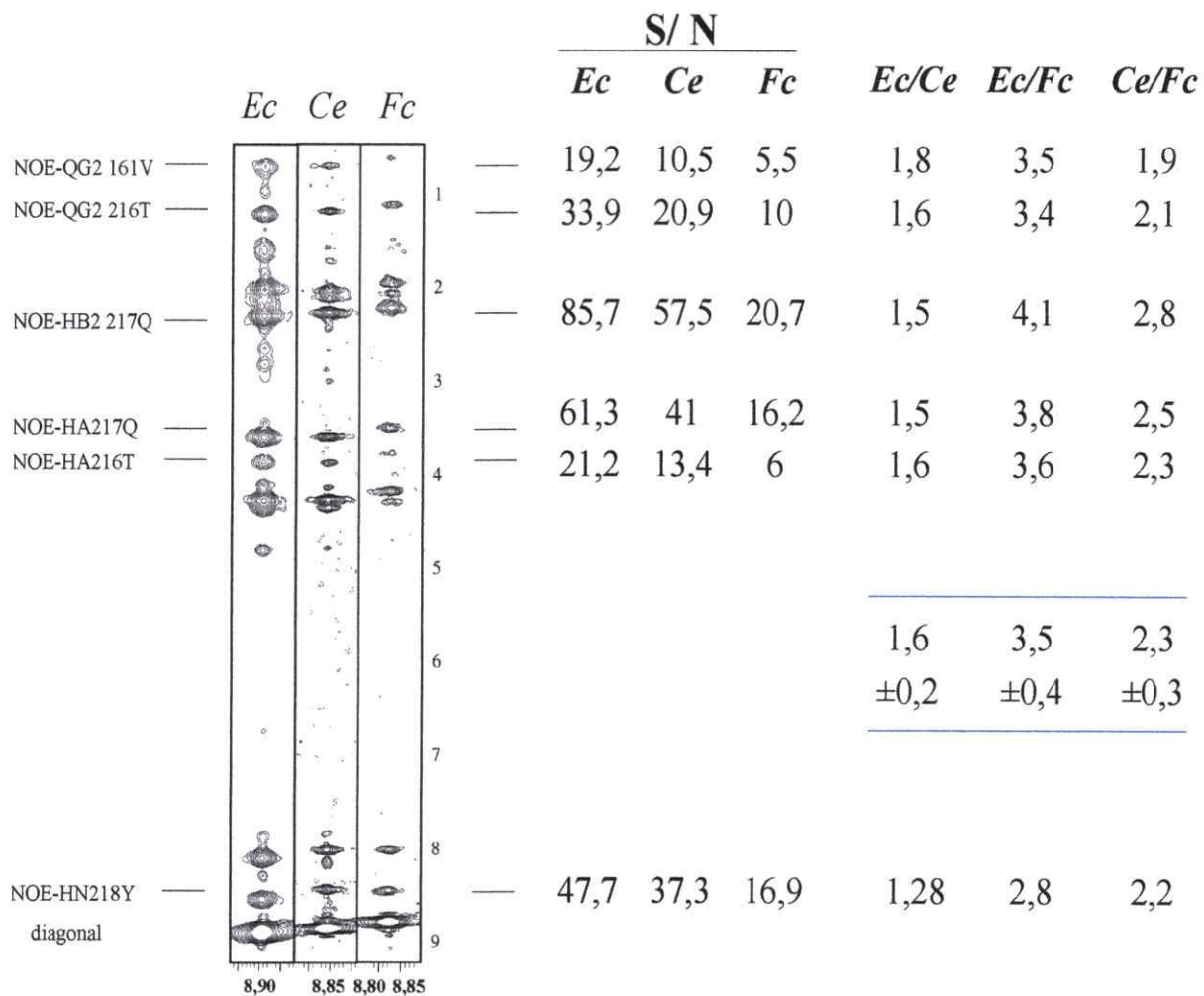


Figura 31. Comparación de señal/ruido para NOESY de ecPrP, cePrP y fcPrP. Las bandas de espectroscopia $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ NOESY editada en ^{15}N corresponden a los corrimientos químicos de los protones de amida del residuo 217Q de las proteínas priónicas de *Equus caballus* (*Ec*), *Cervus elaphus* (*Ce*), y *Felis catus* (*Fc*). Los valores de la razón señal/ruido (S/N) fueron calculados con el programa XEASY. Las columnas de la derecha muestran los valores obtenidos al dividir la señal/ruido de dos especies. En azul se muestra el promedio de las razones entre PrP de distintas especies con las desviaciones estándar respectivas.

4.2.3.1.2. Asignación de resonancias

Las asignaciones de resonancias de ecPrP (121–230) se realizó utilizando la información proveniente de la asignación de resonancias de la proteína priónica de bovino (btPrP). En la **figura 32** se muestra el resultado de la asignación de las resonancias del esqueleto carbonado en el experimento de triple resonancia HNCA de ecPrP. Para efectos comparativos, junto a la asignación de ecPrP se muestra la obtenida para *Xenopus laevis* PrP (xlPrP (99–226)), proteína homóloga de un grupo evolutivo lejano (anfibios), para la cual la asignación de resonancias se obtuvo utilizando una estrategia *de novo* (ver Materiales y Métodos).

En la **figura 32** se muestran las señales provenientes de residuos de dos sectores de la proteína, la hélice $\alpha 1$ (32A) y la región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ (32B). En la región $\alpha 1$ (31A) se puede apreciar señales fuertes en ambas proteínas, y los corrimientos químicos del carbono α para cada residuo observado tienen una desviación positiva respecto a los valores esperados para un ovillo aleatorio (**figura 33**). La región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ en cambio (**figura 32**), muestra resonancias intensas para xlPrP, en tanto que se observa ensanchamiento de las señales para ecPrP (resonancias 170 y 171). Este fenómeno se debe a que este *loop* experimenta intercambio lento entre distintas especies conformacionales (en la escala de tiempo de la diferencia en corrimiento químico entre dichas especies en el experimento de NMR).

En la **figura 33** se muestran las desviaciones de los corrimientos químicos de las señales de carbonos α respecto a los valores de ovillo aleatorio para las secuencias de ecPrP y xlPrP. Bajo ellas se muestra la predicción de estructuras secundarias esperadas

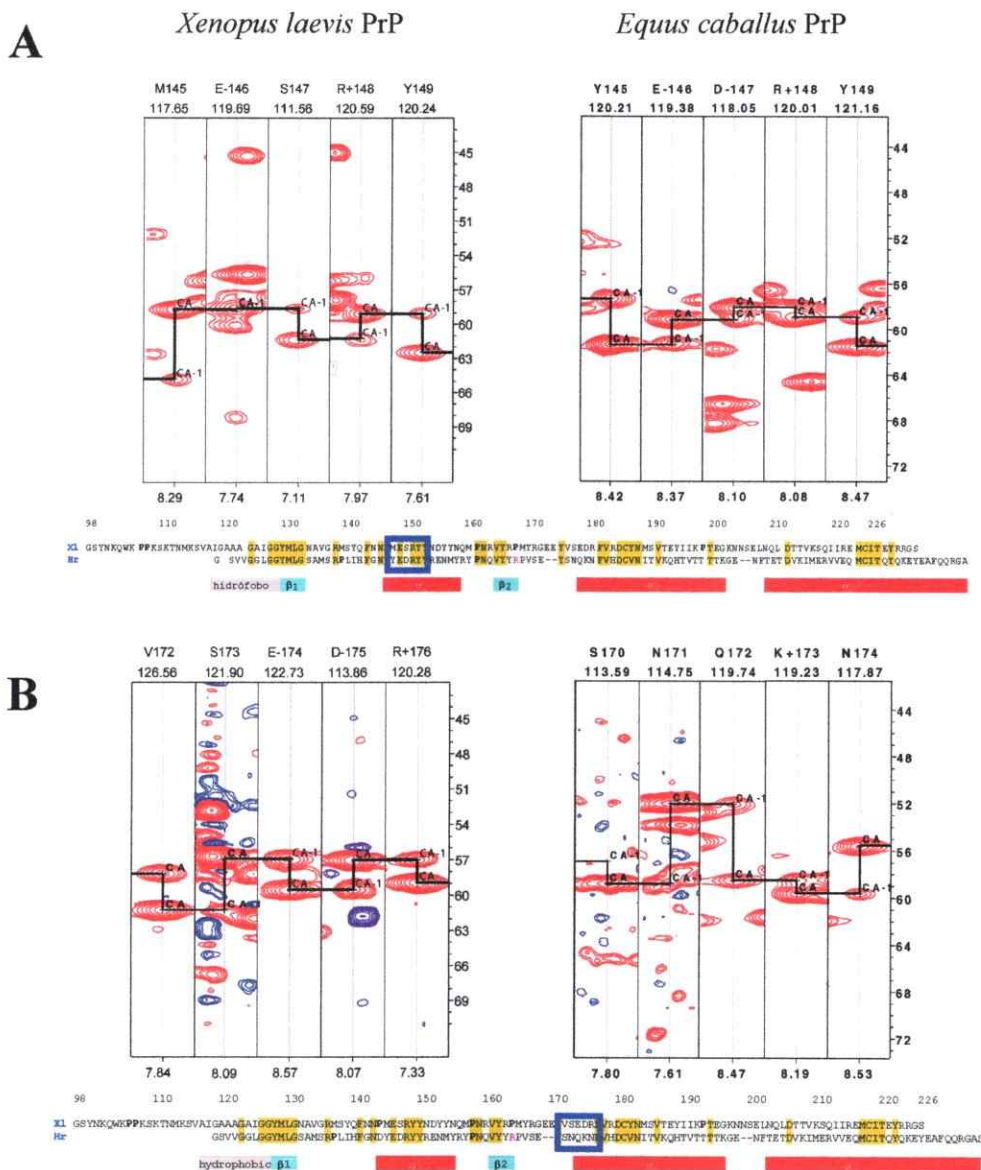


Figura 32. HNCA de ecPrP (121–230) y xIPrP (90–230). En **A** se muestra la región de secuencia de hélice α 1 de xIPrP (izquierda) y ecPrP (derecha). Las bandas espectrales contienen señales de resonancia de protones de amida (abscisa), carbonos α intraresiduo y del residuo precedente (ordenada), y nitrógenos de amida (tercera dimensión no desplegada) asignadas a los residuos que se indican. Bajo los espectros se muestra el alineamiento de ambas secuencias con la región desplegada en el espectro demarcada en azul. Los residuos idénticos se muestran destacados en amarillo. Bajo el alineamiento de la secuencia se indica las regiones de hojas beta (celeste), alfa hélices (rojo), y zona hidrófoba conservada (gris). **B** muestra las resonancias observadas en la región correspondiente al *loop* β 2- α 2 de PrP. Los experimentos se registraron en soluciones de 1 mM PrP, acetato de Na 10 mM pH 4,5 y 10% D₂O en la condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los parámetros de adquisición de los espectros se muestran en el **APÉNDICE II**.

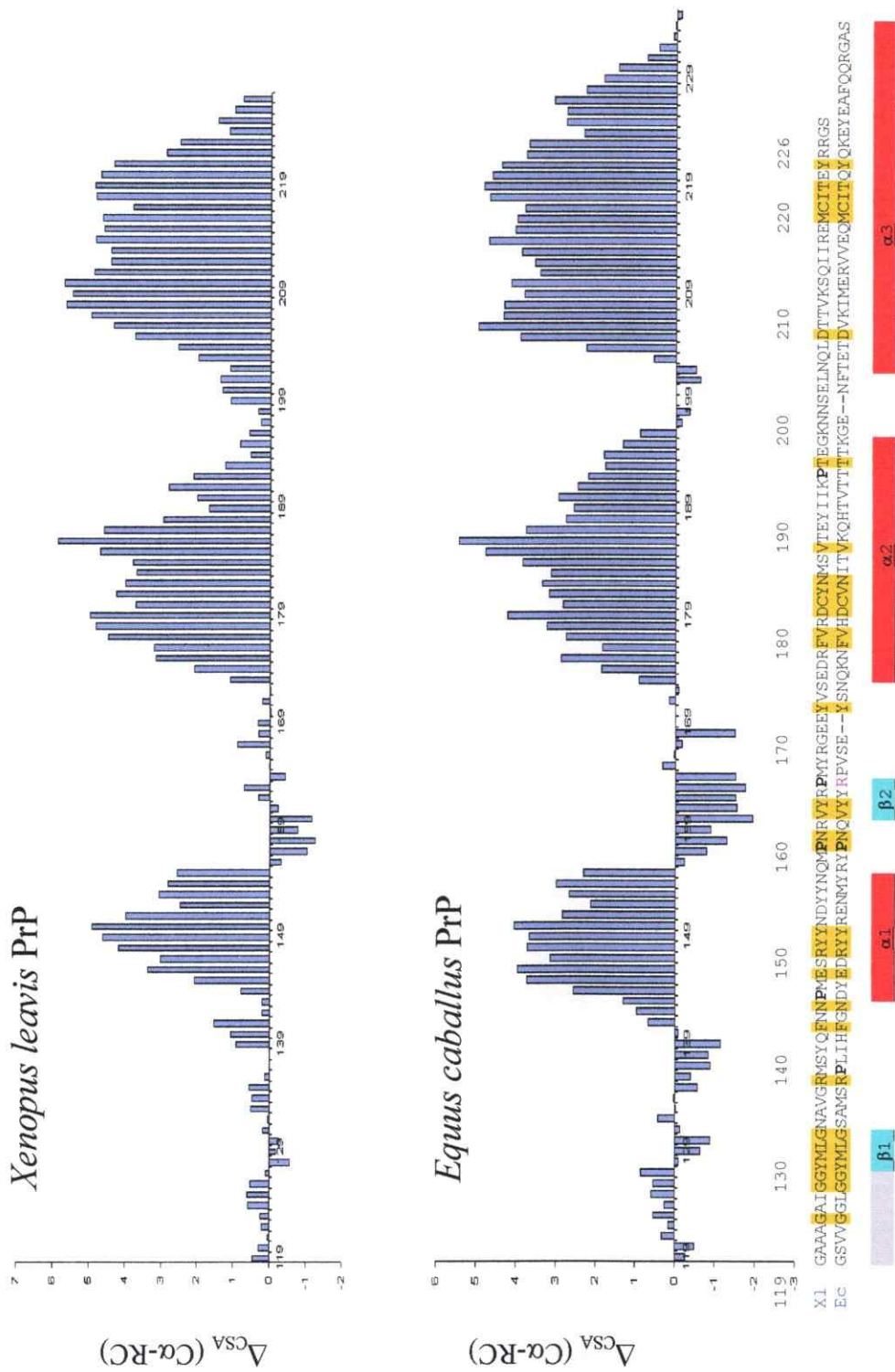


Figura 33. Desviaciones de corrimientos químicos observados de carbonos α respecto a los valores de ovillo aleatorio. Las diferencias en corrimientos químicos se grafican en función de la secuencia y se muestran alineadas. El esquema inferior muestra las estructuras secundarias presentes en los homólogos con estructura conocida según el alineamiento de secuencia. Los residuos destacados en amarillo corresponden a los segmentos con identidad de secuencia entre ecPrP y xlPrP.

en base al alineamiento con los homólogos de estructura conocida (figura 24). Las desviaciones de los corrimientos químicos muestran la presencia de estructuras secundarias en las regiones de secuencia esperadas para ambas proteínas estudiadas.

4.2.3.2. Cálculo de la estructura de ecPrP

Una vez completada la asignación secuencia-específica de las resonancias de protones (APÉNDICE III) se procesaron los datos de espectroscopia NOE con el paquete de programas ATNOS-CANDID-DYANA, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 5.

La figura 34 muestra el conjunto de restricciones de distancia de alcance corto y medio que se obtuvo del análisis de los espectros NOESY. La secuencia aminoacídica muestra las restricciones de alcance corto esperadas cuando la asignación de las resonancias es correcta ($d_{NN}(i,i+1)$; $d_{\alpha N}(i,i+1)$; $d_{\beta N}(i,i+1)$). Además, se observan las restricciones de alcance medio características de alfa hélices ($d_{NN}(i,i+2)$, $d_{\alpha N}(i,i+2)$, $(i,i+3)$, y $(i,i+4)$, y $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$). Estas restricciones se presentan entre los segmentos 144 a 156, 173 a 189, y 199 a 230.

En total 3202 restricciones estructurales significativas se obtuvieron en el ciclo siete del cálculo de estructura (tabla 5). La estructura consiste de un dominio globular que contiene tres hélices α , y una hoja beta que contiene dos cortas hebras β (figura 35A). La hélice $\alpha 1$ comprende los residuos 144–156 con la última vuelta que forma una hélice 3–10, la hélice $\alpha 2$ que comprende los residuos 173–192, y la hélice $\alpha 3$ que incluye los residuos 200 a 226 con la última vuelta que forma una hélice 3–10. Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$

Cantidad	Valor
Número de restricciones de distancia	3202
Número de restricciones de ángulo diedro	112
Función blanco residual, Å ²	1,97 ± 0,48
Violación de restricciones NOE Número ≥ 0.1Å Máximo, Å	30 ± 5 0,24 ± 0,09
Violación de ángulo residual Número ≥ 2.5 ° Máximo, °	0 ± 0 1,05 ± 0,58
Energías Amber, kcal/mol Total Van der Waals Electrostática	-4586,2 ± 83,2 -167,1 ± 16,2 -5354,4 ± 80,1
r.m.s.d. de la geometría ideal Largo de enlaces, Å Angulo de enlaces, °	0,0079 ± 0,0002 2,030 ± 0,112
r.m.s.d. a las coordenadas medias, Å ^b bb (125—226) ha (125—226)	0,37 ± 0,05 0,79 ± 0,06
Estadísticas de la gráfica de Ramachandran ^c Regiones más favorecidas (%) Regiones permitidas adicionales (%) Regiones generosamente permitidas (%) Regiones no permitidas (%)	83 17 0 0

Tabla 5. Datos de entrada para el cálculo estructural y caracterización de la estructura NMR energéticamente minimizada de *Equus caballus* PrP. Excepto para las dos primeras entradas de la tabla se muestra el promedio para los 20 estados conformacionales energéticamente minimizados con los residuales más bajos de la función blanco de DYANA y la desviación estándar entre ellos. **bb** indica los átomos del esqueleto carbonado N, C α , C γ ; **ha** indica todos los átomos pesados. Los números entre paréntesis indican los residuos para los que se calculó la r.m.s.d. Se usó el programa PROCHECK (Morris *et al.*, 1992).

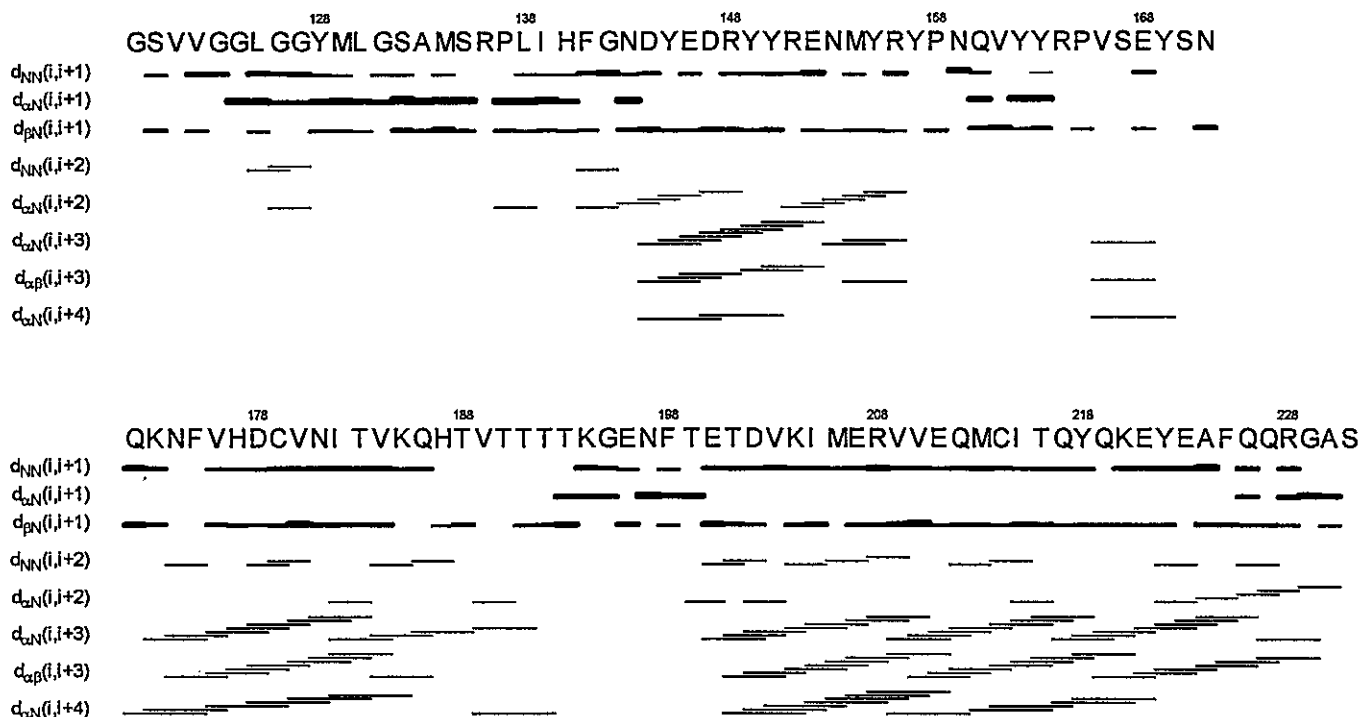


Figura 34. Restricciones de alcance medio y corto para el cálculo de estructura de ecPrP. Las barras y líneas negras se ubican bajo los residuos en que se observaron conectividades NOE. Las conexiones observadas involucran los protones de grupos amida en el esqueleto carbonado (d_{NN}); alfa y amida del esqueleto carbonado ($d_{\alpha N}$); beta y amida del esqueleto carbonado ($d_{\beta N}$). Las conexiones fueron observadas entre residuos contiguos ($i,i+1$), y a uno ($i,i+2$), dos ($i,i+3$), tres ($i,i+3$), y cuatro ($i,i+4$) residuos de distancia.

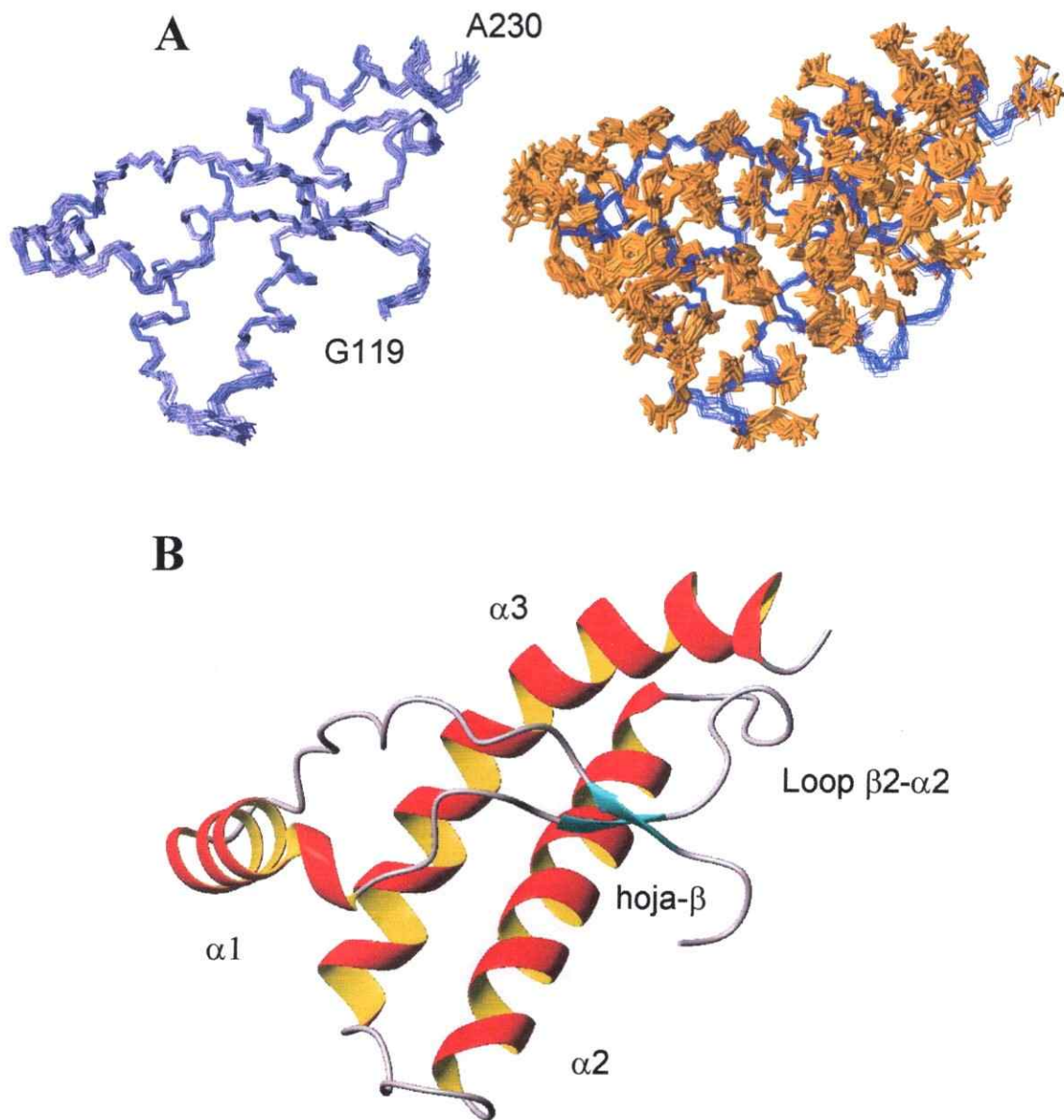


Figura 35. Estructura NMR de ecPrP (121–230). Sólo se muestran los residuos ordenados 125–230. **A.** A la izquierda se muestra el esqueleto carbonado del conjunto de 20 estados conformacionales con el valor más bajo de función blanco de DYANA. A la derecha se muestran las cadenas laterales del conjunto de 20 conformeros. Los estados conformacionales fueron alineados para el mejor ajuste de los heteroátomos del esqueleto carbonado de los residuos 125–230, con una r.m.s.d. de 0,37 Å. **B.** Representación de cinta de la estructura con el valor de función de blanco menor entre los 20 conformeros. Las tres hélices, $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ están coloreadas en rojo y amarillo, las hojas β en celeste, y los segmentos del dominio con estructura no regular en gris. Esta figura fue preparada con el programa MolMol (Koradi *et al.*, 1996).

están unidas por un puente bisulfuro entre los residuos C179 y C214. La superposición de las 20 estructuras está bien definida: los heteroátomos del esqueleto carbonado tienen una r.m.s.d. de 0,37 Å respecto a las coordenadas medias, y de 0,79 Å al considerar todos los heteroátomos entre los residuos 125 a 226 (ver **tabla 5** y **figura 35**).

4.2.3.3. Estudios de Relajación

Los datos de relajación muestran que los dos extremos de la proteína tienen tiempos de relajación T_1 y T_2 más largos que el resto de la proteína. En acuerdo con esto, los valores de $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronucleares son menores a 0,5 (**figura 36**). Estas regiones incluyen los residuos S120 a G127 y G226 a S231 en los extremos N- y C-terminal, respectivamente (donde el residuo S120 es un artefacto del procedimiento de clonación, ver Materiales y Métodos). El residuo I139 muestra un valor reducido en el $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear, junto a tiempos de relajación mayores, lo que indica que este residuo tiene una mayor flexibilidad cuando se compara con el resto de la proteína. Si se excluyen los residuos mencionados arriba, los parámetros de relajación promedio son $T_1 = 681 \pm 42$ ms, y $T_2 = 89 \pm 8,6$ ms, con un tiempo de correlación total τ_c de $7,82 \pm 1,2$ ns, y $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear de $0,73 \pm 0,05$.

4.2.3.4. Dependencia de la temperatura de los corrimientos químicos 1H_N

La posición de las 110 correlaciones 1H_N - ^{15}N del esqueleto carbonado fue monitoreada en $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -COSY en función de la temperatura (**figura 37**). La dependencia lineal de temperatura obtenida por regresión lineal se sustrajo de los corrimientos químicos observados en función de la temperatura. Los residuales

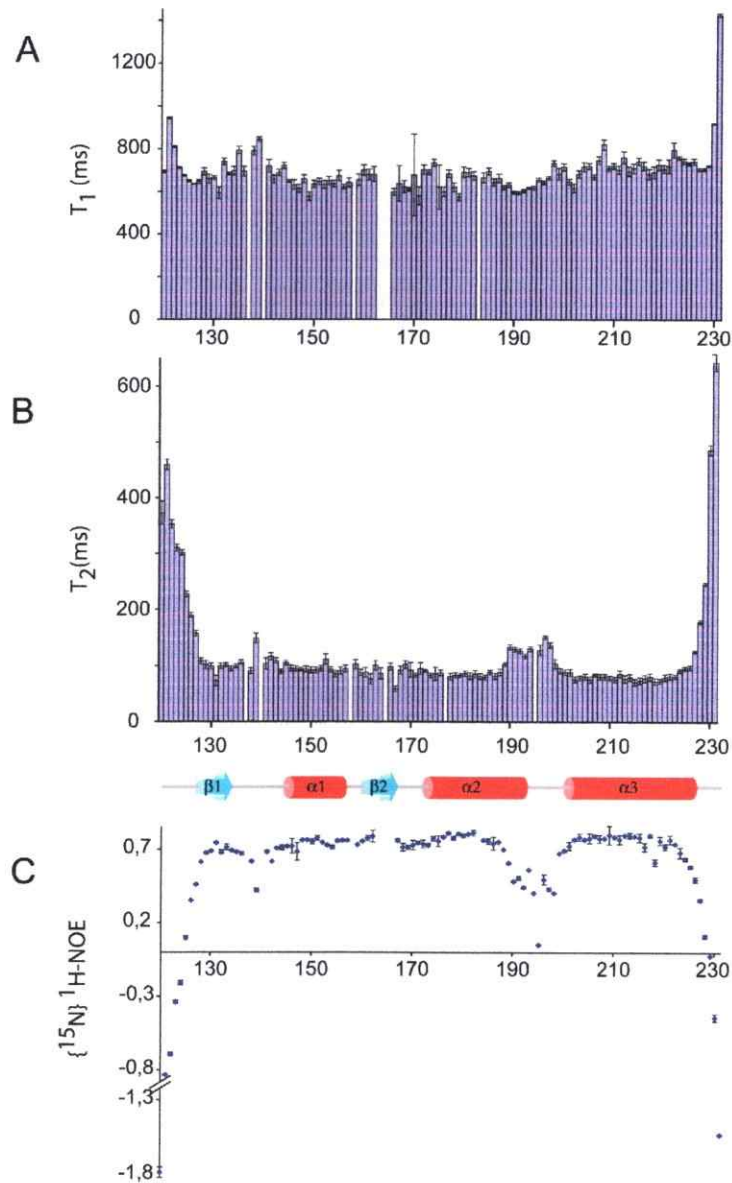


Figura 36. Movilidad interna de ecPrP (121–230) vs. residuo. Se muestran los tiempos de relajación longitudinal (A) y transversal (B) de las señales de amida del esqueleto carbonado. Las barras indican el error del procedimiento de ajuste. (C) ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -NOE de estado estacionario. Las barras de error corresponden a las diferencias observadas en dos mediciones independientes. Sobre la figura C se muestra la representación esquemática de los elementos de estructura regular presentes en la estructura, la hoja β en flechas celeste, y las hélices α en cilindros rojos. Las mediciones fueron hechas en una solución 1 mM de ecPrP marcada con ^{15}N , en H_2O 90%, D_2O 10%, y acetato de Na 10 mM a pH 4,5 y 25 °C.

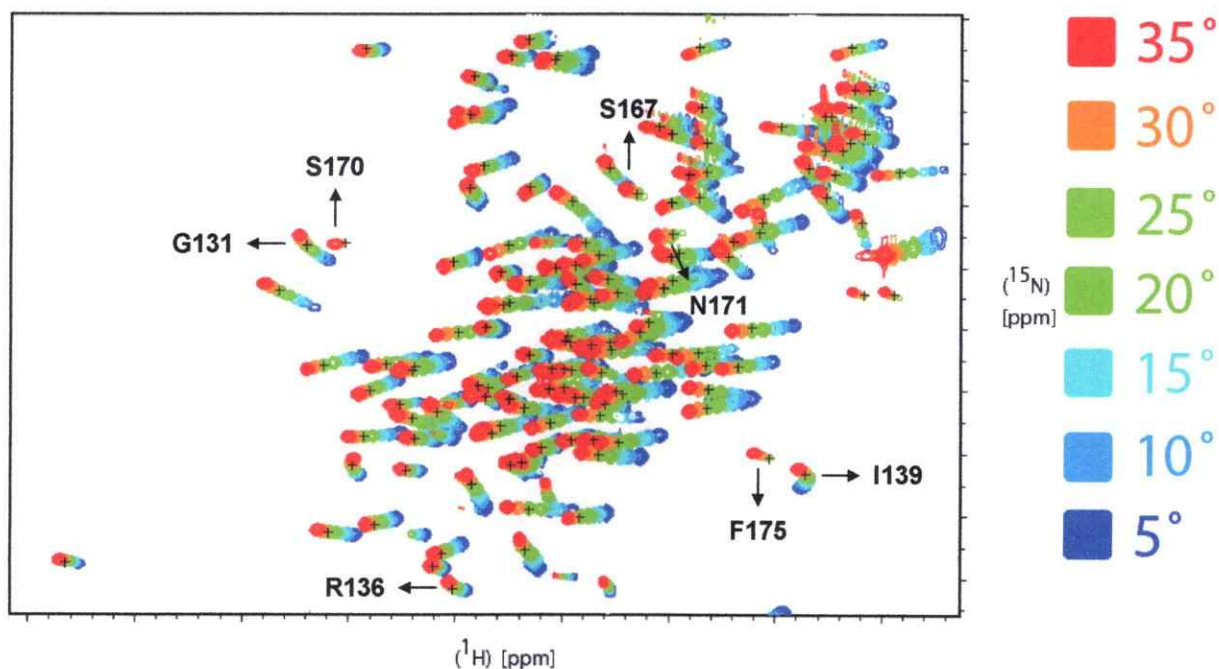


Figura 37. Espectro [^{15}N , ^1H]- COSY en función de la temperatura de ecPrP. El espectro fue registrado a una frecuencia de ^1H de 750 MHz. La superposición de los experimentos registrados se muestra con distintos colores; 5 °C (azul oscuro), 10 °C (azul), 15 °C (celeste), 20 °C (verde oscuro), 25 °C (verde claro), 30 °C (anaranjado), 35 °C (rojo). Se indican las posiciones de tres resonancias resueltas de la región del *loop* (S167, S170 y N171), F175 en la hélice α_2 , I139 y R136 en el *loop* que sigue la hebra β_1 , y G131 en la hebra β_1 . Las cruces indican la posición de las correlaciones a 25 °C. Los espectros fueron registrados en una solución de 1,3 mM de ecPrP, 90% H_2O , 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, y acetato de Na 10 mM a pH 4,5.

resultantes se ajustaron a un polinomio de segundo orden con un error de medición de corrimientos de protones calculado en 0,0067 ppm (**figura 38**). Con un intervalo de confianza de 95% se determina en qué medida el coeficiente de segundo orden del polinomio es significativamente distinto de cero.

Se encontró que 16 resonancias experimentan cambios no lineales de los corrimientos químicos cuando se varía la temperatura (**figura 39**). El comportamiento no lineal más pronunciado se observó para el residuo I139 (**figuras 40**) con un coeficiente de segundo orden de $1,25 \times 10^{-4}$ ppm/°C². La mayoría de los residuos que muestran cambios no lineales del corrimiento químico cuando se varía la temperatura, son residuos localizados en dos grupos (**figura 39**), a saber: el segmento polipeptídico comprendido entre el extremo N-terminal y la hélice α_1 (residuos G127, G131, A133, R136, L138, I139, y H140); y la hélice α_3 (residuos V210, E211, Q212, M213, Q217, y Y222). V166 en el N-terminal del *loop* β_2 - α_2 , T193 en el N-terminal del *loop* α_2 - α_3 , y T183 en el medio de la hélice α_2 , también muestran un comportamiento no lineal con la temperatura.

Adicionalmente, las resonancias pertenecientes a los residuos 167, 168, 170, y 171, todos localizados en el *loop* β_2 - α_2 , muestran un ensanchamiento de la señal cuando la temperatura se reduce. Estas señales desaparecen completamente bajo 20 °C (**figura 41**).

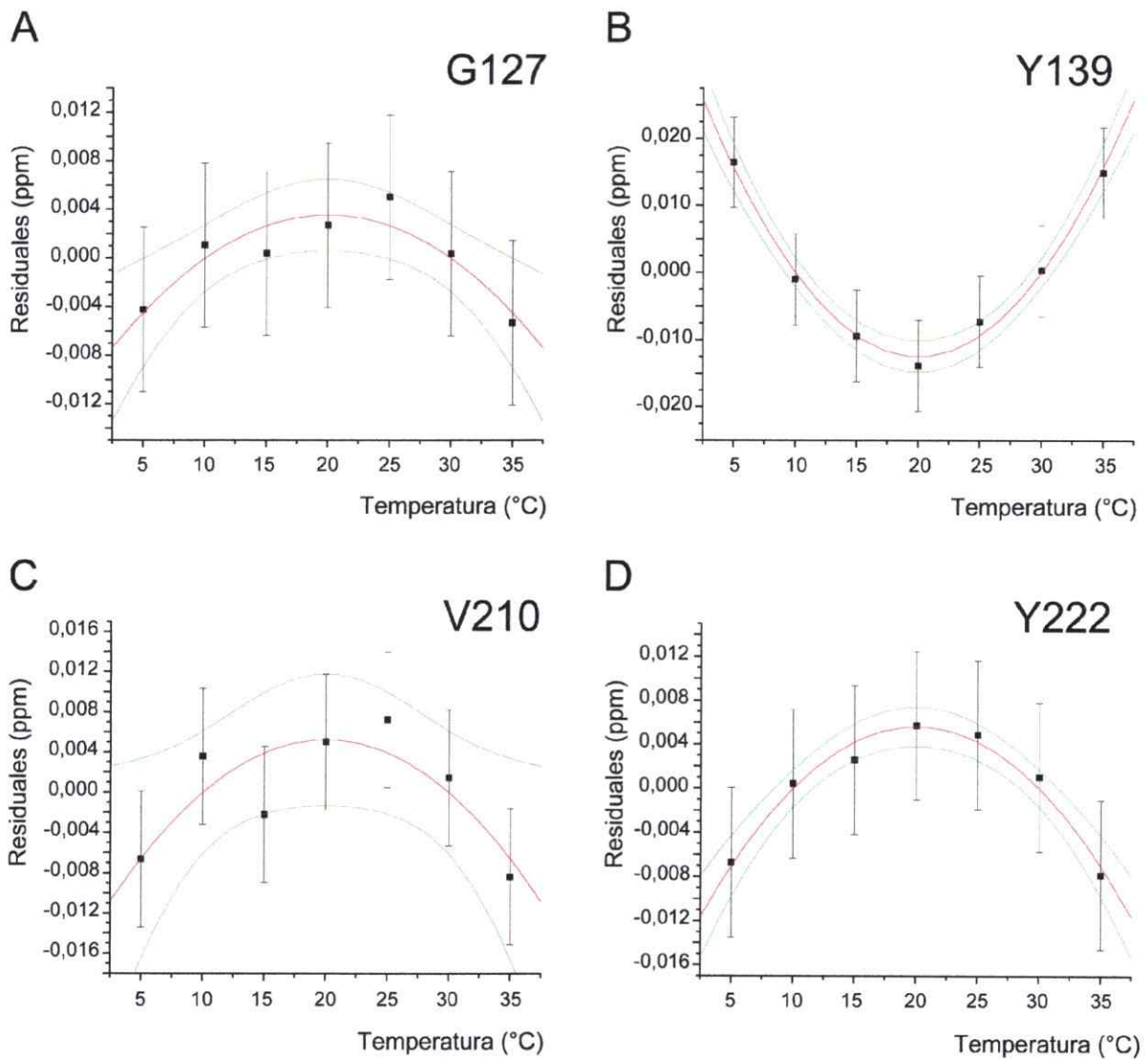


Figura.38. Residuales del ajuste lineal del cambio en los corrimientos químicos de protones en función de la temperatura. Las barras corresponden al error de medición. La línea roja es el ajuste cuadrático de los residuales, y las líneas verdes el intervalo de 95% de confianza del ajuste. Los ajustes fueron obtenidos con el programa Origin. Los datos fueron obtenidos para los residuos (A) G127, (B) I139, (C) V210, y (D) Y222.

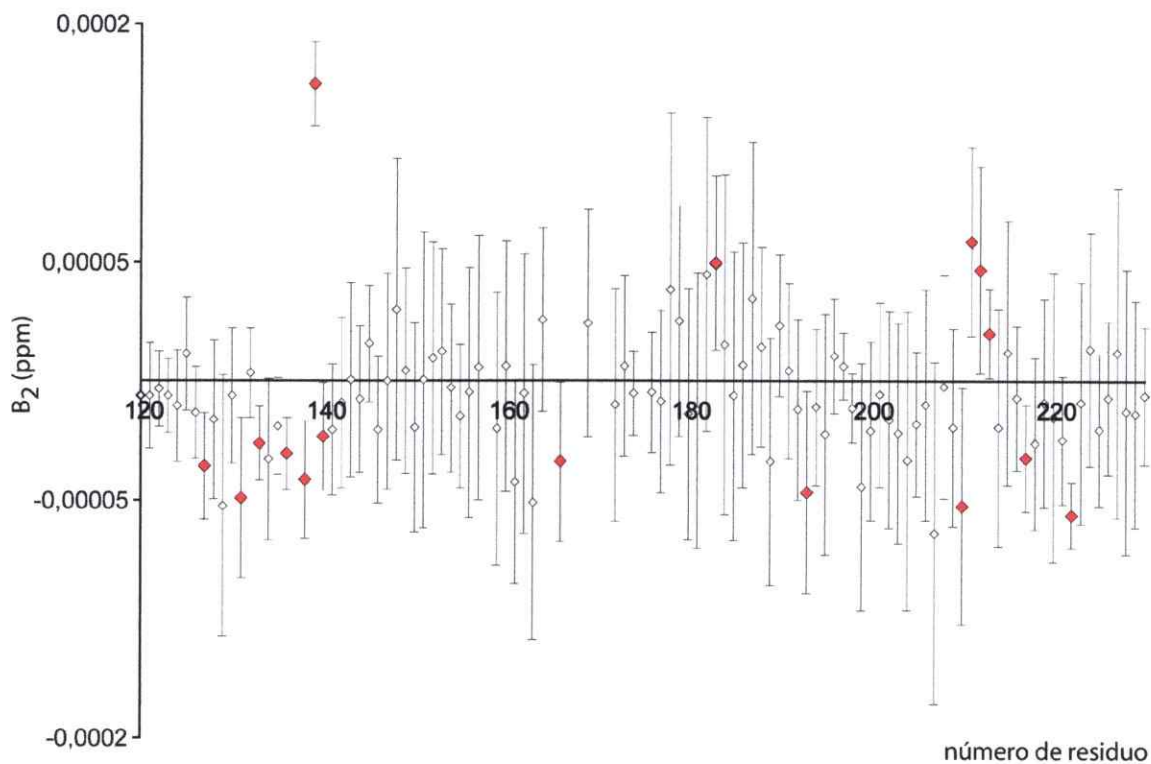


Figura 39. Coeficiente de segundo orden (B_2) en función de la temperatura. Las barras de error indican los valores de 95% de confianza superior e inferior que resultan del ajuste cuadrático del corrimiento químico con la temperatura. Rombos blancos indican aquellos residuos con un intervalo total que incluye un coeficiente de segundo orden igual a cero. Los rombos rojos indican residuos con coeficiente cuadrático distinto de cero con un 95% de confianza.

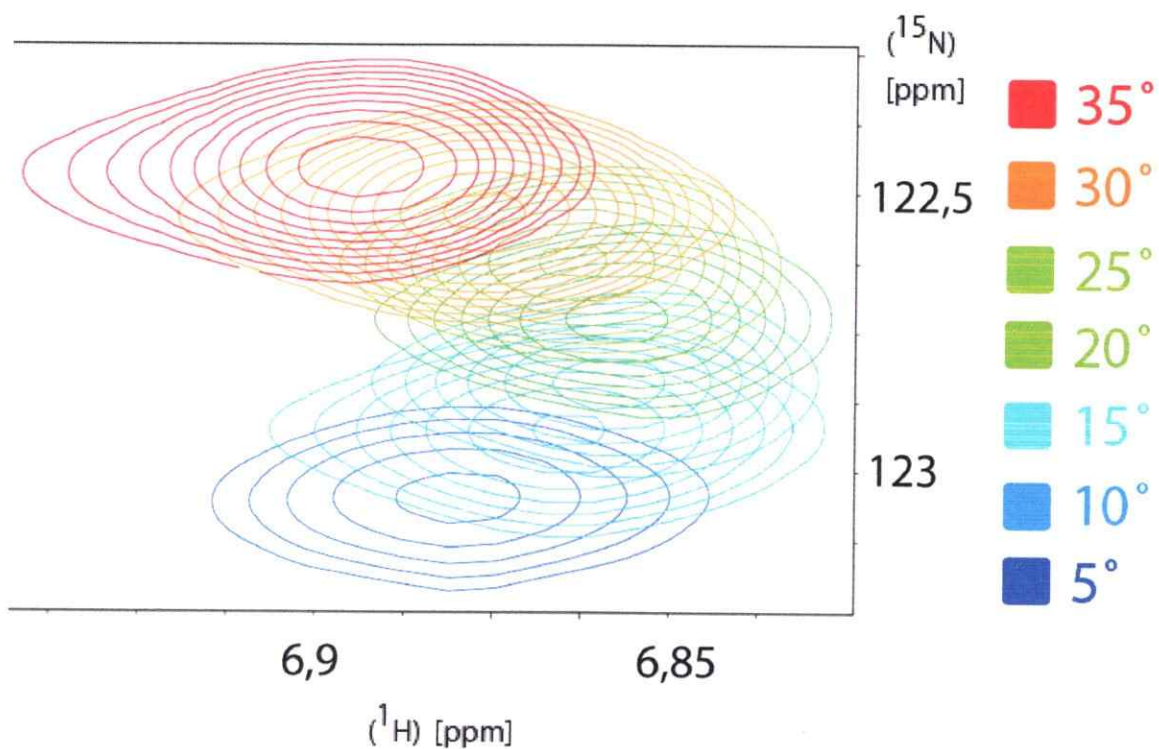


Figura 40. $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -COSY en función de temperatura de la resonancia de amida de I139. Los espectros fueron registrados a 750 MHz en ^1H . Se muestra la superposición de experimentos medidos a 5 °C (azul oscuro), 10 °C (azul), 15 °C (celeste), 20 °C (verde oscuro), 25 °C (verde claro), 30 °C (anaranjado), 35 °C (rojo). Los espectros fueron registrados con una solución 1,3 mM de ecPrP, 90% H_2O , 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, y acetato de Na 10 mM a pH 4,5.

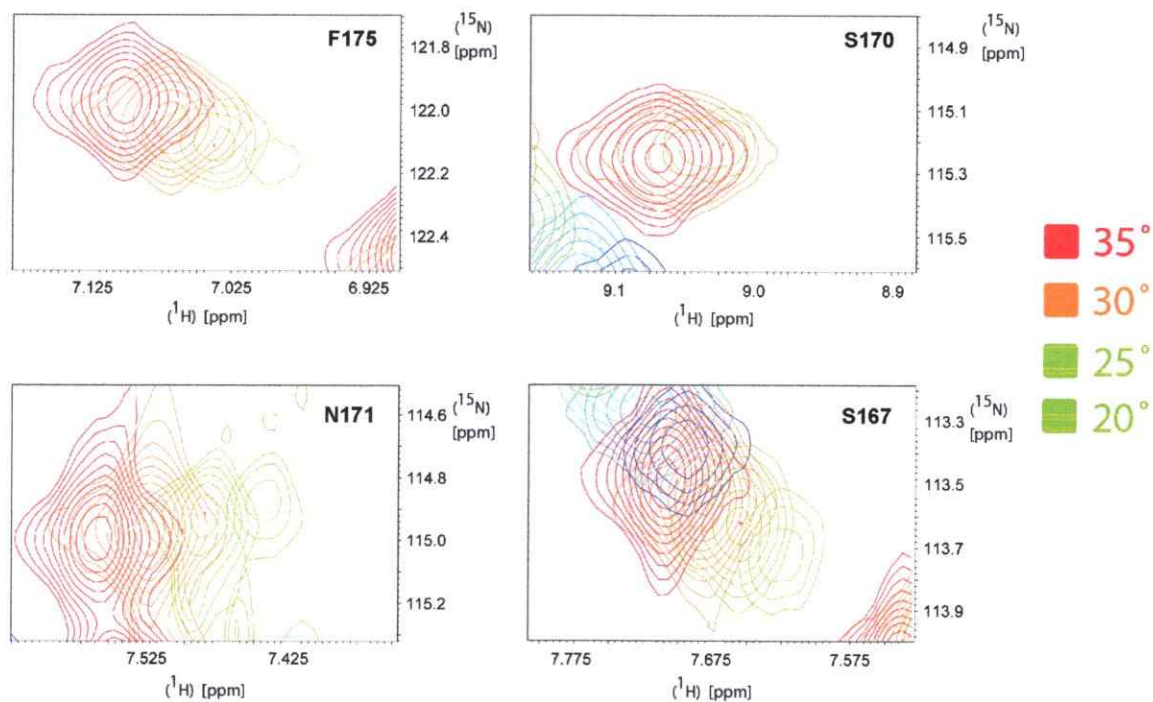


Figura 41. Dependencia de la temperatura de resonancias del *loop* $\alpha 2$ - $\beta 2$ y F175. Los espectros [^{15}N , ^1H]-COSY fueron registrados en función de la temperatura a 750 MHz ^1H . Los recuadros muestran una vista expandida de tres señales provenientes del *loop* $\alpha 2$ - $\beta 2$ más la resonancia de F175 localizada al comienzo de la hélice $\alpha 2$. Se muestra la superposición de los resultados de experimentos efectuados a 20 °C (verde oscuro), 25 °C (verde claro), 30 °C (anaranjado), 35 °C (rojo). Las cruces indican la posición de las correlaciones a 25 °C. Los espectros fueron registrados con una solución 1,3 mM de ecPrP, 90% H_2O , 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, y acetato de Na 10 mM a pH 4,5.

4.2.4. Discusión

4.2.4.1. Estados excitados de baja energía

Una aproximación experimental complementaria para caracterizar las diferencias entre PrPs se basa en la capacidad de NMR de describir no sólo información estructural del estado basal de las proteínas, sino también de entregar información acerca de la dinámica y las conformaciones alternativas que presenta la proteína.

Los tiempos de relajación T_1 y T_2 , y $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear fueron medidos para la proteína priónica de Hamster (Kuwata *et al.*, 2004), así como los cambios en los corrimientos químicos de los grupos amida en función de la presión, donde estos últimos experimentos dan cuenta de estados excitados de baja energía (Kuwata *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se estudiaron las conformaciones alternativas mediante el estudio de ensanchamiento de señales en función de la temperatura. Además se detectó la presencia de estados excitados de baja energía mediante el estudio de los cambios en los corrimientos químicos de los grupos amida en función de la temperatura. Para ello se midieron los espectros ^{15}N -HSQC a distintas temperaturas y se identificaron las resonancias que mostraron un desplazamiento no lineal dependiente de temperatura. Estas resonancias pertenecen a residuos que pueblan conformaciones alternativas en intercambio rápido con el estado conformacional basal (todo ello en la escala de tiempo del corrimiento químico), y cuyas energías libres relativas al estado basal cambian como función de la temperatura (Reed *et al.*, 1988; Delepierre *et al.*, 1991). El valor del corrimiento químico de estos residuos en intercambio rápido de conformaciones, no es más que el simple promedio de los corrimientos químicos de cada uno de los estados, los

que son fácilmente accesibles a temperatura ambiente en solución (Baxter *et al.*, 1998). Las mayores desviaciones de la linealidad de las resonancias amida en el esqueleto carbonado, en función de la temperatura, están asociadas con cambios en el patrón de puentes de hidrógeno debido a la generación de estados excitados de baja energía y cuyas poblaciones son mayores que 5%.

Los residuos observados que presentan un comportamiento no lineal de los corrimientos químicos de grupo amida en función de la temperatura pueden ser agrupados, de acuerdo a su localización en la estructura en: a) comienzo del *loop* $\alpha 2$ - $\alpha 3$; b) en la región que conecta las estructuras secundarias regulares $\beta 1$ y $\alpha 1$; c) en la hélice $\alpha 3$; y d) en la posición N-terminal del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$.

A continuación se discute acerca de la probable naturaleza de las conformaciones alternativas observadas para los residuos en las regiones mencionadas.

a) T193 se localiza en la posición N-terminal del *loop* que conecta las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Estudios previos han descrito movimientos de bisagra en las posiciones extremas de regiones de un *loop* (Baxter *et al.*, 1998). Los estudios de relajación muestran que a 20 °C la región completa del *loop* $\alpha 2$ - $\alpha 3$ presenta una dinámica en la escala de nanosegundos (**figura 36**). Por lo tanto, las conformaciones alternativas observadas en este residuo probablemente sean generadas por movimientos de tipo bisagra presentes desde los 20 °C.

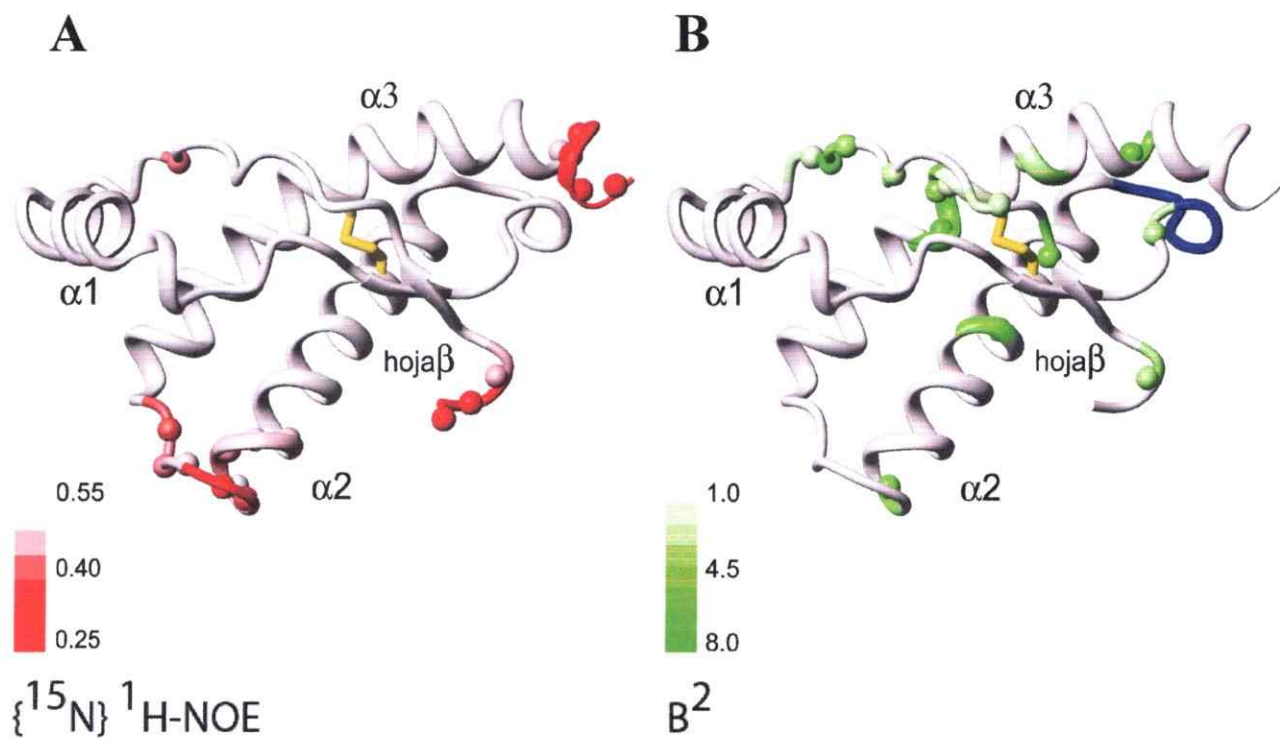


Figura 42. Dinámica y estados conformacionales alternativos en ecPrP. El esqueleto carbonado de ecPrP (125–230) es representado como un tubo gris engrosado que muestra la estructura secundaria de hélice y flechas delineando las hebras beta. Las posiciones de segmentos de estructura secundaria y de N y C-terminal están indicadas. El puente disulfuro se muestra en amarillo. (A) En tonos rojos se indican los residuos con valores de $\{^{15}\text{N}\}^1\text{H-NOE}$ heteronuclear menores que 0,5. Las esferas indican la posición de respectivos átomos de nitrógeno del esqueleto carbonado. (B) En tonos verdes se muestran aquellos residuos que manifiestan un comportamiento no lineal de los cambios de corrimiento químico dependientes de la temperatura. En azul se destaca el segmento que contiene las resonancias de grupo amida que se ensanchan y desaparecen al reducir la temperatura bajo 20 °C.

b) Los residuos G127, G131, A133, R136, L138, I139, y H140, localizados en el segmento polipeptídico que conecta las estructuras secundarias regulares $\beta 1$ y $\alpha 1$, también muestran dependencia no lineal con la temperatura. (figura 39). Con excepción de I139, los estudios de relajación muestran que estos residuos no son particularmente flexibles a 20 °C, por lo tanto la aparición de estados excitados alternativos es un evento que ocurriría al elevar la temperatura por sobre los 20 °C (Baxter *et al.*, 1998). I139 representa un caso interesante, puesto que los estudios de dinámica muestran que este residuo sí experimenta dinámica en la escala de nanosegundos a 20 °C (figura 36). Además este residuo muestra la dependencia no lineal más pronunciada de todos los residuos en la proteína. Los resultados sugieren que, estando localizado en la región que conecta $\beta 1$ y $\alpha 1$, este residuo actuaría como bisagra en movimientos que podrían implicar la región N-terminal de la proteína.

c) Los residuos Q217 y Y222 pertenecen a la hélice $\alpha 3$. El segmento 210–213 en la hélice $\alpha 3$ también muestra dependencia no lineal de las resonancias de amida respecto de la temperatura. Debido a la cercanía de estos residuos con el puente bisulfuro C179–C214, no se puede descartar el que una fracción de la población haya experimentado una isomerización del puente bisulfuro y pueda actuar como fuente de conformaciones alternativas en este segmento.

d) El residuo V166 está localizado en el N-terminal del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$. Varias resonancias pertenecientes a este *loop* muestran ensanchamiento de las señales que son dependientes

de la temperatura (figura 41) lo que sustenta la existencia de conformaciones alternas en la escala de milisegundos.

Estos resultados que muestran conformaciones alternativas de la región N-terminal y de la hélice $\alpha 3$, son complementarios a los descritos en un estudio previo con PrP de hamster para los corrimientos de grupos amida en función de la presión (Kuwata *et al.*, 2002). Tales estudios, realizados a pH 5,2 y a 30 °C, proponen la existencia de un intermediario de desplegamiento con las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ inestables, donde los residuos 210, 213, 217, y 220 mostraron las mayores inestabilidades. Estos estudios también proponen movimientos de bisagra para los residuos 138, 140, 157, 163, 193, y 211 en la proteína plegada, y sugieren la existencia de conformaciones alternativas para la región N-terminal y la hélice $\alpha 3$ observadas en el presente trabajo.

4.2.4.2. Comparación con PrP de otros mamíferos

La comparación de las estructuras de proteínas priónicas de mamíferos entrega información acerca de las diferencias que pudieran generar la barrera interespecies y determinar la propensión a la formación de priones. Sin embargo, las proteínas priónicas muestran estructuras muy similares, y presentan sólo diferencias sutiles que involucran regiones moleculares muy restringidas.

Al comparar la estructura tri-dimensional de ecPrP con PrPs de otras especies mamíferos, se observan dos regiones de interés: el *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ y el final de la hélice $\alpha 3$.

Estudios anteriores (Grossert *et al.*, 2005) demuestran que el *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ presenta heterogeneidad conformacional entre PrPs de distintas especies. En la mayor parte de las

estructuras determinadas de PrPs, este *loop* tiene una estructura menos definida al ser comparada con la de otras regiones de la proteína. La estructura de ecPrP determinada en este trabajo muestra un *loop* $\beta 2-\alpha 2$ muy bien definido, donde todas las resonancias provenientes de este *loop* son posibles de observar en espectros NMR, características encontradas hasta ahora sólo en la PrP de ciervo. Sin embargo, los picos de resonancia provenientes del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ de ecPrP se agudizan por sobre los 30 °C y se ensanchan hasta desaparecer cuando la temperatura desciende bajo 20 °C, lo que sugiere que la disminución de la temperatura desencadena un movimiento en la escala de milisegundos en esta región.

Al comparar las estructuras de PrPs de distintos mamíferos se observa que la región C-terminal de la hélice $\alpha 3$, a partir del residuo 220, muestra marcadas diferencias en su orientación y definición (Riek *et al.*, 1996; Zahn *et al.*, 2000; Calzolari *et al.*, 2000). En ecPrP la hélice $\alpha 3$ muestra un alto grado de definición hasta el residuo 226, con una curvatura marcada que permite al extremo C-terminal de esta hélice acercarse al *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Siete de las veinte estructuras calculadas muestran contactos de van der Waals entre las cadenas laterales de la hélice $\alpha 3$ y la región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. S167 hace contacto con F225 y Q226, y Y218 con Q172. La posición S167 es una sustitución presente únicamente en ecPrP. El hecho que la cadena lateral de este residuo participe en los contactos observados entre el *loop* y la hélice sugiere que esta sustitución única es la que permite la estabilización del *loop* mediante interacciones de tipo hidrofóbico con la hélice $\alpha 3$. Más aún, si bien la estructura del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ está bien definida en PrP de ciervo (con N en posición 167), en este caso la hélice $\alpha 3$ no está doblada como en ecPrP

y no se observan contactos de van der Waals entre ambas regiones (Grossert *et al.*, 2005).

Las resonancias que experimentan ensanchamiento y desaparición dependientes de la temperatura se encuentran en el *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$, una región que junto al extremo C-terminal de la hélice $\alpha 3$, son las únicas regiones de la proteína que muestran heterogeneidad estructural entre PrPs de distintos mamíferos. Los estados de baja energía podrían constituir una característica distintiva entre los PrPs de distintas especies, modular su interacción con el factor X, y determinar en qué medida la barrera interespecie puede ser sobrepasada. La caracterización de estas conformaciones alternativas de proteínas priónicas provenientes de otros mamíferos o mutantes de los mismos, y la subsiguiente comparación entre ellas, puede revelar las propiedades de estos estados excitados de baja energía y revelar características importantes de la conversión de PrP^C a PrP^{SC}.

4.3. VARIANTES DE *MUS MUSCULUS* PrP EN EL

LOOP $\beta 2$ - $\alpha 2$

4.3.1. Introducción

Las estructuras de las proteínas priónicas muestran un plegamiento global muy similar caracterizado por la presencia de un tallo flexible no estructurado de 100 residuos en el extremo N-terminal, unido a un dominio globular en el C-terminal. El dominio globular muestra variabilidad estructural localizada entre las distintas especies. Una de las regiones que muestran diferencias entre las distintas especies es el *loop* de residuos 167–171, que une la hoja $\beta 2$ con la hélice $\alpha 2$. Este segmento varía en el grado de definición estructural de una especie a otra.

El *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ permanece expuesto al solvente incluso en presencia de los azúcares unidos post-traduccionalmente (Rudd *et al.*, 2001). Esta región ha sido identificada como posible epítipo de interacción con un factor hasta ahora desconocido, codificado por el huésped y que se ha denominado como "factor X" (Kaneko *et al.*, 1997a). Esta molécula desconocida ha sido propuesta como mediadora de la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, y está involucrada en la barrera interespecies (Telling *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997b).

En ciervo, dos sustituciones en la secuencia del *loop* (S170N, N174T) dan cuenta de un *loop* bien definido, para el cual todas las resonancias del esqueleto carbonado son observables (Gossert *et al.*, 2005). En contraste, un desorden estructural pronunciado en este *loop* se observa en la PrP^C de otras especies de mamíferos (Riek *et al.*, 1996; López-

García *et al.*, 2000; Zahn *et al.*, 2000; Lysek *et al.*, 2005), donde se pierden un número de resonancias NMR del esqueleto carbonado. Resultados preliminares con ratones transgénicos demuestran que la inclusión de dos sustituciones en el *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$, ambas provenientes de la secuencia de príon de ciervo, producen la inducción espontánea de la enfermedad priónica, sin necesidad de inocular el agente infeccioso. En qué medida las características estructurales del *loop* con secuencia de PrP de ciervo son determinantes en el fenotipo, es un tema que requiere ser investigado. Por esa razón, profundizamos la investigación para develar las características estructurales de la región del *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se determinó la estructura del príon de caballo ecPrP (ver sección 4.2). Una característica particular de esta estructura fue la alta definición del *loop* $\alpha_2\text{-}\beta_2$, constituyéndose así en la segunda estructura de proteína priónica (luego del príon de ciervo cePrP) en mostrar un '*loop* rígido' en el cálculo de la estructura.

En esta tercera parte del trabajo de tesis se investigan las determinantes moleculares de la estructura y estabilidad del *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$. Se usa como modelo el príon de ratón (mmPrP) cuyo *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$ no está definido en las estructuras NMR. En el esquema de la **figura 43** se muestran las posiciones en la secuencia del *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$ de mmPrP que presentan sustituciones en ecPrP. Esta última proteína presenta un *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$ de estructura bien definida. En esta sección del trabajo se generaron variantes de la PrP de ratón que contienen las sustituciones presentes en ecPrP. Estas variantes de mmPrP con '*sustituciones equinas*', mostradas en azul en la **figura 43** tienen por objeto estudiar la naturaleza del intercambio conformacional que experimenta región del *loop* $\beta_2\text{-}\alpha_2$. En la

figura además se destaca la posición de la Y169 (en anaranjado) que se postula como el residuo que otorga la estabilidad a la región del β 2- α 2 postulada como el residuo estabilizante del loop β 2- α 2. En este trabajo se diseñó un segundo grupo de mutantes que incluyen sustituciones en la posición Y169. Estas mutantes fueron producidas para investigar la estabilización global de la estructura del *loop*.

	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
secuencia loop β2-α2 en mPrP	V	D	Q	Y	S	N	Q	N	N	F	V
Substituciones de equino			S	E				K			
Substitución desestabilizante				(F, A, G)							

Figura 43. Sitios de sustituciones en la secuencia del *loop* β 2- α 2 del prión de ratón mmPrP. En negro, la secuencia del segmento 166–176 de la proteína priónica de ratón (mmPrP). En azul se muestran los residuos incluidos en el *loop* de ratón, todos ellos sustituciones presentes en la secuencia del *loop* de caballo (ecPrP). En anaranjado se muestran las sustituciones realizadas para reemplazar la Y169.

4.3.2. Objetivos

Obtención, purificación y caracterización de la estructura de variantes del prión de *Mus musculus* (mmPrP) con modificaciones en la secuencia del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$.

i) Expresión y purificación:

- Subclonamiento del cDNA de PrP de *Mus musculus* (mmPrP): A partir del cDNA de mmPrP cepa silvestre se generaron las mutantes para la región del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$. Mediante mutagénesis sitio-dirigida se sustituyeron los residuos de la secuencia de mmPrP por los correspondientes a ecPrP para esta región.

- Purificación: La proteína se obtuvo mediante sobreexpresión en *E. coli* DE3.

ii) Registro de espectros NMR.

- Registro de espectros de correlación cuántica simple (HSQC). ^1H - ^{15}N -COSY, y ^{13}C HSQC para regiones alifática y aromática.

- Registro de espectros de triple resonancia: HNCO, HNCACO, y HNCA, para este efecto se trabajó con una muestra de mmPrP marcada con ^{15}N y ^{13}C .

- Registro de [^1H , ^1H] NOE editados en: ^{15}N , ^{13}C alifáticos y ^{13}C aromáticos.

- Registro de espectros de correlación: HCcH-TOCSY y ^{15}N -TOCSY.

iii) Asignación. Se utilizó como base la asignación previa de las señales de mmPrP cepa silvestre para asignar las resonancias de las mutantes. Se trabajó con el programa de visualización CARA.

iv) Cálculo de la estructura tridimensional semi-automatizado con los programas ATNOS-CANDID-DYANA (ver Materiales y Métodos).

v) Refinamiento de la estructura.

4.3.3. Resultados

4.3.3.1. Bioquímica

Las variantes producidas para el *loop* β 2- α 2 de ratón se pueden dividir en dos grupos: las que incluyen sólo sustituciones con residuos provenientes de la secuencia del príon de caballo, y el segundo grupo que contiene sustituciones en la posición de la Y169 (figura 43). Los nombres y posiciones de sustitución de las proteínas mutantes de mmPrP se muestran en la tabla 6.

Sustituciones equinas		Sustituciones que incluyen Y169	
nombre	reemplazo	nombre	reemplazo
S	mmPrP [D167S]	SGK	mmPrP [D167S, Y169G, N173K]
E	mmPrP [Q168E]	SAK	mmPrP [D167S, Y169A, N173K]
K	mmPrP [N173K]	SA	mmPrP [D167S, Y169A]
SE	mmPrP [D167S, Q168E]	SF	mmPrP [D167S, Y169F]
SK	mmPrP [D167S, N173K]	SFK	mmPrP [D167S, Y169F, N173K]
EK	mmPrP [Q168E, N173K]		
SEK	mmPrP [D167S, Q168E, N173K]		

Tabla 6. Variantes de la PrP de ratón. En ambas columnas se muestra el nombre abreviado para cada mutante y a su derecha la sustitución en la secuencia del *loop* de ratón. El nombre abreviado corresponde a la letra del aminoácido incluido en la mutación.

Luego de realizada la mutagénesis sitio-dirigida, las mutantes fueron expresadas en *E.coli* y purificadas a homogeneidad. La **figura 44** muestra las concentraciones solubles finales obtenidas para cada mutante en la solución de medición de NMR.

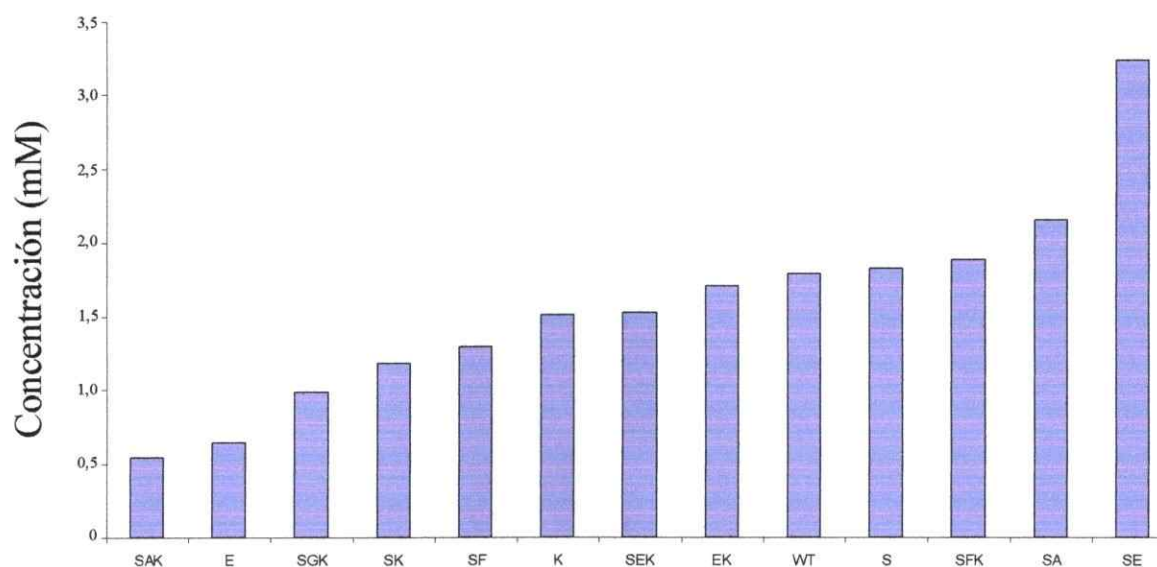


Figura 44. Concentración de proteínas variantes de mmPrP solubles en la muestra de NMR. Cada solución fue preparada en 90% H₂O, 10% ²H₂O, acetato de Na 10 mM, azida de Na 1 mM, a pH 4,5. El nombre abreviado de cada mutante se indica bajo las barras.

La **figura 45** muestra el espectro de protones de algunas de las mutantes preparadas. Se incluye el espectro de la proteína silvestre mmPrP, la que fue preparada como control para los experimentos que siguen. En los espectros se observa gran dispersión de señales a alto y bajo campo. Tal dispersión es típica de proteínas plegadas. La señal a 4,7 ppm corresponde a la señal del H₂O. En los espectros no se observan señales de compuestos

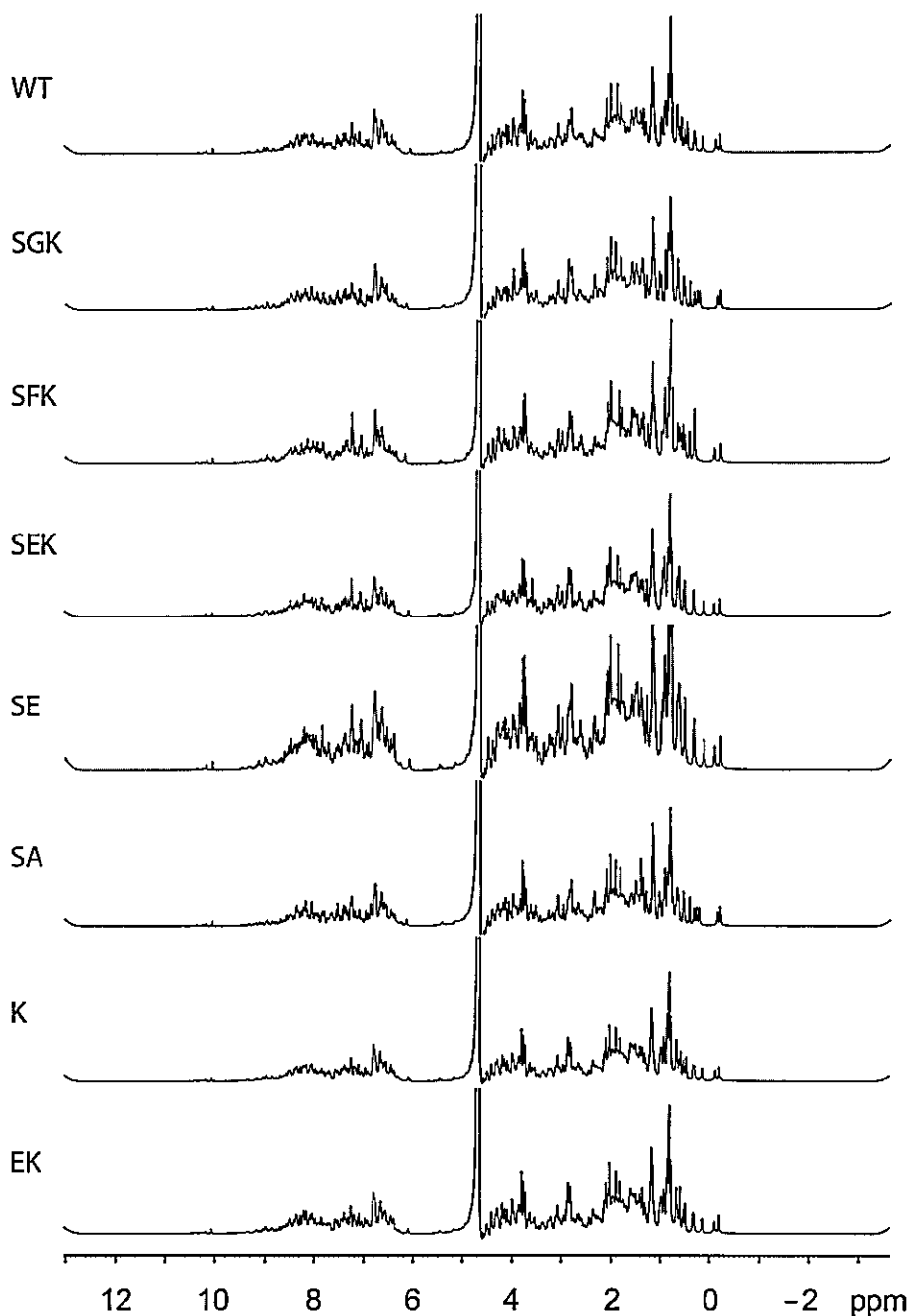


Figura 45. Espectros ^1H 1D NMR de mutantes de mmPrP. Los espectros fueron medidos en un espectrómetro de 750 MHz en frecuencias de ^1H , a 293 K. Todos los espectros fueron obtenidos con el promedio de ocho barridos, de tal forma que una vez procesados, la intensidad de las señales es proporcional a la concentración de proteína. A la izquierda de cada espectro se indica el nombre abreviado de la mutante usada en la medición.

contaminantes. Estas suelen ser muy intensas y angostas. El alto grado de pureza observado en los espectros es representativo de todas las muestras obtenidas. La señal a 0.2 ppm en el espectro de la mutante EK corresponde al grupo metilo de I182. Este residuo se encuentra cercano al *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Los grupos metilo son muy sensibles a variaciones estructurales, y por tanto los cambios en el corrimiento químico del I182 informan acerca de cambios en la zona de este *loop*.

4.3.3.2. Estabilidad del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Mutación Y169G

4.3.3.2.1. Cambios en los corrimientos químicos

El papel de la tirosina 169 en la estabilización de la estructura del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ fue investigado reemplazando este residuo por glicina, y observando los cambios en el corrimiento químico de los grupos amida de cada residuo.

Un problema importante al abordar este estudio es que los cambios más importantes a observar se encuentran en la región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$, pero precisamente es en esta región donde no se observan las resonancias. Por ello, para el estudio de estabilidad de Y169 se utilizó como secuencia de partida la de una proteína variante de la proteína priónica de ratón, una variante en la que sí es posible observar todas las resonancias del *loop*. La variante utilizada como base para el estudio de la Y169 fue la mutante SK (mmPrP_[D167S,N173K]).

Como control, y con el objetivo de investigar cual es la magnitud de los cambios de los corrimientos químicos cuando se sustituye un residuo que no afecta la estructura del

loop, se analizaron los cambios en los corrimientos químicos para el reemplazo de Q168 por E. La **figura 46A** muestra el resultado de este control. Se muestran los espectros HSQC de la mutante SK de la proteína priónica de ratón (mmPrP_[D167S,N173K]), y a su derecha el espectro de la mutante en que se cambió el residuo Q168 por E resultando la mutante SEK (mmPrP_[D167S, Q168E, N173K]). Se señalan en rojo las posiciones de las resonancias S170, y N171 pertenecientes al *loop* β 2- α 2, y de F175 localizado al comienzo de la hélice α 2. Los espectros muestran que la mutación Q168E produce cambios mínimos en los corrimientos químicos para los grupos amida. En la **figura 46C** se muestra el gráfico con los cambios en los corrimientos químicos observados para cada residuo de la secuencia. Las modificaciones en los corrimientos químicos se producen en la vecindad inmediata del residuo cambiado (168) y son de una magnitud no mayor a $\sim 0,4$ ppm.

En la **figura 47** se muestra el efecto en las posiciones de las resonancias amida cuando se cambia el residuo Y169 por glicina. En la parte superior de la **figura 46A** se muestra el espectro HSQC para mmPrP_[D167S,N173K] (variante SK) proteína con Y en posición 169, y en la **figura 46B** la variante mmPrP_[D167S,Y169G,N173K] (variante SGK) en que la tirosina en posición 169 se reemplazó por glicina. En rojo se señalan las posiciones de las resonancias de la zona del *loop* para la variante SK. En el espectro de SGK las señales del *loop* están completamente desplazadas de su posición original en la proteína control SK (círculos rojos). Las señales en SGK fueron asignadas y los cambios en los corrimientos químicos se muestran graficados en la **figura 47C**. Los mayores cambios se observan en la región aledaña al *loop* β 2- α 2 (165–175), pero también se

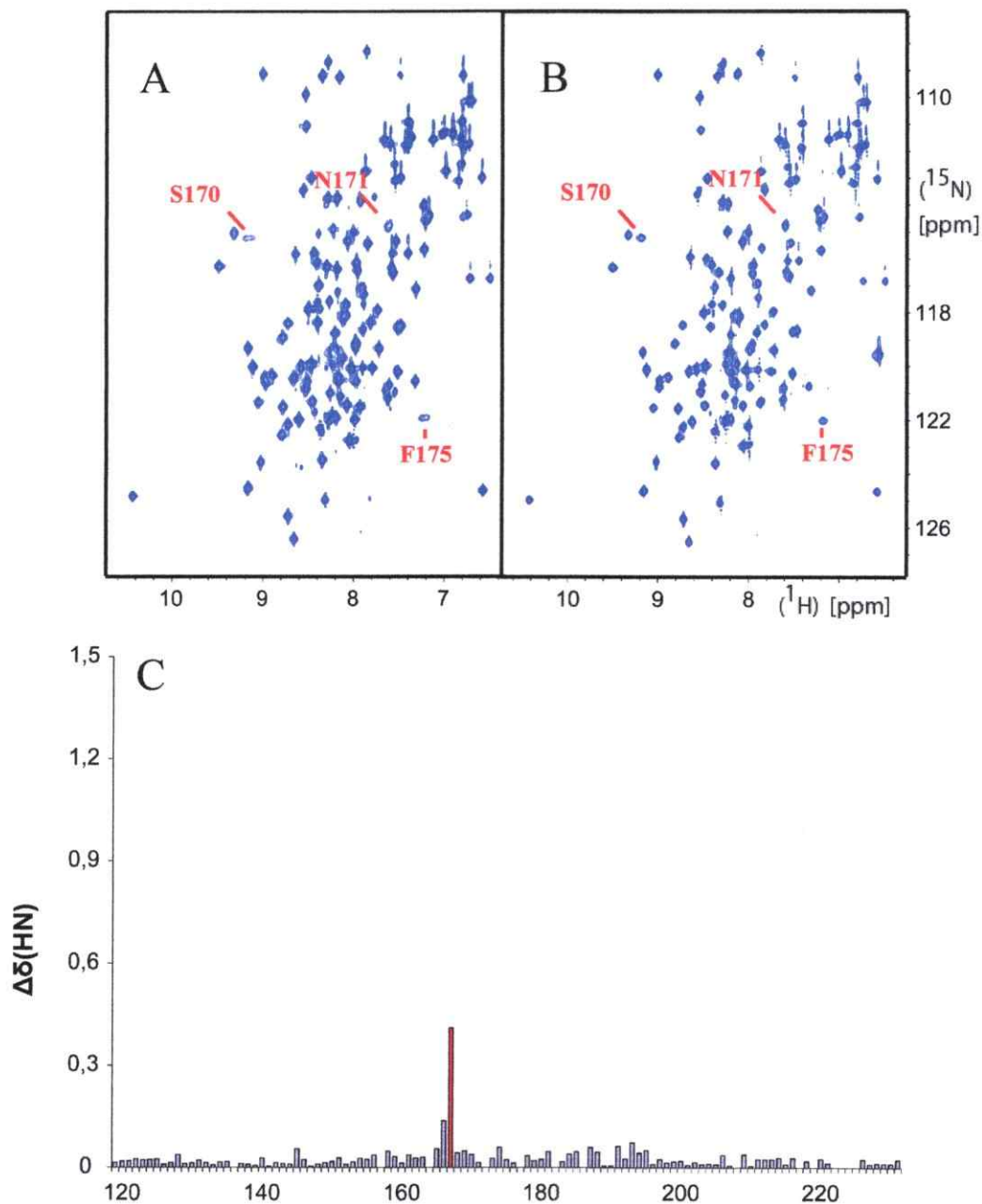


Figura 46. Cambios en los corrimientos químicos en la mutante Q168E. En A, espectro ^{15}N HSQC de mmPrP_[D167S,N173K] en una solución 1,2 mM, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM pH 4,5 a 293 K, registrado en un espectrómetro de 750 MHz para la frecuencia de ^1H . En B, mmPrP_[D167S,Q168E,N173K] en iguales condiciones que el anterior. En C, gráfico con los cambios en corrimientos químicos del grupo amida por residuo calculados como $\Delta\delta(\text{HN}) = \sqrt{\{\Delta\delta(\text{H}^{\text{N}})^2 + [\Delta\delta(\text{N})/5]^2\}}$. La barra roja corresponde a la resonancia del residuo modificado por la mutación.

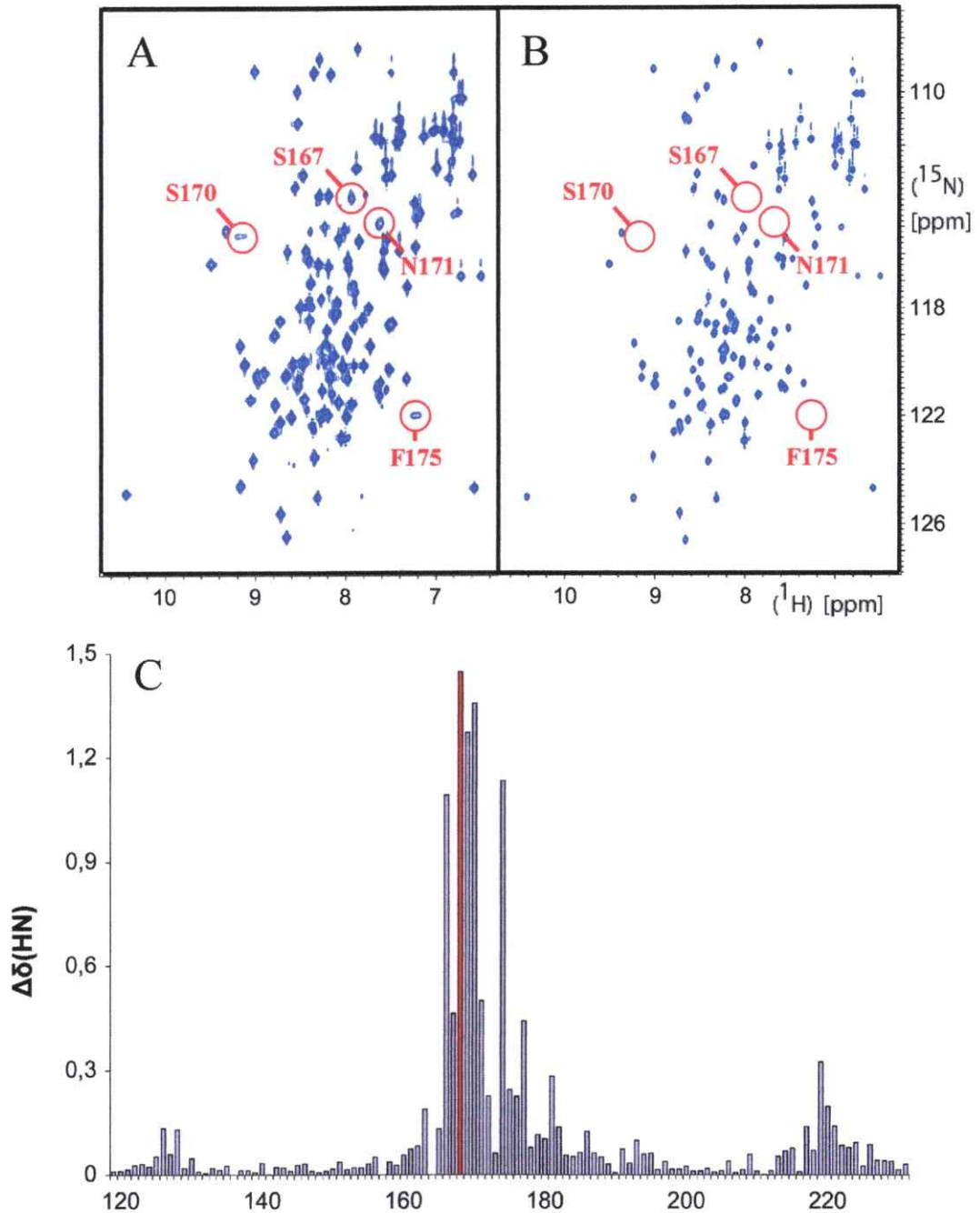


Figura 47. Cambios en los corrimientos químicos en la mutante Y169G. En A, espectro ^{15}N HSQC de mmPrP [D167S, N173K] en una solución 1,2 mM, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM pH 4,5 y 293°K, registrado en un espectrómetro de 750 MHz para la frecuencia de ^1H . En B, mmPrP [D167S, Y169G, N173K] en iguales condiciones que el anterior. En C, gráfico con los cambios en corrimientos químicos del grupo amida por residuo, calculados como $\Delta\delta(\text{HN}) = \sqrt{\{\Delta\delta(\text{H}^{\text{N}})^2 + [\Delta\delta(\text{N})/5]^2\}}$. La barra roja corresponde a la resonancia del residuo modificado por la mutación.

observa cambios al final de la hélice α_3 (216–224), y en la región N-terminal (120–130), antes de la hebra β_1 .

4.3.3.2.2. Flexibilidad de la mutante Y169G

El aumento en la flexibilidad del *loop* al reemplazar la Y169 por glicina fue observado de tres formas distintas: como aumento en la intensidad de las señales provenientes de esa región, como aumento en el grado de intercambio con el agua, y como una reducción del valor observado para $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear.

Las **figuras 48** y **49** muestran las bandas de señales NOE del espectro de protones bidimensional hacia el grupo amida de los residuos en la zona del *loop* β_2 - α_2 . Las señales de la variante SK se muestran en la **figura 48** y las señales NOE para la variante SGK (que incluye la mutación Y169G) en la **figura 49**.

En la **figura 48A** se ve que, si bien es posible observar las señales provenientes del *loop* estas son más débiles que en el resto de la proteína. Este efecto queda claro al comparar la señales NOE débiles del residuo 170 (localizado en medio del *loop*) con las fuertes señales de los residuos 166 ó 174 (ubicados en los extremos del *loop*).

En **figura 48B** se muestra una expansión del mismo espectro para la zona correspondiente al corrimiento químico del agua (4,7 ppm, línea roja). En la figura se observa un intercambio con agua de nivel basal para la región del *loop* (línea roja). En la **figura 49A** se observan los datos obtenidos con la mutante SGK (reemplazo de Y169 por glicina), en el que la intensidad de las señales NOE del *loop*, en la mutante con glicina en la posición 169, es mucho mayor que la observada cuando el residuo tirosina

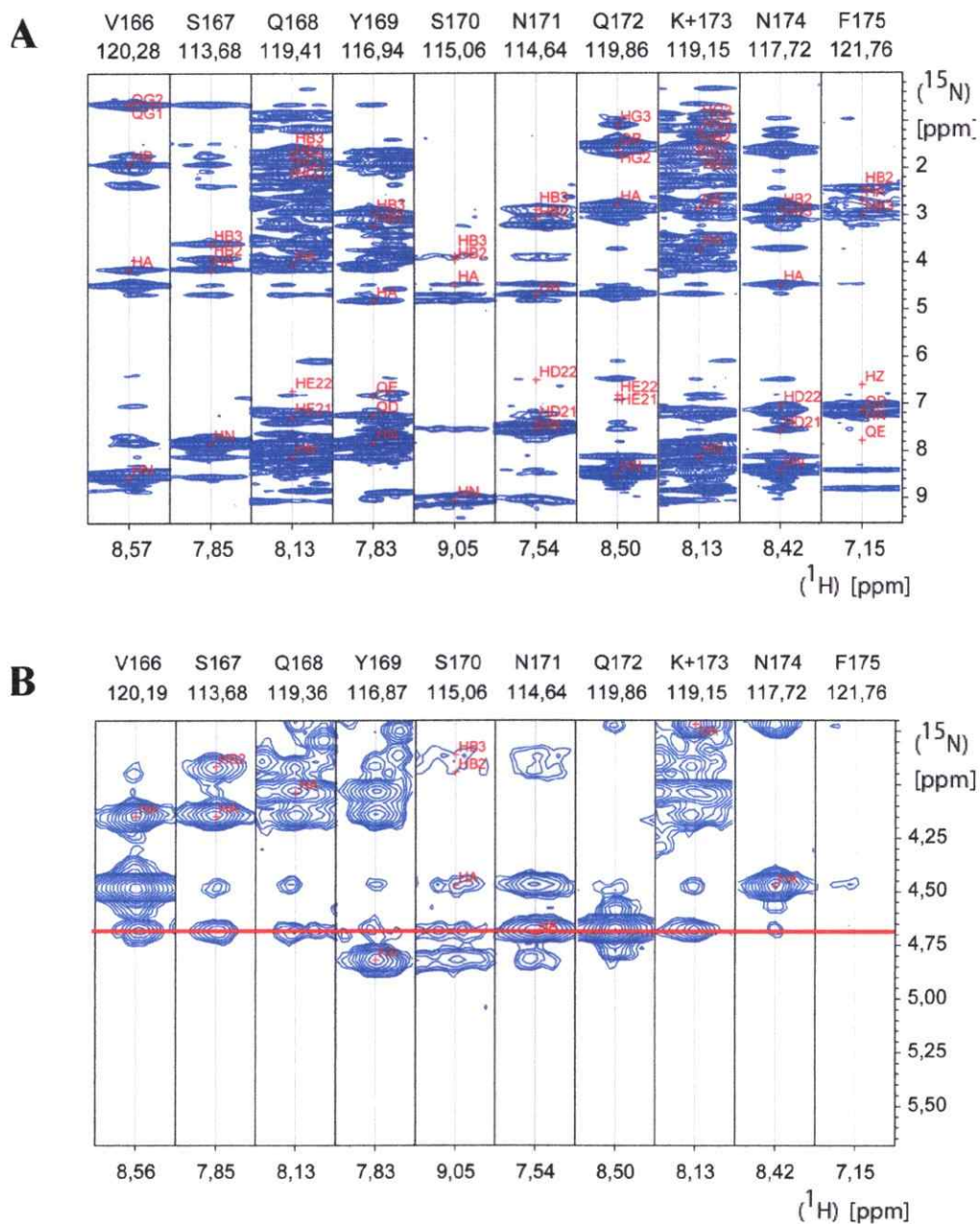


Figura 48. $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOE editado en ^{15}N . En A, mmPrP $[\text{D167S}, \text{N173K}]$ 1,2 mM, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM, azida de Na 1 mM, pH 4,5. El espectro fue registrado en un espectrómetro de 750 MHz para la frecuencia de ^1H , a 293 K. Los parámetros de adquisición fueron τ_m 60 ms, tiempos de evolución máximo en dimensión indirecta de ^1H y dimensión ^{15}N iguales a 18 ms y 30 ms, respectivamente, ganancia de 256, y se promediaron 8 barridos por FID. En B, una ampliación de la región de frecuencia correspondiente al agua (4,7 ppm), en línea roja se destaca el corrimiento químico de la señal de agua.

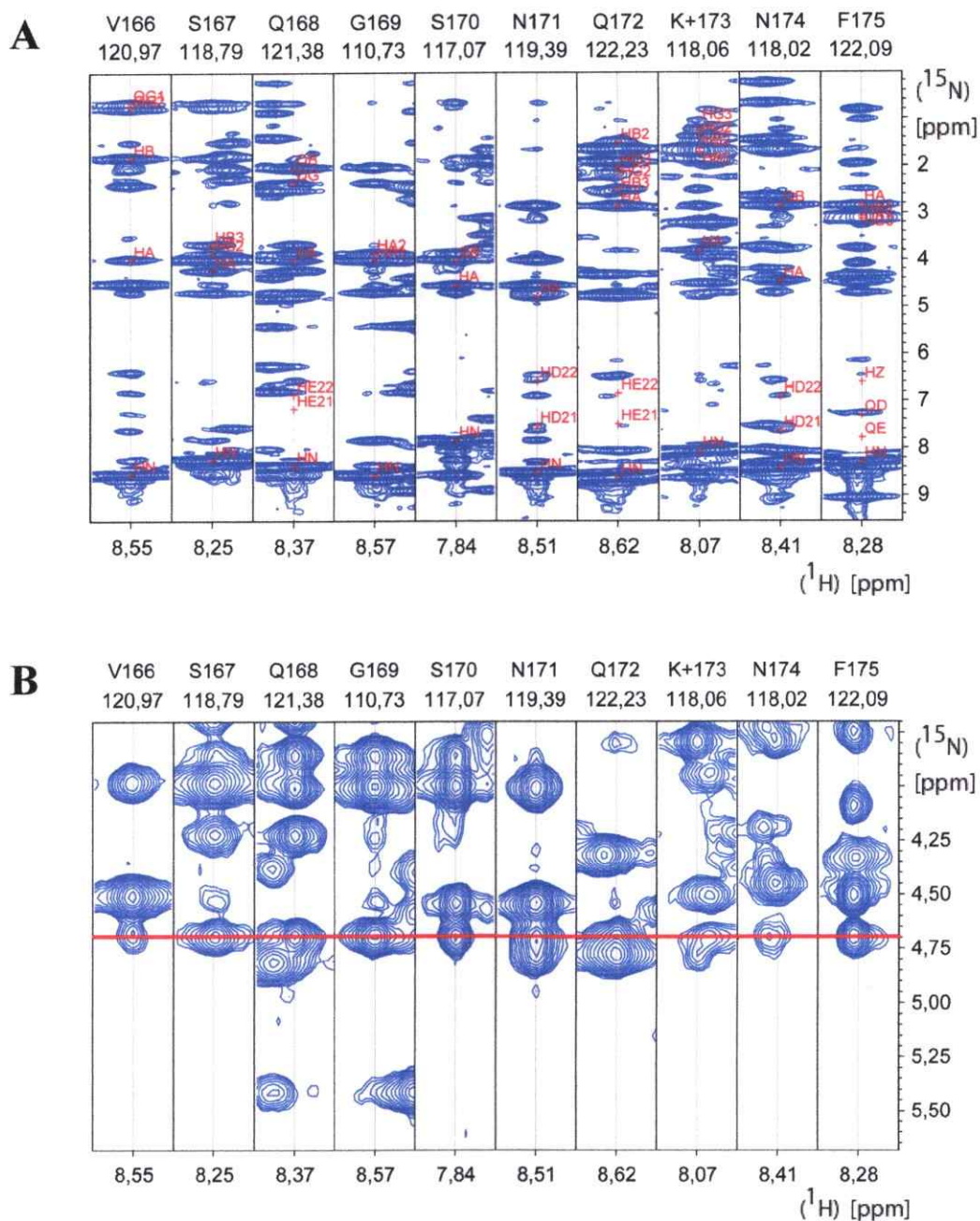


Figura 49. [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-NOE editado en ^{15}N . En A, mmPrP_[D167S,Y169G,N173K] 1,2 mM, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM, azida de Na 1 mM, pH 4,5. El espectro fue registrado en un espectrómetro de 750 MHz en frecuencia de ^1H , a 293 K, con parámetros de adquisición τ_m 60 ms, tiempos de evolución máximo en dimensión indirecta de ^1H y dimensión ^{15}N iguales a 18 ms y 30 ms, respectivamente, ganancia de 256. Se promediaron 8 barridos por FID. En B, una ampliación de la región de frecuencia correspondiente al agua (4,7 ppm). En línea roja se destaca el corrimiento químico de la señal de agua.

es el que ocupa esta posición. El nivel de intercambio con agua para esta región (**figura 49B**) es mucho mayor en la mutante con glicina.

Los valores de $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear (**figura 50**) muestran una reducción respecto al resto de la proteína, lo que significa una mayor flexibilidad para esta zona que no ha sido observada en ninguna proteína priónica hasta ahora. Los valores para los otros residuos muestra el patrón que ya fue descrito para la proteína priónica de caballo en la sección anterior.

4.3.3.3. Intercambio conformacional. Sustituciones equinas en mmPrP

El *loop* $\beta 2\text{-}\alpha 2$ en PrP de caballo (*loop* rígido) presenta tres sustituciones respecto a la secuencia de ratón: D167S, Q168E, y N173K. Se generaron variantes de la proteína priónica de ratón que contienen las tres sustituciones y sus combinaciones. La **figura 51** muestra los espectros $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -COSY para estas mutantes. Se destacan con círculos las posiciones de las resonancias del *loop* $\beta 2\text{-}\alpha 2$. En la proteína mmPrP no fue posible observar las resonancias de este *loop*, las sustituciones Q168E, y N173K por sí solas no son suficientes para modificar el comportamiento del *loop*, y las resonancias de esta región aún siguen ausentes del espectro. En cambio, la sustitución del residuo aspártico 167 por serina (D167S) en la proteína de ratón, por sí sola modifica el comportamiento del *loop*, haciendo que las resonancias del *loop* sean visibles en el espectro. El cambio Q168E en la mutante que ya tiene modificado D167S no produce ningún efecto, pero la doble mutación [D167S, N173K] tiene como efecto la aparición de señales dobles para todos los residuos del *loop* $\beta 2\text{-}\alpha 2$. Esto es, la lisina en posición 173 en presencia de

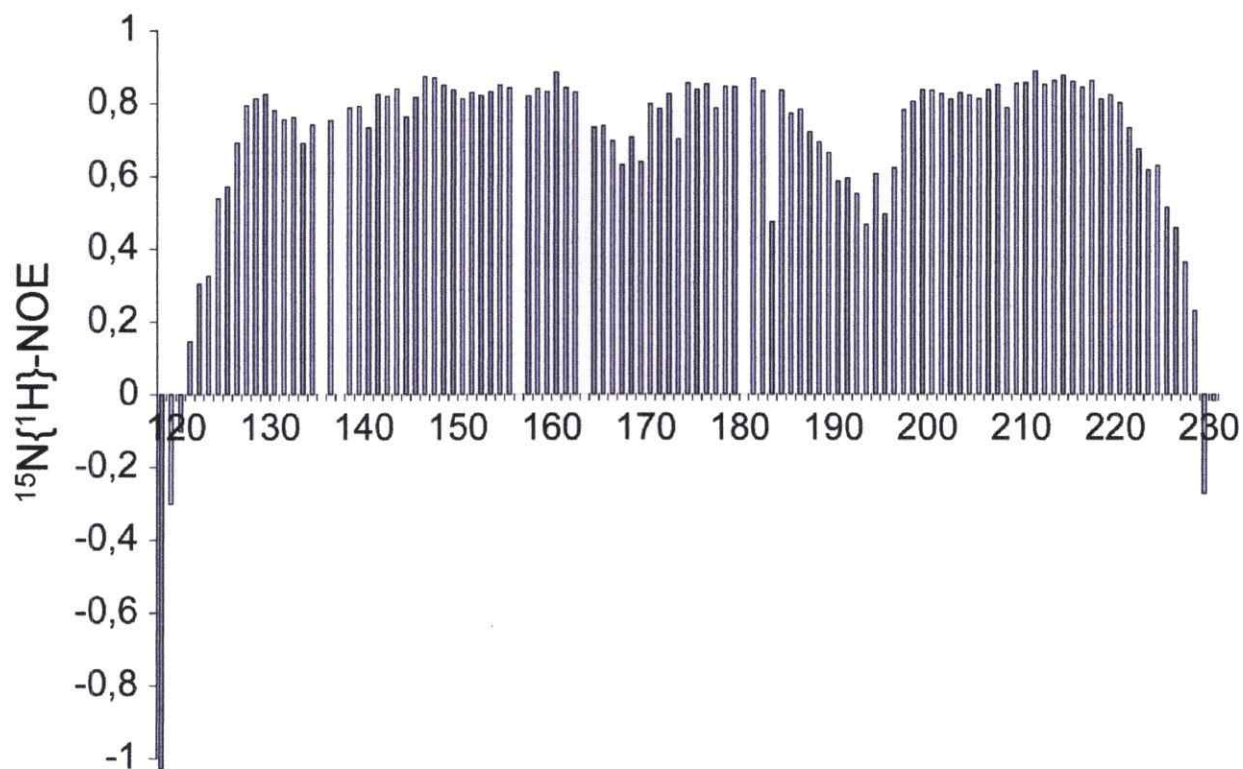


Figura 50. $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE heteronuclear de ecPrP. El espectro se registró en un espectrómetro de 500 MHz en frecuencia de ^1H . La transferencia de magnetización longitudinal se realizó al equilibrio, saturando ^1H durante 3s. Se registró un espectro de referencia intercalado entre cada FID, consistente en excitación directa del núcleo ^{15}N . El gráfico muestra la razón entre la intensidad de la resonancia NOE y la de referencia para cada residuo.

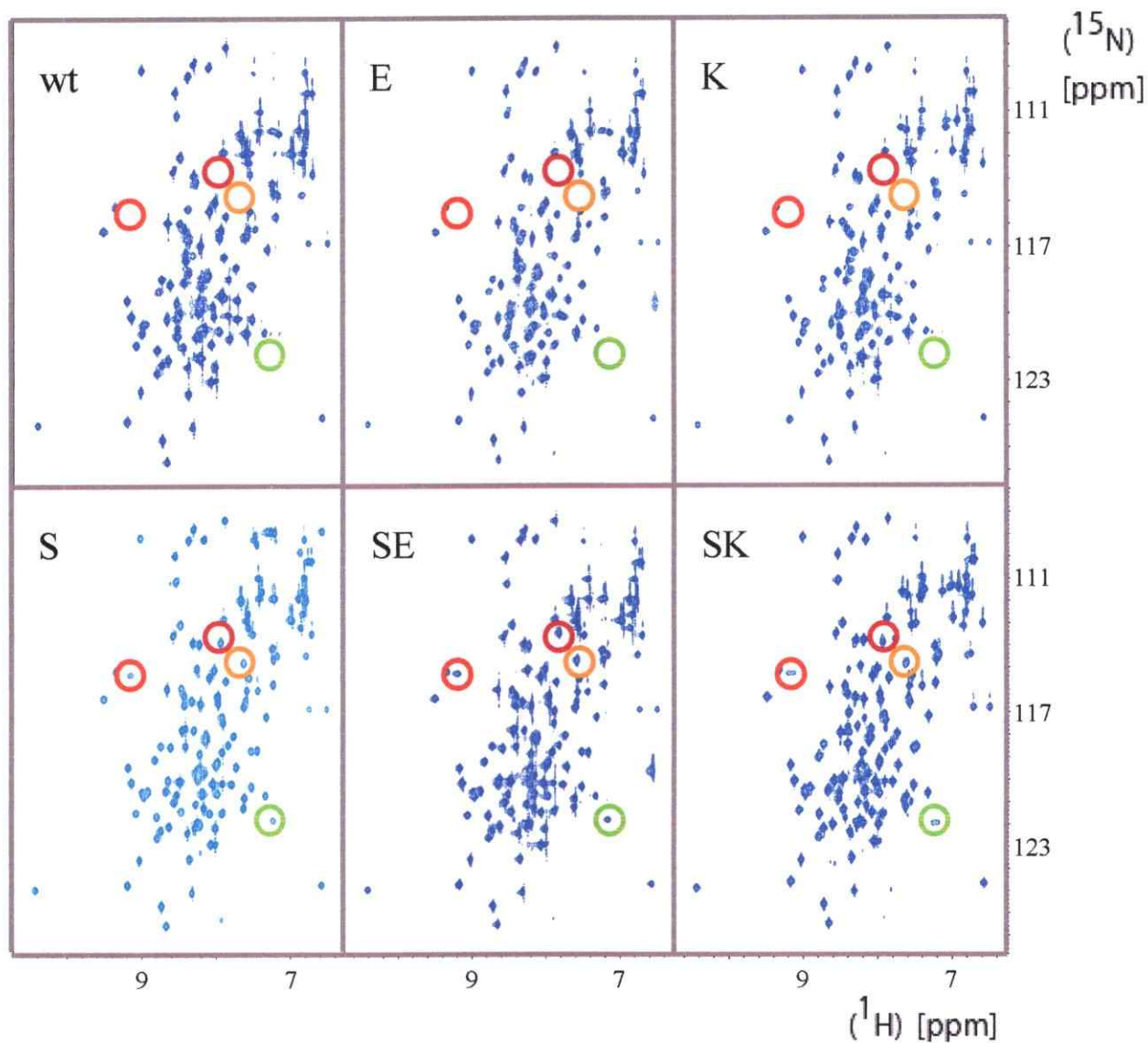


Figura 51. Espectros $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -COSY de mmPrP y cinco mutantes de mmPrP. Los espectros fueron registrados en un espectrómetro de 750 MHz en frecuencia de ^1H , con soluciones, 90% H_2O , 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM, y azida de Na 1 mM, pH 4,5. La abscisa contiene los corrimientos de ^1H y la ordenada los de ^{15}N . Arriba a la izquierda de cada espectro se indica el nombre abreviado de la mutante utilizada en la medición. En círculos rojos, el corrimiento químico de la amida del residuo 170, en círculo café, la del residuo 167, en anaranjado la del residuo 171, y en círculo verde la del residuo 175.

serina en posición 167 modifica el intercambio conformacional de una forma tal que se tiene un intercambio entre dos conformeros, y a una tasa de intercambio suficientemente lenta que permite la observación de una resonancia por cada estado conformacional en equilibrio. La mutante SEK tiene el mismo comportamiento espectroscópico que S y SE (dato no mostrado).

Las resonancias dobles de la zona del *loop* de la mutante SK (mmPrP_[D167S, N173K]) motivaron la resolución de la estructura de esta mutante para investigar en qué medida era posible distinguir el segundo estado conformacional del *loop* β 2- α 2.

4.3.3.4. Determinación de la estructura de mmPrP_[D167S,N173K]

Se registraron espectros de triple resonancia, y de correlación necesarios para asignar las resonancias de mmPrP_[D167S,N173K]. Luego de asignar las resonancias, se utilizó el programa RADAR (que incluye ATNOS, CANDYD y DYANA) para asignar los espectros NOESY, y determinar las restricciones de distancia necesarias en el cálculo de la estructura.

Los valores de entrada para el cálculo de la estructura y los parámetros de la estructura minimizada se muestran en la **tabla 7**.

Un total de 2645 restricciones estructurales significativas se obtuvieron en el ciclo siete del cálculo de estructura (ver **tabla 7**). La estructura consiste de un dominio globular con tres alfa hélices y una hoja beta que consiste en dos cortas hebras β . La hélice α 1 comprende los residuos 144–156 con la última vuelta que forma una hélice 3–10, la hélice α 2 comprende los residuos 173–192, y la hélice α 3 incluye los residuos

200 a 226 con la última vuelta que forma una hélice 3-10. Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ están unidas por un puente disulfuro entre los residuos C179 y C214. La estructura es bien definida con una r.m.s.d. para la superposición de las 20 estructuras entre los residuos 125 y 228 de 0,38 Å, y 0,73 Å para todos los heteroátomos en el mismo segmento polipeptídico (ver **tabla 7** y **figura 52**).

La **figura 52A** a la izquierda muestra la definición del esqueleto carbonado en representación de cable. Los 20 estados conformacionales con menor valor de función de blanco en el programa de dinámica de ángulos de torsión DYANA, se sobreponen para minimizar la r.m.s.d de la estructura promedio. En esta figura además se muestra la definición de las cadenas laterales obtenidas en esta estructura. Estas son mostradas como barras naranjas. La **figura 52** de la derecha muestra la estructura con el esqueleto carbonado representado como tubo, en el que el diámetro es proporcional a la definición local de la estructura. Aquí se aprecia el alto grado de definición en todas las regiones de la proteína. La cadena lateral de la Y169 apunta hacia el núcleo hidrofóbico (barras naranjas). En la **figura 52B** se muestra un gráfico con los tipos y distribución en la secuencia de las restricciones extraídas desde la espectroscopia NOESY, y utilizadas luego en el cálculo de la estructura tridimensional. En el gráfico se observa que la gran cantidad de restricciones de largo alcance que define la estructura se encuentra distribuida uniformemente en la secuencia, definiendo la estructura en todos los segmentos. La excepción la constituye el *loop* que conecta las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (residuos 187-199) donde la estructura queda definida sólo por restricciones de mediano y corto alcance.

Cantidad	Valor
Número de restricciones de distancia	2645
Número de restricciones de ángulo diedro	104
Función blanco residual, Å ²	1,30 ± 0,24
Violaciones residuales NOE Número ≥0.1Å Máximo, Å	29 ± 5 (21—38) 0,14 ± 0,03 (0,12—0,27)
Violaciones de ángulo residual Número ≥2.5 ° Máximo, °	3 ± 2 (0—7) 3,87 ± 0,72 (1,91—4,92)
Energías Amber, kcal/mol Total Van der Waals Electrostática	-4922.52 ± 79,35 -310,42 ± 13,17 -5448,00 ± 76,55
rmsd desde geometría ideal Largos de enlace, Å Ángulos de enlace, °	0,0078 ± 0,0001 1,962 ± 0,043
rmsd a las coordenadas medias, Å ^b bb (125—228) ha (125—228)	0,38 ± 0,08 (0,28—0,56) 0,73 ± 0,06 (0,64—0,87)
Estadísticas del gráfico de Ramachandran Regiones más favorables (%) Regiones permitidas adicionales (%) Regiones generosamente permitidas (%) Regiones no permitidas (%)	79 21 0 0

Tabla 7. Datos de entrada para el cálculo de estructura y caracterización de la estructura NMR minimizada de mmPrP_SK (120—232). Salvo por las dos primeras entradas se muestra el promedio para los 20 estados conformacionales energéticamente minimizados con los residuales más bajos de la función blanco de DYANA y la desviación estándar entre ellos con los mínimos y máximos mostrados entre paréntesis. **bb** indica los átomos del esqueleto carbonado N, C α , C'; **ha** indica todos los átomos pesados. Los números entre paréntesis indican los residuos para los que se calcula la r.m.s.d. Determinado por PROCHECK (Morris *et al.*, 1992).

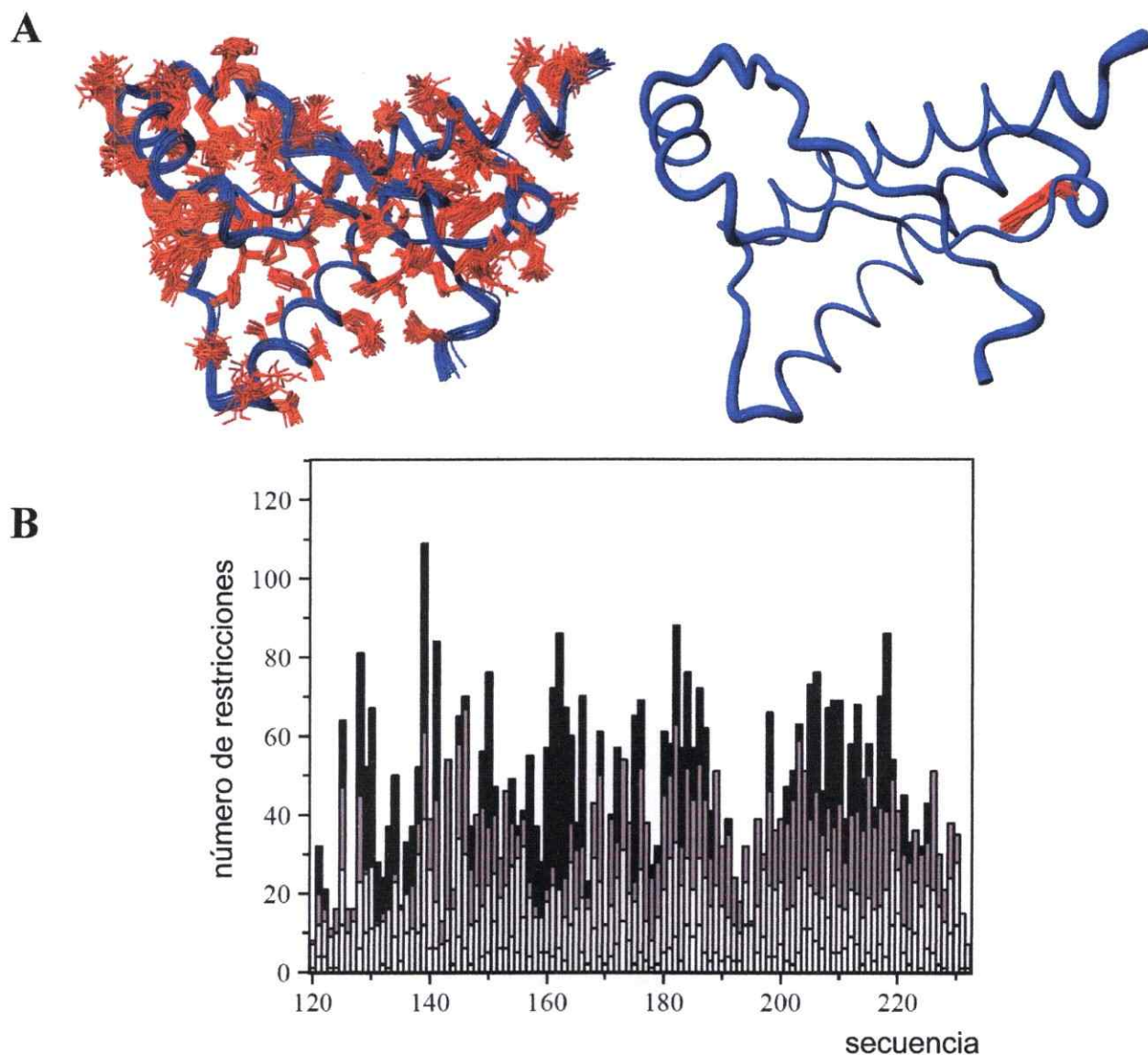


Figura 52. Estructura NMR de mmPrP_[D167S,N173K](121–230) y restricciones de distancia ocupadas en el cálculo. **A**, a la izquierda, en diagrama de cable se muestra el esqueleto carbonado del conjunto de 20 estados conformacionales con el valor más bajo de función blanco de DYANA. En anaranjado las cadenas laterales del conjunto de 20 conformeros. A la derecha la figura muestra un diagrama de tubo del esqueleto carbonado en que el diámetro del tubo es proporcional a la r.m.s.d local de la estructura promedio. En anaranjado la cadena lateral de la Y169 en los 20 conformeros. Los estados conformacionales fueron alineados para el mejor ajuste de los heteroátomos del esqueleto carbonado de los residuos 125–228, con una r.m.s.d. de 0,38 Å. **B**. Restricciones de distancia para el cálculo de estructura de mmPrP_[D167S,N173K]. En la abscisa el número de restricciones de distancia por residuo, en barras blancas las restricciones de alcance corto, en barras grises las de alcance medio y en barras negras las de alcance largo.

4.3.3.5. Intercambio conformacional *loop* $\beta 2-\alpha 2$ en mmPrP_[D167S,N173K]

La observación de dos resonancias por residuo en el *loop* $\beta 2-\alpha 2$ permite un estudio más detallado del fenómeno de intercambio conformacional que ahí tiene lugar. Se registraron los espectros HSQC a distintas temperaturas para estudiar el comportamiento de las resonancias del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. La **figura 53** muestra a la izquierda la resonancia del grupo amida del residuo 170 registrado a distintas temperaturas. En forma análoga a lo observado en la proteína priónica de caballo, a 20 °C la señal se ensancha hasta desaparecer. Al aumentar la temperatura, ambas señales del doblete aumentan en intensidad, pero la señal a alto campo lo hace en forma más pronunciada. Al graficar las intensidades en función de la temperatura se observa que a 40 °C la señal a alto campo casi dobla la señal a bajo campo. En régimen de intercambio lento se observan dos señales en posiciones Ωa y Ωb . Como se explica en **APÉNDICE I**, en cada posición la intensidad de la señal queda determinada por:

$$A(\omega \approx \Omega_{a(\text{v}\Omega_b)}) = \frac{f_a \tau_a}{(\Omega_a - \omega)^2 + \left(\frac{1}{\tau_a}\right)^2} M_0$$

Luego, la intensidad en la posición Ωa para cada estado conformacional es proporcional a la fracción de población f_a del estado conformacional que produce la señal.

En el *loop* $\beta 2-\alpha 2$ de ecPrP, se tiene que (usando $\Delta G = (\ln K)/RT$) a 37 °C la energía de estabilización del estado conformacional que aparece a alto campo es de -0.308Kcal/mol.

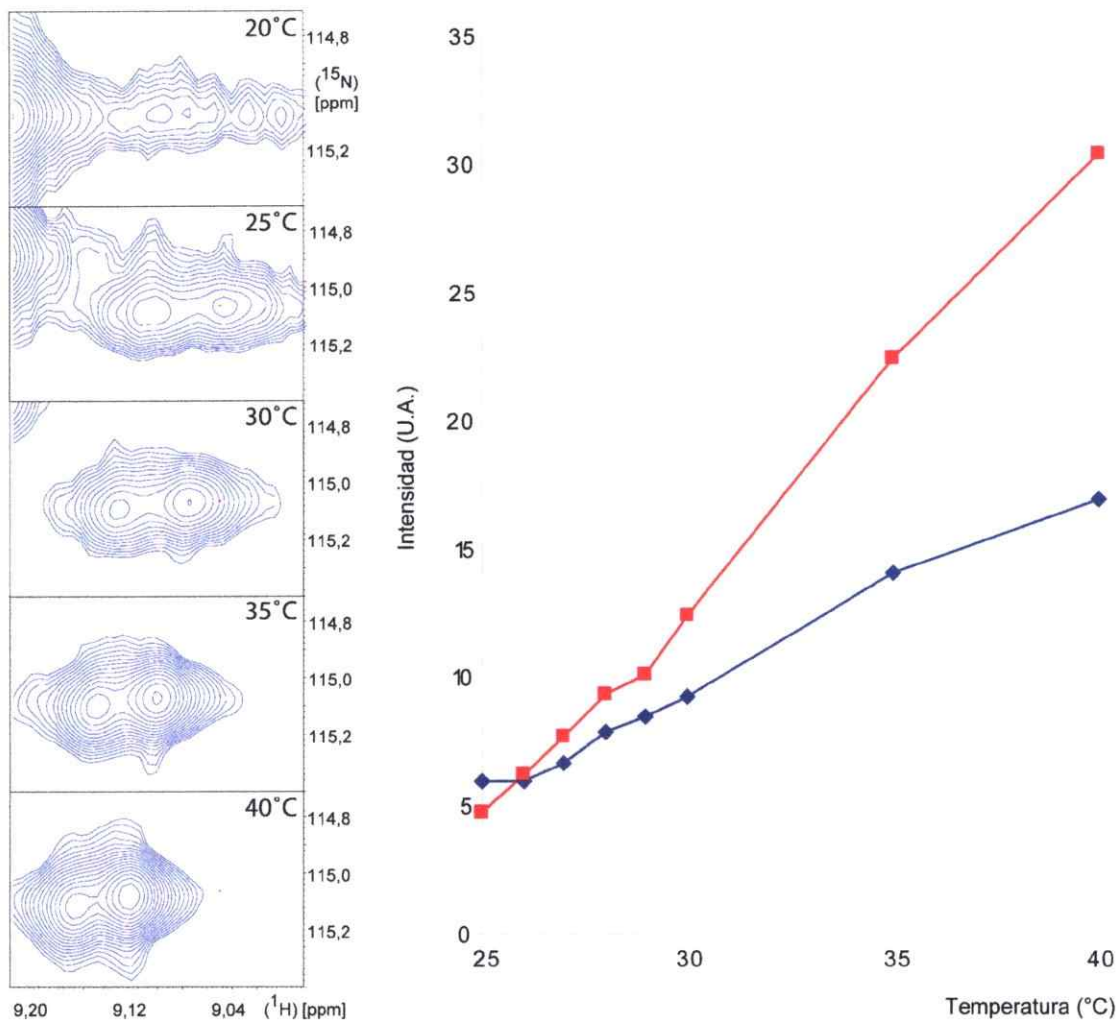


Figura 53. Población de estados conformacionales del *loop* $\beta 2$ - $\alpha 2$ dependiente de la temperatura. A la izquierda se muestra el doblete de la resonancia para el grupo amida del residuo S167 del espectro $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -COSY. Los espectros fueron registrados a 750 MHz en frecuencia ^1H , para una muestra de mmPrP_[D167S,N173K] 1,2 mM, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, acetato de Na 10 mM, azida de Na 1 mM, pH 4,5. Se muestran los espectros registrados a cinco temperaturas distintas, las que son indicadas en el extremo superior derecho de cada espectro. A la derecha se muestra la dependencia de la temperatura de las intensidades medidas para las dos resonancias mostradas en los espectros de la izquierda.

4.3.4. Discusión

4.3.4.1 Estabilidad del *loop* $\beta 2-\alpha 2$

En esta última parte del trabajo de tesis se investigaron los determinantes moleculares de la estabilidad y del intercambio conformacional del *loop* $\beta 2-\alpha 2$, región de PrP que une el factor X involucrado en la generación de la conformación patógena PrP^{SC} (Telling *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997b).

La importancia de develar los mecanismos moleculares de estabilización e intercambio conformacional del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ quedan de manifiesto a la luz de nuevos resultados con ratones transgénicos. En ellos la modificación de dos residuos en la región del *loop* que 'rigidiza' su estructura, produce la generación espontánea de la enfermedad priónica. En que medida este efecto es mediado por las características estructurales del *loop* requiere de más investigación. En ese contexto se investigaron las características estructurales del *loop* $\beta 2-\alpha 2$.

Se demostró que la estructura del *loop* está determinada por la Y169. En ausencia de este residuo, la región completa pierde su estructura adquiriendo flexibilidad. Este incremento de flexibilidad del *loop* esta acompañado por perturbaciones en la estructura de la región C-terminal de la hélice $\alpha 3$, en concordancia con las interacciones descritas entre ambas regiones en la sección anterior (determinación de la estructura de ecPrP) y con las perturbaciones de la estructura de la región N-terminal de la proteína (residuos 120–130), lo que sugiere algún tipo de interacción entre ambas regiones, no descrita hasta ahora. En las estructuras de alta definición obtenidas en este trabajo de tesis, Y169

está orientada apuntando al núcleo hidrófobo, y establece un puente de hidrógeno entre el Hy y el grupo carboxilo de D178. Este puente de hidrógeno no tiene mayor influencia en la estabilización de la región del *loop*, puesto que el reemplazo de Y169 por fenilalanina no tiene mayor efecto en la estabilización o dinámica del *loop* (datos no mostrados).

4.3.4.2. Intercambio conformacional del *loop* $\beta 2-\alpha 2$

En PrP de ratón las resonancias del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ no son observables y la región no queda definida en la estructura determinada por NMR (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1998). A la luz de los resultados generados en este trabajo de tesis, la ausencia de resonancias en la región del *loop* es debida al ensanchamiento de la señal generado por un intercambio conformacional en la escala de milisegundos en el intervalo de 5 a 40 °C.

Al sustituir los residuos del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ en la proteína priónica de ratón (mmPrP), por los residuos pertenecientes a la secuencia de PrP de caballo, se observó que basta el cambio de aspártico por serina en la posición 167 (uno de los tres residuos que son distintos entre ambas secuencias) para que el *loop* de mmPrP adquiriera las propiedades dinámicas de la proteína de caballo. Esto es, que el *loop* experimenta intercambio conformacional en la escala de milisegundos a temperaturas inferiores a 20 °C. Bajo esta temperatura las señales se ensanchan hasta desaparecer, y por sobre los 20 °C, las señales aumentan de intensidad y se angostan. La sustitución D167S es única de la secuencia de PrP de caballo (ecPrP). El resultado obtenido con la mutante de PrP de ratón, concuerda con las observaciones hechas en ecPrP para el rol principal que tiene la

serina 167 en la estabilización del *loop* mediado por las interacciones entre el *loop* y la hélice α_3 . Las otras dos sustituciones presentes en ecPrP (Q168E y N173K) no tienen efecto por sí solas en la dinámica del *loop*. Lisina en la posición 173 afecta la dinámica del *loop* sólo en presencia de serina en la posición 167, en este caso la lisina disminuye la tasa de intercambio conformacional, haciendo el movimiento del *loop* más lento y permitiendo de esta forma observar las dos resonancias producidas por los estados conformacionales en equilibrio.

Los datos obtenidos permiten establecer un modelo general para describir la estabilización y dinámica del *loop* β_2 - α_2 . La **figura 54** muestra la posición de Y169 (residuo que determina la estructura del *loop*) en los 20 estados conformacionales obtenidos del cálculo estructural. Esta estructura experimenta intercambio entre dos estados conformacionales en la escala de milisegundos (bajo 20°C en la mutante mPrP_SK, y en todo el intervalo de temperatura en la proteína silvestre). La **figura 54** muestra los grupos amida en los 20 estados conformacionales que experimentan ensanchamiento de la señal.

La dependencia de la temperatura del intercambio y distribución poblacional de los estados conformacionales da cuenta de la naturaleza hidrófoba del fenómeno. El incremento de la temperatura hace caer al sistema en régimen de intercambio lento y genera la aparición de las señales. El movimiento disminuye junto con un incremento de la población de uno de los conformeros. Esto es, el aumento de la temperatura estabiliza uno de los estados conformacionales con una energía de $-0,3$ °Kcal/mol. Este efecto revela la naturaleza hidrófoba de la estabilización conformacional.

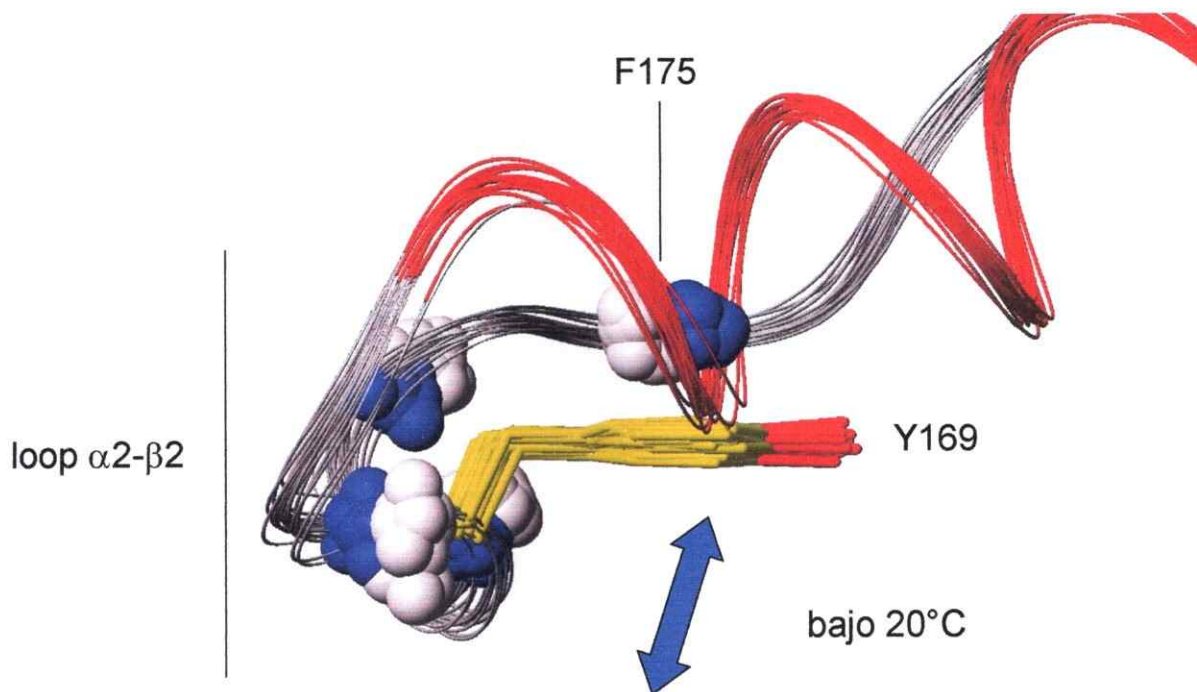


Figura 54. Modelo del intercambio conformacional en el *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Representación de cable de la estructura del *loop* $\beta 2-\alpha 2$. En gris el segmento que conecta $\beta 2$ y $\alpha 2$, y en rojo el segmento N-terminal de la hélice $\alpha 2$. La figura se obtuvo alineando los 20 estados conformacionales para minimizar la r.m.s.d. de los átomos pesados del esqueleto carbonado respecto a la estructura media. Esferas azules y blancas: los átomos de nitrógeno e hidrógeno respectivamente que pertenecen al grupo amida del esqueleto carbonado de los residuos S167, E168, Y169, S170, N171 de la región del *loop*, más fenilalanina de la hélice $\alpha 2$. Debido al intercambio conformacional, ellos son los pertenecientes a la región del *loop* $\beta 2-\alpha 2$ más la fenilalanina 175. El corrimiento químico de este último residuo está afectado por la corriente de anillo generada por Y169 y por tanto actúa como reportero del movimiento de la Y169. Gracias a esta amida reportera (F175) es posible saber que el movimiento que experimenta el *loop* bajo los 20 °C involucra un desplazamiento del anillo de la Tirosina 169. En amarillo se muestra la cadena lateral del residuo Y169. Esta figura fue preparada con el programa Molmol (Koradi *et al.*, 1996).

En qué medida la rigidez del *loop* esta directa o indirectamente relacionada con el cambio conformacional que lleva a la formación de PrP^{SC} para producir la enfermedad, requiere del uso de modelos transgénicos. Es necesaria la generación de animales con distintas combinaciones aminoacídicas que produzcan *loops* con distintas características estructurales. y ver cual es su efecto en la generación de la enfermedad y la barrera inter-especies.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alper T.** (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**: 764–766.
- Alper T.** (1967b) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 278–284.
- Aguzzi, A.** and Brandner, S. (1999) The genetics of prions- a contradiction in terms? *Lancet* **354**: 22–25.
- Askanas, V., Bilak, M., Engel, W.K., Leclerc, A. and Tome, F.** (1993) Prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of human normal neuromuscular functions. *Neurosci. Lett.* **159**: 111–4.
- Bartels, C., Xia, T.H., Billeter, M., Güntert P. and Wüthrich, K.** (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral-analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* **6**: 1–10.
- Bax, A., Clore, G.M., Driscoll, P.C., Gronenborn, A.M., Ikura, M. and Kay, L.E.** (1990) Paractical aspects of proton carbon carbon proton 3-dimensional correlation spectroscopy of C-13-labeled proteins. *J. Mag. Res.* **87**: 620–7.
- Bax, A., Clore, M. and Gronenborn, A.M.** (1990b) ^1H - ^1H correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C -enriched proteins. *J. Mag. Res.* **88**: 425–431.
- Bax, A. and Ikura, M.** (1991) An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ^{15}N backbone amide resonances with the α -carbon of the preceding residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *J. Biomol. NMR.* **1**: 99–104.
- Bax, A. and Grzesiek, S.** (1993) Methodological advances in Protein NMR. *Acc. Chem. Res.* **26**: 131–138.
- Baxter, N.J., Hosszu, L.L.P., Waltho, J.P. and Williamson, M.P.** (1998) Characterisation of low free-energy excited states of folded proteins. *J. Mol. Biol.* **284**: 1625–1639.
- Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R. and Wüthrich, K.** (1997) Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 7281–7285.
- Bodenhausen, G. and Ruben, D.J.** (1980). Natural abundance N-15 by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**:185–189.

- Bolton, D.C.**, McKinley, M.P. and Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309–1311.
- Bounhar, Y.**, Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A. (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**: 39145–9.
- Bruce, M.E.**, Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. and Bostock C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 498–501.
- Bueler, H.**, Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to Scrapie. *Cell* **73**: 1339–1347.
- Calzolari, L.**, Lysek, D.A., Güntert, P., von Schroetter, C., Riek, R., Zahn, R. and Wüthrich, K. (2000) NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8340–8345.
- Calzolari, L.**, Lysek, D., Pérez, D.R., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2005) Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 651–655.
- Cereghetti, G.M.**, Schweiger, A., Glockshuber R. and Van Doorslaer S. (2001). Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu(2+) to the C-terminal domain of the murine prion protein. *Biophys. J.* **81**: 516–25.
- Chiarini, L.B.**, Freitas, A.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R. and Linden, R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21**: 3317–26.
- Colling, S.B.**, Collinge, J. and Jefferys, J.G., (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+) activated K+ currents. *Neurosci. Lett.* **209**: 49–52.
- Collinge, J.**, Wittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature.* **370**: 295–7.
- Cornell, W.D.**, Cieplak, P., Bayly C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmayer, D.C., Fox, T., Caldwell J.W. and Kollman, P.A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5179–5197.
- Creutzfeldt, H.G.** (1920) Über eine eigentartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* **57**:1–18.
- Delepierre, M.**, Larvor, M.P., Baleux, F. and Goldberg, M.E. (1991). ¹H-NMR conformational analysis of a high-affinity antigenic 11-residue peptide from the tryptophan synthase β₂ subunit. *Eur. J. Biochem.* **201**: 681–693.
- Eberl, H.**, Tittmann, P. and Glockshuber, R. (2004) Characterization of recombinant, membrane-attached full-length prion protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 25058–25065.
- Fesik, S.W.** and Zuiderweg, E.R. (1988) Heteronuclear 3-Dimensional NMR-spectroscopy - a strategy for the simplification of homonuclear two dimensional NMR spectra. *J. Mag. Res.* **78**: 588–593.

- Fournier, J.G.**, Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. and Robain, O. (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C. R. Acad. Sci.* **318**: 339–44.
- Gabus, C.**, Auxilien, S., Pechoux, C., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W., Nandi, P. and Darlix, J.L. (2001a) The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J. Mol. Biol.* **307**: 1011–1021.
- Gabus, C.**, Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W.K., Marc, D., Nandi, P. and Darlix, J.L. (2001b) The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 19301b–19309.
- Gabriel, J.M.**, Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. and Prusiner, S.B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 9097–9101.
- Gauczynski, S.**, Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* **20**: 5863–5875.
- Gehring, K.** and Ekiel, I. (1998) H(C)CH-COSY and (H)CCH-COSY experiments for ^{13}C -labeled proteins in H_2O solution. *J. Mag. Res.* **135**: 185–193.
- Gerstmann, J.** (1928) Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des cerebellären Systems. *Wien. med. Wochenschr.* **78**: 906–908.
- Gossert, A.D.**, Bonjour, S., Lysek, D.A., Fiorito, F. and Wüthrich, K. (2005) Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 646–50.
- Griffith J.S.** (1967) Self replication and scrapie. *Nature* **215**: 1043–1044.
- Gilch, S.**, Nunziante, M., Ertmer, A., Wopfner, F., Laszlo, L. and Schätzl, H. M. (2004) *Traffic* **5**, 300–313.
- Grzesiek, S.** and Bax, A. (1992) Improved 3D triple resonance NMR techniques applied to a 31 KDa Protein. *J. Mag. Res.* **96**: 432–440.
- Grzesiek, S.** and Bax, A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Biomol. NMR.* **3**: 185–204.
- Grzesiek, S.**, Anglister, J., Ren, H. and Bax, A. (1993) ^{13}C line narrowing by ^2H decoupling in $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. Application to triple-resonance 4D J connectivity of sequential amides *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 4369–4370.
- Güntert, P.**, Dötsch, V., Wider, G. and Wüthrich, K. (1992). "Processing of multidimensional NMR data with the new software PROSA. *J. Biomol. NMR*, **2**(6), 619–629.
- Güntert P.**, Mumenthaler, C. and Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**:283–98.
- Haire, L.F.**, Whyte, S.M., Vasisht, N., Gill, A.C., Verma, C., Dodson, E.J., Dodson, G.G. and Bayley, P.M. (2004) The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J. Mol. Biol.* **336**: 1175–1183.

- Harris, D.** (1999) Cellular Biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 429-444.
- Harris, D.A., Falls, D.L., Johnson, F.A. and Fischbach, G.D.** (1991) A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 7664-7668.
- Hasnain, S.S., Murphy, L.M., Strange, R.W., Grossmann, J.G., Clarke, A.R., Jackson, G.S. and Collinge, J.** (2001) XAFS study of the high-affinity copper-binding site of human PrP(91-231) and its low resolution structure in solution. *J. Mol. Biol.* **311**: 467-73.
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R.** (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science.* **279**: 827-834.
- Hermes, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. and Kretzschmar, H.** (2000). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* **19**: 8866-75.
- Herrmann, T., Güntert P. and Wüthrich, K.** (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR.* **24**: 171-89.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C.L., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J. and Lantos, P.** (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-50.
- Hornemann, S., Schorn, C. and Wüthrich, K.** (2004) NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep.* **5**: 1159-64.
- Ikura, M., Kay, L.E. and Bax, A.** (1991) Improved three-dimensional ^1H - ^{13}C - ^1H correlation spectroscopy of a ^{13}C -labeled protein using constant-time evolution. *J. Biomol. NMR.* 299-304.
- Ironside, J., Head, M.W., Bell, J.E., McCardle, L. and Will, R.** (2000) Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* **37**: 1-9.
- Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R. and Collinge, J.** (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 8531-5.
- James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E.** (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 10086-10091.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B.** (1997a) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 10069-10074.
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B.** (1997b) COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 2333-2338.

- Kay, L.E.,** Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, T. (1990) Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Mag. Res.* **89**: 496–514.
- Keller, R.** (2004) The computer aided resonance assignment tutorial. 1st Ed. ISBN 3-85600-112-3, CANTINA Verlag.
- Keshet, G.I.,** Bac-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U. and Gabizon, R. (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J. Neurochem.* **75**: 1889–97.
- Kimberlin, R.H.** (1986) Scrapie: How much do we really understand? *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **12**: 131–147.
- Kirkwood, J.K.** and Cunningham, A.A. (1994) Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British isles. *Vet. Rec.* **135**: 296–303.
- Koradi, R.,** Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**: 51–5.
- Kramer, M.L.,** Kratzin, H.D., Schmidt, B., Romer, A. Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S. and Kretzschmar, H. (2001) Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.* **276**: 16711–9.
- Kumar, A.,** Ernst, R.R. and Wüthrich, K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) for the elucidation of complete proton proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1–6.
- Kuwata, K.,** Li, H., Yamada, H., Legname, G., Prusiner S.B., Akasaka, K. and James T.L. (2002) Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PrP^{Sc}? *Biochemistry.* **41**: 12277–12283.
- Kuwata, K.,** Kamatari, Y.O., Akasaka, K. and James, T.L. (2004) Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry.* **43**: 4439–4446.
- Lasmezas, C.I.,** Fournier, J.G., Nouvel, V., Boe, H., Marce, D., Lamoury, F., Kopp, N., Hauw, J.J., Ironside, J., Bruce, M., Dormont, D. and Deslys, J.P. (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 4142–4147.
- Lee, D.C.,** Stenland, C.J., Miller, J.L., Cai, K., Ford, E.K., Gilligan, K.J., Hartwell, R.C., Terry, J.C., Rubenstein, R., Fournel, M. and Patteway, S.R. (2001) A direct relationship between the partitioning of the pathogenic prion protein and transmissible spongiform encephalopathy infectivity during the purification of plasma proteins. *Transfusion.* **41**: 449–55.
- Liu, H.,** Farr-Jones, S., Ulyanov, N.B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., López García, F., Zahn, R., Riek, R. and Wüthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8334–8339.
- López García F.,** Zahn, R., Riek, R. and Wüthrich K. (2000) NMR Structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8334–9.

- Luginbühl, P., Güntert, P., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996)** The new program OPAL for molecular dynamics simulations and energy refinements of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR.* **8**: 136–146.
- Luz, Z. and Meiboom, S. (1963)** Nuclear Magnetic Resonance study of the proteolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution – order of the reaction with respect to the solvent. *J. Chem. Phys.* **39**: 366.
- Lysek, D., Schorn, C. Nivon, L.G, Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Güntert., P. and Wüthrich, K. (2005)** Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 640–645.
- Macura, S. and Ernst., R.R. (1980)** Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR-spectroscopy. *Mol. Phys.*, **41**: 95–117.
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G. and Collinge, J. (2002)** Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* **21**: 202–10.
- Marion, D., Kay, L.E., Sparks, S.W., Torchia, D.A. and Bax, A. (1989)** 3-Dimensional Heteronuclear NMR of N-15-Labeled proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1515–1517.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Jonson, M.O. and van Zijl, P.C.M. (1995)** Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new phase HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation *J. Mag. Res. series B.* **108**: 94–98.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. and Kellermann, O. (2000)** Signal transduction through prion protein. *Science.* **289**: 1925–1928.
- Muhandiram, D.R., Farrow, N.A., Xu, G., Smallcombe, S.H. and Kay, L.E. (1993)** A gradient ¹³C NOESY-HSQC experiment for recording NOESY spectra of ¹³C-labeled proteins dissolved in H₂O. *J. Mag. Res. B* **102**: 317–321.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1996)** Recombinant scrapie-like prion protein of 106 aminoacids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:15457–15462.
- Nandi, P.K. and Leclerc, E. (1999)** Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution. *Arch. Virol.* **144**: 1751–1763.
- Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoka, R., Atarashi, R., Kataoka, Y. and Miyamoto, T. (1997)** Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell. Mol. Neurobiol.* **17**: 537–45.
- Nunziante, M., Gilch, S. and Schätzl, H. M. (2003)** Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 3726–3734.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B. and Hood, L.E. (1985)** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* **40**: 735–746.
- Oesch, B., Jensen, M., Nilsson, P. and Fogh, J. (1994)** Properties of the scrapie prion protein: quantitative analysis of protease resistance. *Biochemistry.* **33**: 5926–31.

- Pauly, P.C.** and Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 33017–10.
- Perera, W.S.** and Hooper, N.M. (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr. Biol.* **11**: 519–23.
- Peretz, D.,** Williamson R.A., Matsunaga, Y., Servan, H., Pinilla, C., Bastidas, R.B., Rozenshteyn, James, T.L., Houghten R.A., Cohen, F., Prusiner, S.B. and Burton D.R. (1997) A conformational transition at the N-terminus of the prion protein features in the formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.* **273**: 614–622.
- Pérez, D.R.** and Wüthrich, K. (2005) NMR assignment of the *Xenopus laevis* prion protein fragment xIPrP (98-226). *J. Biomol. NMR.* **31**: 260.
- Pfeifer, K.,** Bachmann, M., Schroeder, H.C., Forrest, J., Muller, W.E. (1993) Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells. *Cell Biochem. Funct.* **11**: 1–11.
- Prusiner, S.B.** (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136–144.
- Prusiner, S.B.,** Scott, M.R., DeArmond, S.J. and Cohen, F.E. (1998). Prion Protein Biology. *Cell.* **93**: 337–348.
- Prusiner, S.B.** (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science.* **252**: 1515–1522.
- Prusiner, S.B.** (1996) Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 482–487.
- Prusiner, S.B.** (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 13363–13383.
- Reed, J.,** Hull, W.E., von der Lieth, C.W., Kübler, D., Suhai, S. and Kinzel, V. (1988) Secondary structure of the Arg-Gly-Asp recognition site in proteins involved in cell-surface adhesion. *Eur. J. Biochem.* **178**: 141–154.
- Renner, C.,** Schleicher, M., Moroder, L. and Holak T.A. (2002) Practical aspects of the 2D ¹⁵N-¹H-NOE experiment. *J. Biomol. NMR.* **23**: 23–33.
- Riek, R.,** Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121–321). *Nature.* **382**: 180–182.
- Riek, R.,** Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **413**: 282–288.
- Riek, R.,** Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 11667–11672.
- Rudd, P.M.,** Wormald, M.R., Wing, D.R., Prusiner, S.B. and Dwek, R.A. (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry.* **40**: 3759–66.
- Rybner, C.,** Finel-Szermanski, S., Felin, M., Sahraoui, T., Rousseau, C., Fournier, J.G., Seve, A.P. and Botti, J. (2002) The cellular prion protein: a new partner of the lectin CBP70 in the nucleus of NB4 human promyelocytic leukemia cells. *J. Cell Biochem.* **84**: 408–419.

- Schmitt-Ulms, G.**, Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.L., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* **314**: 1209–25.
- Scott, M.**, Foster, D., Mirenda, C., Servan, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G. and DeArmond, S.J. (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* **59**: 847–57.
- Shyng, S.L.**, Huber, M.T. and Harris, D.A (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* **268**: 15922–15928.
- Simonic, T.**, Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Ceciliani, F. and Ronchi, S. (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* **469**: 33–38.
- Skelton, N.J.**, Palmer, A.G., Akke, M., Kordel, J., Rance, M. and Chazin, W.J. (1993) Practical aspect of two dimensional proton detected ^{15}N spin relaxation measurements. *J. Mag. Res. B* **102**: 253–264.
- Spielhaupter, C.** and Schätzl, H.M. (2001) PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**: 44604–44612.
- Stahl, N.**, Baldwin, M. A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. and Prusiner, S.B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**: 1991–2002.
- Strumbo, B.**, Ronchi, S., Bolis, L.C. and Simonic, T. (2001) Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* **508**: 170–174.
- Szyperski, T.**, Lüginbuhl, G., Otting, P., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1993) Protein dynamics studied by rotating frame ^{15}N spin relaxation times. **3**: 151–164.
- Telling, G.C.**, Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. and Prusiner, S.B. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science.* **274**: 2079–2082.
- Telling, G.C.**, Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1995) Prion propagating in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell.* **83**: 79–90.
- Tobler, I.**, Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature.* **380**: 639–642.
- Van Rheede, T.**, Smolenaars, M.M., Madsen, O. and De Jong, W.W. (2003) Molecular evolution of the Mammalian prion protein. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 111–121.
- Vanik, D.L.**, Surewicz, K.A. and Surewicz, W.K. (2004) Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol. Cell.* **14**: 139–145.
- Viles, J. H.**, Donne, D., Kroon, G., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2001) Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. *Biochemistry.* **40**: 2743–2753.

- Weissmann, C.** (1996) The Ninth Datta Lecture. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Lett.* **389**: 3–11.
- Whittal, R.M.,** Ball, H.L., Cohen, F.E., Burlingame, A.M., Prusiner, S.B. and Baldwin, M.A. (2000) Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein.Sci.* **9**: 332–43.
- Wider, G.,** Macura, S., Kumar, A., Ernst, R.R. and Wüthrich, K. (1984) Homonuclear two-dimensional H-1-NMR of proteins- experimental procedures. *J. Mag. Res.* **56**: 207–234.
- Will, R.G.,** Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. and Smith, P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet North Am. Ed.* **347**: 921–925.
- Will, R.G.,** Cousens, S.N., Farrington, C.P., Smith, P.G., Knight, R.S.G. and Ironside J.W. (1999) Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet North Am. Ed.* **353**: 979.
- Wille, H.,** Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A. and Prusiner, S.B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3563–3568.
- Williams, E.S.** and Young, S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* **16**: 89–98.
- Williamson, M.P.,** Havel, T.F. and Wüthrich, K. (1985) Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315.
- Whittington, M.A.,** Sidle, K.C., Gowland, I., Meads, J., Hill, A.F., Palmer, M.S., Jefferys, J.G. and Collinge, J. (1995) Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat. Gen.* **9**: 197–201.
- Wopfner, F.,** Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T. and Schätzl, H.M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* **289**: 1163–1178.
- Wüthrich, K.** (1986) NMR of proteins and nucleic acids, Wiley, New York.
- Yamazaki, T.,** Julie, D., Forma-Kay and Kay, L.E. (1993) Two dimensional NMR experiments for correlating ¹³Cβ and ¹Hδ/ε chemical shifts of aromatic residues in ¹³C labeled proteins via scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 11044–11055.
- Zahn R.,** von Schroetter, C. and Wüthrich, K. (1997) Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding *FEBS Lett.* **417**, 400–404.
- Zahn, R.,** Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López García, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wüthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 145–150.
- Zanata, S.M.,** Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., de Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R. and Martins, V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21**: 3307–16.

APÉNDICE I

Revisión teórica de resonancia magnética nuclear (NMR)

NMR es un fenómeno relacionado con la rotación de los núcleos atómicos, el movimiento de los electrones en su vecindad inmediata. Si el núcleo gira, el momento magnético nuclear y las cargas eléctricas nucleares giran con él. Este cambio en la orientación de ambas propiedades respecto a los campos circundantes cambia la energía del núcleo. El Hamiltoniano de espín nuclear es un operador cuántico que contiene términos que describen la forma en que cambia la energía nuclear magnética en la medida que el núcleo gira, de esta forma representa las interacciones que el espín nuclear establece con los campos circundantes.

El momento magnético es una función del operador de momento angular $\hat{\mu} = \gamma \hat{\mathbf{I}}$, donde γ es la constante giromagnética, propia de cada isótopo.

La energía nuclear magnética: $\hat{\mathbf{H}}^{mag} = -\hat{\mu} \cdot \mathbf{B}$ tiene un valor mínimo cuando el momento magnético \mathbf{B} es paralelo al campo externo.

El espín nuclear interactúa con campos eléctricos y magnéticos. Cuando esos campos provienen de la misma muestra se trata de *interacciones de espín internas*. Si los campos

son originados por el espectrómetro, las interacciones son llamadas *interacciones de espín externas*, estas últimas son solamente de carácter magnético.

La parte del Hamiltoniano que da cuenta de las interacciones externas es:

$$\hat{H}_{\text{EXT}}(t) = \sum_j \hat{H}_j^{\text{static}} + \sum_j \hat{H}_j^{\text{RF}}(t)$$

donde el primer término es la interacción de cada espín I_j con el campo estático longitudinal B_0 , y el segundo término es la interacción de cada espín con el campo de radiofrecuencia transversal, ambos generados por el espectrómetro.

El Hamiltoniano de interacción del espín con el campo estático longitudinal, también llamado *interacción nuclear de Zeeman*, obedece a la siguiente relación:

$$\hat{H}_j^{\text{static}} = -\gamma_j B_0 \hat{I}_{jz}$$

Por otra parte el Hamiltoniano interno consta de los siguientes términos:

$$\hat{H}_{\text{INT}}(t) = \sum_j \hat{H}_j^{\text{CS}} + \sum_j \hat{H}_j^{\text{QC}} + \sum_j \hat{H}_j^{\text{DDC}} + \sum_j \hat{H}_j^{\text{JC}} + \sum_j \hat{H}_j^{\text{SR}}$$

donde

CS: Corrimiento químico. Interacción magnética indirecta entre el campo magnético externo y el espín nuclear a través de los electrones.

QC: Acoplamiento cuadrupolar. Interacción electrónica entre núcleos con espín $>1/2$ con los campos eléctricos circundantes.

DDC: Acoplamiento dipolar. Interacción magnética directa entre espines nucleares.

JC: Acoplamiento escalar. Interacciones magnéticas indirectas entre espines nucleares, a través de la participación de los electrones.

SR: Rotación de espín. Interacciones de espines nucleares con campos magnéticos generados por el movimiento rotacional de las moléculas.

El cálculo de las interacciones se facilita al obtener una versión simplificada del Hamiltoniano interno. Ello se logra mediante dos formas:

1) La aproximación secular. El cálculo de Hamiltonianos se realiza en gran medida mediante operaciones de matrices. Dichas operaciones se facilitan en gran medida al obtener matrices diagonales. En NMR el trabajo con campos magnéticos estáticos de gran magnitud permite la aproximación secular que lleva a la diagonalización de matrices. Bajo esta aproximación, la dinámica de espines está dominada por la fuerte interacción con el campo estático externo.

Brevemente, para cualquier par de operadores **A** y **B**, si se expresa **B** usando la base propia de **A** como base:

- i)* Si los operadores conmutan, se obtiene **B** como matriz diagonal
- ii)* Si los operadores conmutan, pero **A** contiene algunos valores propios degenerados, el resultado es la matriz **B** diagonal en bloque.
- iii)* Si **A** y **B** no conmutan, el resultado es la matriz **B** con valores finitos en cualquier posición.

En aquellos casos en que aún persistan valores distintos de cero en elementos fuera de la diagonal en la matriz **B**, estos términos pueden descartarse siempre que:

$|b_{mn}| \ll |a_m - a_n|$, donde b_{mn} es un elemento fuera de la diagonal en la matriz **B** en la base propia de **A**, y a_i son los valores propios de **A**. Esto es, los términos serán descartables cuando su valor sea significativamente menor a la diferencia entre los valores de la diagonal que conecta en las posiciones correspondientes de la matriz **A**.

En espectroscopia de NMR, el trabajo con campos estáticos de gran magnitud genera una *interacción nuclear Zeeman* fuerte. En presencia de esta interacción, una aproximación secular permite descartar los componentes transversales provenientes de pequeños campos adicionales que interactúan con el espín y simplificar la expresión del Hamiltoniano interno.

Uno de los términos simplificados en el Hamiltoniano interno es el de acoplamiento escalar:

$$\hat{H}^{JC} = 2\pi J_{IS} (\hat{I}_x \hat{S}_x + \hat{I}_y \hat{S}_y + \hat{I}_z \hat{S}_z)$$

en presencia de la interacción nuclear de Zeeman

$$\hat{H}^Z = \omega_I^0 I_z + \omega_S^0 S_z$$

cuando ambos términos son expresados en la base propia del Hamiltoniano de Zeeman ($|\alpha\alpha\rangle, |\alpha\beta\rangle, |\beta\alpha\rangle, |\beta\beta\rangle$), el resultado es una esperada matriz diagonal para el Hamiltoniano de Zeeman

$$\hat{H}^Z = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \omega_I^0 + \omega_S^0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \omega_I^0 - \omega_S^0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\omega_I^0 + \omega_S^0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\omega_I^0 - \omega_S^0 \end{bmatrix}$$

y una matriz diagonal de bloque para el Hamiltoniano de acoplamiento escalar

$$\hat{H}^{JC} = \begin{bmatrix} \frac{1}{2}\pi J_{IS} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{2}\pi J_{IS} & \pi J_{IS} & 0 \\ 0 & \pi J_{IS} & -\frac{1}{2}\pi J_{IS} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{1}{2}\pi J_{IS} \end{bmatrix} /$$

Cada elemento fuera de la diagonal en el Hamiltoniano escalar se compara con la diferencia entre los valores propios en las posiciones diagonales correspondientes del Hamiltoniano de Zeeman. Los elementos fuera de la diagonal son descartados si cumplen la condición $|\omega_I^0 - \omega_S^0| \gg \pi J_{IS}$. Esta condición es satisfecha cuando los espines provienen de dos isótopos distintos (heteronuclear), y en caso homonuclear cuando la diferencia en corrimientos químicos (medida en Hertz) es suficientemente grande. Dicha condición se cumple al trabajar con campos estáticos fuertes en espectrómetros de alta potencia. En este caso la aproximación es denominada *de acoplamiento débil*.

2) Los movimientos moleculares rápidos permiten aplicar el *promedio de movimiento*. Cuando las moléculas sufren movimientos moleculares rápidos, los términos de interacción fluctúan en el tiempo. Si el movimiento molecular es suficientemente rápido, la interacción fluctuante puede ser reemplazada por su valor promediado por movilidad.

Los términos no seculares del Hamiltoniano que tienen un valor promediado por movimiento igual a cero son descartados, y son tratados en forma separada por cuanto son ellos los responsables de la relajación nuclear del espín.

Si se aplica un pulso corto de radiofrecuencia (rf), el momento magnético precesará alrededor del campo magnético total. Una vez que el pulso rf finaliza, el momento magnético ya no se encuentra paralelo al campo magnético principal y, por lo tanto, la energía magnética nuclear no es la mínima posible. Entonces, el momento magnético precesará de forma de volver a su estado de energía mínimo. La aproximación teórica a esta evolución del momento magnético puede llevarse a cabo de tres distintas formas: el modelo vectorial, la aproximación mecánico-cuántica, y el formalismo del operador de producto. A continuación, un resumen de cada una de estas aproximaciones.

El modelo vectorial.

Este modelo describe el efecto que tiene el pulso de radiofrecuencia en la magnetización total de la muestra generada por el campo magnético estático. La magnetización total es descrita como un vector de magnetización rotando en un espacio tridimensional, y los movimientos observados obedecen las leyes de la teoría electromecánica clásica.

La magnetización total es definida como la suma de todos los momentos magnéticos microscópicos en la muestra:

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_{\text{sample}} \vec{\mu}$$

Un dipolo magnético se tiende a alinear con un campo magnético externo bajo la acción de un torque mecánico definido como

$$\vec{T} = \vec{\mu} \times \vec{B}$$

Los momentos magnéticos microscópicos (μ) de electrones y núcleos están relacionados con el momento angular general (L) según $\vec{\mu} = \gamma \vec{L}$. En esta ecuación giromagnética se define γ como la constante giromagnética.

De acuerdo a las leyes mecánicas de Newton, el cambio en el momento angular genera un torque: $\vec{T} = \frac{d}{dt} \vec{L}$. Usando las últimas tres ecuaciones se demuestra que

$$\frac{d}{dt} \vec{M}(t) = \gamma \vec{M}(t) \times \vec{B}$$

Suponiendo $B = (0, 0, B_0)$, el sistema acoplado de ecuaciones diferenciales queda de la forma:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} M_x(t) &= \gamma M_y(t) B_0 \\ \frac{d}{dt} M_y(t) &= -\gamma M_x(t) B_0 \\ \frac{d}{dt} M_z(t) &= 0 \end{aligned}$$

y su solución es:

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_x(0) \cos(\omega_0 t) - M_y(0) \sin(\omega_0 t) \\ M_y(t) &= M_x(0) \sin(\omega_0 t) + M_y(0) \cos(\omega_0 t) \\ M_z(t) &= M_z(0) \end{aligned}$$

bajo la condición:

$$M(0) = (M_x(0), M_y(0), M_z(0))$$

y definiendo la frecuencia angular de Larmor como $\omega_0 = -\gamma B_0$

Se puede escribir en forma de vector:

$$\vec{M}(t) = R_z(\omega_0 t) \vec{M}(0)$$

Donde R_z es la matriz de rotación que gira la magnetización inicial $\vec{M}(0)$ alrededor del eje z:

$$R_z(\omega_0 t) = \begin{bmatrix} \cos(\omega_0 t) & -\sin(\omega_0 t) & 0 \\ \sin(\omega_0 t) & \cos(\omega_0 t) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

No se puede suponer que la magnetización precese por siempre alrededor del eje z. De hecho hay mecanismos de amortiguación que devuelven el vector de magnetización a su orientación energéticamente más favorable. Entre estos mecanismos se cuentan T_1 , o relajación longitudinal (espín-medio), que devuelve una magnetización en estado de no equilibrio a su valor de equilibrio, T_2 o relajación transversal (espín-espín), que devuelve los componentes transversales de la magnetización a cero. Luego de suponer una cinética de primer orden para ambos, se consiguen las ecuaciones de Bloch:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} M_x(t) &= \gamma M_y(t) B_0 - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{d}{dt} M_y(t) &= -\gamma M_x(t) B_0 - \frac{M_y(t)}{T_2} \\ \frac{d}{dt} M_z(t) &= -\frac{M_z(t) - M_{eq}}{T_1} \end{aligned}$$

que en su forma vectorial se expresan:

$$\frac{d}{dt} \vec{M}(t) = \gamma(\vec{M}(t) \times \vec{B}) - \Re\{\vec{M}(t) - \vec{M}_{eq}\}$$

$$\text{con } \Re = \begin{bmatrix} 1/T_2 & 0 & 0 \\ 0 & 1/T_2 & 0 \\ 0 & 0 & 1/T_1 \end{bmatrix}$$

cuya solución es:

$$M_x(t) = [M_x(0) \cos(\omega_0 t) - M_y(0) \sin(\omega_0 t)] \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

$$M_y(t) = [M_x(0) \sin(\omega_0 t) + M_y(0) \cos(\omega_0 t)] \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

$$M_z(t) = M_{eq} + (M_z(0) - M_{eq}) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)$$

o, en su forma vectorial

$$\vec{M}(t) = R_z(\omega_0 t) \exp(-\mathfrak{R}T) (\vec{M}(0) - \vec{M}_{eq}) + \vec{M}_{eq}$$

Para obtener el efecto de resonancia es necesario la aplicación de un campo magnético dependiente del tiempo, y la solución a la ecuación de movimiento del vector de magnetización en la presencia de un campo rf dependiente del tiempo es difícil. Sin embargo, el cálculo se facilita si se trabaja en un sistema de coordenadas rotatorio, en vez del sistema de coordenadas fijo del laboratorio. En este sistema de referencia rotatorio el decaimiento libre de la inducción magnética (FID) queda determinado como:

$$\vec{M}'(t) = R_z(\Omega t) \exp(-\mathfrak{R}t) (\vec{M}'(0) - \vec{M}_{eq}) + \vec{M}_{eq}$$

con $\Omega = \omega_0^* - \omega_{rf}$, donde ω_0^* es la frecuencia de Larmor que incluye el corrimiento químico)

La ventaja de esta aproximación vectorial es que es muy intuitiva, permitiendo visualizar y predecir el producto de experimentos de NMR muy simples, y provee una descripción fenomenológica de los dos principales mecanismos de relajación, la relajación transversal y la longitudinal.

La principal desventaja es que sí predice la evolución en sistemas de núcleos de espines 1/2 y que no interactúan entre sí.

Si se quiere describir experimentos NMR más complejos, como los experimentos heteronucleares, es necesario hacer uso de aproximaciones teóricas más completas, con ellas se pueden abordar experimentos que incluyen transferencias de magnetización, ya sea longitudinal (NOESY), o mediante correlación (COSY).

Mecánica cuántica.

Este modelo permite la explicación y predicción completa de la espectroscopia NMR.

La magnetización es estudiada a nivel atómico, y es definida como distribución de poblaciones de espines nucleares en distintos niveles energéticos.

Los fenómenos asociados con la secuencias de pulsos de NMR, son descritos como cambios en la distribución y transiciones de espines entre los distintos estados energéticos y superposiciones coherentes entre ellos. Los operadores Hamiltonianos describen la influencia de las interacciones entre los espines nucleares y el medio circundante sobre los procesos mencionados.

La evolución temporal de un sistema cuántico cerrado se describe mediante la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi(t)\rangle = \mathbf{H} |\Psi(t)\rangle$$

Si el Hamiltoniano (\mathbf{H}) es independiente del tiempo, la ecuación se puede resolver fácilmente mediante separación de variables:

$$\Psi(t) = \psi(\tau)\varphi(t)$$

donde $\psi(\tau)$ contiene las variables de espín y espaciales independientes del tiempo, y $\varphi(t)$ contiene las variables dependientes del tiempo.

La solución a la ecuación es

$$|\Psi(t)\rangle = |\psi(\tau)\rangle \exp(-itE_k / \hbar)$$

donde E_k son los valores propios del operador Hamiltoniano y tienen dimensión de energía.

En mecánica cuántica son frecuentes los cálculos de productos escalares y de valores esperados para un determinado operador. Estos cálculos se facilitan en gran medida cuando se utiliza una formulación particular en mecánica cuántica. Esta formulación especial se enfoca especialmente en la matriz de densidad más que en la función de onda para un sistema determinado.

La función de onda puede ser descrita por un vector en un espacio de funciones de Hilbert de N dimensiones.

$$|\Psi(t)\rangle = \sum_{i=1}^N c_i(t) |\phi_i\rangle$$

El operador de densidad se define como

$$\sigma(t) = \sum_i \sum_j \overline{c_i(t)c_j^*(t)} |\phi_i\rangle \langle \phi_j|$$

donde la barra indica el promedio sobre el arreglo completo.

$$\sigma(t) = \begin{bmatrix} \overline{c_1(t)c_1^*(t)} & \overline{c_1(t)c_2^*(t)} & \dots & \overline{c_1(t)c_{N-1}^*(t)} & \overline{c_1(t)c_N^*(t)} \\ \overline{c_2(t)c_1^*(t)} & \overline{c_2(t)c_2^*(t)} & \dots & \overline{c_2(t)c_{N-1}^*(t)} & \overline{c_2(t)c_N^*(t)} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \overline{c_{N-1}(t)c_1^*(t)} & \overline{c_{N-1}(t)c_2^*(t)} & \dots & \overline{c_{N-1}(t)c_{N-1}^*(t)} & \overline{c_{N-1}(t)c_N^*(t)} \\ \overline{c_N(t)c_1^*(t)} & \overline{c_N(t)c_2^*(t)} & \dots & \overline{c_N(t)c_{N-1}^*(t)} & \overline{c_N(t)c_N^*(t)} \end{bmatrix}$$

De la definición del valor esperado para un operador

$$\langle A \rangle = \langle \Psi | A | \Psi \rangle$$

se obtiene

$$\overline{\langle A \rangle} = \text{Tr}\{\sigma(t)A\}$$

Para evaluar el valor esperado de una observable se debe conocer la representación de matriz del operador apropiado y, más importante, la forma del operador de densidad. La evolución temporal del sistema, cuando pasa a través de una secuencia de pulsos de radiofrecuencia y retardos, puede ser descrita por la evolución temporal de la matriz de densidad.

La ecuación de Liouville-von Neumann es la ecuación diferencial que describe la evolución en el tiempo del operador de densidad. Esta ecuación se deriva de la ecuación de Schrödinger al expandir la función de onda en la combinación lineal de funciones ortonormales y sus coeficientes.

$$|\Psi(t)\rangle = \sum_{i=1}^N c_i(t) |\phi_i\rangle$$

Utilizando el arreglo de coeficientes en σ , se tiene

$$\frac{d\sigma(t)}{dt} = -i[\mathbf{H}, \sigma(t)]$$

donde la solución para el Hamiltoniano independiente del tiempo es

$$\sigma(t) = \exp(-i\mathbf{H}t)\sigma(0)\exp(i\mathbf{H}t)$$

Con este resultado se puede escribir

$$\overline{\langle A \rangle} = \text{Tr}\{\exp(-i\mathbf{H}t)\sigma(0)\exp(i\mathbf{H}t)A\}$$

se utiliza la aproximación de alta temperatura para obtener

$$\sigma(0) = \sigma_{eq} = - \sum_{n=1}^N \frac{\omega_{0n}}{Nk_B T} I^{nz}$$

donde N es el número de espines por unidad de volumen, y K es el número de tipos de espín en el sistema.

En el equilibrio $\sigma(0)$ es diagonal, y los elementos de la diagonal tienen una distribución de Boltzmann.

Si los Hamiltonianos son dependientes del tiempo, entonces se necesita una transformación de la ecuación de Liouville-von Neumann a un sistema de referencia rotatorio.

$$\frac{d\sigma^r(t)}{dt} = -i[\mathbf{H}_e, \sigma^r(t)]$$

donde \mathbf{H}_e y $\sigma^r(t)$ se define como

$$\mathbf{H}_e = \mathbf{U} \mathbf{H} \mathbf{U}^{-1} - i \mathbf{U} \frac{d\mathbf{U}^{-1}}{dt}$$

y

$$\sigma^r(t) = \mathbf{U} \sigma(t) \mathbf{U}^{-1}$$

y la solución a la ecuación

$$\sigma^r(t) = \exp(-i\mathbf{H}_e t) \sigma^r(0) \exp(i\mathbf{H}_e t)$$

La expresión $\exp(-i\mathbf{H}_e t)$ es denominada el propagador \mathbf{U} .

Se necesita encontrar una transformación a la ecuación que genere el Hamiltoniano en su forma independiente del tiempo, aplicarla a \mathbf{H} y a $\sigma(0)$, para entonces conseguir

la ecuación de Liouville-von Neumann en el marco de interacción, y entonces transformar $\sigma^r(t)$ de vuelta a $\sigma(t)$ a través de

$$\sigma(t) = U^{-1}\sigma^r(t)U$$

Para calcular el FID, se necesita determinar el operador de densidad a tiempo cero, para conseguir los Hamiltonianos de espín (entonces conseguir sus valores propios y vectores propios para obtener su diagonal), y aplicar la ecuación de Liouville-von Neumann para conseguir el operador de densidad tantas veces como sea necesario).

La magnetización compleja que se registra durante el periodo de adquisición del experimento NMR se define como

$$M^+(t) = N\gamma\hbar Tr \left\{ \sigma(t) \sum_{k=1}^K (I_{kx} + iI_{ky}) \right\}$$

donde N es el número de espines por unidad de volumen y K el número de tipos de espín en el sistema.

Ejemplo de cálculo mecánico cuántico:

El experimento de NMR más simple, un pulso simple seguido por adquisición del FID.

El efecto de un pulso de noventa grados en x $(\pi/2)_x$ se calcula aplicando operadores de rotación al sistema en equilibrio.

Para un espín aislado, el operador de densidad al equilibrio es proporcional al operador de momento angular de espín en el eje z

$$\sigma^{eq} \propto I_z$$

por lo tanto

$$\begin{aligned}\sigma(t) &= \exp(-i\mathbf{H}t)\sigma^{\text{eq}}\exp(i\mathbf{H}t) \\ &= \mathbf{R}_x(\alpha)I_z\mathbf{R}_x^{-1}(\alpha)\end{aligned}$$

donde \mathbf{R}_x y \mathbf{R}_x^{-1} son las matrices de rotación

$$\begin{aligned}\mathbf{R}_x(\pi/2) &= \begin{bmatrix} \cos(\pi/2) & i\sin(\pi/2) \\ i\sin(\pi/2) & \cos(\pi/2) \end{bmatrix} \\ \mathbf{R}_x^{-1}(\pi/2) &= \begin{bmatrix} \cos(\pi/2) & -i\sin(\pi/2) \\ -i\sin(\pi/2) & \cos(\pi/2) \end{bmatrix}\end{aligned}$$

y $I_z = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}$ la matriz de Pauli para el componente longitudinal de operador de

momento angular de espín.

$$\begin{aligned}\mathbf{R}_x(\pi/2)I_z\mathbf{R}_x^{-1}(\pi/2) &= \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \cos(\pi/2) & i\sin(\pi/2) \\ i\sin(\pi/2) & \cos(\pi/2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos(\pi/2) & -i\sin(\pi/2) \\ -i\sin(\pi/2) & \cos(\pi/2) \end{bmatrix} \\ &= \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 0 & i \\ -i & 0 \end{bmatrix} = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} 0 & -i \\ i & 0 \end{bmatrix} = -I_y\end{aligned}$$

esto es, luego de aplicar el pulso $(\pi/2)_x$ a la magnetización en z, el resultado es la magnetización en $-I_y$.

La magnetización en $-I_y$ evoluciona durante el periodo de adquisición bajo la influencia del Hamiltoniano de corrimiento químico

$$\mathbf{H}^{\text{CS}} = (\omega_0 - \omega_f)I_z = \Omega I_z$$

La ecuación de Liouville-von Neumann para este sistema es

$$\frac{d\sigma(t)}{dt} = i[\sigma(t), \mathbf{H}^{\text{CS}}]$$

Como el Hamiltoniano es independiente del tiempo se tiene que

$$\begin{aligned}
\sigma(t) &= \exp(-i\mathbf{H}t)\sigma(0)\exp(i\mathbf{H}t) \\
&= \exp(-i\Omega I_z t)(-I_y)\exp(i\Omega I_z t) \\
&= \exp\left\{-i\Omega t \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}\right\} \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 0 & i \\ -i & 0 \end{bmatrix} \exp\left\{i\Omega t \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}\right\} \\
&= \frac{1}{2}\begin{bmatrix} \exp(i\Omega t/2) & 0 \\ 0 & \exp(-i\Omega t/2) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 & i \\ -i & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -\exp(i\Omega t/2) & 0 \\ 0 & -\exp(-i\Omega t/2) \end{bmatrix} \\
&= \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 0 & i \exp(-i\Omega t) \\ -i \exp(i\Omega t) & 0 \end{bmatrix} \\
&= \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 0 & i[\cos(\Omega t) - i \sin(\Omega t)] \\ -i[\cos(\Omega t) + i \sin(\Omega t)] & 0 \end{bmatrix} \\
&= \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 0 & i \cos(\Omega t) + \sin(\Omega t) \\ -i \cos(\Omega t) + \sin(\Omega t) & 0 \end{bmatrix} \\
&= \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 0 & -\sin(\Omega t) \\ \sin(\Omega t) & 0 \end{bmatrix} + \frac{i}{2}\begin{bmatrix} 0 & \cos(\Omega t) \\ -\cos(\Omega t) & 0 \end{bmatrix} \\
&= \begin{bmatrix} 0 & -1/2 \\ 1/2 & 0 \end{bmatrix} \sin(\Omega t) + \begin{bmatrix} 0 & i/2 \\ -i/2 & 0 \end{bmatrix} \cos(\Omega t) \\
&= I_x \sin(\Omega t) - I_y \cos(\Omega t)
\end{aligned}$$

Llevar a cabo el cálculo de las ecuaciones en una representación explícita de matrices para el operador de densidad, y su evolución en el tiempo (ecuación de Liouville-von Neumann), bajo el efecto de las interacciones con los campos circundantes (Hamiltonianos), provee una descripción rigurosa de la evolución de un sistema de

espines nuclear. Pero el formalismo de matrices de densidad presenta ciertas desventajas, primero que los cálculos de matrices se vuelven agobiantes a medida que se incrementa el número de espines participantes en el sistema, y luego que el formalismo no otorga una visión cualitativa de los experimentos de NMR que permita visualizar intuitivamente el resultado de una secuencia de pulsos.

Formalismo del operador de producto

La mayoría de los experimentos de NMR, en especial los heteronucleares, constan de muchos pulsos y retardos. Como el principal objetivo del análisis teórico de espectroscopia de NMR es la predicción del producto de experimentos, focalizar la atención en los operadores en sí mismos más que en las soluciones de la ecuación de Schrödinger para cada paso demuestra ser una muy buena aproximación al problema de entender los experimentos. Con ese propósito fue desarrollado el formalismo del operador de producto (POF).

La notación utilizada para mostrar experimentos de NMR con el formalismo de operador de producto es:

$$\sigma^2 = \exp(-i\mathbf{H}t)\sigma^1 \exp(i\mathbf{H}t)$$

$$\sigma^1 \xrightarrow{\mathbf{H}t} \sigma^2$$

Con POF es posible describir sistemas de espines simples y múltiples con algunas restricciones:

En un sistema de espines múltiples, la función de onda puede ser expresada como productos directos de las funciones de onda de los espines individuales

$$\Psi_m = |m_1\rangle \otimes |m_2\rangle \otimes |m_3\rangle \dots \otimes |m_N\rangle$$

Estas funciones de onda son independientes entre sí en caso que los espines estén bajo un régimen de acoplamiento débil, esto es, que la frecuencia de acoplamiento escalar es pequeña comparada con la diferencia en frecuencia Larmor entre los espines involucrados en el acoplamiento

$$2\pi J / \omega_A - \omega_B \ll 1$$

Esta condición permite trabajar solamente con los términos seculares de los Hamiltonianos y describir el experimento con POF.

Si el acoplamiento es fuerte, entonces las funciones de onda de los distintos espines involucrados en el acoplamiento y que tienen el mismo número cuántico se mezclan, y no pueden ser tratados de forma independiente.

En el régimen de acoplamiento débil los niveles de energía, transiciones, superposiciones coherentes de niveles de energía y rotaciones para un sistema de N espines, se describe en un espacio de producto de 4^N dimensiones. De esta forma, para describir la evolución del operador de densidad en un sistema de dos espines se requiere trabajar en un espacio de 16 dimensiones.

Antes de poder describir los movimientos del operador de densidad durante una secuencia de pulsos y retardos, es necesario conocer todas las relaciones de conmutación entre los distintos niveles de energía y coherencias. Estas están resumidas en la siguiente tabla.

E	I_z	S_z	$I_z^2 S_z$	I_x	I_y	$I_x S_z$	$-I_y S_z$	S_x	S_y	$I_z^2 S_x$	$I_z^2 S_y$	$I_x S_x$	$I_y S_y$	$I_x S_y$	$I_y S_x$	$I_x S_z$	$I_y S_z$	$I_x S_x$	$I_y S_x$
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I_z	0	0	0	I_y	$-I_x$	$I_y S_z$	$-I_x S_z$	0	0	0	0	$I_y S_x$	$-I_x S_y$	$I_y S_y$	$-I_x S_x$	$I_y S_z$	$-I_x S_z$	$I_y S_x$	$-I_x S_y$
S_z	0	0	0	0	0	0	0	S_y	$-S_x$	$I_z^2 S_y$	$-I_z^2 S_x$	$I_x S_y$	$-I_x S_x$	$-I_y S_x$	$-I_x S_y$	$I_x S_x$	$-I_x S_y$	$I_y S_y$	$I_y S_x$
$I_z^2 S_z$	0	0	0	$I_y S_z$	$-I_x S_z$	I_y	$-I_x$	$I_z^2 S_y$	$-I_z^2 S_x$	S_y	$-S_x$	0	0	0	0	0	0	0	0
I_x	0	$-I_y$	0	$-I_y S_z$	0	I_z	$I_z^2 S_z$	0	0	$-I_y S_x$	$-I_y S_y$	0	0	$I_z^2 S_y$	0	$I_z^2 S_x$	0	$I_z^2 S_x$	0
I_y	0	I_x	0	$I_x S_z$	$-I_z$	0	0	0	0	$I_x S_x$	$I_x S_y$	$-I_z^2 S_x$	0	0	0	$-I_z^2 S_y$	0	$-I_z^2 S_y$	0
$I_x S_z$	0	$-I_y S_z$	0	$-I_y$	0	$I_z^2 S_z$	0	$I_x S_y$	$-I_x S_x$	0	0	S_y	0	0	0	$-S_x$	0	$-S_x$	0
$I_y S_z$	0	$I_x S_z$	0	I_x	$-I_z^2 S_z$	$-I_z$	0	$I_y S_y$	$-I_y S_x$	0	0	0	0	$-S_x$	0	0	0	S_y	0
S_x	0	$-S_y$	0	$-I_z^2 S_y$	0	$-I_x S_y$	$-I_y S_y$	0	S_x	0	$I_z^2 S_z$	0	$I_y S_z$	$I_x S_z$	$I_x S_z$	0	0	$-I_y S_z$	0
S_y	0	S_x	0	$I_z^2 S_x$	0	$I_x S_x$	$I_y S_x$	$-S_z$	0	$-I_z^2 S_z$	0	$-I_x S_z$	0	0	0	$-I_x S_z$	0	$-I_y S_z$	0
$I_z^2 S_x$	0	$-I_z^2 S_y$	0	$-S_y$	$I_y S_x$	0	0	0	$I_z^2 S_z$	0	S_z	I_z	0	0	0	0	0	$-I_x$	0
$I_z^2 S_y$	0	$I_z^2 S_x$	0	S_x	$-I_x S_y$	0	0	$-I_z^2 S_z$	0	0	0	0	$-I_x$	I_y	I_y	0	0	0	0
$I_x S_x$	0	$-I_y S_x$	0	0	0	$-S_y$	0	0	$I_x S_z$	$-I_y$	0	0	0	S_z	0	0	0	I_z	I_z
$I_y S_y$	0	$I_x S_y$	0	0	0	0	0	$-I_y S_z$	0	I_x	0	0	0	0	0	0	0	$-I_z$	$-S_z$
$I_x S_y$	0	$-I_y S_y$	0	0	0	S_x	0	$-I_x S_z$	0	0	$-I_y$	$-S_z$	I_z	0	0	0	0	0	0
$I_y S_x$	0	$I_x S_x$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$-S_z$	$-I_z$	0	0	0	0	0	0
$I_y S_x$	0	$I_x S_x$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Todos los conmutadores deben ser multiplicados por i y todos los productos de coherencias por 2.

donde las coherencias se definen como

Coherencia	Nombre de la coherencia
E	Identidad
I_z	longitudinal I
S_z	longitudinal S
$2I_zS_z$	longitudinal de orden doble espín
I_x, I_y	transversal I coherencia cuántica simple
$2I_xS_z, 2I_yS_z$	transversal I anti-fase en S
S_x, S_y	transversal S coherencia cuántica simple
$2I_zS_x, 2I_zS_y$	transversal S anti-fase en I
$2I_xS_x, 2I_yS_y, 2I_xS_y, 2I_yS_x$	coherencia cero- y doble-cuántica

En teoría hay 15 dimensiones que pueden servir como ejes de rotaciones para que el operador de densidad gire alrededor de él.

Para tres operadores cualesquiera que satisfagan las siguientes conmutaciones cíclicas.

$$[A, B] = iC$$

$$[C, A] = iB$$

$$[B, C] = iA$$

se cumple la siguiente identidad

$$\exp(-i\theta C)(A)\exp(i\theta C) = A \cos \theta + [C, A] \sin \theta = A \cos \theta + B \sin \theta$$

o usando la notación POF

$$A \xrightarrow{\theta C} A \cos(\theta) + B \sin(\theta)$$

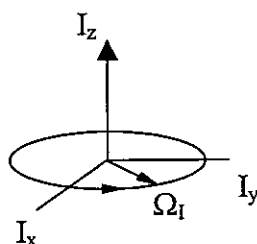
Una de esas identidades fue demostrada en el ejemplo de cálculo mecánico cuántico presentado arriba.

Todas las posibles rotaciones pueden ser descritas por una sola ecuación.

Esta identidad permite a POF evitar el cálculo de matriz para el operador de densidad. Una característica particularmente interesante de POF es que trabaja exclusivamente con operadores de momento angular de espín, los cuales tienen un significado físico claro, y que los efectos de pulsos y retardos son vistos como rotaciones geométricas en subespacios tridimensionales del espacio completo de coherencias, muy al estilo del modelo vectorial. Por tanto, la expresión $\exp(-i\theta C)(A)\exp(i\theta C)$ o $A \xrightarrow{\theta C}$ se interpreta como la rotación de A en un ángulo θ alrededor de C.

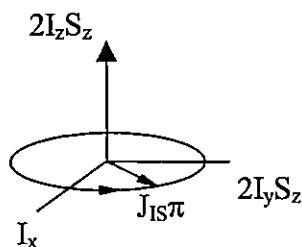
Las tres rotaciones básicas en POF son

i) Precesión de Larmor



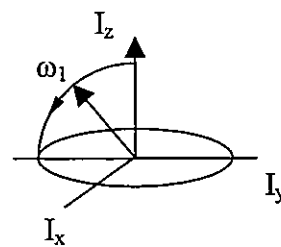
$$\mathbf{H}_{free} = \Omega_I I_z$$

ii) Modulación de J



$$\mathbf{H}_J = 2\pi J_{IS} I_z S_z$$

iii) Nutación



$$\mathbf{H}_{rf} = \omega_1 I_{x/y}$$

La precesión de Larmor es la precesión clásica alrededor del campo estático B_0 . En POF se describe como una rotación en el plano I_x, I_y alrededor de I_z , con frecuencia Ω_I . Cualquier otro espín S realiza exactamente la misma precesión de Larmor en el plano S_x, S_y , alrededor de S_z , con frecuencia Ω_S .

La modulación escalar es la precesión alrededor del eje $2I_zS_z$ con frecuencia πJ_{IS} . Esta es una rotación en el plano $I_x, 2I_yS_z$ o en el plano $2I_xS_z, I_y$. Esto es, en un plano I_x, I_y donde uno de los dos I_x or I_y tiene un coeficiente extra S_z .

La precesión alrededor del campo B_I con frecuencia $\omega_I = \gamma B_I$ se denomina nutación. El eje de rotación puede estar en cualquier punto del plano XY. En la figura del ejemplo se muestra un pulso en I a lo largo del eje X del sistema de referencia rotatorio.

Las reglas presentadas arriba permiten la descripción de una amplia variedad de experimentos de pulso de NMR. Antes de presentar algunos ejemplos es necesario especificar algunas formalidades y aspectos prácticos:

1) Conmutación de los pulsos y retardos:

$$\sigma^1 \xrightarrow{\Omega_I I_x t + \Omega_S S_z t + 2\pi J_{IS} I_x S_z t} \sigma^4$$

Cuando los términos conmutan entre sí, como en la ecuación precedente, la evolución puede ser dividida en una serie de rotaciones independientes

$$\sigma^1 \xrightarrow{\Omega_I I_x t} \sigma^2 \xrightarrow{\Omega_S S_z t} \sigma^3 \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_x S_z t} \sigma^4$$

El orden en que se apliquen las rotaciones debidas a corrimiento y acoplamiento no tiene ninguna importancia.

2) De igual forma, el efecto de un pulso no selectivo aplicado sobre I y S se escribe

$$\sigma^1 \xrightarrow{\omega_1 t (S_x + I_x)} \sigma^3$$

debido a que I y S conmutan

$$\sigma^1 \xrightarrow{\omega_1 t S_x} \sigma^2 \xrightarrow{\omega_1 t I_x} \sigma^3$$

3) El efecto de un pulso aplicado selectivamente al espín S de un término tal como el producto $2I_x S_z$ se obtiene utilizando la regla que la rotación afecta solamente al operador del mismo espín.

$$2I_x S_z \xrightarrow{\omega_1 S_x} 2I_x S_z \cos(\omega_1 t) - 2I_x S_y \sin(\omega_1 t)$$

4) Los operadores no son afectados por rotaciones que involucran al mismo operador debido a que un operador y el exponencial del mismo operador conmutan.

$$I_x \xrightarrow{\omega_1 S_x} I_x$$

5) En POF es usual distinguir entre espines activos y pasivos. Espines activos contribuyen con operadores transversales, en cambio espines pasivos contribuyen con operadores longitudinales (operadores-z). En el caso de coherencias cero y doble-cuánticas en las cuales i y j son activos, se define el siguiente grupo de operadores:

doble cuántica:

$$DQ_x^{(ij)} = \frac{1}{2}(2I_{ix}I_{jx} - 2I_{iy}I_{jy})$$

$$DQ_y^{(ij)} = \frac{1}{2}(2I_{ix}I_{jy} + 2I_{iy}I_{jx})$$

cero cuántica:

$$ZQ_x^{(ij)} = \frac{1}{2}(2I_{ix}I_{jx} + 2I_{iy}I_{jy})$$

$$ZQ_y^{(ij)} = \frac{1}{2}(2I_{ix}I_{jy} - 2I_{iy}I_{jx})$$

La evolución de estos términos bajo corrimientos químicos es análoga a la evolución de I_x e I_y bajo precesión libre excepto que las frecuencias de evolución son $(\Omega_i + \Omega_j)$ y $(\Omega_i - \Omega_j)$ respectivamente:

$$\begin{aligned}
DQ_x^{(ij)} &\xrightarrow{\Omega_i t_{iz} + \Omega_j t_{jz}} \cos[(\Omega_i + \Omega_j)t] DQ_x^{(ij)} + \sin[(\Omega_i + \Omega_j)t] DQ_y^{(ij)} \\
DQ_y^{(ij)} &\xrightarrow{\Omega_i t_{iz} + \Omega_j t_{jz}} \cos[(\Omega_i + \Omega_j)t] DQ_y^{(ij)} - \sin[(\Omega_i + \Omega_j)t] DQ_x^{(ij)} \\
ZQ_x^{(ij)} &\xrightarrow{\Omega_i t_{iz} + \Omega_j t_{jz}} \cos[(\Omega_i - \Omega_j)t] ZQ_x^{(ij)} + \sin[(\Omega_i - \Omega_j)t] ZQ_y^{(ij)} \\
ZQ_y^{(ij)} &\xrightarrow{\Omega_i t_{iz} + \Omega_j t_{jz}} \cos[(\Omega_i - \Omega_j)t] ZQ_y^{(ij)} - \sin[(\Omega_i - \Omega_j)t] ZQ_x^{(ij)}
\end{aligned}$$

Las coherencias cuánticas múltiples entre espines i y j no evolucionan bajo la influencia del acoplamiento entre los dos espines activos i y j . Los espines evolucionan bajo acoplamientos pasivos, en una forma enteramente análoga a la evolución de I_x e I_y ,

$$\begin{aligned}
DQ_x^{(ij)} &\longrightarrow \cos(\pi J_{DQ,eff} t) DQ_x^{(ij)} + \sin(\pi J_{DQ,eff} t) 2I_{kz} DQ_y^{(ij)} \\
DQ_y^{(ij)} &\longrightarrow \cos(\pi J_{DQ,eff} t) DQ_y^{(ij)} - \sin(\pi J_{DQ,eff} t) 2I_{kz} DQ_x^{(ij)} \\
ZQ_x^{(ij)} &\longrightarrow \cos(\pi J_{ZQ,eff} t) ZQ_x^{(ij)} + \sin(\pi J_{ZQ,eff} t) 2I_{kz} ZQ_y^{(ij)} \\
ZQ_y^{(ij)} &\longrightarrow \cos(\pi J_{ZQ,eff} t) ZQ_y^{(ij)} - \sin(\pi J_{ZQ,eff} t) 2I_{kz} ZQ_x^{(ij)}
\end{aligned}$$

donde $J_{DQ,eff}$ es la suma de los acoplamientos entre el espín i y todos los otros espines más la suma de los acoplamientos entre el espín j y todos los demás espines. $J_{ZQ,eff}$ es la suma de los acoplamientos entre el espín i y todos los otros espines menos la suma de los acoplamientos entre el espín j y todos los otros espines.

6) POF puede ser aplicado a tres o más espines. Se ha mostrado que si bien la aplicación de POF a un sistema de dos espines involucra 16 dimensiones, lo cierto es que todas las rotaciones individuales tienen lugar en subespacios tri-dimensionales X,Y,Z. Esto se mantiene aún si se incrementa el número de espines débilmente acoplados. No aparecen nuevas propiedades, la evolución del corrimiento químico y los pulsos de radiofrecuencia son tratados de la misma manera que en un sistema de dos espines. La evolución del acoplamiento escalar J se puede deducir de las reglas de conmutación

anteriormente expuestas. A modo de ejemplo, supongamos que se desea calcular la transformación bajo acoplamiento escalar J entre los espines I y S en un intervalo τ . El operador de producto no evolucionará bajo el acoplamiento J_{IS} en los siguientes casos: si ambos espines están ausentes del operador de producto, si un espín I o S está presente llevando el índice Z , y si ambos espines están presentes en el operador de producto ambos llevando el índice Z . En todos los demás casos el operador de producto sí evoluciona bajo el acoplamiento escalar J_{IS} .

Ejemplos:

1) Transferencia de coherencia:

La transferencia de coherencia entre espines es un fenómeno fundamental en espectroscopia de NMR multidimensional. Éste es un efecto que no puede ser descrito por el modelo vectorial de Bloch.

Suponiendo que de alguna forma se genera un componente anti-fase $2I_xS_z$, el efecto de aplicar un pulso $(\pi/2)_y$ en ambos espines es

$$2I_xS_z \xrightarrow{(\pi/2)_y} -2I_zS_z \xrightarrow{(\pi/2)_y} -2I_zS_x$$

La coherencia de anti-fase original en el espín I se transfiere a coherencia de anti-fase en el espín S . Luego, bajo la influencia de un pulso de radiofrecuencia la coherencia ha sido transferida de un espín a otro.

En contraste, la aplicación de un pulso $(\pi/2)_x$ a ambos espines genera

$$2I_x S_z \xrightarrow{(\pi/2)(I_x + S_x)} -2I_x S_y$$

El mismo resultado se obtiene al aplicar un pulso solamente al espín S

$$2I_x S_z \xrightarrow{(\pi/2)S_x} -2I_x S_y$$

Los dos últimos casos muestran la generación de coherencia cuántica múltiple en espines homonucleares y heteronucleares respectivamente.

2) Eco de espín

El pulso de secuencia eco de espín debe ser examinado en tres casos:

espín aislado, dos espines homonucleares acoplados, y dos espines heteronucleares acoplados.

Si se comienza con la magnetización I_z en el equilibrio, un pulso inicial $(\pi/2)_x$ genera

$$I_z \xrightarrow{\pi/2 I_x} -I_y$$

i) La secuencia de pulso eco de espín para un espín aislado se escribe como:

$$\tau \text{ — } \pi_x \text{ — } \tau$$

La evolución durante el periodo de precesión libre produce:

$$-I_y \xrightarrow{\Omega_1 I_x \tau} -I_y \cos(\Omega_1 \tau) + I_x \sin(\Omega_1 \tau)$$

El pulso convierte el operador de densidad en

$$-I_y \cos(\Omega_1 \tau) + I_x \sin(\Omega_1 \tau) \xrightarrow{\pi_x} I_y \cos(\Omega_1 \tau) + I_x \sin(\Omega_1 \tau)$$

Después de un segundo retardo τ

$$I_y \cos(\Omega_1 \tau) + I_x \sin(\Omega_1 \tau) \xrightarrow{\Omega_1 I_x \tau} I_y \cos^2(\Omega_1 \tau) - I_x \cos(\Omega_1 \tau) \sin(\Omega_1 \tau) \\ + I_x \sin(\Omega_1 \tau) \cos(\Omega_1 \tau) + I_y \sin^2(\Omega_1 \tau) = I_y$$

Se puede ver que la secuencia de pulso eco de espín, partiendo desde un estado inicial $-I_y$, genera un estado final I_y . El corrimiento químico ha sido reenfocado por el eco de espín.

ii) La misma secuencia de eco de espín puede ser aplicada a un sistema de espín homonuclear. Los pulsos se suponen no-selectivos. Como en el caso del espín aislado, el corrimiento químico es reenfocado y puede ser descartado. Por lo tanto, la evolución del operador de densidad durante la secuencia de pulso se debe al acoplamiento escalar.

Un pulso inicial $(\pi/2)_x$ genera $-I_y$ a partir de I_z .

El acoplamiento se desarrolla durante τ

$$-I_y \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_x S_z \tau} -I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau)$$

El pulso π_x lo convierte en

$$-I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \xrightarrow{\pi(I_x + S_x)} I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau)$$

La evolución bajo el segundo retardo τ produce (usando las identidades trigonométricas

$$\cos(2\theta) = \cos^2(\theta) - \sin^2(\theta)$$

y

$$\sin(2\theta) = 2\sin(\theta)\cos(\theta):$$

$$I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_x S_z \tau} I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau)$$

Calibrando el retardo $\tau = \frac{1}{4J_{IS}}$ se obtiene el operador de densidad enteramente en

término anti-fase $2I_x S_z$, mientras que calibrando $\tau = \frac{1}{2J_{IS}}$ se obtiene el operador de

densidad enteramente como el término en fase $-I_y$.

iii) Si los dos espines con acoplamiento escalar son heteronucleares, los pulsos de radiofrecuencia pueden ser aplicados solamente a un tipo de espín (en este caso I). De nuevo, el corrimiento químico para I es reenfozado y puede ser ignorado.

En este caso, luego de un pulso $(\pi/2)_x$ la evolución que sigue:

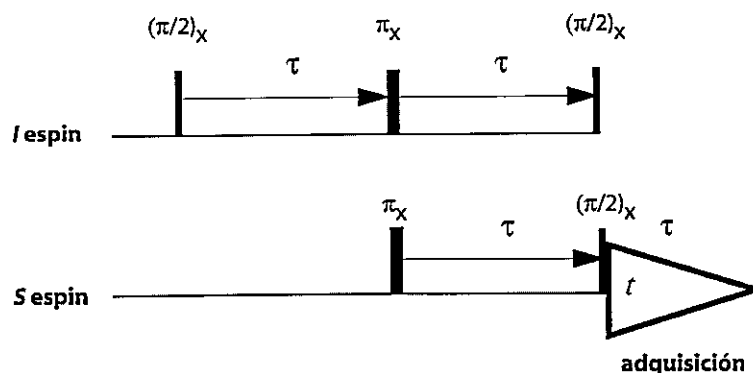
$$\begin{aligned}
 -I_y &\xrightarrow{2\pi J_{IS}I_z S_z \tau} -I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \\
 &\xrightarrow{\pi_x} I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \\
 &\xrightarrow{2\pi J_{IS}I_z S_z \tau} I_y
 \end{aligned}$$

El uso de la secuencia espín-eco desacopla el espín S del espín I .

3) INEPT

Aumento de la señal de núcleos insensibles por transferencia de polarización INEPT (siglas del nombre en inglés *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*) es un componente esencial de muchos experimentos de NMR multidimensionales. El objetivo es transferir magnetización desde un núcleo sensible al campo estático con una constante giromagnética alta (^1H), a un núcleo menos sensible al campo estático con una constante giromagnética baja (^{15}N o ^{13}C).

La secuencia INEPT se puede escribir como:



Se comienza con la magnetización al equilibrio $K_I I_z$ en la que $K_I = \frac{\omega_I}{2k_B T}$

$$K_I I_z \xrightarrow{\pi 2I_x + 2\pi J_{IS} I_x S_x \tau + \pi(I_x + S_x) + 2\pi J_{IS} I_x S_x \tau} K_I \{I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau)\}$$

Se aplica un pulso $(\pi/2)_y$ al espín I y un pulso $(\pi/2)_x$ al espín S :

$$K_I \{I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau)\} \xrightarrow{\pi 2(I_y + S_x)} K_I \{I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_y \sin(2\pi J_{IS} \tau)\}$$

Si el retardo es calibrado a $\tau = \frac{1}{4J_{IS}}$ entonces la señal final viene dada por

$$K_I \{-2I_x S_y\}.$$

La magnetización de anti-fase se transfirió al espín S . Además, el término anti-fase es multiplicado por un factor K_I . En cambio, si un pulso simple $(\pi/2)_x$ se aplica a la magnetización de equilibrio del espín S . En este caso la magnetización observable viene dada por $K_S \{-S_y\}$, que corresponde a un doblete anti-fase.

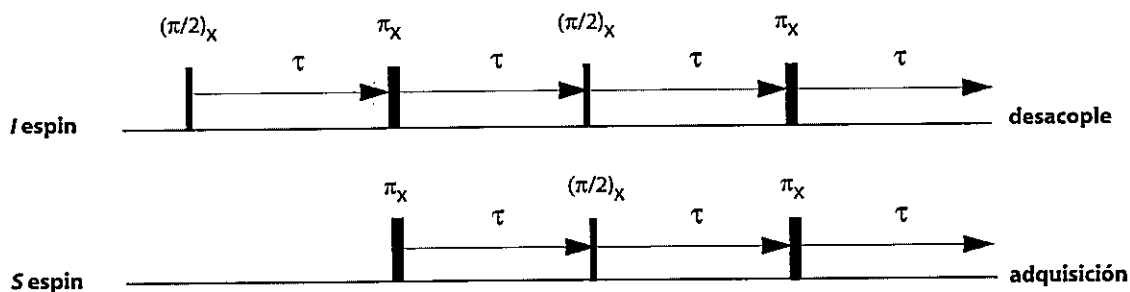
La constante K_S es proporcional a la constante giromagnética. Por tanto:

$$\frac{\text{INEPT}}{\text{Convencional}} = \frac{K_I}{K_S} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S}$$

La ventaja de aplicar INEPT crece en la medida en que la constante giromagnética del espín S disminuye. Una ventaja adicional es que la tasa de repetición del experimento está determinada por las constantes de tiempo de relajación del espín I , más que por las del espín S . Normalmente el espín I corresponde al protón, y sus tiempos de relajación pueden ser notablemente más cortos que los tiempos de relajación para el espín S .

En el INEPT reenforcado, la coherencia anti-fase $K_I \{-2I_z S_y\}$ se convierte en coherencia en-fase y un pulso de desacople se aplica sobre el espín I . El propósito de este campo es aumentar la sensibilidad del experimento reduciendo el tamaño del acoplamiento escalar a cero. El resultado es que la señal que normalmente se observa como un multiplete colapsa en un singulete, en donde la amplitud del singulete es la suma de las amplitudes de los multipletes. Se requiere convertir la coherencia de anti-fase a en-fase pues los campos de desacople solamente se pueden aplicar sobre un operador en-fase.

El experimento se escribe como:



Si se calibra $\tau = \frac{1}{4J_{IS}}$ la secuencia de pulso final produce

$$-K_I 2I_z S_y \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z \tau + \pi(I_x + S_x) + 2\pi J_{IS} I_x S_x \tau} K_I S_x$$

Este doblete en-fase ahora puede desacoplarse para aumentar la sensibilidad del espectro. El operador S_x obtenido se puede convertir en un operador S_z mediante la aplicación de un pulso $(\pi/2)_{-y}$ al espín S .

$$K_I S_x \xrightarrow{\pi/2 I_{-y}} K_I S_z$$

La magnetización de equilibrio del espín S es proporcional a $K_S S_z$, comparando esta distribución de población con la obtenida del INEPT re-enfocado, queda al descubierto uno de los resultados más impresionantes de este experimento, y es que la distribución de Boltzmann para la población del espín I fue transferida al espín S .

La principal ventaja del POF es que los operadores de espín angular tienen un significado físico claro y directamente relacionado con las magnetizaciones macroscópicas generadas. Como estos operadores están representados en un espacio tridimensional, el formalismo ofrece una comprensión intuitiva de los experimentos de NMR permitiendo una buena visualización de las vías que toma la magnetización en la secuencia de pulsos. En conclusión, POF facilita la predicción del producto de un experimento de NMR, mientras que retiene gran parte de la rigurosidad del tratamiento del cálculo de la matriz de densidad.

Experimentos de espectroscopia de NMR

NOESY

La espectroscopia de NOESY (del inglés *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) se basa en la transferencia de magnetización longitudinal entre dos espines acoplados por interacciones dipolo-dipolo. El efecto Overhauser queda descrito por las ecuaciones de Solomon

$$\frac{d}{dt}(\langle I_z \rangle - I_0) = -R_{II}(\langle I_z \rangle - I_0) - R_{IS}(\langle S_z \rangle - S_0)$$

$$\frac{d}{dt}(\langle S_z \rangle - S_0) = -R_{II}(\langle S_z \rangle - S_0) - R_{IS}(\langle I_z \rangle - I_0)$$

que en notación de matriz

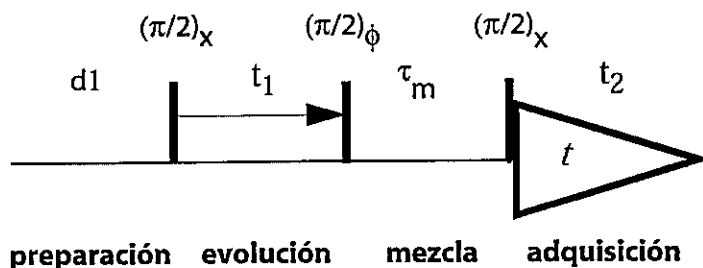
$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} I'_{z1} \\ I'_{z2} \\ \vdots \\ I'_{zn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_{11} & R_{12} & \cdots & R_{1n} \\ R_{21} & R_{22} & \cdots & R_{2n} \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ R_{n1} & \cdots & \cdots & R_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I'_{z1} \\ I'_{z2} \\ \vdots \\ I'_{zn} \end{bmatrix}$$

$$\frac{d}{dt} \vec{I}'_z = -\underline{R} \vec{I}'_z$$

y cuya solución es

$$\vec{I}'_z(t) = e^{-Rt} \vec{I}'_z(0)$$

La secuencia de pulso para NOESY bi-dimensional tiene cuatro etapas:



preparación : es un retardo de relajación que permite al sistema restablecer la magnetización longitudinal de equilibrio después de un barrido previo.

evolución: Después de un pulso $(\pi/2)_x$ se genera magnetización transversal en Y, la densidad del espín queda

$$\sigma = -I_0 I_y - S_0 S_y$$

siendo I_0 y S_0 las magnetizaciones en el equilibrio

$$I_0 = \frac{\gamma_I B_0}{k_B T} \qquad S_0 = \frac{\gamma_S B_0}{k_B T}$$

En el periodo de evolución las magnetizaciones precesan y son marcadas con sus propias frecuencias Ω_1 y Ω_2 (fuera de sintonía con la frecuencia portadora)

$$-I_y \xrightarrow{\Omega_I t_1} -I_y \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1) \quad -S_y \xrightarrow{\Omega_S t_1} -S_y \cos(\Omega_S t_1) + S_x \sin(\Omega_S t_1)$$

mezcla: En ausencia de acoplamiento escalar, y luego de aplicar un segundo pulso $(\pi/2)_x$, la magnetización es posicionada nuevamente en Z. La densidad del espín en este punto es

$$\sigma = I_0 [I_z \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1)] + S_0 [S_z \cos(\Omega_S t_1) + S_x \sin(\Omega_S t_1)]$$

si el pulso es aplicado en -X

$$\sigma = I_0 [I_z \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1)] + S_0 [S_z \cos(\Omega_S t_1) + S_x \sin(\Omega_S t_1)]$$

Ambos pulsos se aplican secuencialmente y las respectivas respuestas son sustraídas una de la otra para obtener el FID final. De esta forma se cancela la magnetización originada en X. Esta técnica es denominada ciclación de fase.

Así, al comienzo del tiempo de mezcla las magnetizaciones están situadas en el eje Z

$$\sigma = -I_z I_0 \cos(\Omega_I t_1) - S_z S_0 \cos(\Omega_S t_1)$$

Las magnetizaciones en el eje Z comienzan a volver a sus valores de equilibrio. Con tiempos de mezcla cortos se puede aproximar.

$$\Delta \langle I_z \rangle = -\{R_{II}[\langle I_z(0) \rangle - I_0] - R_{IS}[\langle S_z(0) \rangle - S_0]\} \tau_m$$

Al final del tiempo de mezcla el término longitudinal de I es

$$\langle I_z(\tau_m) \rangle = \langle I_z(0) \rangle + \Delta \langle I_z \rangle$$

con

$$\langle I_z(0) \rangle = -I_0 \cos(\Omega_I t_1) \quad \langle S_z(0) \rangle = -S_0 \cos(\Omega_S t_1)$$

genera

$$\langle I_z(\tau_m) \rangle = -I_0 \cos(\Omega_I t_1)(1 - R_{II} \tau_m) + S_0 R_{IS} \tau_m \cos(\Omega_S t_1) + (I_0 R_{II} + S_0 R_{IS}) \tau_m$$

donde el primer término es la magnetización originada en I_z marcada con la frecuencia Ω_I que ha reducido su magnitud con la constante de auto-relajación R_{II} en una cantidad $(1 - R_{II} \tau_m)$. El segundo término es la magnetización transferida desde S_z con una constante de relajación cruzada R_{IS} , y marcada con la frecuencia Ω_S . El tercer término no está marcado con ninguna frecuencia y es cancelado con la ciclación de fase al comienzo del periodo de mezcla.

adquisición: el pulso final $(\pi/2)_x$ convierte I_z en $-I_y$, y su precesión de Larmor es monitoreada durante esta etapa.

La señal detectada finalmente es proporcional a

$$F(t_1, t_2) \propto I_0 [(1 - R_{II} \tau_m) \cos(\Omega_I t_1) \cos(\Omega_I t_2) - R_{SI} \tau_m \cos(\Omega_I t_1) \cos(\Omega_S t_2)] \\ + S_0 [(1 - R_{SS} \tau_m) \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_S t_2) - R_{IS} \tau_m \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_I t_2)]$$

donde el primer y tercer términos son picos diagonales (con la misma frecuencia de precesión durante t_1 y t_2), y el segundo y cuarto términos otorgan los picos cruzados NOE (que contienen una frecuencia en cada dimensión).

Para tiempos de mezcla cortos la intensidad de los picos cruzados de NOE es proporcional a las constantes de relajación cruzada $R_{IS}=R_{SI}$, que a su vez dependen de la distancia internuclear entre I y S .

Si la principal fuente de relajación son las interacciones dipolares, y si la molécula rota isotrópicamente con un tiempo de correlación τ_c , las constantes de relajación quedan descritas por:

$$R_{II} = \frac{\hbar\gamma_I^2\gamma_S^2}{10r^6} \left(\frac{6\tau_c}{1+(\omega_I+\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2\tau_c^2} \right)$$

$$R_{SS} = \frac{\hbar\gamma_I^2\gamma_S^2}{10r^6} \left(\frac{6\tau_c}{1+(\omega_I+\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+\omega_S^2\tau_c^2} \right)$$

$$R_{IS} = \frac{\hbar\gamma_I^2\gamma_S^2}{10r^6} \left(\frac{6\tau_c}{1+(\omega_I+\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S)^2\tau_c^2} \right)$$

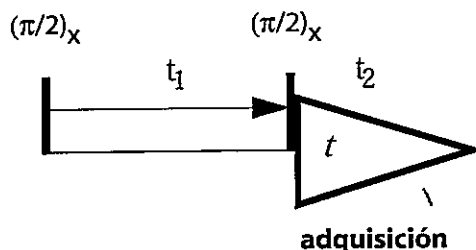
$$R_{SI} = R_{IS}$$

donde ω_I y ω_S son las frecuencias de Larmor de los espines, y donde todos ellos dependen del inverso de la sexta potencia de la distancia internuclear. Esta es la principal fuente de información estructural que permite calcular la estructura de macromoléculas.

COSY

La espectroscopia de correlación (COSY) se basa en la transferencia de magnetización mediante correlación. Aunque el sistema funciona con espines fuertemente acoplados, la secuencia de pulsos se puede tratar en el límite de acoplamiento débil y ser analizada con POF si se cumple que el corrimiento químico entre los espines homonucleares y el campo magnético es suficientemente fuerte (ver aproximación secular de acoplamiento escalar).

La secuencia de pulsos para el experimento más sencillo de espectroscopia de correlación COSY (del inglés *correlation spectroscopy*) es muy simple. Contiene solamente dos pulsos $\pi/2$ separados por un tiempo de retardo variable t_1 .



Suponiendo espines $-1/2$ en un conjunto de tipo AX:

$$\sigma_1 = \sigma_{eq} = I_z + S_z$$

El operador de densidad se transforma como sigue:

$$\sigma_1 \xrightarrow{(\pi/2)I_x} \xrightarrow{(\pi/2)S_x} \sigma_2 = -I_y - S_y$$

$$\begin{aligned} \sigma_2 \xrightarrow{\Omega_1 I_x t} \xrightarrow{\Omega_2 S_x t} \xrightarrow{2\pi J_{IS} t_1 S_x t} \sigma_3 = & -I_y \cos(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) + 2I_x S_z \cos(\Omega_1 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + I_x \sin(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) + 2I_y S_z \sin(\Omega_1 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + S_y \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) + 2I_z S_x \cos(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + S_x \sin(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) + 2I_z S_y \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sigma_3 \xrightarrow{(\pi/2)I_x} \xrightarrow{(\pi/2)S_x} \sigma_4 = & -I_z \cos(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_x S_y \cos(\Omega_1 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + I_x \sin(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_z S_y \sin(\Omega_1 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & - S_z \cos(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_y S_x \cos(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + S_x \sin(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_y S_z \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \end{aligned}$$

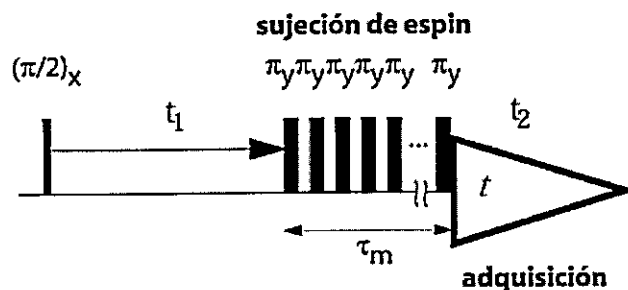
Para analizar la señal se necesita considerar solamente los términos cuánticos

aislados:

$$\begin{aligned} \sigma_4 = & +I_x \sin(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_z S_y \sin(\Omega_1 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \\ & + S_x \sin(\Omega_2 t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) - 2I_y S_z \sin(\Omega_2 t_1) \sin(\pi J_{IS} t_1) \end{aligned}$$

i La principal limitación de la transferencia de coherencia de tipo COSY se deriva de la estructura del multiplete anti-fase de los picos cruzados en el espectro. En ciertas condiciones es posible cancelar parcialmente el multiplete como resultado de interferencia destructiva entre los componentes anti-fase de los picos. Los componentes anti-fase pueden ser re-enfocados y los efectos de interferencia destructiva son eliminados pero a expensas de un periodo de re-enfocamiento adicional.

TOCSY



La secuencia básica de pulso se parece al experimento COSY, donde el segundo pulso $(\pi/2)$ ha sido reemplazado por un pulso de sujeción de espín, esto es un pulso de radiofrecuencia con una duración de hasta 10 ms. La sujeción está hecha de un tren de pulsos π no selectivos. Durante el pulso de sujeción de espín, se elimina la frecuencia de precesión de Larmor, y se permite que el sistema de espines evolucione bajo la influencia de la modulación J. Las secuencias de sujeción (y desacople) de espín más conocidas son MLEV, WALTZ y DIPSI.

En la practica, la intensidad máxima para el pulso de radiofrecuencia de desacople, al borde de ser dañino para la muestra, es aproximadamente 5 kHz. El campo de radiofrecuencias es un tren de pulsos π de 100 μ s cada uno.

Si se considera un sistema de dos espines homonucleares IS , el cual evoluciona en presencia de un campo de radiofrecuencia fuerte B_1 . El eje apropiado de rotación en el espacio de coherencia es:

$$R_{SL} = \Omega_I I_x + \Omega_S S_x - J_{IS}(I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) + \omega_1(I_x + S_x)$$

El término final $\omega_1(I_x + S_x)$ representa el campo de sujeción de espín con $\omega_1 = \gamma B_1$.

Después del primer pulso ($\pi/2$), seguido por el tiempo de evolución t_1 , las cuatro coherencias $I_x, I_y, I_x S_z, I_y S_z$ son generadas a partir de I_z .

$$I_z \xrightarrow{\pi/2 I_x + 2\pi J_{IS} t_1 + \Omega_I t_1} -I_y \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1) + 2I_x S_z \cos(\Omega_I t_1) + 2I_y S_x \sin(\Omega_I t_1)$$

Si por el momento se desprecia el acoplamiento escalar J_{IS} , y más aún, se supone que la fuerza del campo B_1 (frecuencia ω_1) es grande comparada con la diferencia de las frecuencias de des-sintonía (offset) Ω_I y Ω_S , el vector de magnetización precesará alrededor de

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_1 + \frac{1}{\gamma} \vec{\Omega}$$

con una frecuencia efectiva $\omega_{eff} = \sqrt{\omega_1^2 + \Omega^2}$

Ya que \vec{B}_{eff} está casi alineado con el eje X, la precesión que comienza en I_x describe un cono de ángulo pequeño alrededor del eje X. De esta forma, el componente I_x

permanece efectivamente sujeto. En contraste, si se comienza con I_y , tiene lugar una precesión en el plano ZY (ligeramente inclinada). Debido a que el campo de sujeción de espín se mantiene por varios milisegundos (de tal forma que varias revoluciones en el plano ZY tienen lugar), la coherencia I_y desaparece víctima de la inhomogeneidad de la radiofrecuencia. En forma similar, la coherencia $I_x S_z$ se desvanece debido a su precesión alrededor del inhomogéneo campo B_1 . Para $I_y S_z$ la situación es algo más complicada; la precesión alrededor de $\omega_1(I_x + S_x)$ produce:

$$I_y S_z \xrightarrow{\omega_1(I_x + S_x)} I_y S_z \cos^2(\omega_1 t) - I_x S_y \sin^2(\omega_1 t) + (I_y S_y - I_x S_z) \cos(\omega_1 t) \sin(\omega_1 t)$$

Para tomar en cuenta la inhomogeneidad del campo de radiofrecuencia, se debe suponer alguna distribución de ω_1 . Bajo un promediado de ω_1 , el último término ($I_y S_y - I_x S_z$) de la ecuación previa se desvanece, pero los primeros dos no lo hacen. De hecho estas coherencias mezcladas ($I_x S_y - I_y S_z$) pueden ser vistas como los equivalentes de las coherencias cero cuánticas para las coherencias de espines sujetos y es por tanto insensible a la inhomogeneidad del campo de radiofrecuencia. Así, sólo se requiere considerar los destinos de I_x y $2I_y S_z$ durante el pulso de sujeción de espín.

Supóngase que el campo B_1 es suficientemente fuerte para considerar: $\vec{B}_{eff} = \vec{B}_1$, esto es, que los términos de frecuencia fuera de sintonía pueden ser despreciados:

$$R_{SL} \approx -J_{IS} (I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) + \omega_1 (I_x + S_x)$$

Usando las relaciones de conmutación $[I_y S_y + I_z S_z, I_x + S_x] = 0$, la evolución de σ durante el tren de pulsos π se describe como el producto de tres rotaciones independientes:

$$\xrightarrow{(I_x+S_x)\omega_1 t} \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_x S_x} \xrightarrow{2\pi J_{IS} (I_y S_y + I_z S_z)}$$

Primero se evalúa qué pasa cuando se comienza en I_x durante un pulso de sujeción por un periodo τ_m . La rotación alrededor de (I_x+S_x) no tiene efecto, por tanto todo lo que permanece es la rotación alrededor de:

$$R_{iso} = -J_{IS} (I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z)$$

Esta rotación particular es mejor conocida como mezcla isotrópica. Ya que $I_x S_x$ también conmuta con I_x todo lo que queda es:

$$I_x \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_x S_x \tau} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \xrightarrow{2\pi J_{IS} S_y J_{IS} \tau} \\ I_x \cos^2(\pi J_{IS} \tau) - 2I_z S_y \sin(\pi J_{IS} \tau) \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin^2(\pi J_{IS} \tau) + S_x \cos(\pi J_{IS} \tau) \sin(\pi J_{IS} \tau)$$

En el espectro final de TOCSY las contribuciones de coherencias son: señal diagonal, señal cruzada, señal diagonal, señal cruzada, respectivamente.

Para evaluar como evoluciona $2I_y S_z$ durante el tren de pulsos π , se aplica un truco escribiendo la coherencia como:

$$2I_y S_z = (I_y S_z + I_z S_y) + (I_y S_z - I_z S_y)$$

$(I_y S_z - I_z S_y)$ conmuta con $(I_x + S_x)$, el otro $(I_y S_z + I_z S_y)$ puede ser descartado debido a la inhomogeneidad del campo de radiofrecuencia.

El efecto del R_{iso} :

$$I_y S_z - I_z S_y \xrightarrow{R_{iso} \tau} I_y S_z \cos(2\pi J_{IS} \tau) - I_z S_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - \frac{1}{2} I_x (2\pi J_{IS} \tau) + \frac{1}{2} S_x \sin(2\pi J_{IS} \tau)$$

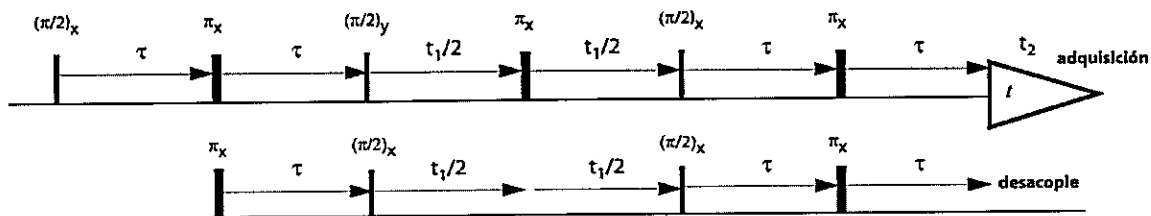
En el espectro final de TOCSY las contribuciones de las coherencias son: señal diagonal, señal cruzada, señal diagonal, señal cruzada, respectivamente.

Una ventaja del experimento TOCSY es que además de la transferencia de coherencia de antifase, $I_x \longrightarrow I_z S_y$, ahora además hay una transferencia de coherencia en-fase $I_x \longrightarrow S_x$. Esta transferencia es óptima para un pulso de sujeción de espín de duración $\tau_m = 1/2 J$. Para el caso más simple de dos espines, esto corresponde a una transferencia de coherencia completamente en-fase, sin señales diagonales o componentes de antifase.

Hay dos factores importantes que influyen en la eficiencia de la transferencia de coherencia. Primero está el grado de desintonía entre el espín y la frecuencia portadora (Ω). Típicamente, cuando una resonancia está desintonizada en un grado mayor que la fuerza del campo de radiofrecuencia ω_1 , entonces la transferencia de coherencia es muy ineficiente. El segundo factor es la no-complementariedad, definida como la diferencia entre las frecuencias de los espines (expresadas como la distancia en Hertz con la frecuencia portadora): $\Delta = |\Omega_I| - |\Omega_S|$. La transferencia de coherencia óptima se obtiene para $\Delta=0$, el que puede ser logrado colocando la frecuencia portadora exactamente en el centro entre las frecuencias de precesión de Larmor ω_I y ω_S .

La forma más simple de la secuencia de pulsos TOCSY es bastante sensible a imperfecciones del experimento. Un gran número de secuencias alternativas de TOCSY se han desarrollado y han demostrado ser más robustas.

HSQC



El análisis del experimento se basa en un sistema heteronuclear IS ($I=^1\text{H}$, $S=^{15}\text{N}$ or $S=^{13}\text{C}$) en el cual los espines I y S están directamente unidos por un enlace covalente y donde el protón I está acoplado escalarmente a un protón remoto K .

En HSQC (del inglés *heteronuclear single quantum coherence transfer*), una secuencia INEPT se usa para transferir polarización de espín I (I_z) a una coherencia cuántica simple (SQ) heteronuclear de anti-fase ($2 I_z S_y$). La coherencia anti-fase heteronuclear SQ evoluciona durante el periodo de evolución t_1 que sigue. Luego, una segunda secuencia INEPT se usa para transferir la coherencia SQ heteronuclear, que ha sido marcada en frecuencia, de vuelta a la magnetización de protón para su detección.

Para un sistema de espín IS , la evolución a través de la secuencia de pulsos se describe como sigue.

$$\begin{aligned}
 I_z &\xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x)-\tau-\pi(I_x+K_x)-\pi S_x-\tau-\frac{\pi}{2}(I_y+K_y)-\frac{\pi}{2}S_x} 2I_z S_y \cos(2\pi J_{IK}\tau) \\
 &\xrightarrow{t_1/2-\pi(I_x+K_x)-t_1/2} 2I_z S_y \cos(\Omega_s t_1) \cos(2\pi J_{IK}\tau) \\
 &\xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x)-\frac{\pi}{2}S_x-\tau-\pi(I_x+K_x)-\tau} I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos^2(2\pi J_{IK}\tau) + I_y K_z \cos(\Omega_s t_1) \sin(4\pi J_{IK}\tau)
 \end{aligned}$$

en la cual se ha despreciado la evolución de la interacción de acoplamiento escalar ^1H homonuclear en ^1H durante la secuencia INEPT.

El retardo 2τ se debería calibrar a $1/(2J_{IS})$ (5,4 ms para enlace simple $^1\text{H}-^{15}\text{N}$, con $J_{\text{NH}}=140\text{Hz}$). En realidad, el retardo se calibra algo más corto que $1/(2J_{IS})$ para evitar mayor relajación durante este tiempo. La evolución del corrimiento químico del espín I durante los periodos 2τ y durante t_1 es re-enfocada por los pulsos $\pi(I)$. La evolución bajo el acoplamiento J_{IS} se reenfoca con el pulso $\pi(I)$, siempre y cuando no se aplique ningún pulso al espín S. La evolución del corrimiento químico del espín S durante los periodos $2t$ se re-enfoca mediante el pulso $\pi(S)$.

El término restante $I_y S_x$ es una coherencia cuántica múltiple no-observable. El operador $2I_z S_y$ presente durante t_1 conmuta con el Hamiltoniano de acoplamiento escalar ^1H homonuclear, y la señal FI no contiene contribuciones de interacciones de acoplamiento escalar ^1H .

Cuando se incluye la interacción de acoplamiento homonuclear en la evolución, la evolución a través de la secuencia se expresa como:

$$\begin{aligned}
 I_z \frac{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x) - (2\pi J_{IS}I_z S_z + 2\pi J_{IK}I_z K_z)2\tau - \frac{\pi}{2}(I_y+K_y) - \frac{\pi}{2}S_x}{(\Omega_s t_1 + 2\pi J_{IK}I_z K_z)t_1} &\rightarrow 2I_z S_y \cos(2\pi J_{IK}\tau) \\
 &\rightarrow 2I_z S_y \cos(\Omega_s t_1) \cos(2\pi J_{IK}\tau) \\
 \frac{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x) - \frac{\pi}{2}S_x - (2\pi J_{IS}I_z S_z + 2\pi J_{IK}I_z K_z)2\tau}{(\Omega_s t_1 + 2\pi J_{IK}I_z K_z)t_1} &\rightarrow I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos^2(2\pi J_{IK}\tau) + I_y K_z \cos(\Omega_s t_1) \sin(4\pi J_{IK}\tau)
 \end{aligned}$$

en la cual los términos observables han sido incluidos.

La evolución bajo el acoplamiento homonuclear JIK no se re-enfoca con los pulsos $\pi(I)$. Esto se debe a que ambos protones I y K experimentan el efecto del pulso no selectivo.

La evolución del acoplamiento escalar ^1H durante los periodos INEPT modula la amplitud pero no la fase de la resonancia absorptiva en-fase, e introduce una contribución dispersiva anti-fase a la señal F_2 . El componente dispersivo anti-fase se puede eliminar aplicando un pulso $(\pi/2)_x(I)$ antes de la adquisición.

$$I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos^2(2\pi J_{IK} \tau) + I_y K_z \cos(\Omega_s t_1) \sin(4\pi J_{IK} \tau) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x)}$$

$$I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos^2(2\pi J_{IK} \tau) - I_z K_y \cos(\Omega_s t_1) \sin(4\pi J_{IK} \tau)$$

El operador anti-fase de espín I se transforma en operador anti-fase de espín K. Si la resonancia del espín K se encuentra en una región sin importancia en el espectro (si no está acoplada a un espín S de interés), el espectro de la correlación IS tiene una pura señal absorptiva en-fase en ambas dimensiones.

El pulso $(\pi/2)(I)$ que sigue al periodo t_1 esta desfasado en $\pi/2$ respecto al pulso $(\pi/2)(I)$ que precede el periodo de evolución t_1 . Si los dos pulsos tienen la misma fase y, entonces la evolución a través de la secuencia de pulso es como sigue:

$$I_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_x+K_x) - (2\pi J_{IS} I_z S_x + 2\pi J_{IK} I_z K_x) 2\tau - \frac{\pi}{2}(I_y+K_y) - \frac{\pi}{2} S_x} 2I_z S_y \cos(2\pi J_{IK} \tau) + 4I_y S_y K_x \sin(2\pi J_{IK} \tau)$$

$$\xrightarrow{(\Omega_s S_x + 2\pi J_{IK} I_z K_x) t_1} 2I_z S_y \cos(\Omega_s t_1) \cos(2\pi J_{IK} \tau) + 4I_y S_y K_x \cos(\Omega_s t_1) \sin(2\pi J_{IK} \tau)$$

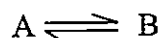
$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_y+K_y) - \frac{\pi}{2} S_x - (2\pi J_{IS} I_z S_x + 2\pi J_{IK} I_z K_x) 2\tau} I_y \cos(\Omega_s t_1) \cos(2\pi J_{IK} \tau) + 2I_x K_z \cos(\Omega_s t_1) \sin(4\pi J_{IK} \tau)$$

La comparación entre las dos evoluciones muestra que el cambio de fase en el pulso final $(\pi/2)(I)$ reduce la contribución que la interacción de acoplamiento escalar tiene en la evolución durante el periodo inicial del INEPT debido a:

$$\cos^2(2\pi J_{IK} \tau) > \cos(4\pi J_{IK} \tau) \text{ and } \sin(4\pi J_{IK} \tau) < 2 \sin(4\pi J_{IK} \tau)$$

INTERCAMBIO QUÍMICO

Para una reacción química



la variación de la magnetización en los ejes del plano XY viene dada por

$$\frac{d}{dt}M_{x_a} = -\frac{1}{T_{2a}}M_{x_a} + \Omega_a M_{y_a} - k_{ab}M_{x_a} + k_{ba}M_{x_b}$$

$$\frac{d}{dt}M_{y_a} = -\frac{1}{T_{2a}}M_{y_a} + \Omega_a M_{x_a} - k_{ab}M_{y_a} + k_{ba}M_{y_b}$$

que en su forma combinada es

$$G = M_x + iM_y$$

La variación de la magnetización compleja del plano XY para ambos compuestos es

$$\frac{d}{dt}G_a = -\left(i\Omega_a + \frac{1}{T_{2a}}\right)G_a - k_{ab}G_a + k_{ba}G_b$$

$$\frac{d}{dt}G_b = -\left(i\Omega_b + \frac{1}{T_{2b}}\right)G_b - k_{ba}G_b + k_{ab}G_a$$

siendo Ω_a y Ω_b las frecuencias de las señales provenientes de las especies A y B, respectivamente

$$\frac{d}{dt}G_a = -i\left(\Omega_a + \frac{1}{T_{2app}}\right)G_a$$

El tiempo aparente de relajación transversal como función de la constante directa de la reacción química queda definido como

$$\frac{1}{T_{2app}} = \frac{1}{T_{2a}} + k_{ab}$$

$$\Omega_a - \Omega_b$$

$$\Omega_{av} = f_a \Omega_a + f_b \Omega_b$$

$$\frac{d}{dt} G_a = \left(\Omega_a + \frac{1}{T2_{app}} \right) G_a$$

La señal final viene determinada por

$$A(\omega) = \frac{f_a f_b (\Omega_a - \Omega_b)^2 \tau^{-1}}{(\Omega_a - \omega)^2 (\Omega_b - \omega)^2 + (\bar{\Omega} - \omega)^2 \tau^{-2}} M_0$$

con f_a y f_b siendo las fracciones de población en los estados A y B, respectivamente

$$\frac{f_a}{f_b} = \frac{k_{ba}}{k_{ab}}$$

$$f_a + f_b = 1$$

$\tau = \frac{1}{k_{ab} + k_{ba}}$ es una medida de la constante de interconversión entre los estados A y B y

donde el tiempo de vida de las distintas especies es

$$\tau_a = \frac{1}{k_{ab}} \quad \& \quad \tau_b = \frac{1}{k_{ba}}$$

Como relación entre recíprocos esta adquiere la forma

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b}$$

con $\bar{\Omega} = f_a \Omega_a + f_b \Omega_b$ igual a la frecuencia promedio ponderada por las fracciones poblacionales.

El análisis del comportamiento de las señales se divide en dos:

a) En régimen de intercambio lento, las intensidades de las señales en posiciones Ω_a y Ω_b es:

$$A(\omega \approx \Omega_{a(\vee\Omega_b)}) = \frac{f_a \tau_a}{(\Omega_a - \omega)^2 + \left(\frac{1}{\tau_a}\right)^2} M_0$$

que equivale a una línea lorenziana en posición Ω_a con una intensidad proporcional a f_a y un ancho de señal a la altura media de

$$\pi \Delta \nu_{1/2} = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{1}{\tau_a}$$

Luego, se tiene que:

<i>intercambio lento</i>		<i>intercambio rápido</i>	
τ_a grande	\Rightarrow señales angostas	τ_a pequeño	\Rightarrow señales anchas
k_{ab} o k_{ba} pequeños	\Rightarrow señales angostas	k_{ab} o k_{ba} grande	\Rightarrow señales anchas

b) En régimen de intercambio rápido, para una señal en posición $\bar{\Omega}$

$$A(\omega \approx \bar{\Omega}) = \frac{f_a f_b (\Omega_a - \Omega_b)^2 \tau}{f_a^2 f_b^2 \tau^2 (\Omega_a - \Omega_b)^4 + (\bar{\Omega} - \omega)^2} M_0$$

donde el ancho de la señal queda determinado por

$$\pi \Delta \nu = f_a f_b (\Omega_a - \Omega_b)^2 \tau$$

<i>intercambio lento</i>		<i>intercambio rápido</i>	
τ_a grande	\Rightarrow señal ancha	τ_a pequeño	\Rightarrow señal angosta
k_{ab} o k_{ba} pequeños	\Rightarrow señal ancha	k_{ab} o k_{ba} grande	\Rightarrow señal angosta

APÉNDICE II

Valores de parámetros de adquisición

En esta sección se tabulan los valores de los parámetros calibrados en la adquisición de los experimentos

Adquisición

XIPrP	RG	ns	ET	TD	IN(μs)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
HNCA	128	16	15h						
F3(1H)				2048	71.4	146.34	4.694	14	3.42(0.0068)
F1(15N)*				54	380	20.52	118.56	25.96	24.36(0.48/2)
F2(13C)				50	135	6.75	54	29.45	74.07(0.59)
HN(co)CA	64	32	17h						
F3(1H)				2048	62.4	127.9	4.7	16.02	3.91(0.0072)
F1(15N)				40	300	12	117.976	32.88	41.66(0.82)
F2(13C)				40	160	6.4	54.602	24.85	78.12(0.62)
CBCA(CO)NH	512	72	1d21h						
F3(1H)				2048	62.4	127.9	4.695	16.02	3.91(0.0078)
F1(13C)				52	71.12	3.75	55.602	55.9	135.2(1.075)
F2(15N)				36	371.98	13.4	118.295	26.52	37.3(0.73)
HNCACB	85	128	4d8h						
F3(1H)				2048	70.2	143.9	4.703	14.24	3.48(0.007)
F1(15N)*				34	330	11.22	118.56	29.89	44.56(0.88/2)
F2(13C)				79	66	4.62	41.5	60.24	108.22(0.86)

EcPrP	RG	ns	ET	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
HNCA	96	16	1d2h						
F3 (1H)			2048		66.6	136.51	4.7	15	3.67(0.0073)
F1 (15N)*			60		350	21	118	28.18	23.8(0.47/2)
F2 (13C)			80		132.5	10.6	56	30	47.17(0.375)
HNCO	128	4	11h						
F3 (1H)			2048		59.6	122.17	4.7	16.77	4.1(0.0082)
F1(13C)			120		138.03	16.56	172	28.79	30.18(0.23)
F2(15N)*			80		137.02	21.92	118	35.99	22.81(0.44/2)
HN(CA)CO	256	8	21h						
F3(1H)			2048		71.4	146.35	4.7	14	3.42(0.0068)
F1(13C)			120		138.03	16.56	172	28.8	30.18(0.23)
F2(15N)*			80		137.02	21.92	118	35.99	22.81(0.44/2)

Tabla A1.- Experimentos de triple resonancia en Equus caballus y Xenopus laevis PrP. * evolución a tiempo constante. **RG:** ganancia de receptor. **ns:** número de mediciones en la dimensión directa de protones. **ET:** tiempo experimental. **TD:** dominio de tiempo en puntos complejos. **IN:** tiempo de incremento. **AQ :** tiempo de adquisición; **AQ=R(TD)xNDxIN**, con **R(TD):** parte real de los puntos complejos, y **ND:** número de incrementos en el programa de pulso. **Port:** frecuencia portadora. **SW:** barrido espectral; **SW=1/(NDxIN)**. **RES:** resolución; **RES=SW/TD**.

XIPrP	ns	RG	ET	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H - ^{15}N]-COSY	4	2050	30m						
F1(^1H)				2048	39.6	81.19	4.75	14.03	6.16(0.0068)
F2(^{15}N)				382	231.5	88.4	118.69	23.68	5.65(0.062)
^1H - ^{13}C]-COSY	4	32	40m						
F1(^1H)				2048	71.4	146.34	4.702	14	3.419(0.0068)
F2(^{13}C)				512	49.7	25.44	39.3	79.99	19.64(0.156)
EcPrP	ns	RG	ET	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H - ^{15}N]-COSY	4	512	1h14m						
F1(^1H)				2048	42.8	87.74	4.714	12.98	5.704(0.0063)
F2(^{15}N)				918	250	229.5	118.711	21.928	2.178(0.0238)
^1H - ^{13}C]-COSY	16	128	1h22m						
F1(^1H)				2048	71.4	146.34	4.699	14	3.419(0.0068)
F2(^{13}C)				256	50	12.8	41.602	79.5	39.06(0.31)

Tabla A2.- Calibración de parámetros de experimentos de correlación de coherencia cuántica simple heteronuclear 2D ^1H - ^{15}N]-COSY y ^1H - ^{13}C]-COSY. RG: ganancia del receptor. ns: número de registros. ET: tiempo total experimental. TD: dominio temporal en puntos complejos. IN: tiempo de incremento. AQ: tiempo de adquisición. Port: frecuencia portadora. SW: amplitud de barrido. RES: resolución.

XIPrP	RG	ns	ET	mixT(ms)	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H -HJ-TOCSY(^{15}N ed)	128	8	3d23h	70						
F3(H)					2048	64.2	131.6	4.707	12.98	3.8(0.0063)
F2(^{15}N)					86	311	26.75	118.56	26.44	18.69(0.31)
F1(H)					400	65	26	4.707	12.82	19.23(0.032)
HC(C)H-TOCSY	128	4	3d13h	23						
F3(H)					2048	64.2	131.6	4.696	12.98	3.8(0.0063)
F2(^{13}C)					128	52	6.656	37.602	63.72	75.12(0.49)
F1(H)					500	64	32	4.696	13.02	15.625(0.026)
EcPrP	RG	ns	ET	mixT(ms)	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H -HJ-TOCSY(^{15}N ed)	512	8	1d20h	70						
F3(H)					2048	53.6	109.8	4.718	12.43	4.55(0.006)
F2(^{15}N)					64	328.8	15.283	118	20	23.75(0.312)
F1(H)					256	53.6	13.72	4.718	12.43	36.43(0.048)
HC(C)H-TOCSY	512	8	1d19h	23						
F3(H)					2048	59.6	122.2	4.708	13.98	4.1(0.0068)
F2(^{13}C)					64	50	3.2	43	66.26	156.25(1.03)
F1(H)					256	59.6	15.26	4.708	13.98	32.77(0.055)

Tabla A3.- Ajuste de parámetros de experimentos de coherencia cuántica múltiple homonuclear 3D ^1H -HJTOCSY editado en ^{15}N y H(C)CH-TOCSY, y de coherencia cuántica simple homonuclear 3D H(C)CH-COSY., RG: ganancia del receptor. ns: número de registros. ET: tiempo experimental. mixT: tiempo de mezcla. TD: dominio temporal en números complejos. IN: tiempo de incremento. AQ: frecuencia portadora. Port: amplitud de barrido. RES: resolución.

EcPrP	RG	ns	ET(d)	mixT(ms)	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H - ^1H -NOESY (^{15}N ed)	1024	8	3d	70						
F3(H)					2048	42	86.1	4.702	13.227	5.81(0.0064)
F2(^{15}N)					94	233.4	21.9	117	23.489	22.79(0.25)
F1(H)					256	42	10.8	4.702	13.227	46.5(0.0516)
^1H - ^1H -NOESY (^{13}C al.ed)	512	8	2.75	60						
F3(H)					2048	39.6	81.2	4.697	14.03	6.16(0.0068)
F2(^{15}N)					80	63.1	5.1	35.5	35	99(0.437)
F1(H)					320	39.6	12.7	4.697	14.03	39.5(0.044)
^1H - ^1H -NOESY (^{13}C ar.ed)	406	8	2.33	50						
F3(H)					2048	69.6	142.7	4.699	11.97	3.51(0.0058)
F2(^{15}N)					80	118.3	9.47	125	28	52.82(0.35)
F1(H)					256	69.6	17.8	4.699	11.97	28.062(0.47)
XIPrP	RG	ns	ET(d)	mixT(ms)	TD	IN(μ s)	AQ(ms)	Port.(ppm)	SW(ppm)	RES (Hz/ppm)
^1H - ^1H -NOESY (^{15}N ed)	512	8	5.7	60						
F3(H)					2048	39.6	81.2	4.704	14.0319	6.165(0.0068)
F2(^{15}N)					130	231	30	118.56	23.7365	16.65(0.182)
F1(H)					400	47.6	19	4.704	11.67	26.26(0.029)
^1H - ^1H -NOESY (^{13}C al.ed)	456	8	6.41	60						
F3(H)					2048	46.4	95.1	4.704	11.9755	5.26(0.00584)
F2(^{15}N)					154	110.5	17.017	33.5	19.998	29.38(0.129)
F1(H)					380	47.6	18.09	4.704	11.6736	27.64(0.031)
^1H - ^1H -NOESY (^{13}C ar.ed)	406	8	2.66	60						
F3(H)					2048	48	98.4	4.708	11.576	5.09(0.0056)
F2(^{13}C)					64	126	8.06	122.75	17.536	62(0.274)
F1(H)					380	47.6	18.1	4.708	11.6736	27.64(0.031)

Tabla A4.- Valores ajustados para los parámetros de medición de experimentos NOESY editados en ^{15}N , ^{13}C alifáticos y aromáticos. La definición de los parámetros es equivalente a los presentados en la Tabla A3. , **RG:** ganancia del receptor. **ns:** número de registros. **ET:** tiempo experimental. **mixT:** tiempo de mezcla. **TD:** dominio temporal en números complejos. **IN:** tiempo de incremento. **AQ:** tiempo de adquisición. **Port:** frecuencia portadora. **SW:** amplitud de barrido. **RES:** resolución

Gly 196	110.2 (8.46)	45.6 (3.72, 3.90)			
Lys 197	119.6 (7.72)	55.9 (4.28)	33.4 (1.67, -)	γCH_2 25.2 (1.21, 1.29); δCH_2 29.2 (1.44, -); ϵCH_2 42.3 (2.85, -); ζNH_3^+ - (-)	
Asn 198	119.2 (8.45)	53.4 (4.53)	39.0 (2.64, 2.70)	γC -; δNH_2 113.0 (6.86, 7.53)	
Asn 199	119.4 (8.47)	54.2 (4.52)	39.0 (2.65, 2.69)	γC -; δNH_2 112.1 (6.80, 7.51)	
Ser 200	115.7 (8.25)	59.5 (4.23)	64.0 (3.77, 3.89)	γOH (-)	
Glu 201	121.3 (8.31)	57.5 (4.11)	29.6 (1.91, 1.98)	γCH_2 35.4 (2.20, 2.24); δC - (-)	
Leu 202	121.1 (7.80)	56.0 (4.10)	42.3 (1.38, 1.51)	γCH 27.3 (1.51); δCH_3 23.9 (0.73), 25.2 (0.79)	
Asn 203	119.6 (8.25)	54.2 (4.46)	39.1 (2.62, 2.73)	γC -; δNH_2 112.0 (6.70, 7.63)	
Gln 204	123.3 (8.49)	59.1 (3.88)	28.5 (1.95, -)	γCH_2 34.0 (2.24, 2.29); δC -; ϵNH_2 111.9 (6.76, 7.31)	
Leu 205	122.3 (7.83)	57.8 (3.86)	41.7 (1.11, 1.16)	γCH 26.9 (0.79); δCH_3 25.0 (0.62), 26.4 (0.60)	
Asp 206	117.3 (7.42)	58.6 (3.79)	42.9 (2.50, 2.53)	γC - (-)	
Thr 207	112.3 (7.74)	67.2 (3.69)	69.1 (4.11)	γCH_3 22.3 (1.09); γOH (-)	
Thr 208	119.8 (8.37)	66.7 (3.99)	68.7 (4.18)	γCH_3 22.1 (1.20); γOH (-)	
Val 209	123.6 (8.35)	68.0 (3.61)	31.9 (2.07)	γCH_3 22.3 (1.08), 24.5 (0.87)	
Lys 210	116.9 (8.26)	61.3 (3.84)	34.2 (1.86, 1.40)	γCH_2 25.2 (1.13, 1.33); δCH_2 29.2 (1.46, -); ϵCH_2 42.2 (2.77, -); ζNH_3^+ - (-)	
Ser 211	112.9 (8.46)	63.2 (3.93)	63.2 (4.11, 4.13)	γOH (-)	
Gln 212	119.2 (7.70)	59.9 (4.00)	35.8 (2.18, 2.52)	γCH_2 30.3 (2.00, 2.19); δC -; ϵNH_2 112.5 (6.87, 7.48)	
Ile 213	115.6 (8.10)	64.4 (3.52)	37.5 (1.71)	γCH_2 27.5 (1.33, 1.44); γCH_3 18.5 (0.63); δCH_3 14.9 (0.75)	
Ile 214	122.2 (8.42)	66.4 (3.53)	38.2 (1.93)	γCH_2 31.1 (0.67, 1.86); γCH_3 20.3 (1.00); δCH_3 15.6 (0.68)	
Arg 215	119.0 (7.94)	62.0 (3.68)	29.6 (1.80, -)	γCH_2 28.0 (1.26, 1.37); δCH_2 42.9 (2.87, 2.96); ϵNH 84.6 (6.96); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)	
Glu 216	115.2 (7.60)	59.4 (3.97)	30.1 (1.85, 1.92)	γCH_2 34.4 (2.18, 2.20); δC - (-)	
Met 217	120.5 (9.01)	60.7 (3.98)	35.8 (1.88, 2.34)	γCH_2 34.3 (2.32, 2.90); ϵCH_3 17.3 (1.67)	
Cys 218	119.4 (8.81)	59.2 (4.46)	40.3 (3.00, 3.57)	γSH (-)	
Ile 219	122.3 (8.12)	66.8 (3.51)	38.9 (1.89)	γCH_2 30.5 (0.90, 1.83); γCH_3 17.1 (0.78); δCH_3 14.5 (0.72)	
Thr 220	116.5 (8.06)	67.5 (3.73)	69.1 (4.30)	γCH_3 21.9 (1.13); γOH (-)	
Glu 221	120.8 (8.51)	59.1 (3.93)	29.5 (2.29, 2.45)	γCH_2 36.3 (2.38, 2.40); δC - (-)	
Tyr 222	120.3 (7.88)	61.9 (2.88)	37.7 (2.65, 2.88)	γC -; δCH 131.9 (-), - (6.37); ϵCH 117.3 (-), - (6.52); ζC - (-)	
Arg 223	115.6 (7.70)	57.9 (3.74)	30.6 (1.71, 1.86)	γCH_2 28.7 (1.60, 1.89); δCH_2 43.9 (2.95, 3.06); ϵNH 86.6 (7.57); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)	
Arg 224	119.3 (7.68)	57.9 (4.04)	30.9 (1.64, 1.78)	γCH_2 27.6 (1.57, 1.67); δCH_2 44.1 (3.02, 3.06); ϵNH 85.5 (7.16); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)	
Gly 225	108.3 (7.68)	45.5 (3.86, 3.76)			
Ser 226	120.6 (7.71)	60.0 (4.07)	65.1 (3.63, 3.69)	γOH (-)	
Gly 227	- (-)	- (-, -)			

TABLE A6.-Asignación de resonancias de la proteína priónica de *Xenopus laevis* (xIPrP).

APÉNDICE III

Asignación de resonancias

Esta sección contiene tablas con las asignaciones de las resonancias para ecPrP y xIPrP

	N	C ^α	C ^β	others
Gly 119	- (-)	43.2 (3.66)		
Ser 120	115.7 (8.44)	58.6 (4.67)	63.6 (3.60)	H ^γ (-)
Val 121	122.4 (8.18)	60.6 (4.36)	32.5 (1.81)	C ^γ 20.9 (0.67), 21.1 (0.64)
Val 122	125.2 (8.11)	62.2 (3.94)	32.6 (1.81)	C ^γ 20.4 (0.68), 20.9 (0.68)
Gly 123	113.5 (8.38)	45.2 (3.71)		
Gly 124	108.6 (8.10)	45.2 (3.71)		
Leu 125	121.7 (8.02)	54.8 (4.12)	42.4 (1.30, 1.38)	C ^γ 26.8 (1.26); C ^δ 23.4 (0.34), 24.6 (0.45)
Gly 126	109.8 (8.35)	46.2 (3.62, 3.66)		
Gly 127	109.2 (8.18)	45.1 (3.51, 3.70)		
Tyr 128	117.8 (7.52)	58.0 (4.17)	39.9 (2.59, 2.69)	C ^γ ; C ^δ - (6.64); C ^ε - (6.41); C ^ζ - (-)
Met 129	121.4 (8.85)	53.7 (4.26)	34.5 (0.81, 1.33)	C ^γ 31.9 (1.99); C ^ε 17.0 (1.73)
Leu 130	121.5 (7.89)	53.3 (4.20)	43.4 (0.72, 1.37)	C ^γ 25.9 (1.14); C ^δ 21.6 (-0.26), 25.7 (0.39)
Gly 131	115.3 (9.12)	45.1 (4.20, 3.88)		
Ser 132	113.3 (8.10)	58.6 (4.17)	63.9 (3.74, 3.67)	H ^γ (-)
Ala 133	125.6 (8.54)	52.9 (4.16)	18.3 (1.03)	
Met 134	121.5 (8.62)	54.0 (4.53)	37.0 (1.82)	C ^γ 31.1 (2.19, 2.28); C ^ε 17.7 (1.96)
Ser 135	116.1 (8.23)	58.7 (4.09)	63.0 (3.60, 3.51)	H ^γ (-)
Arg 136	126.3 (8.45)	55.0 (4.12)	29.1 (1.45)	C ^γ 28.7 (1.39, 1.40); C ^δ 43.9 (2.78, 2.90); N ^ε 85.3 (6.75); C ^ζ ; N ^η - (-)
Pro 137	-	62.3 (4.15)	32.1 (1.52, 1.99)	C ^γ 27.5 (1.80, 1.81); C ^δ 50.4 (3.42, 3.64)
Leu 138	125.1 (8.49)	54.2 (4.33)	40.1 (1.27, 1.41)	C ^γ 26.9 (1.36); C ^δ 23.5 (0.62), 24.6 (0.69)
Ile 139	122.7 (6.80)	59.5 (3.65)	39.8 (0.82)	C ^γ 26.5 (0.44, 0.65); C ^{γ2} 16.6 (-0.32); C ^δ 13.0 (0.13)
His 140	122.3 (8.13)	54.0 (4.71)	29.0 (2.75, 3.06)	C ^γ ; N ^δ - (-); C ^δ - (7.04); C ^ε - (-); N ^{ε2} - (-)
Phe 141	125.4 (10.25)	59.9 (3.94)	40.1 (3.02, 2.60)	C ^γ ; C ^δ - (7.13); C ^ε - (6.64); C ^ζ - (6.29)
Gly 142	108.9 (8.86)	45.6 (3.47, 3.88)		
Asn 143	114.7 (6.98)	52.6 (4.61)	41.6 (2.56, 2.55)	C ^γ ; N ^δ 115.7 (7.14, 7.41)
Asp 144	124.2 (8.80)	57.7 (4.17)	41.0 (2.48)	C ^γ - (-)
Tyr 145	120.2 (8.19)	61.6 (3.96)	37.5 (2.98, 2.81)	C ^γ ; C ^δ - (6.82); C ^ε - (6.48); C ^ζ - (-)
Glu 146	119.4 (8.14)	59.6 (3.28)	29.1 (1.63, 1.11)	C ^γ 36.5 (1.57, 2.19); C ^δ - (-)
Asp 147	118.2 (7.88)	58.4 (4.44)	40.7 (2.71, 2.61)	C ^γ - (-)
Arg 148	120.2 (7.85)	58.6 (3.74)	29.8 (1.66)	C ^γ 27.6 (1.28, 1.49); C ^δ 43.6 (2.94); N ^ε 84.8 (7.20); C ^ζ ; N ^η - (6.40), - (6.67)

Tyr 149	121.2 (8.24)	61.8 (3.61)	38.4 (2.33, 2.48)	C ^γ ; C ^δ - (6.60); C ^ε - (6.54); C ^ζ - (-)
Tyr 150	119.2 (8.61)	61.3 (4.01)	38.5 (2.97, 2.95)	C ^γ ; C ^δ - (7.03); C ^ε - (6.66); C ^ζ - (-)
Arg 151	116.3 (7.39)	59.7 (3.44)	29.6 (1.72, 1.64)	C ^γ 28.1 (1.45, 1.66); C ^δ 43.3 (3.01, 3.05); N ^ε 84.6 (7.23); C ^ζ ; N ^η - (6.34), - (6.79)
Glu 152	115.5 (7.74)	57.7 (3.87)	29.6 (1.68, 1.66)	C ^γ 35.8 (2.03, 2.21); C ^δ - (-)
Asn 153	115.5 (7.37)	55.3 (4.45)	40.5 (2.02, 2.14)	C ^γ ; N ^δ 116.9 (6.38, 6.51)
Met 154	119.1 (7.25)	59.9 (3.48)	32.6 (1.49, 1.34)	C ^γ 30.6 (1.68, 1.83); C ^ε 16.7 (1.59)
Tyr 155	113.8 (7.42)	59.1 (3.95)	36.4 (2.83, 2.71)	C ^γ ; C ^δ - (6.86); C ^ε - (6.40); C ^ζ - (-)
Arg 156	118.8 (7.40)	56.6 (3.78)	30.5 (0.93, 1.45)	C ^γ 27.7 (0.62, 1.03); C ^δ 43.9 (2.82, 2.90); N ^ε 84.1 (6.99); C ^ζ ; N ^η - (6.70)
Tyr 157	119.1 (7.09)	54.2 (4.68)	36.4 (2.97, 2.76)	C ^γ ; C ^δ - (6.86); C ^ε - (6.44); C ^ζ - (-)
Pro 158	-	63.2 (4.28)	32.5 (1.62, 2.18)	C ^γ 27.2 (1.25, 1.42); C ^δ 50.0 (3.12, 3.18)
Asn 159	115.1 (8.15)	51.8 (4.52)	38.0 (2.15, 3.52)	C ^γ ; N ^δ 108.8 (6.57, 7.29)
Gln 160	113.6 (6.96)	54.0 (4.35)	34.0 (1.44, 1.73)	C ^γ 34.2 (1.81, 1.90); C ^δ ; N ^ε 112.8 (6.79, 7.72)
Val 161	112.6 (8.30)	58.6 (4.66)	34.0 (2.37)	C ^γ 18.1 (0.51), 23.7 (0.73)
Tyr 162	121.0 (8.20)	56.8 (5.35)	41.8 (2.40, 2.32)	C ^γ ; C ^δ - (6.67); C ^ε - (6.53); C ^ζ - (-)
Tyr 163	110.9 (8.35)	55.6 (4.59)	40.1 (2.62, 2.46)	C ^γ ; C ^δ - (6.95); C ^ε - (6.27); C ^ζ - (-)
Arg 164	120.8 (7.73)	53.0 (4.37)	29.7 (1.62, 1.50)	C ^γ 27.7 (0.69, 0.80); C ^δ 43.2 (2.57, 2.62); N ^ε 84.3 (6.74); C ^ζ ; N ^η - (-)
Pro 165	-	63.3 (4.35)	32.4 (1.63, 2.24)	C ^γ 28.2 (1.77, 1.89); C ^δ 50.1 (3.22, 3.41)
Val 166	120.7 (8.51)	65.4 (4.06)	32.2 (1.81)	C ^γ 21.4 (0.52), 21.8 (0.55)
Ser 167	117.8 (7.56)	53.3 (4.18)	39.9 (2.68, 2.60)	H ^γ (-)
Glu 168	119.9 (7.98)	56.5 (3.89)	63.1 (1.60)	C ^γ 35.6 (1.94, 1.95); C ^δ - (-)
Tyr 169	116.8 (7.65)	57.1 (4.67)	42.0 (2.81, 3.10)	C ^γ ; C ^δ - (7.12); C ^ε - (6.66); C ^ζ - (-)
Ser 170	113.6 (7.57)	58.3 (4.35)	64.0 (3.72, 3.80)	H ^γ (-)
Asn 171	- (-)	52.3 (4.47)	40.1 (2.89, 2.70)	C ^γ ; N ^δ 114.8 (6.54, 7.02)
Gln 172	119.7 (8.25)	58.7 (2.61)	29.4 (1.28, 1.24)	C ^γ 33.5 (0.86, 1.43); C ^δ ; N ^ε 111.3 (6.68, 6.75)
Lys 173	119.2 (7.97)	59.8 (3.55)	31.8 (1.54, 1.43)	C ^γ 24.7 (1.05, 1.17); C ^δ 29.0 (1.40); C ^ε 41.9 (2.70); N ^ζ - (-)
Asn 174	117.9 (8.29)	55.4 (4.32)	38.0 (2.70, 2.97)	C ^γ ; N ^δ 111.5 (6.90, 7.47)
Phe 175	- (-)	- (-)	- (-, -)	C ^γ ; C ^δ - (6.51); C ^ε - (7.67); C ^ζ - (6.97)
Val 176	120.4 (8.69)	67.4 (3.18)	31.9 (1.93)	C ^γ 21.8 (0.82), 24.6 (0.79)
His 177	117.1 (8.19)	59.2 (4.05)	28.4 (3.18, 3.13)	C ^γ ; N ^δ 1 - (-); C ^δ - (7.20); C ^ε - (7.90); N ^ε 2 - (-)
Asp 178	118.7 (7.26)	57.0 (4.29)	40.7 (2.80)	C ^γ - (-)

Cys 179	119.8 (7.90)	58.1 (4.49)	40.7 (2.60, 2.97)	H ^γ (-)
Val 180	124.5 (9.02)	66.1 (3.43)	31.9 (1.90)	C ^γ 21.1 (0.71), 23.5 (0.83)
Asn 181	116.6 (7.43)	56.6 (4.05)	38.6 (2.54, 2.52)	C ^γ -; N ^δ 111.7 (6.51, 7.42)
Ile 182	118.0 (8.39)	62.1 (3.49)	36.5 (1.30)	C ^γ 27.5 (0.52, 0.62); C ^{β2} 18.3 (-0.01); C ^δ 11.2 (0.15)
Thr 183	118.4 (7.89)	68.7 (3.82)	68.3 (4.26)	C ^γ 22.3 (1.29); H ^γ (6.12)
Val 184	120.9 (8.62)	67.6 (3.41)	31.3 (2.05)	C ^γ 20.4 (0.72), 23.3 (0.83)
Lys 185	121.6 (7.64)	59.6 (3.82)	32.1 (1.71, 1.62)	C ^γ 24.8 (1.19, 1.35); C ^δ 29.1 (1.38); C ^ε 41.9 (2.67); N ^ε - (-)
Gln 186	116.4 (8.07)	57.5 (3.79)	29.1 (1.37, 1.89)	C ^γ 33.3 (1.34, 1.89); C ^δ -; N ^ε 110.3 (6.50, 6.57)
His 187	117.1 (7.75)	58.7 (4.34)	29.7 (3.13, 3.05)	C ^γ -; N ^{δ1} - (-); C ^δ - (7.11); C ^ε - (7.97); N ^{ε2} - (-)
Thr 188	114.0 (7.88)	64.3 (3.96)	69.3 (4.13)	C ^γ 21.5 (0.97); H ^γ (-)
Val 189	122.0 (7.73)	64.4 (3.78)	32.0 (1.95)	C ^γ 21.1 (0.75), 21.3 (0.76)
Thr 190	116.5 (7.87)	63.5 (3.99)	69.2 (4.02)	C ^γ 21.6 (1.01); H ^γ (-)
Thr 191	115.2 (7.82)	63.5 (3.99)	69.1 (3.92)	C ^γ 21.4 (0.78); H ^γ (-)
Thr 192	116.0 (7.95)	63.6 (4.14)	69.3 (4.12)	C ^γ 21.5 (1.03); H ^γ (-)
Thr 193	115.9 (7.85)	63.6 (3.99)	69.2 (4.03)	C ^γ 21.7 (1.01); H ^γ (-)
Lys 194	121.4 (7.78)	56.7 (4.08)	32.5 (1.57, 1.69)	C ^γ 24.9 (1.20, 1.26); C ^δ 28.9 (1.41); C ^ε 41.9 (2.71); N ^ε - (-)
Gly 195	109.3 (7.95)	45.4 (3.81, 3.63)		
Glu 196	119.9 (7.67)	55.4 (4.05)	30.4 (1.57)	C ^γ 35.2 (1.95); C ^δ - (-)
Asn 197	120.1 (8.30)	52.8 (4.43)	39.5 (2.42, 2.49)	C ^γ -; N ^δ 113.0 (6.66, 7.34)
Phe 198	123.1 (8.36)	57.0 (4.89)	40.1 (2.76, 2.98)	C ^γ -; C ^δ - (7.10); C ^ε - (7.04); C ^ε - (-)
Thr 199	116.8 (9.24)	60.8 (4.36)	69.2 (4.59)	C ^γ 21.5 (1.15); H ^γ (-)
Glu 200	119.8 (8.82)	59.5 (3.85)	28.7 (1.89, 1.82)	C ^γ 35.5 (2.12, 2.19); C ^δ - (-)
Thr 201	116.4 (7.71)	66.6 (3.53)	68.6 (3.44)	C ^γ 21.0 (0.40); H ^γ (-)
Asp 202	120.0 (7.22)	58.1 (4.23)	41.0 (2.84, 2.06)	C ^γ - (-)
Val 203	119.3 (7.87)	67.4 (3.18)	31.7 (1.89)	C ^γ 21.1 (0.68), 23.0 (0.82)
Lys 204	119.3 (7.46)	59.3 (3.82)	32.3 (1.71, 1.61)	C ^γ 25.0 (1.20, 1.35); C ^δ 29.1 (1.42); C ^ε 41.9 (2.67); N ^ε - (-)
Ile 205	120.2 (7.82)	64.9 (3.34)	37.6 (1.60)	C ^γ 28.6 (1.29, 1.29); C ^{β2} 18.1 (0.38); C ^δ 13.7 (0.38)
Met 206	119.1 (8.61)	59.7 (3.29)	32.9 (1.91, 1.83)	C ^γ 32.2 (1.96, 2.00); C ^ε 16.8 (1.54)
Glu 207	117.0 (8.13)	60.5 (3.40)	28.3 (1.97, 1.82)	C ^γ 35.3 (2.03, 2.34); C ^δ - (-)
Arg 208	117.9 (7.02)	58.3 (3.91)	29.9 (1.81, 1.67)	C ^γ 26.8 (1.44, 1.50); C ^δ 42.5 (2.89, 2.98); N ^ε 83.1 (7.03); C ^ε -; N ^γ - (6.38), - (6.53)

Val 209	120.5 (8.09)	66.3 (3.23)	32.5 (1.87)	C ^γ 21.1 (0.85), 23.8 (0.74)
Val 210	119.0 (8.73)	66.3 (3.37)	31.1 (1.96)	C ^γ 24.4 (0.77), 24.6 (0.98)
Glu 211	120.9 (7.97)	60.8 (3.33)	28.5 (1.97)	C ^γ 35.7 (1.86); C ^δ - (-)
Gln 212	115.0 (7.12)	58.6 (3.73)	27.7 (1.87, 1.91)	C ^γ 33.6 (2.11, 2.17); C ^δ -; N ^ε 113.8 (6.70, 7.29)
Met 213	119.2 (7.92)	59.9 (3.90)	34.4 (1.85)	C ^γ 32.4 (2.24, 2.55); C ^ε 16.7 (1.67)
Cys 214	119.0 (9.02)	59.9 (4.15)	41.8 (3.32, 2.61)	H ^γ (-)
Ile 215	123.7 (8.05)	66.6 (3.24)	38.2 (1.75)	C ^γ 30.7 (0.59, 0.59); C ^γ 2 16.8 (0.63); C ^δ 14.0 (0.58)
Thr 216	118.4 (7.89)	67.0 (3.66)	68.3 (4.06)	C ^γ 22.2 (1.02); H ^γ (-)
Gln 217	122.5 (8.67)	58.6 (3.41)	28.4 (2.09, 1.82)	C ^γ 32.4 (1.37, 1.45); C ^δ -; N ^ε 112.8 (6.33, 7.24)
Tyr 218	119.7 (8.32)	62.0 (2.63)	36.7 (2.77, 2.45)	C ^γ -; C ^δ - (5.94); C ^ε - (6.10); C ^ζ - (-)
Gln 219	116.9 (7.79)	59.0 (3.52)	27.7 (2.06, 1.89)	C ^γ 33.6 (2.24, 2.45); C ^δ -; N ^ε 110.9 (6.57, 7.28)
Lys 220	118.6 (7.67)	59.2 (3.80)	32.2 (1.70, 1.59)	C ^γ 24.8 (1.19, 1.33); C ^δ 28.3 (1.88, 1.91); C ^ε - (-); N ^ε - (-)
Glu 221	118.8 (8.09)	57.5 (3.79)	29.3 (1.45, 1.90)	C ^γ 35.8 (1.90, 2.21); C ^δ - (-)
Tyr 222	122.5 (8.94)	61.8 (3.63)	73.2 (2.37, 1.92)	C ^γ -; C ^δ - (7.08); C ^ε - (6.54); C ^ζ - (-)
Glu 223	118.3 (7.69)	59.3 (3.80)	27.8 (1.90)	C ^γ 35.6 (1.89, 2.18); C ^δ - (-)
Ala 224	120.4 (7.23)	54.4 (3.89)	18.1 (1.20)	
Phe 225	119.5 (7.74)	59.5 (4.08)	39.2 (2.86, 2.80)	C ^γ -; C ^δ - (6.55); C ^ε - (6.87); C ^ζ - (-)
Gln 226	118.4 (7.79)	57.0 (3.62)	28.7 (1.74, 1.68)	C ^γ - (-); C ^δ -; N ^ε 112.3 (6.62, 6.67)
Gln 227	118.0 (7.54)	56.4 (3.93)	28.7 (1.78, 1.90)	C ^γ 33.7 (2.16); C ^δ -; N ^ε 112.0 (6.59, 7.26)
Arg 228	120.0 (7.61)	56.7 (4.01)	30.4 (1.59, 1.54)	C ^γ 27.0 (1.38); C ^δ 43.3 (2.92); N ^ε 84.3 (6.97); C ^ζ -; N ^η - (6.40)
Gly 229	109.1 (7.95)	45.3 (3.63)		
Ala 230	124.0 (7.83)	52.3 (4.09)	19.4 (1.14)	
Ser 231	120.4 (7.73)	- (-)	- (-, -)	H ^γ (-)

Tabla A5. Asignación completa de resonancias de NMR para la proteína priónica de *Equus caballus* (ccPrP).

	N	C ^α	C ^β	others
Ser 98	115.3 (8.60)	58.5 (4.36)	64.2 (3.72, 3.69)	γOH (-)
Gly 99	110.5 (8.41)	45.4 (3.77, -)		
Tyr 100	120.0 (8.02)	58.2 (4.38)	39.0 (2.79, 2.85)	γC -; δCH 132.3 (-), - (6.93); εCH 117.3 (-), - (6.66); ζC - (-)
Asn 101	121.2 (8.22)	53.1 (4.49)	39.0 (2.54, 2.62)	γC -; δNH ₂ 112.3 (6.79, 7.44)
Lys 102	121.7 (8.11)	57.0 (4.06)	33.1 (1.59, 1.66)	γCH ₂ 25.1 (1.23, 1.26); δCH ₂ - (-, -); εCH ₂ 42.3 (2.81, -); ζNH ₃ ⁺ - (-)
Gln 103	120.1 (8.18)	55.9 (4.19)	29.5 (1.83, 1.93)	γCH ₂ 34.1 (2.18, -); δC -; εNH ₂ 112.1 (6.76, 7.41)
Trp 104	123.5 (8.11)	58.3 (4.38)	29.8 (3.07, -)	γC -; δ ¹ CH 126.4 (7.11); δ ² C -; ε ¹ NH - (-); ε ² C -; ε ³ CH 119.8 (7.39); ζ ² CH 131.1 (7.34); ζ ³ CH 121.0 (6.97); η ¹ CH 123.6 (7.10)
Lys 105	125.7 (7.59)	53.2 (4.26)	33.5 (1.31, 1.46)	γCH ₂ 24.6 (1.12, 1.15); δCH ₂ - (-, -); εCH ₂ 42.2 (2.77, -); ζNH ₃ ⁺ - (-)
Pro 106	-	62.9 (4.23)	32.4 (1.78, 2.14)	γCH ₂ 27.6 (1.90, -); δCH ₂ 50.8 (3.53, 3.61)
Pro 107	-	61.3 (4.05)	31.0 (1.66, 2.13)	γCH ₂ 27.5 (1.79, -); δCH ₂ 50.5 (3.26, 3.29)
Lys 108	121.3 (8.29)	56.6 (4.11)	33.2 (1.60, 1.66)	γCH ₂ 25.1 (1.27, 1.32); δCH ₂ - (-, -); εCH ₂ 42.2 (2.84, -); ζNH ₃ ⁺ - (-)
Ser 109	117.1 (8.23)	58.3 (4.29)	64.2 (3.69, 3.72)	γOH (-)
Lys 110	123.3 (8.42)	56.7 (4.26)	33.3 (1.63, 1.75)	γCH ₂ 25.1 (1.29, 1.34); δCH ₂ - (-, -); εCH ₂ 42.4 (2.86, -); ζNH ₃ ⁺ - (-)
Thr 111	114.8 (8.07)	62.1 (4.17)	69.9 (4.03)	γCH ₃ 21.8 (1.04); γOH (-)
Asn 112	121.1 (8.40)	53.3 (4.58)	39.0 (2.62, 2.71)	γC -; δNH ₂ 112.3 (6.79, 7.49)
Met 113	121.0 (8.25)	55.8 (4.32)	33.1 (1.85, 1.96)	γCH ₂ 32.2 (2.38, 2.46); εCH ₃ 17.1 (1.95)
Lys 114	122.3 (8.26)	56.6 (4.19)	33.3 (1.63, 1.70)	γCH ₂ 25.1 (1.28, 1.32); δCH ₂ 29.2 (1.53, -); εCH ₂ 42.2 (2.85, -); ζNH ₃ ⁺ - (-)
Ser 115	117.0 (8.19)	58.4 (4.33)	64.1 (3.70, -)	γOH (-)
Val 116	121.5 (8.05)	62.3 (4.01)	33.1 (1.94)	γCH ₃ 20.6 (0.78), 21.4 (0.79)
Ala 117	127.7 (8.23)	52.5 (4.21)	19.5 (1.21)	
Ile 118	120.4 (8.08)	61.5 (4.01)	39.1 (1.71)	γCH ₂ 27.7 (1.06, 1.35); γCH ₃ 17.7 (0.77); δCH ₃ 13.2 (0.71)
Gly 119	112.5 (8.37)	45.5 (3.79, -)		
Ala 120	123.8 (8.06)	52.7 (4.15)	19.6 (1.23)	
Ala 121	122.9 (8.16)	52.8 (4.14)	19.5 (1.24)	
Ala 122	122.7 (8.09)	52.9 (4.13)	19.4 (1.24)	
Gly 123	108.2 (8.32)	45.5 (3.81, -)		
Ala 124	122.9 (8.03)	52.7 (4.25)	20.1 (1.28)	
Ile 125	120.2 (8.14)	62.0 (3.79)	39.3 (1.52)	γCH ₂ 28.9 (0.58, 1.34); γCH ₃ 17.9 (0.35); δCH ₃ 13.4 (0.59)
Gly 126	114.7 (8.77)	45.4 (3.45, 3.97)		
Gly 127	107.6 (7.30)	44.7 (3.63, 3.97)		
Tyr 128	114.8 (8.17)	56.7 (5.14)	43.8 (2.51, 2.58)	γC -; δCH 132.1 (-), - (6.57); εCH 117.3 (-), - (6.33); ζC - (-)

Met 129	119.5 (8.89)	54.1 (4.71)	36.5 (1.90, -)	γCH_2 31.8 (2.30, 2.37); εCH_3 17.3 (1.96)
Leu 130	125.9 (8.62)	55.7 (3.94)	42.6 (1.23, -)	γCH 27.1 (1.16); δCH_3 23.9 (0.08), 24.1 (0.24)
Gly 131	111.3 (8.68)	44.3 (3.84, 4.01)		
Asn 132	117.7 (8.71)	53.2 (4.48)	39.1 (2.57, 2.67)	γC ; δNH_2 113.1 (6.94, 7.61)
Ala 133	123.8 (8.49)	52.7 (4.45)	18.6 (1.15)	
Val 134	121.2 (8.56)	62.2 (4.09)	33.8 (2.06)	γCH_3 20.9 (0.95), 22.1 (0.96)
Gly 135	111.4 (8.31)	44.7 (3.69, 4.02)		
Arg 136	121.0 (8.18)	57.3 (4.12)	30.3 (1.36, 1.51)	γCH_2 27.4 (1.25, -); δCH_2 43.5 (2.63, 2.78); εNH 85.2 (6.78); ζC ; ηNH_2 - (-), - (-)
Met 137	124.7 (8.19)	54.7 (4.46)	35.1 (1.54, 1.57)	γCH_2 32.0 (2.30, -); εCH_3 17.3 (1.84)
Ser 138	117.0 (8.31)	57.2 (4.45)	62.9 (3.61, 3.66)	γOH (-)
Tyr 139	123.0 (7.41)	57.8 (4.11)	40.3 (1.89, 2.03)	γC ; δCH 131.8 (-), - (6.22); εCH 117.3 (-), - (6.44); ζC - (-)
Gln 140	122.8 (8.03)	54.7 (4.21)	29.2 (1.62, 1.76)	γCH_2 33.9 (2.10, -); δC ; εNH_2 112.7 (6.67, 7.35)
Phe 141	- (-)	58.3 (4.44)	40.7 (2.73, 3.59)	γC ; δCH 131.3 (-), - (7.16); εCH 130.5 (-), - (7.07); ζCH 128.7 (6.36)
Asn 142	118.1 (8.73)	55.3 (4.44)	39.3 (2.96, 2.72)	γC ; δNH_2 114.0 (6.85, 7.92)
Asn 143	113.2 (7.53)	51.6 (5.00)	40.0 (2.72, -)	γC ; δNH_2 115.1 (6.76, 7.72)
Pro 144	-	65.2 (4.40)	32.6 (1.86, 2.35)	γCH_2 28.0 (1.92, 2.03); δCH_2 51.8 (3.76, 3.81)
Met 145	117.6 (8.30)	59.0 (4.12)	31.9 (1.93, 2.07)	γCH_2 32.7 (2.47, 2.53); εCH_3 17.3 (2.00)
Glu 146	119.7 (7.74)	58.9 (3.54)	29.8 (1.51, 1.55)	γCH_2 36.4 (2.23, 2.26); δC - (-)
Ser 147	111.6 (7.11)	61.6 (3.84)	62.9 (3.98, -)	γOH (-)
Arg 148	120.6 (7.97)	59.4 (3.97)	30.3 (1.83, -)	γCH_2 27.4 (1.57, 1.65); δCH_2 43.8 (3.13, -); εNH 86.6 (7.42); ζC - (-); ηNH_2 - (-), - (-)
Tyr 149	120.2 (7.61)	62.8 (4.11)	39.1 (2.95, 3.03)	γC ; δCH 132.1 (-), - (6.84); εCH 117.3 (-), - (6.39); ζC - (-)
Tyr 150	117.2 (8.11)	62.3 (3.82)	39.4 (2.84, 2.80)	γC ; δCH 132.5 (-), - (7.17); εCH 117.3 (-), - (6.95); ζC - (-)
Asn 151	112.1 (7.61)	56.9 (4.05)	39.5 (2.66, 2.71)	γC ; δNH_2 113.9 (7.00, 7.53)
Asp 152	119.7 (8.53)	56.8 (4.07)	40.2 (1.73, 2.33)	γC - (-)
Tyr 153	116.6 (7.89)	57.7 (4.41)	36.6 (1.86, 2.90)	γC ; δCH 132.9 (-), - (6.40); εCH 116.7 (-), - (6.54); ζC - (-)
Tyr 154	122.2 (6.87)	62.6 (3.57)	38.9 (2.37, 2.98)	γC ; δCH 132.2 (-), - (6.64); εCH 117.4 (-), - (6.70); ζC - (-)
Asn 155	115.6 (8.31)	55.3 (4.07)	37.5 (2.55, 2.60)	γC ; δNH_2 - (-, -)
Gln 156	116.4 (8.01)	55.5 (4.33)	29.4 (1.97, 2.23)	γCH_2 - (2.19, 2.30); δC ; εNH_2 111.6 (6.70, 7.42)
Met 157	119.5 (7.38)	52.1 (4.72)	33.1 (2.03, -)	γCH_2 33.7 (2.50, 2.88); εCH_3 20.9 (2.07)
Pro 158	-	63.0 (4.02)	31.5 (1.00, 1.11)	γCH_2 27.2 (1.27, 1.49); δCH_2 50.1 (3.42, 3.56)
Asn 159	117.3 (8.33)	52.4 (4.71)	40.0 (2.45, 3.13)	γC ; δNH_2 110.1 (6.75, 7.43)
Arg 160	113.8 (7.07)	54.9 (4.58)	26.3 (1.30, 1.42)	γCH_2 35.4 (1.29, 1.58); δCH_2 44.8 (2.97, 3.01); εNH 85.5 (7.15); ζC ; ηNH_2 - (-), - (-)
Val 161	114.4 (8.89)	60.2 (4.68)	35.7 (2.46)	γCH_3 18.0 (0.67), 25.1 (1.12)

Tyr 162	118.3 (7.29)	59.1 (4.03)	39.5 (2.23, 2.44)		γC -; δCH 131.0 (-), - (6.58); ϵCH 117.5 (-), - (6.25); ζC - (-)
Arg 163	122.2 (8.86)	52.8 (4.29)	31.9 (1.79, -)		γCH_2 27.5 (1.71, 1.78); δCH_2 44.1 (3.04, 3.10); ϵNH 85.7 (7.03); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)
Pro 164	-	62.1 (3.69)	32.0 (0.96, 1.26)		γCH_2 28.4 (1.64, 1.76); δCH_2 50.6 (2.62, 3.08)
Met 165	119.1 (7.59)	53.7 (4.34)	33.4 (1.36, 1.69)		γCH_2 31.4 (2.08, 2.10); ϵCH_3 17.0 (1.80)
Tyr 166	122.6 (8.44)	58.4 (4.60)	40.1 (2.57, 2.88)		γC -; δCH 132.3 (-), - (6.90); ϵCH 117.1 (-), - (6.55); ζC - (-)
Arg 167	121.5 (8.69)	56.7 (4.21)	31.0 (1.64, 1.73)		γCH_2 27.9 (1.46, -); δCH_2 43.5 (3.04, -); ϵNH 85.5 (7.09); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)
Gly 168	110.4 (8.60)	45.8 (3.79, 3.97)			
Glu 169	117.7 (8.22)	56.1 (4.26)	29.6 (1.78, 2.00)		γCH_2 35.3 (2.14, 2.15); δC - (-)
Glu 170	120.7 (8.05)	56.8 (4.10)	30.2 (1.81, -)		γCH_2 35.3 (2.10, 2.15); δC - (-)
Tyr 171	121.5 (8.29)	58.2 (4.38)	38.9 (2.70, 2.91)		γC -; δCH 132.5 (-), - (6.95); ϵCH 117.2 (-), - (6.65); ζC - (-)
Val 172	126.6 (7.84)	61.5 (3.76)	33.9 (1.71)		γCH_3 20.4 (0.43), 21.5 (0.58)
Ser 173	121.9 (8.10)	57.3 (4.16)	65.2 (3.85, 4.12)		γOH (-)
Glu 174	122.7 (8.57)	59.9 (2.07)	29.2 (1.55, 1.47)		γCH_2 33.1 (1.50, -); δC - (-)
Asp 175	113.9 (8.07)	57.4 (3.98)	41.1 (2.39, -)		γC - (-)
Arg 176	120.3 (7.33)	59.3 (3.78)	30.9 (1.52, 1.62)		γCH_2 27.0 (1.52, -); δCH_2 44.1 (2.89, 3.02); ϵNH 87.6 (7.66); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)
Phe 177	118.2 (7.85)	60.7 (4.59)	41.0 (2.97, 3.01)		γC -; δCH 132.6 (-), - (7.29); ϵCH 130.9 (-), - (7.61); ζCH 127.9 (7.11)
Val 178	117.6 (9.18)	68.4 (3.41)	31.7 (2.07)		γCH_3 21.2 (0.85), 25.7 (1.00)
Arg 179	119.9 (7.74)	60.4 (3.97)	27.4 (1.66, 1.49)		γCH_2 30.2 (1.84, 1.90); δCH_2 43.7 (3.11, -); ϵNH 86.1 (7.15); ζC -; ηNH_2 - (-), - (-)
Asp 180	119.1 (8.14)	58.0 (4.57)	39.6 (2.48, 2.73)		γC - (-)
Cys 181	122.4 (9.01)	59.5 (4.56)	40.0 (2.77, 3.29)		γSH (-)
Tyr 182	127.6 (9.80)	62.4 (3.81)	39.7 (2.90, 3.25)		γC -; δCH 132.2 (-), - (6.85); ϵCH 118.0 (-), - (6.97); ζC - (-)
Asn 183	117.2 (8.90)	56.4 (4.25)	37.8 (2.72, 2.88)		γC -; δNH_2 111.4 (6.76, 7.88)
Met 184	118.4 (7.49)	57.5 (4.01)	32.8 (1.39, 1.46)		γCH_2 32.7 (1.41, -); ϵCH_3 17.6 (1.21)
Ser 185	114.3 (8.14)	63.5 (3.97)	65.0 (3.84, 4.20)		γOH (5.22)
Val 186	120.7 (9.07)	67.3 (3.44)	31.6 (1.84)		γCH_3 21.4 (0.59), 22.0 (0.39)
Thr 187	119.0 (7.50)	67.7 (3.68)	68.4 (4.21)		γCH_3 21.7 (0.95); γOH (-)
Glu 188	116.6 (7.33)	58.4 (3.75)	29.5 (1.12, 1.45)		γCH_2 33.3 (1.83, 1.85); δC - (-)
Tyr 189	111.9 (8.18)	58.1 (4.82)	39.7 (2.71, 3.05)		γC -; δCH 131.4 (-), - (7.07); ϵCH 117.3 (-), - (6.96); ζC - (-)
Ile 190	117.9 (8.20)	63.1 (4.14)	39.2 (2.04)		γCH_2 28.1 (0.88, 1.34); γCH_3 17.9 (0.76); δCH_3 14.6 (0.81)
Ile 191	121.7 (7.98)	63.9 (3.72)	37.8 (2.01)		γCH_2 27.9 (1.07, 1.35); γCH_3 17.1 (0.77); δCH_3 11.7 (0.66)
Lys 192	121.3 (8.53)	59.8 (4.13)	30.7 (1.69, 1.72)		γCH_2 26.1 (1.22, 1.33); δCH_2 29.5 (1.46, -); ϵCH_2 42.0 (2.69, 2.74); ζNH_3^+ - (-)
Pro 193	-	64.8 (4.24)	31.6 (1.60, 2.18)		γCH_2 28.4 (1.75, 1.81); δCH_2 50.7 (3.04, 3.53)
Ala 194	119.2 (7.31)	52.8 (4.13)	19.4 (1.33)		
Glu 195	119.1 (7.76)	57.8 (4.00)	29.1 (1.92, 1.95)		γCH_2 35.1 (2.23, 2.38); δC - (-)