

Tesi Doctoral realitzada a la  
Unitat de Biofísica  
Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

análisis de la estructura del transportador  
adp/atp por espectroscopia de infrarrojo  
utilizando métodos matemáticos de  
estrechamiento y ajuste de bandas

Por Víctor A. Lórenz Fonfría  
Bellaterra, mayo del 2003

*Al deseo,  
esa pregunta cuya respuesta  
no he encontrado*

*Toda tesis cuenta la historia de una renuncia*

análisis de la estructura del  
transportador adp/atp por  
espectroscopia de infrarrojo  
utilizando métodos matemáticos de  
estrechamiento y ajuste de bandas

*Memòria presentada per en Víctor Lòrenz Fonfría  
per optar al grau de Doctor.*

*Els treballs presentats han estat dirigits pel  
Dr. Esteve Padrós i Morell, i realitzats en la Unitat de  
Biofísica del Departament de Bioquímica i de Biologia  
Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona*

*Vist i plau del director de la tesi:*

Dr. Esteve Padrós i Morell

No decía palabras,  
acercaba tan sólo un cuerpo interrogante,  
porque ignoraba que el deseo es una pregunta  
cuya respuesta no existe,  
una hoja cuya rama no existe,  
un mundo cuyo cielo no existe.

*No decía palabras*

*Luis Cernuda*

“...En aquel Imperio, el Arte de la Cartografía logró tal Perfección que el mapa de una sola Provincia ocupaba toda una Ciudad, y el mapa del imperio, toda una Provincia. Con el tiempo, esos Mapas Desmesurados no satisficieron y los Colegios de Cartógrafos levantaron un Mapa del Imperio, que tenía el tamaño del Imperio y coincidía puntualmente con él. Menos Adictas al Estudio de la Cartografía, las Generaciones Sigüientes entendieron que ese dilatado Mapa era Inútil y no sin Impiedad lo entregaron a las Inclemencias del Sol y de los Inviernos.[...]”

*Del rigor en la ciencia*

*Jorge Luis Borges*

“11:15 Restate my assumptions:

1. Mathematics is the language of nature
2. Everything around us can be represented and understood through numbers
3. If you graph these numbers, patterns emerge. Therefore: There are patterns everywhere in nature”

*Max Cohen*

en la película  $\pi$

<b><i>a</i></b> : constante de un filtro	<b><i>DR</i></b> : desconvolución regularizada
<b><i>A</i></b> : área de una banda	<b><i>DRME</i></b> : desconvolución regularizada por máxima entropía
<b><i>aI</i></b> : vibración amida I	<b><math>\langle E(z)^2 \rangle</math></b> : intensidad media del campo eléctrico del haz evanescente respecto al incidente, en función de la distancia, $z$ , en el medio exterior
<b><i>aII</i></b> : vibración amida II	<b><math>\langle E(0)^2 \rangle</math></b> : intensidad del campo eléctrico evanescente en la interfase
<b><i>aA</i></b> : vibración amida A	<b><math>\langle E(0,l)^2 \rangle</math></b> : intensidad del campo eléctrico evanescente en la interfase para una muestra de grosor $l$
<b><i>aa</i></b> : aminoácido/s	<b><math>E^m(\nu)</math></b> : espectro solución <i>a priori</i>
<b><i>Abs</i></b> : absorbancia	<b><i>f</i></b> : (1) factor de desconvolución, definido como $\gamma/\gamma'$ (2) constante de fricción de un oscilador
<b><i>ADP</i></b> : adenosina difosfato	<b><math>F\{\}</math></b> : Transformada directa de Fourier de la función o datos situados entre los paréntesis
<b><i>Anc2</i></b> : isoforma 2 del transportador ADP/ATP mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	<b><math>F^{-1}\{\}</math></b> : Transformada inversa de Fourier de la función o datos situados entre los paréntesis
<b><i>Anc2pHis</i></b> : <i>Anc2</i> con una cola en el extremo terminal rica en histidinas (GRSRHHHHHH)	<b><math>F_{S/R}</math></b> : relación S/R retenida al desconvular
<b><i>A/R</i></b> : relación entre la absorbancia y la desviación estándar del ruido	<b><i>g</i></b> : factor Gaussiano de una Voigtiana, definido como $\gamma_G / (\gamma_L + \gamma_G)$
<b><i>ATP</i></b> : adenosina trifosfato	<b><math>G(\nu, \gamma_L)</math></b> : forma Gaussiana de anchura $\gamma_G$
<b><i>atr</i></b> : ácido atractilósido	<b><i>H</i></b> : matriz Hessiana
<b><i>B</i></b> : coeficiente neperiano de absorción molar integrado	<b><i>h</i></b> : función de respuesta al impulso
<b><i>BCA</i></b> : ácido bicinconínico	<b><i>H/D</i></b> : hidrógeno / deuterio
<b><i>BSA</i></b> : albúmina de suero bovino	<b><i>IR</i></b> : infrarrojo
<b><i>catr</i></b> : ácido carboxiatractilósido	<b><i>IR-TF</i></b> : infrarrojo por transformada de Fourier
<b><i>d</i></b> : separación entre dos bandas relativa a su anchura	
<b><math>d_e</math></b> : distancia de penetración efectiva	
<b><math>d_p</math></b> : distancia de penetración	
<b><math>D(\nu, l)</math></b> : filtro	
<b><i>DC</i></b> : dicroísmo circular	
<b><i>DF</i></b> : desconvolución de Fourier	
<b><i>DFPL</i></b> : desconvolución de Fourier seguida de predicción lineal	
<b><i>DM</i></b> : dodecil maltósido	

**$k$ :** (1) constante de fuerza de un potencial armónico (2) coeficiente de absorción

**$k_{ef}$ :** factor de estrechamiento efectivo

**$k_{opt}$ :** factor de estrechamiento óptimo

**$k_{PL}$ :** factor de estrechamiento en DFPL

**$l$ :** (1) punto de corte del interferograma del espectro de absorbancia en la desconvolución de Fourier (2) grosor de la muestra

**$L(\nu, \gamma_L)$ :** forma Lorentziana de anchura  $\gamma_L$

**$l_a$ :** longitud del interferograma utilizado para obtener  $h$

**$l_M$ :** longitud de  $h$

**$l_{opt}$ :** punto de corte óptimo

**$l_{PL}$ :** distancia del interferograma del espectro de absorbancia hasta la que se realiza la extrapolación mediante predicción lineal

**$n$ :** índice de refracción

**$n_1$ :** índice de refracción de las ventanas (T) o del cristal (RTA)

**$n_2$ :** índice de refracción de la muestra

**$n_3$ :** índice de refracción del material sobre la muestra (aire)

**$p$ :** parámetro de orden de un ángulo

**$P$ :** precisión

**$PA$ :** ácido fosfatídico

**$PC$ :** fosfatidil colina

**$PL$ :** predicción lineal

**$q$ :** distancia de una oscilación respecto a la posición de equilibrio

**$r$ :** factor de resta

**$R$ :** (1) razón dicroica (2) reflectancia

**$R(\nu, x_f)$ :** ensanchamiento instrumental de resolución nominal  $1/x_f$

**$R^{iso}$ :** razón dicroica isotrópica

**$res_d$ :** resolución digital

**$RMN$ :** resonancia magnética nuclear

**$RMS$ :** raíz cuadrada de la media de las diferencias cuadráticas entre los parámetros verdaderos de las bandas y los determinados mediante ajuste

**$RTA$ :** reflexión total atenuada

**$S$ :** (1) entropía (2) parámetro de forma de una banda desconvulada

**$S/R$ :** relación entre la señal y la desviación estándar del ruido. La señal corresponde al máximo del espectro a al máximo de una banda

**$S/R'$ :** relación S/R al desconvular

**$T$ :** transmitancia

**$T_1$ :** proceso de relajación energética

**$T_2$ :** proceso de relajación por desfase

**$UA$ :** unidades de absorbancia

**$V(\nu, \gamma_L, \gamma_G)$ :** forma Voigtiana de anchuras  $\gamma_L$  y  $\gamma_G$

**$\nu$ :** número de onda. En algunos casos frecuencia.

**$\nu_0$ :** frecuencia / número de onda natural de oscilación

**$x$ :** diferencia de camino óptico

**$x_f$ :** diferencia de camino óptico máxima a la que se adquiere un interferograma

**$\alpha$ :** (1) coeficiente neperiano de absorción (2) ángulo que forma el momento dipolar de transición de una vibración con el

eje de una estructura (3) parámetro de regularización no-lineal

$\beta$ : ángulo que forma el eje de una estructura molecular con la normal de la bicapa lipídica

$\chi^2$ : función estadística Chi-cuadrada

$\delta(\nu-\nu_0)$ : delta de Dirac situada en  $\nu_0$

$\Delta\nu$ : intervalo de números de onda en el que está definido un espectro

$\varepsilon$ : (1) ruido o errores (2) coeficiente de absorción / extinción molar

$\phi$ : ángulo que forma el momento dipolar de transición de una vibración con la normal del cristal de RTA (o ventanas de T) para un sistema con simetría axial

$\gamma$ : (1) anchura de una banda (2) ángulo que forma la normal de la bicapa lipídica con la normal del cristal de RTA (o ventanas de T)

$\gamma'$ : anchura de desconvolución

$\lambda$ : parámetro de regularización lineal

$\mu$ : (1) masa reducida (2) momento dipolar

$\theta$ : ángulo que forma el haz de radiación infrarrojo con la normal del cristal de RTA o la normal de las ventanas de T.

$\sigma$ : desviación estándar

$\tau$ : constante de relajación de un oscilador

$\left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q}\right)_0$ : variación del momento dipolar de una vibración o momento dipolar de transición

índice

# INTRODUCCIÓN

<b>1. El transportador mitocondrial ADP/ATP</b>	<b>1</b>
1.1 Localización y función del transportador	1
1.2 Estructura del transportador	1
1.3 Estados conformacionales del transportador	2
1.4 Sitios de unión del transportador	2
1.5 Mecanismo de transporte y estado de oligomerización	3
1.6 El transportador ADP/ATP de <i>S. cerevisiae</i> (Anc2)	4
<b>2. Espectroscopia de infrarrojo (IR)</b>	<b>5</b>
2.1 Origen e interpretación de los espectros de IR	5
2.1.1 Visión clásica del oscilador armónico	
2.1.1.1 Un solo oscilador: forma de las bandas	
2.1.1.2. Osciladores múltiples equivalentes: forma de las bandas	
2.1.2 Los modos normales de vibración	
2.1.3 Acoplamiento dipolar	
2.2 Espectros de infrarrojo de proteínas	11
2.2.1 Modos de vibración del grupo amida	
2.2.1.1 Vibración N-H (amida A)	
2.2.1.2 Vibración amida I	
2.2.1.3 Vibración amida II	
2.2.1.4 Otras vibraciones amida	
2.2.2 Correlación frecuencia-estructura en la amida I	
2.2.3. Definición de las estructuras secundarias de las proteínas	
2.2.3.1 Hélices alfa	
2.2.3.2 Hélices $3_{10}$	
2.2.3.3 Láminas beta	
2.2.3.4 Giros reversos	
2.2.3.5 Estructuras desordenadas	
2.2.4 Vibraciones de las cadenas laterales de los aminoácidos	
<b>3. Desconvolución y estrechamiento de bandas</b>	<b>20</b>
3.1 Necesidad de desconvolar y estrechar bandas	20
3.2 Autodesconvolución en el espacio de Fourier	22
3.2.1 Características generales	
3.2.2 Fundamentos teóricos de la autodesconvolución de Fourier	
3.2.2.1 La autodesconvolución	

3.2.2.2 El filtro	
3.2.2.3 Estrechamiento, forma y disminución de la relación señal/ruido de las bandas autodesconvuladas	
3.2.3 La desconvolución de Fourier fuera de las condiciones de autodesconvolución	
3.3 Desconvolución regularizada	28
3.4 Desconvolución de Fourier y predicción lineal	29
3.4.1 Predicción lineal de un interferograma truncado	
3.4.2 Predicción lineal de un interferograma deapodizado y truncado	
<b>4. Ajuste de bandas y estimación de sus parámetros</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. Obtención del transportador ADP/ATP (Anc2)</b>	<b>39</b>
1.1 Obtención de las mitocondrias	39
1.2 Purificación del Anc2pHis a partir de mitocondrias	40
1.3 Determinación de la concentración del Anc2pHis y del DM	41
1.4 Reconstitución del Anc2pHis en liposomas	42
<b>2. Adquisición de los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier</b>	<b>43</b>
2.1 Formas de adquirir un espectro	43
2.2 Adquisición y procesamiento de un espectro por interferometría	43
2.2.1 Fuente monocromática	
2.2.2 Fuente policromática	
2.2.3 Limitaciones instrumentales	
2.2.3.1 Respuesta dependiente de la frecuencia de la radiación para el detector y el divisor de haces	
2.2.3.2 Resolución limitada	
2.2.3.3 La corrección de la fase del interferograma	
2.2.3.4 Respuesta no-lineal del detector	
2.3 Condiciones experimentales de los espectros de IR-TF	47
<b>3. Espectros de absorbancia por transmitancia</b>	<b>49</b>
3.1 Distorsiones en los espectros de absorbancia obtenidos por transmitancia	49
3.2 Determinación del paso óptico de la muestra	52

3.3 Resta del agua	53
3.4 Determinación de la relación señal/ruido	54
3.5 Condiciones de adquisición de los espectros de transmitancia	56
<b>4. Espectros de absorbancia por reflexión total atenuada (RTA)</b>	<b>57</b>
4.1 Ley de Lambert-Beer y penetración efectiva en RTA	58
4.2 Cálculo de la penetración efectiva	59
4.2.1 Hipótesis de la película gruesa	
4.2.2 Hipótesis de la película delgada	
4.2.3 Interpolación entre la hipótesis de la película delgada y la gruesa	
4.3 Distorsiones en el espectro de absorbancia por RTA	63
4.4 Condiciones de adquisición de los espectros por RTA	65
<b>5. Experimentos de orientación</b>	<b>66</b>
5.1 Determinación de la orientación molecular mediante espectroscopia infrarroja	66
5.1.1 La razón dicroica	
5.1.2 El parámetro de orden	
5.1.3 Efecto de un polarizador imperfecto	
5.1.4 Obtención de la orientación molecular a partir de la razón dicroica experimental	
5.1.5 Determinación del grosor de la muestra	
5.1.6 Corrección por la presencia de estructuras no orientadas	
5.1.7 Determinación experimental de la razón dicroica	
5.2 Obtención de espectros de dicroísmo lineal	72
5.3 Efecto de la orientación de la muestra en la absorbancia en ausencia de polarización	73
<b>6. Cálculos numéricos y simbólicos</b>	<b>75</b>

## RESULTADOS TEÓRICOS

<b>1. Desconvolución de Fourier: infra y sobredesconvolución, y determinación de los parámetros óptimos de desconvolución</b>	<b>77</b>
1.1 Bandas Lorentzianas	79
1.1.1 Forma de las bandas desconvuladas	
1.1.2 Estrechamiento efectivo ( $k_{ef}$ )	
1.1.3 Degradación de la relación señal/ruido	

1.1.4	El estrechamiento efectivo y la degradación de la relación señal/ruido	
1.1.5	Uso práctico de la desconvolución de Fourier: elección de $k$ , $\gamma'$ y el filtro	
1.1.5.1	Elección del filtro	
1.1.5.2	Elección del factor de estrechamiento ( $k$ )	
	A. El criterio teórico	
	B. El criterio gráfico	
	C. El método de la detección de bandas (nuestro método)	
1.1.5.3	Elección de la anchura de desconvolución ( $\gamma'$ )	
1.1.5.3.1	Obtención de una anchura representativa de las bandas	
	A. Método visual	
	B. Método del ruido en el módulo del interferograma	
	C. Método de la derivada del módulo del interferograma (nuestro método)	
	D. Método de la predicción lineal	
1.1.5.3.2	Estimación de las anchuras de todas las bandas	
<b>1.2</b>	<b>Bandas Gaussianas</b>	<b>111</b>
	A. Elección de $k$	
	B. Elección de $\gamma'$	
<b>1.3</b>	<b>Bandas Voigtianas</b>	<b>116</b>
1.3.1	Características de las bandas Voigtianas	
1.3.2	Desconvolución de bandas Voigtianas	
1.3.3	Elección de $k$	
1.3.4	Elección de las anchuras Lorentzianas y Gaussianas de desconvolución	
<b>2.</b>	<b>Desconvolución regularizada</b>	<b>127</b>
2.1	Regularizadores lineales	127
2.1.1	Solución general	
2.1.2	Forma y anchura de las bandas desconvuladas	
2.1.3	Elección del parámetro de regularización	
2.2	Regularizadores no lineales para soluciones positivas	131
2.2.1	Tres regularizadores entrópicos	
2.2.2	Obtención del espectro desconvulado por máxima entropía	
2.2.3	Aplicación práctica	
2.2.4	Efecto de la no-linealidad en la distribución del ruido en la solución	
2.2.5	Efecto de la expresión de la entropía en la solución	
2.3	Regularizadores entrópicos para soluciones sin restricción de signo	137
2.3.1	La entropía $S_1$ sin restricción de signo	
2.3.2	La entropía $S_2$ sin restricción de signo	
<b>3.</b>	<b>Desconvolución mediante predicción lineal</b>	<b>145</b>
3.1	Efecto del ruido	146
3.2	Bandas con carácter Gaussiano	152
3.3	Efecto del truncamiento del espectro en la predicción lineal	153

3.4 Presencia de línea base	155
3.5 Aplicación práctica	155
3.5.1 Elección y efecto de los parámetros en la solución	
3.5.2 Estrechamiento obtenido	
3.5.3 Infra y sobredesconvolución	
3.5.4 Efecto de la no-linealidad en la distribución del ruido en la solución	
3.5.5 Aplicación a bandas Voigtianas	
<b>4. Ajuste de bandas</b>	<b>161</b>
4.1 Una Lorentziana aislada	161
4.1.1 Una banda Lorentziana con resolución limitada	
4.1.1.1 Teoría	
4.1.1.2 Ejemplo práctico	
4.1.2 Una banda Lorentziana suavizada	
4.1.3 Una banda Lorentziana apodizada	
4.1.4 Una banda Lorentziana desconvulada	
4.1.4.1 Exactitud en la obtención de los parámetros	
A. Filtro Bessel	
B. Filtro Blackmann-Harris-Lórenz	
C. Filtro Gaussiano	
4.1.4.2 Uso de bandas Voigtianas como modelo general para ajustar bandas Lorentzianas desconvuladas	
4.1.4.3 Precisión de los parámetros obtenidos en presencia de ruido	
4.2 Bandas Lorentzianas solapadas	179
4.2.1 Obtención de los parámetros	
4.2.1.1 Mínimos locales y mínimo global de $\chi^2$	
4.2.1.2 Ajuste del espectro desconvulado	
4.2.2 Efecto de los errores en el planteamiento del modelo sobre los valores de los parámetros obtenidos	
4.2.2.1 Condicionamiento del ajuste	
4.2.2.2 Errores causados por una línea base compleja y bandas adyacentes	
4.2.2.3 Errores inducidos por la corrección de la línea base	
4.2.2.4 Errores en la forma de las bandas	
4.2.3 Precisión en el ajuste de bandas Lorentzianas solapadas	
4.2.3.1 Tres bandas solapadas	
4.2.3.2 Múltiples bandas solapadas con diversas anchuras: amida I	
4.3 Ajuste de bandas Voigtianas	199
4.3.1 Una banda Voigtiana aislada	
4.3.2 Ajuste de una Voigtiana desconvulada aislada	
4.3.3 Ajuste de bandas Voigtianas solapadas	
4.3.4 Ajuste de bandas Voigtianas desconvuladas y solapadas	

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

<b>1. Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM</b>	<b>205</b>
1.1 Purificación del Anc2pHis inhibido	205
1.2 Película seca del Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM	206
1.2.1 Propiedades del espectro	
1.2.1.1 Determinación de la relación señal/ruido	
1.2.1.2 Contribuciones en la amida I y amida II	
1.2.1.3 Coeficiente de absorción molar del enlace peptídico	
1.2.1.4 La banda de tirosina	
1.2.1.5 La banda del C=O de los fosfolípidos	
1.2.2 Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I	
1.2.3 Determinación del número y posición de las bandas componentes en la amida I	
1.2.3.1 Desconvolución de Fourier	
1.2.3.2 Desconvolución regularizada por máxima entropía	
1.2.3.3 Desconvolución de Fourier y predicción lineal	
1.2.4 Determinación de los parámetros de las bandas componentes	
1.2.5 Asignación de las bandas del Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM	
1.3 Anc2pHis inhibido y solubilizado con DM en disolución acuosa (H <sub>2</sub> O)	230
1.3.1 Propiedades del espectro	
1.3.1.1 Contribuciones en la amida I y amida II	
1.3.1.2 Determinación de la relación señal/ruido	
1.3.1.3 Coeficiente de absorción del enlace peptídico	
1.3.1.4 La banda del C=O de los fosfolípidos	
1.3.2 Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I	
1.3.3 Determinación del número y posición de las bandas componentes en la amida I	
1.3.3.1 Desconvolución de Fourier	
1.3.3.2 Desconvolución regularizada por máxima entropía	
1.3.4 Determinación de los parámetros de las bandas componentes	
1.4 ¿Película seca del Anc2pHis o Anc2pHis en disolución? Ventajas y desventajas de su estudio por IR-TF	241
<b>2. Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas de PC/PA</b>	<b>245</b>
2.1 Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación no polarizada (H <sub>2</sub> O)	245
2.1.1 Propiedades del espectro	
2.1.1.1 Grosor de la película	
2.1.1.2 Grado de hidratación de la película	
2.1.1.3 Estado del PC/PA en la película	
2.1.1.4 Determinación de la relación señal/ruido	
2.1.1.5 Contribuciones en la amida I y amida II	

2.1.1.6 La banda de tirosina	
2.1.2 Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I	
2.1.3 Determinación del número y posiciones de las bandas componentes entre 1800-1600 $\text{cm}^{-1}$ para la PC/PA	
2.1.4 Determinación del número y posiciones de las bandas componentes de la amida I	
2.1.4.1 Desconvolución de Fourier	
2.1.4.2 Desconvolución regularizada por máxima entropía	
2.1.5 Determinación de los parámetros de las bandas componentes en la amida I	
2.1.6 Asignación de las bandas amida I del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas de PC/PA ( $\text{H}_2\text{O}$ )	
<b>2.2 Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación polarizada (<math>\text{H}_2\text{O}</math>)</b>	<b>264</b>
2.2.1 Propiedades del espectro	
2.2.2 Determinación del parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis respecto a la normal de la bicapa	
2.2.2.1 Determinación del parámetro de orden de las vibraciones respecto al cristal de RTA	
2.2.2.2 Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto al cristal de RTA	
2.2.2.3 Determinación del parámetro de orden de la bicapa	
2.2.2.4 Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto a la normal de la bicapa de proteoliposomas	
2.2.3 El espectro de dicroísmo	
2.2.4 Asignación de bandas del espectro de dicroísmo	
<b>3. Intercambio hidrógeno/deuterio del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas</b>	<b>277</b>
3.1 Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación no polarizada ( $\text{D}_2\text{O}$ )	278
3.1.1 Propiedades del espectro	
3.1.1.1 Grosor de la película	
3.1.1.2 Determinación de la relación señal/ruido	
3.1.1.3 La banda de tirosina	
3.1.2 Efecto del intercambio H/D en las posiciones de las bandas	
3.1.3 Determinación del grado de intercambio H/D del grupo amida	
3.1.4 Determinación del número y posición de las bandas componentes en la amida I	
3.1.4.1 Desconvolución en el espacio de Fourier	
3.1.4.2 Desconvolución regularizada por máxima entropía	
3.1.5 Determinación de los parámetros de las bandas componentes de la amida I	
3.1.6 Asignación de las bandas para el Anc2pHis reconstituido ( $\text{D}_2\text{O}$ )	
3.2 Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación polarizada ( $\text{D}_2\text{O}$ )	290

- 3.2.1 Propiedades del espectro
- 3.2.2 Determinación del parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis respecto a la normal de la bicapa
  - 3.2.2.1 Determinación del parámetro de orden de las vibraciones respecto al cristal de RTA
  - 3.2.2.2 Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto al cristal de RTA
  - 3.2.2.3 Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto a la normal de la bicapa de proteoliposomas
- 3.2.3 El espectro de dicroísmo
- 3.2.4 Asignación de bandas para el espectro de dicroísmo (D<sub>2</sub>O)

## **DISCUSIÓN GENERAL**

<b>1. El problema del ajuste de la amida I. Efecto del número, forma de las bandas y desconvolución realizada en los resultados del ajuste</b>	<b>299</b>
1.1 Número de bandas en el ajuste	299
1.2 Forma de las bandas en el ajuste	301
1.3 Efecto del tipo de desconvolución y de los parámetros de desconvolución utilizados en el ajuste	304
<b>2. Estimación de la estructura secundaria del transportador ADP/ATP</b>	<b>306</b>
2.1 Anc2pHis inhibido y solubilizado	306
2.2 Anc2pHis inhibido y reconstituido	306
<b>3. Discusión sobre la estructura del transportador ADP/ATP reconstituido</b>	<b>308</b>
3.1 Las hélices transmembrana: número de onda, orientación e intercambio H/D	308
3.1.1 Diferencias estructurales entre las hélices transmembrana	
3.1.2 Diferencia de estabilidad/accesibilidad al disolvente de las hélices transmembrana	
3.2 Los lazos topológicos y extremos terminales	311
3.3 Comparación del grado de intercambio H/D del transportador ADP/ATP con otras proteínas de membrana	312
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>315</b>

<b>REFERENCIAS</b>	<b>317</b>
--------------------	------------

## **APÉNDICES**

<b>1. Teoría de la inversión de integrales e inferencias</b>	<b>331</b>
<b>2. Modelación de datos y estimación de parámetros</b>	<b>344</b>
<b>3. Expresiones de filtros y funciones de apodización</b>	<b>352</b>
<b>4. Manipulación del ruido, de la intensidad y de la relación señal/ruido de un espectro en el espacio de Fourier</b>	<b>355</b>
<b>5. Modelos autorregresivos</b>	<b>358</b>
<b>6. Asignación estructural de las bandas de proteína en espectroscopia de infrarrojo</b>	<b>362</b>
<b>7. Coeficientes de absorción molar integrados absolutos y relativos para la vibración amida I de las diferentes estructuras secundarias de proteínas</b>	<b>387</b>
<b>6. Comparación de los resultados obtenidos con los publicados</b>	<b>390</b>

## **PUBLICACIONES**

1. Lórenz et al., 2001 ( <i>Biochemistry</i> )	393
2. Lórenz-Fonfría et al., 2002 ( <i>Appl. Spectrosc.</i> )	407
3. Dave et al., 2002 ( <i>J. Biol. Chem.</i> )	419
4. Lórenz-Fonfría et al., 2003 ( <i>Biophys. J.</i> )	427

introducción

# 1. El transportador mitocondrial de ADP/ATP

## 1.1. Localización y función del transportador

El transportador ADP/ATP es una proteína intrínseca de membrana, localizada en la membrana interna de la mitocondria, y cuya función fisiológica es el intercambio de  $\text{ADP}^{3-}$  citosólico por  $\text{ATP}^{4-}$  mitocondrial. La estequiometría del transporte es uno a uno, y sólo las formas libres, sin compensación de carga, son transportadas. Como consecuencia el transporte es electrogénico (Brandolin et al., 1993b).

La dirección global del intercambio está determinada por las concentraciones de los nucleótidos di- y tri-fosfato en el interior y exterior, y del potencial de membrana. Así, *in vitro*, se puede invertir la dirección del transporte, o conseguir transportes fútiles:  $\text{ADP}_{\text{ex}}^{3-} / \text{ADP}_{\text{in}}^{3-}$  o  $\text{ATP}_{\text{ex}}^{4-} / \text{ATP}_{\text{in}}^{4-}$ . Más recientemente, también se han observado y estudiado medios ciclos del transporte ( $\text{ATP}_{\text{ex}}^{4-} / 0_{\text{in}}$  y  $\text{ADP}_{\text{ex}}^{3-} / 0_{\text{in}}$ ) (Gropp et al., 1999).

El transportador muestra una baja actividad catalítica, con una velocidad máxima para el intercambio ADP/ATP de  $400 \text{ min}^{-1}$  a  $0^\circ\text{C}$ , y de  $1000\text{-}2000 \text{ min}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  (Brandolin et al., 1993b). A pesar de esto, la entrada de suficiente ATP en el citosol está asegurada por la gran abundancia del transportador en la membrana interna de la mitocondria, que puede alcanza el 15-10% de las proteínas en esta membrana (Brandolin et al., 1993b).

## 1.2. Estructura del transportador

Su estructura primaria consta de unos 300 aminoácidos (33KDa) con tres segmentos de 100 aminoácidos que muestran homología entre sí. Presenta un alto porcentaje de residuos polares (40%), y una carga neta positiva a pH neutro (+18) (Walker, 1992.). Estas características están compartidas por toda la familia de transportadores mitocondriales, a la que pertenece el transportador (Walker 1992). Los gráficos de hidrofobicidad aplicados al transportador dan una señal poco clara, pero considerando que los tres segmentos de 100 aminoácidos mostrarán un plegamiento similar, y que todos los miembros de la familia de transportadores mitocondriales mostrarán la misma topología por el hecho de formar una familia, los gráficos de hidrofobicidad predicen seis segmentos transmembrana de 20-25 aminoácidos cada uno (Saraste y Walker, 1992). La existencia de un número par de segmentos transmembrana ha sido probada por la reciente expresión de homodímeros covalentes funcionales (Hatanaka et al., 1999; Trézéguet et al., 2000; Huang et al., 2001).

Las predicciones topológicas predicen la existencia de tres grandes lazos ( $\approx 40$  aminoácidos cada uno) entre las hélices I-II, III-IV, y V-VI situados en la matriz mitocondrial (Klingenberg y Nelson, 1994). Estos lazos se muestran accesibles desde el citosol durante el transporte, sugiriendo que éstos se extienden hacia dentro de la membrana, posiblemente envolviendo al camino de traslocación del ATP/ADP (Klingenberg y Nelson, 1994).

### **1.3. Estados conformacionales del transportador**

Dos familias de inhibidores han sido de vital importancia en el estudio de las diferentes conformaciones que adopta el transportador ADP/ATP: el ácido carboxiatractilósido (catr) y el ácido atractilósido (atr) por un lado, y el ácido bongcréquico (ba) y el ácido isobongcréquico (iso-ba) por otro. El atr es un veneno producido por el cardo *Atractylis gumifera*, que crece en tierras costeras al mar Mediterráneo. El ba y el iso-ba son dos compuestos tóxicos secretados por la bacteria *Pseudomonas cocovenenans* (Fiore et al. 1998). Estos inhibidores han permitido identificar dos conformaciones excluyentes del transportador: una sensible a catr (conformación CATR) en la que el catr se une al transportador exclusivamente por el lado citosólico; y otra a ba (conformación BA), el cual, por su parte, se une al transportador exclusivamente por el lado mitocondrial. Estas dos conformaciones preexisten en la membrana mitocondrial, siendo simplemente estabilizadas por los inhibidores (Block et al., 1983; Brandolin et al., 1993b). Además, estas dos conformaciones son intercambiadas por la presencia de ADP o/y ATP, pero no por nucleótidos no transportables, por lo que se supone que el cambio de conformación está implicado en el proceso de transporte (Fiore et al., 1998). Es interesante que esta alternancia entre las dos conformaciones inducida por la presencia de ADP o/y ATP también se da cuando el transportador se halla solubilizado en algunos detergentes, por ejemplo con el dodecil maltósido (Brandolin et al., 1993b).

Las conformaciones CATR y BA presentan diferencias estructurales, pues la reactividad química, enzimática e inmunológica del transportador es marcadamente diferente tras la unión de catr y de ba. Dependiendo de la presencia de catr o de ba zonas específicas del transportador son enmascaradas o resultan accesibles a reactivos químicos, a anticuerpos o a enzimas proteolíticos (Brandolin et al., 1993b, Walker, 1992; Klingenberg, 1989). Quizá el resultado más sorprendente se dio con el estudio de la reactividad química al fosfato pirodoxal. El fosfato pirodoxal es un reactivo no permeable a la membrana que modifica químicamente a las cadenas laterales de las lisinas. Las lisinas del lazo mitocondrial M2 se marcan con fosfato pirodoxal liberado en la matriz mitocondrial, pero sólo cuando la proteína adopta la conformación BA. Sorprendentemente, en la conformación CATR estos mismos residuos se marcan con pirodoxal liberado en el citosol, pero no desde la matriz mitocondrial (Bogner et al., 1986).

### **1.4. Sitos de unión del transportador**

Los inhibidores muestran una muy alta afinidad por el transportador, indicando que el sitio de unión es altamente adecuado para los inhibidores, sin necesidad de alterar al transportador de su estructura con menor energía (Klingenberg, 1989). La selectividad de los inhibidores apunta a que el sitio de unión no forzado es muy diferente entre las conformaciones CATR y BA. Siendo un transportador un enzima que cataliza el transporte de una molécula, la unión del sustrato (ADP o ATP) ha de estabilizar el estado de transición (Klingenberg, 1989). La existencia del estado de transición requerirá a su vez que el transportador se encuentre alterado respecto a su estructura basal. La energía libre asociada con la unión del ADP (o ATP) al estado de transición será la que permita forzar la estructura del transportador para que

se dé dicho estado. Por ello la constante de unión del ADP y ATP es mucho menor que la de sus inhibidores, pues parte de la energía libre de unión ha de invertirse en un cambio conformacional (Klingenberg, 1989). Que compuestos químicos tan diferentes como el catr, ba, ADP y ATP se unan al mismo sitio de unión implica una gran flexibilidad de éste, sufriendo importantes cambios según el estado del transportador.

También ha sido importante el uso de ADP, ATP, catr o ba fotoactivables para la localización de el/los sitio/s de unión. Cuando estas moléculas de ATP y ADP fotoactivables y no transportables son expuestas a mitocondrias desde el citosol, los segmentos de aminoácidos 137-170 y 234-266 (localizados en los lazos M2 y M3) quedan marcados, y son pues buenos candidatos para la localización del sitio de unión (Brandolin et al., 1993b; Dalbon et al., 1988; Mayinger et al., 1989; Dianoux et al., 2000). Curiosamente, los aminoácidos de estos lazos se localizan supuestamente en la matriz mitocondrial. Ambos resultados se pueden reconciliar si en las diferentes conformaciones del transportador estos lazos se encuentran expuestos a diferentes lados de la membrana.

Los inhibidores poseen un sitio de unión por cada unidad dimérica de transportador, y para el complejo transportador-catr solubilizado en el detergente *Triton X-100* se ha comprobado que el transportador se halla como dímero (Hackenberg y Klingenberg, 1980). A partir de estudios de dispersión de neutrones también se concluyó que los complejos transportador-catr y transportador-ba tienen una forma dimérica (Block et al., 1982).

### **1.5. Mecanismo de transporte y estado de oligomeración**

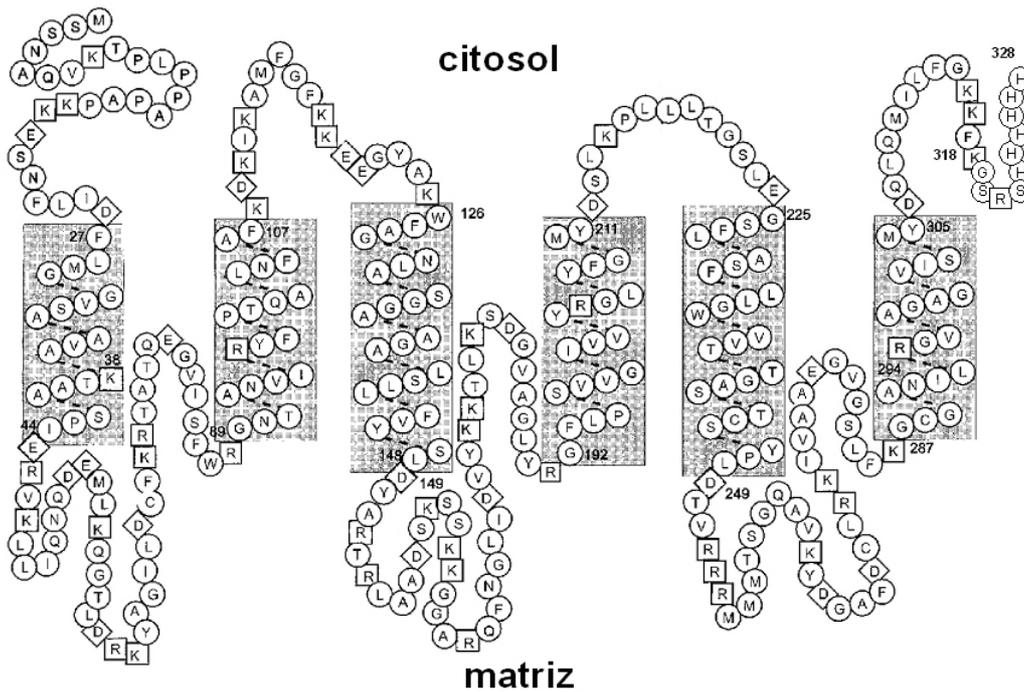
Existen dos hipótesis distintas que responden a cual es el mecanismo de transportador y cual es su estado de oligomeración.

La hipótesis más aceptada relaciona el estado CATR con el estado en el que transportador sería capaz de unir o liberar ADP o ATP en el citosol (estado c). En el estado BA, por su parte, el transportador sólo uniría o liberaría ADP o ATP desde la matriz mitocondrial (estado m). El transporte tendría lugar por la interconversión de ambas conformaciones, siguiendo un mecanismo de ping-pong (Klingenberg, 1989). Dado que la forma unida a catr se ha identificado como un dímero también lo sería la unidad funcional.

Otros autores rechazan la equivalencia de los estados CATR y BA, y de los estados c y m. La observación de que ATP citosólico es capaz de inducir el cambio de la conformación BA a la CATR (Brandolin et al., 1993b; Block et al., 1983), junto a la deducción de un mecanismo secuencial para el transporte a partir de estudios cinéticos (Duyckaerts et al., 1980), y a su determinación de la mitad de los sitios de unión para el ATP o ADP que para los inhibidores, les lleva a la deducción de una unidad funcional mínima compuesta por un tetrámero (Brandolin et al., 1993b).

### **1.6. El transportador ADP/ATP de *S. Cerevisiae* (Anc2)**

En la levadura *S. cerevisiae* se expresan tres isoformas del transportador ADP/ATP, siendo la Anc2 la única necesaria para el crecimiento en una forma no fermentable de carbono, y es la expresada de forma mayoritaria en estado aeróbico (Brandolin et al. 1993b; Fiore et al., 1998). En este trabajo el transportador ADP/ATP se ha obtenido a partir de una cepa genéticamente modificada de *S. cerevisiae*, la cual produce sólo la isoforma Anc2 con una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal (Anc2pHis) (Fiore et al., 2000). La forma estudiada ha sido la inhibida con catr. La secuencia primaria del Anc2pHis junto con una posible topología se muestra con la figura 1.1.



**Figura 1.1.** Representación de la secuencia primaria del Ancp2His y de su probable organización topológica (adaptado de Müller et al., 1996)

## 2. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

### 2.1. Origen e interpretación de los espectros de IR

#### 2.1.1. Visión clásica del oscilador armónico

Desde el punto de vista químico las moléculas constan de átomos enlazados. La comprensión de dichos enlaces y de la naturaleza de los elementos químicos es el campo de la química física, y requiere el formalismo de la mecánica cuántica. Aún así, muchas de las características espectroscópicas de las moléculas (cómo interaccionan con la radiación electromagnética, por ejemplo) pueden entenderse a partir de modelos no cuánticos que descansan en una realidad más próxima a nosotros. Aunque conceptualmente erróneos o incompletos, estos modelos resultan muchas veces sorprendentemente útiles, siempre que se sepa cuando prescindir de ellos.

Una molécula puede considerarse como una serie de masas, unidas por muelles con una geometría concreta. Las masas representan el núcleo de los átomos y los muelles los enlaces. Sabemos que cuando varios cuerpos unidos por un muelle se empujan (perturban), comienzan a oscilar (la distancia entre los cuerpos varía periódicamente con el tiempo) hasta que eventualmente vuelven a su estado inicial (el sistema se relaja). La frecuencia de oscilación así como el tiempo de relajación vienen determinados por el conjunto formado por el muelle, los cuerpos, su geometría y el medio y, por tanto, nos dan información sobre los cuerpos, sus enlaces, su estructura y el medio en el cual oscilan.

##### 2.1.1.1. Un solo oscilador: forma de las bandas

Una visión físico-matemática del problema resulta más enriquecedora. Consideremos dos átomos (cuerpos) enlazados (unidos por un muelle). El movimiento de los átomos está sujeto a las leyes de Newton. A causa de la presencia del muelle existirá un campo potencial que dependerá de la distancia entre los átomos. Además, el movimiento de los cuerpos estará sujeto a un rozamiento con el medio, el cual dependerá de su velocidad. El campo potencial causado por el muelle puede ser de expresión complicada en especial si ha de mimetizar al enlace químico. Si llamamos  $q$  la separación de los átomos respecto a la distancia de equilibrio, el potencial se puede desarrollar como una serie de Taylor alrededor de la posición de equilibrio entre los átomos ( $q = 0$ ) como (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1):

$$V(q) = V(0) + \left(\frac{\partial V}{\partial q}\right)_0 q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial^2 q}\right)_0 q^2 + \frac{1}{6} \left(\frac{\partial^3 V}{\partial^3 q}\right)_0 q^3 + \dots + \frac{1}{n!} \left(\frac{\partial^n V}{\partial^n q}\right)_0 q^n \approx \frac{1}{2} kq^2 \quad (2.1)$$

donde  $k$  se conoce como la constante de fuerza de la vibración (Nakamoto, 1997 cap. 1).

Para valores pequeños de  $q$  el término cuadrático es suficiente para describir el potencial, que pasa a llamarse armónico. Los términos cúbicos o superiores son a veces necesarios para la descripción del potencial, que entonces deja de ser armónico (Hollas, 1996 cap. 6).

La primera manera de estudiar el sistema es en ausencia de fuerzas externas. La ecuación diferencial que describe la distancia entre los dos átomos respecto a la distancia de equilibrio,  $q$ , es (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1):

$$\mu \frac{d^2 q}{dt^2} + f \frac{dq}{dt} + kq = 0 \quad (2.2)$$

donde  $\mu$  es la masa reducida de los dos átomos,  $k$  es la constante de fuerza del muelle, y  $f$  la constante de fricción. Una solución de dicha ecuación\* tras una perturbación del sistema que desplaza la distancia entre los átomos del equilibrio en el tiempo cero (hace que  $q(0) = q_0$ ) es:

$$q(t) = q_0 \exp(-t/\tau) \cos\left[\sqrt{(2\pi\nu_0)^2 - (1/\tau)^2} t\right] \approx q_0 \exp(-t/\tau) \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.3)$$

donde el tiempo de relajación viene dado por  $\tau = 2\mu/f$ , y la frecuencia de vibración por  $\nu_0 = 2\pi\sqrt{k/\mu}$  (si  $\tau^{-1} \ll \nu_0$ ).

El valor de  $q(t)$  no puede ser determinado (los átomos son muy pequeños para ser “vistos” y “oscilan” a mucha frecuencia para ser seguidos). En el caso de una molécula diatómica dipolar la oscilación de los átomos genera una oscilación del campo eléctrico, que no es sino una onda electromagnética. El campo eléctrico de esta onda puede ser detectado, y depende de la distancia entre los átomos como:

$$\vec{E}(t) = \left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q}\right) q = \left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q}\right)_0 q + \left(\frac{\partial \bar{\mu}^2}{\partial^2 q}\right)_0 q^2 + \dots + \frac{1}{(n-1)!} \left(\frac{\partial \bar{\mu}^n}{\partial^n q}\right)_0 q^n \approx \left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q}\right)_0 q \quad (2.4)$$

donde  $\bar{\mu}$  es el momento dipolar del enlace. Por suerte, generalmente sólo el término lineal es significativo, y  $(\partial \bar{\mu} / \partial q)_0$  se conoce como la variación del momento dipolar de la vibración o momento dipolar de transición. Cuando los términos superiores son importantes se introduce una anarmonicidad (Hollas, 1996 cap. 6).

A la vez que la variación de  $q$  produce un campo eléctrico, el aplicar un campo eléctrico producirá una variación de  $q$ . El campo eléctrico nos permitirá perturbar el valor de  $q$  del equilibrio, de  $q = 0$  a  $q = q_0$ .

Volviendo a la ecuación 2.3, ésta consta de tres partes: el valor  $q_0$  representa la magnitud de la perturbación del sistema a partir del valor de equilibrio, el cual depende de la intensidad del campo electromagnético de la onda aplicado, de la variación del momento dipolar de la vibración y la orientación entre ambos. Este término nos puede dar información sobre el valor de la variación del momento dipolar y sobre su orientación. El segundo término representa la relajación del sistema que dependerá de la fricción. El último término representa la oscilación cuya frecuencia depende de la masa del cuerpo y la constante de fuerza de muelle (la fuerza del enlace).

Como hemos comentado ya, así como la oscilación del sistema produce una perturbación en el campo electromagnético, un campo electromagnético puede inducir la oscilación del sistema. Esto permite

---

\* La ecuación general es una exponencial compleja, que incluye la solución cosenoide y la senoide con diferentes grados de desfases.

perturbar el sistema mediante un pulso electromagnético corto (menor que el tiempo de relajación del sistema) de modo semejante a RMN. Sin embargo, ésta no es la manera habitual de operar en IR. Habitualmente, en espectroscopia de IR, el sistema se ve sujeto a la presencia continua de una radiación electromagnética, la cual realiza una fuerza oscilatoria sobre el sistema. La ecuación diferencial que describe la distancia entre los dos átomos respecto a la distancia de equilibrio ( $q$ ) es (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1):

$$\mu \frac{d^2 q}{dt^2} + f \frac{dq}{dt} + kq = F_q \exp(i2\pi\nu t) \quad (2.5)$$

donde  $\vec{F}$  es la fuerza máxima que se aplica sobre el sistema, y  $F_q = |\vec{F}| \cos\phi_q$  es la fuerza máxima que se aplica en la dirección  $q$ . El sistema responde oscilando a la misma frecuencia que la fuerza aplicada. Para tiempos mayores que el tiempo de relajación  $\tau$ , el sistema se estabiliza, y el desplazamiento que vendrá dado por:

$$q(t) = \text{Re} \left\{ \frac{|\vec{F}| \cos\phi_q}{k - \mu(2\pi\nu)^2 + i2\pi\nu f} \exp(i2\pi\nu t) \right\} \quad (2.6)$$

La amplitud de la oscilación vendrá dada por el primer término de la ecuación 2.6. La fracción de energía absorbida (energía absorbida dividido por la energía aplicada), es (Bernath, 1995 cap. 1):

$$\frac{q_{\text{max}}^2 \left| \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q} \right)_0 \right|^2}{|\vec{F}|^2} \propto \left| \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q} \right)_0 \right|^2 \cos^2 \phi_q \frac{f / (\pi\mu)}{\pi \left( \left( \frac{f}{2\pi\mu} \right)^2 + 4 \left( \nu - \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu} \right)^2 \right)} \quad (2.7)$$

Esta expresión es una banda Lorentziana con posición  $\nu_0$ , anchura  $\gamma$  y área  $A$ :

$$\frac{2A\gamma}{\pi(\gamma^2 + 4(\nu - \nu_0)^2)} \quad (2.8)$$

donde,

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \gamma = \frac{1}{\pi\tau} = \frac{f}{2\pi\mu} \quad A \propto \left| \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial q} \right)_0 \right|^2 \cos^2 \phi_q \quad (2.9)$$

Por lo tanto, si medimos la intensidad de la oscilación del sistema respecto a la energía aplicada en función de la frecuencia de la radiación aplicada, obtenemos una banda Lorentziana, cuyo máximo se da cuando la frecuencia aplicada coincide con la natural del sistema. A partir de la anchura de la banda podemos obtener la constante de rozamiento del sistema, y de su área un valor relacionado con la variación del momento dipolar de la vibración y la orientación entre ésta y la radiación.

Por lo tanto, en el experimento de perturbación mediante un pulso y el experimento de perturbación continua se obtiene la misma información sobre el sistema, pero de diferente forma. En el primero obtenemos la información de la respuesta del sistema en función del tiempo, que llamaremos decaimiento,

nos da la, mientras en el segundo es la respuesta del sistema respecto a la frecuencia de la perturbación, que llamaremos espectro, la que nos la da. Las dos formas son intercambiables matemáticamente mediante la transformada de Fourier (Marshall y Verdun, 1990 cap. 1). Esta transformación se utiliza en RMN para obtener el espectro de resonancia a partir del decaimiento medido experimentalmente. Como veremos más adelante esta transformación permite intercambiar también la respuesta de un sistema respecto a la distancia (interferograma) y la respuesta de un sistema respecto al número de onda de la radiación (espectro), lo cual es aprovechado en espectroscopia IR (Marshall y Verdun, 1990 cap. 9; Griffiths y Haseth, 1986 cap. 1).

Es interesante retener las dos formas de obtener la información del sistema. De esta manera podemos entender con mayor facilidad cómo diferentes procesos que afectan el decaimiento de la señal determinan la forma de las bandas en un espectro. Además, en el dominio del tiempo (y la distancia) el decaimiento aparece separado de los otros términos, y por lo tanto puede ser tratado matemáticamente con facilidad, permitiendo la manipulación de la forma y anchura de las bandas en un espectro, tal como veremos más adelante.

Para más información sobre la transformada de Fourier y su aplicación en espectroscopia: Marshall y Verdun (1990), Griffiths y Haseth (1986), Williams (1995), Bates (1976) y Becker y Farrar (1972).

### *2.1.1.2. Osciladores múltiples equivalentes: forma de las bandas*

Consideremos la existencia de varios osciladores equivalentes e independientes. Consideremos también que no somos capaces de observar una oscilación individual sino el conjunto de osciladores. En el caso de que no observemos oscilación, puede deberse a dos causas: los cuerpos no oscilan; o oscilan incoherentemente (cuando en una molécula los átomos se acercan en otra se alejan) con lo que la variación de momento dipolar neta es nula. Por lo tanto, tras un pulso la señal se relajará, pero esta relajación se podrá deber tanto a una disminución de la amplitud de oscilación (interacción inelástica con el medio o fricción, también conocida como relajación  $T_1$ ) como por una pérdida de coherencia de los osciladores (Owrutsky et al., 1994). A su vez, esta pérdida de coherencia puede deberse a dos causas: un desfase propiamente dicho (por interacciones elásticas con el medio, también conocida como relajación  $T_2$ ), o una alteración de la frecuencia de vibración por una inhomogeneidad en el medio (Bernath, 1995 cap. 1; Oxtoby, 1981). En este caso, los diferentes cuerpos o moléculas oscilan a una frecuencia ligeramente diferente, generando un desfase con el tiempo. Hemos visto que el relajamiento de la señal determina la forma y anchura de la banda en el dominio de las frecuencias, por lo tanto la forma de la banda de una vibración vendrá controlada por estos tres mecanismos. Los procesos homogéneos ( $T_1$  y  $T_2$ ) actúan disminuyendo la señal del decaimiento suavemente hasta cero, por lo tanto en el dominio de las frecuencias generan bandas simétricas, unimodales y de contornos suaves. Para la relajación  $T_1$  pura se obtendría una Lorentziana, y para la relajación  $T_2$  pura, bandas que pueden variar desde una secante hiperbólica (semejante a una Lorentziana) a una Gausiana, siendo habitualmente aproximada a una banda Voigtiana (Oxtoby, 1981). Los procesos inhomogéneos actúan en el dominio de las frecuencias, siendo

una distribución de la frecuencia de los osciladores o una suma de bandas. Esta distribución puede ser asimétrica, contener varios máximos o presentar una forma irregular semejante a los histogramas obtenidos en estudios estadísticos. A falta de mejores suposiciones esta distribución se aproxima a una Gausiana (Oxtoby, 1981).

Cuando se consideran los tres procesos en su conjunto la forma y anchura de la banda es la convolución de las bandas que se obtendrían si los procesos actuaran aisladamente. Por lo tanto pueden aproximarse a bandas Voigtianas (convolución de una banda Lorentziana y una Gausiana).

Para más información sobre la forma de las bandas en espectroscopia y su relación con procesos homogéneos e inhomogéneos ver Owrutsky et al. (1994), Oxtoby (1981) y Mylers (1998).

### 2.1.2. Los modos normales de vibración

El análisis arriba mencionado sólo es directamente aplicable a moléculas diatómicas. Esto se debe a que, en casos más complejos, la fuerza de recuperación no depende tan sólo de la variación de una coordenada interna del sistema (distancias y ángulos entre átomos), sino que la elasticidad de un enlace ( $k$ ) depende de la vibración de enlaces vecinos. Esto es, los osciladores se acoplan a través de los enlaces. La solución es calcular los llamados modos normales de vibración, que son combinaciones lineales de coordenadas internas, con la propiedad que en estas nuevas coordenadas las oscilaciones son totalmente independientes en su vibración (Nakamoto, 1997 cap. 1; Krimm y Bandekar, 1986). Ahora las frecuencias de resonancia dependerán de una combinación de constantes elásticas y masas puestas en movimiento de los enlaces y átomos implicados en un modo de vibración normal determinado. En el caso límite una vibración puede implicar la oscilación de todos los átomos. En la práctica, si una molécula contiene un grupo con una frecuencia natural\* que es muy diferente de la de grupos o enlaces adyacentes, entonces, la oscilación de los grupos adyacentes no afectará a sus propiedades elásticas, y habrá un modo normal de vibración (o varios) principalmente localizado en este grupo (Nakamoto, 1997 cap. 1). En las moléculas orgánicas y biológicas, donde el esqueleto es alifático, los llamados grupos funcionales suelen tener una o varias vibraciones altamente localizadas. Esto permite la rápida identificación de grupos funcionales de una molécula, y que cambios de frecuencia sean más fácilmente correlacionables con un cambio en la constante de fuerza de los enlaces del grupo funcional. Los modos de vibración más localizados implican un menor desplazamiento de masa, y suelen tener una frecuencia entre  $4000-1000\text{ cm}^{-1}$ , que pertenece a la zona del infrarrojo medio.

En proteínas, el grupo funcional más abundante es el grupo amida, el cual forma el enlace peptídico. Más adelante veremos qué modos normales de vibración aparecen localizados en dicho grupo y la sensibilidad que muestran respecto a la estructura de la proteína.

---

\* La frecuencia natural de un grupo es la frecuencia que muestra cuando está aislado.

### 2.1.2. Acoplamiento dipolar

Un enlace, si es un dipolo, al vibrar genera un campo electromagnético. Este campo electromagnético puede afectar a la vibración de un enlace vecino. Éste a su vez, también generará un campo electromagnético, que podrá afectar al primer enlace. Si esto se produce estamos ante el acoplamiento dipolar de dos vibraciones. Para que el acoplamiento dipolar se dé, es necesario que dos osciladores estén próximos en el espacio, que su frecuencia natural de oscilación sea semejante, y que sus momentos dipolares de transición mantengan cierta orientación y que ésta sea adecuada (Krimm y Bandekar, 1986).

El acoplamiento dipolar puede darse también entre varios osciladores. En el caso hipotético que el acoplamiento entre dos osciladores sea detectado y cuantificado, al depender de la orientación entre ambos, es posible obtener información geométrica (Krimm y Bandekar, 1986). Si este acoplamiento se da entre gran parte de los osciladores se podrán obtener suficientes relaciones geométricas para reconstruir una estructura tridimensional. Este podría ser el caso para las proteínas, pues éstas muestran grupos amida contiguos (con modos de vibración localizados) que se acoplarán entre sí, con lo cual, al obtener una relación geométrica entre los diferentes enlaces peptídicos, podríamos conocer la estructura del esqueleto peptídico. Desgraciadamente para detectar y cuantificar acoplamientos dipolares se requieren experimentos de varios pulsos, que permiten obtener espectros multidimensionales en los que aparecen dichos acoplamientos fuera de la diagonal. Se han realizado ciertos avances, pero aún está lejos el día que permitan la obtención de estructuras tridimensionales (Golonzka et al., 2001; Hamm et al., 1999; Hamm et al., 2000; Asplund et al., 2000).

De todas maneras, como el acoplamiento dipolar afecta a la frecuencia de una vibración, su efecto es detectable en un espectro tradicional, aunque de manera incompleta. Las estructuras secundarias de las proteínas, como muestran cierto patrón de relaciones geométricas de los enlaces peptídicos, mostrarán un acoplamiento bastante característico (Krimm y Bandekar, 1986). Este hecho convierte la frecuencia de vibración de las vibraciones localizadas del grupo amida en sensibles a la estructura secundaria. Esta sensibilidad existiría sin el acoplamiento dipolar, pues cada estructura secundaria puede mostrar diferentes constantes de fuerzas para los enlaces del grupo amida o diferentes ángulos, cuya variación también cambia la frecuencia de vibración. Esta sensibilidad, sin embargo, se ve incrementada por el acoplamiento dipolar.

## **2.2. Espectros de infrarrojo de proteínas**

Hemos visto que el concepto de grupo funcional permite el estudio de moléculas por infrarrojo, al simplificar la asignación de bandas y la interpretación de sus cambios. En las proteínas se pueden encontrar numerosos grupos funcionales. Entre ellos el más característico y numeroso es el grupo amida, el grupo que forma el enlace peptídico.

### 2.2.1. Modos de vibración del grupo amida

Como grupo funcional se espera que sus vibraciones como grupo se trasladen de molécula a molécula sin apenas alteración. Así, la molécula más simple conteniendo el grupo funcional, la N-Metil-acetamina, se ha utilizado para caracterizar los modos de vibración del grupo amida (Krimm y Bandekar, 1986). Estos son: la vibración amida I, II, III, IV, V, VI y VII, el estiramiento NH, NC, CN y CC, y la deformación CCN y CNC.

#### 2.2.1.1. Vibración N-H (amida A)

Está totalmente localizada, por lo que en principio es una vibración rica en información, pues los cambios que afecten a la fuerza del enlace serán fácilmente detectable e interpretables. Su vibración aparece sobre los  $3250\text{ cm}^{-1}$ . En la práctica existen dos problemas para extraer su información. El primero es que esta vibración ve afectada su frecuencia como consecuencia de la resonancia de Fermi con el sobretono de la vibración amida II o con la combinación de amida I y II (llamado amida B). Esto hace que su frecuencia dependa de la resonancia, y que ésta se deba cuantificar para obtener la frecuencia de la amida A no perturbada (Krimm y Bandekar, 1986). El segundo problema, es en que en espectros obtenidos en disolución el  $\text{H}_2\text{O}$  tiene una fuerte absorción desde  $3100\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$ , requiriéndose pasos ópticos menores de  $3\text{ }\mu\text{m}$  para poder restar su contribución (Venyaminov y Prendergast, 1997). En la práctica, estos pasos ópticos tan pequeños son fácilmente accesibles por técnicas de reflexión la reflexión total atenuada (RTA).

#### 2.2.1.2. Vibración amida I

Aparece alrededor de  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Principalmente es una vibración del enlace C=O (estiramiento), pero también de otros enlaces. Así, será sensible a procesos que afecten a la fuerza del enlace C=O, como la formación de puentes de hidrógeno del oxígeno con el N-H de un grupo amida, o con el agua (Krimm y Bandekar, 1986). También pueden afectar cambios en la estructura del enlace peptídico (como la pérdida de su planalidad) (Jackson y Mantsh, 1991). Además, el acoplamiento dipolar entre las vibraciones amida I de grupos contiguos hace que la frecuencia amida I de un enlace peptídico sea directamente sensible a la conformación que adopta, y por lo tanto a la estructura secundaria en la que se halla (Krimm y Bandekar, 1986).

Tanto estudios experimentales como teóricos de polipéptidos modelos de estructura conocida, han mostrado que esta vibración es sensible a la conformación secundaria, e insensible a la primaria (esta vibración no se acopla a vibraciones de las cadenas laterales de los aminoácidos) (Krimm y Bandekar, 1986). El cambio de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente induce el cambio del N-H del grupo amida a N-D. Debido al cambio de puentes de hidrógeno a puentes de deuterio, la frecuencia de vibración del C=O disminuye. La causa es que la sustitución de hidrógenos por deuterios hace aumentar las masas desplazadas en las oscilaciones. Cuando la deuteración es completa, tanto cálculos teóricos como observaciones experimentales señalan una disminución de  $5\text{-}15\text{ cm}^{-1}$  de la frecuencia de oscilación de la

amida I, que pasa a llamarse amida I' (Krimm y Bandekar, 1986). Cuando la deuteración no es completa, la amida I y la amida I' se solapan. A esta banda resultante le llamaremos amida I-I'.

Como dificultades experimentales para obtener su espectro se encuentran, principalmente, la absorbancia del agua (H<sub>2</sub>O) en esta zona, que obliga, en disolución, al uso de pasos ópticos de 10 μm o menores, que aunque pequeños no presentan dificultades de obtención. Cuando los experimentos se realizan en D<sub>2</sub>O se ha de tener en cuenta que se habrá producido la sustitución de los hidrógenos amida por deuterios, y que esta sustitución será normalmente parcial. Por ello, en general la amida I' resultante tendrá una complejidad mayor que la amida I obtenida en H<sub>2</sub>O (será amida I' más amida I), dificultando su análisis.

### *2.2.1.3. Vibración amida II*

Vibración más deslocalizada que la amida I, de tal forma que varias oscilaciones contribuyen a su frecuencia. Entre ellas destacan la oscilación del ángulo del N-H y de la distancia C-N. Su frecuencia aparece sobre 1550 cm<sup>-1</sup>. Esta vibración también ha mostrado ser sensible a la conformación secundaria e independiente de la primaria.

La deuteración provoca una reorganización de los modos normales de vibración, desapareciendo la amida II, y apareciendo la amida II' (1480 cm<sup>-1</sup>), que es principalmente una oscilación del enlace C-N. Al desaparecer la amida II al ser deuterada, el seguimiento del área en función del tiempo de exposición a D<sub>2</sub>O permitirá seguir el intercambio de los hidrógenos amida por deuterios.

Las dificultades de su estudio son principalmente la absorción, cuando está presente, de la vibración del anillo de la tirosina, que da una banda comparativamente estrecha que dificulta la aplicación de técnicas de estrechamiento de bandas, utilizadas frecuentemente para la cuantificación de estructuras secundarias. También su menor estudio en la literatura dificulta la asignación de sus bandas. Cuando el estudio se realiza en presencia de D<sub>2</sub>O, la amida II' obtenida puede solaparse con las vibraciones de lípidos. La amida II remanente nos dará información sobre la estructura de los segmentos de la proteína resistentes al intercambio protón / deuterón.

### *2.2.1.4. Otras vibraciones amida*

El resto de las vibraciones normales características del grupo amida han sido en algún caso estudiadas para obtener información sobre la proteína (Krimm y Bandekar, 1986; Fu et al., 1994), pero presentan unas características que dificultan mucho su estudio y su interpretación, como el hecho que muchas de estas vibraciones están menos localizadas y se muestran sensibles a la estructura primaria. También aparecen a número de onda menores, en zonas donde el solapamiento con las absorciones de otras vibraciones es mucho mayor.

### 2.2.2. Correlación frecuencia-estructura en la amida I

Las frecuencias amida del enlace peptídico son sensibles a su conformación y por lo tanto a la estructura en la que se encuentra. Esta correlación frecuencia-estructura se utiliza en la amida I para obtener información estructural de proteínas, principalmente una estimación de los porcentajes de estructura secundaria.

En la tabla 2.1 y 2.2 se muestran unos rangos de número de onda. Estos rangos son los propuestos y/o utilizados por diversos autores para asignar las bandas que se resuelven en la amida I a ciertas estructuras secundarias de proteínas, de acuerdo con el número de onda al que aparecen. Mostramos dos condiciones de trabajo diferentes: en la tabla 2.1 se dan las asignaciones cuando el disolvente utilizado es H<sub>2</sub>O (amida I), y en la tabla 2.2 cuando es D<sub>2</sub>O (amida I-I'). Con estos rangos, una vez localizada la posición de una banda en la amida I, se puede realizar una asignación estructural y finalmente obtener una estimación de

referencia	hélices		láminas beta		giros	estructuras
	alfa	3 <sub>10</sub>	paralelas	antiparalelas	reversos	desordenadas
(A)	1655-1648		≈1630 ≈1645↓	1636-1630 1693-1690↓		1660-1656
(B)	1660-1648	1670-1660		1640-1625 1695-1675↓	1685-1660	1660-1652
(C)	1658-1654			1643-1623	1690-1665	1651-1640
(D)	1660-1650			1638-1624	1695-1670	1648-1642
(E)	1657-1650		1640-1626	1640-1612 1690-1670↓	1675-1655 1696-1680	1651-1640

**Tabla 2.1.** Rangos de número de onda (en cm<sup>-1</sup>) para la amida I (en H<sub>2</sub>O) y su asignación a estructuras secundarias. (A) Arrondo et al. (1993), (B) Tamm y Tatulian (1997), (C) Dong et al. (1990), (D) Kumosinski y Unruh (1996) y (E) Pelton y McLean (2000). Con el símbolo ↓ indicamos bandas de menor intensidad.

la estructura secundaria de una proteína. Se observa que no todos los autores coinciden a la hora de definir el intervalo de aparición de una estructura, y cuando lo hacen, estos intervalos no son exactamente iguales. Estas discrepancias ilustran la dificultad que puede existir, en algunos casos, a la hora de asignar una banda a una estructura concreta.

referencia	hélices		láminas beta		giros	estructuras
	alfa	3 <sub>10</sub>	paralelas	antiparalelas	reversos	desordenadas
(A)	1655-1650		1640-1630 1690-1680↓		1680-1670	≈1644
(B)	1655-1648		≈1632 ≈1648↓	1638-1628 1678-1672↓		≈1643
(C)	1662-1645		1637-1613 1689-1682↓		1682-1663	1645-1637
(D)	1657-1651		1640-1620 1679-1671↓		1671-1659 1696-1681	1647-1641
(E)	1655-1648	1668-1658	1640-1630 1685-1675↓			1645-1640

**Tabla 2.2.** Rangos de número de onda de la amida I-I' (en D<sub>2</sub>O) y su asignación a estructuras secundarias. (A) Jackson et al. (1989), (B) Arrondo et al. (1993), (C) Goormaghtigh et al. (1990), (D) Byler y Susi (1986) y (E) Jackson y Mantsch (1992). Con el símbolo ↓ indicamos bandas de menor intensidad.

### 2.2.3. Definición de las estructural secundarias de las proteínas

Las dificultades para correlacionar la estructura secundaria de una proteína con su espectro no son únicas para IR, y está compartida con otras espectroscopias de baja resolución, como el dicroísmo circular (DC). Estas dificultades existen también a la hora de identificar una estructura secundaria a través de su estructura tridimensional obtenida mediante difracción de rayos X. Así, para una misma estructura tridimensional de una proteína, las estructuras secundarias identificadas varían de manera importante según el cristalógrafo (Levitt y Greer, 1977). Estas discrepancias se deben a que la identificación de las estructuras secundarias de la estructura cristalográfica de una proteína es un proceso con cierto grado de arbitrariedad.

Para aumentar el grado de objetividad, se han desarrollado métodos de determinación automática de los porcentajes de estructura secundaria de proteínas a partir de la estructura tridimensional. El más popular es el método de Levitt y Greer (1977), seguido del de Kabsch y Sander (1983). A pesar de todo, el error realizado en la estimación de la estructura secundaria de una proteína por IR o DC es del orden de la discrepancia entre los porcentajes obtenidos a partir de una estructura cristalográfica utilizando ambos métodos. Por ejemplo, Hering et al. (2002) comparan los porcentajes de estructura secundaria determinados por el método de Levitt y Greer y el de Kabsch y Sander para 18 proteínas. La discrepancia media para los porcentajes de estructuras hélices es del 3% (con un máximo del 15%), y para las láminas beta del 10% (con un máximo del 19%)

Además, para un mismo método, los porcentajes de estructuras secundarias determinados varían entre la estructura tridimensional refinada y la que no lo está, entre estructuras tridimensionales de fuentes diferentes y entre diferentes usuarios que utilizan el método (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983; Goormaghtigh et al., 1994b).

En los siguientes puntos presentaremos varias características que definen a diversos tipos de estructuras secundarias. Formalmente, las estructuras secundarias están determinadas por los ángulos diédricos  $\phi$  y  $\varphi$ , los cuales determinan la conformación del enlace peptídico. Para valores de  $\phi$  y  $\varphi$  repetitivos entre enlaces peptídicos contiguos, o con una secuencia característica, se dan las estructuras secundarias. Veremos que esta definición formal presenta dificultades para identificar una estructura secundaria de una proteína, y en la práctica los patrones de formación de puentes de hidrógenos, y otros parámetros geométricos diferentes de  $\phi$  y  $\varphi$ , juegan un papel importante en la identificación de una estructura secundaria.

### 2.2.3.1. Hélices alfa

Se caracterizan por unos ángulos diédricos para el enlace peptídico de  $\phi \approx -60^\circ$  y de  $\varphi \approx -45^\circ$ , pero estos valores pueden variar sustancialmente y, aún así, la apariencia de la estructura resultante continua siendo la de una hélice alfa (Pelton y McLean, 2000; Krimm y Bandekar, 1986). Además, no todas las estructuras cristalográficas presentan todas las coordenadas atómicas del enlace peptídico (necesarias para determinar los valores de  $\phi$  y  $\varphi$ ). Por estas causas, dichos ángulos son parámetros poco útiles para caracterizar a esta estructura (Levitt y Greer, 1977).

Una de las características más definitoria de una hélice alfa es la presencia de un puente de hidrógeno entre el N-H del enlace peptídico  $i$  y el C=O del enlace peptídico  $i + 4$  ( $i \rightarrow i+4$ ). Para una hélice alfa estándar este puente de hidrógeno tiene una longitud (H $\cdots$ O) de  $\approx 0,19$  nm y un ángulo (N-H con C=O) de  $\approx 10^\circ$  (Krimm y Bandekar, 1986). Cuando más de 4-5 enlaces peptídicos consecutivos muestran este patrón de puentes de hidrógeno se considera que estamos ante una hélice alfa (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983).

En algunos casos la irregularidad de la hélice impide la formación de algún puente de hidrógeno para algún enlace peptídico, y en otros casos se dan puentes de hidrógeno dobles:  $i \rightarrow i+3$  o  $i \rightarrow i+5$  además del  $i \rightarrow i+4$ . Además, el método de Levitt y Greer, al utilizar sólo las coordenadas de los carbonos que forman la cadena peptídica, ha de deducir la posición y la orientación del N-H y C=O. Como consecuencia, la identificación de puentes de hidrógeno no es tan segura como en el método de Kabsch y Sander. Por ello, en el método Levitt y Greer la identificación de una hélice alfa también se basa en la curvatura de la cadena peptídica. Esta curvatura se mide mediante el ángulo de torsión de los átomos C $^\alpha$  (Levitt y Greer, 1977), que para una hélice muestra un rango característico.

Una de las diferencias importantes entre los métodos de Kabsch y Sander y de Levitt y Greer, es que este último tiene muchos problemas para diferenciar una hélice  $3_{10}$  de una hélice alfa distorsionada, tal como los mismo autores reconocen (Levitt y Greer, 1977).

### 2.2.3.2. Hélices $3_{10}$

Se caracterizan por unos ángulos diédricos del enlace peptídico de  $\phi \approx -60^\circ$  y de  $\psi \approx -30^\circ$ , aunque como pasa con las hélices alfa, estos ángulos pueden variar en la práctica. Se caracteriza por la presencia de puentes de hidrógeno  $i \rightarrow i+3$ . Para una hélice  $3_{10}$  estándar este puente de hidrógeno tiene una longitud (H $\cdots$ O) de  $\approx 0,18$  nm y un ángulo (N-H con C=O) de  $\approx 3^\circ$  (Krimm y Bandekar, 1986). Este puente de hidrógeno es por lo tanto más fuerte que el de una hélice alfa estándar.

El método de determinación de estructuras secundarias de Levitt y Greer (1977) confunde las hélices  $3_{10}$ , y la determina como hélices alfa. Quizá por ello, se han considerado durante mucho tiempo un tipo de estructura prácticamente ausente en proteínas, cuando en realidad, su frecuencia de aparición en proteínas es mayor de lo esperado. Se han encontrado bastantes segmentos de hélices  $3_{10}$  en estructuras identificadas tradicionalmente como hélices alfa (Kabsch y Sander, 1983; Toniolo y Benedetti, 1991). Como media, el 3-4% de las estructuras determinadas como hélices alfa son en realidad hélices  $3_{10}$  (Toniolo y Benedetti, 1991).

Habitualmente, las hélices  $3_{10}$  encontradas en proteínas son de una longitud media de 3-4 aminoácidos y suelen darse en los extremos de las hélices alfa (Kabsch y Sander, 1983; Toniolo y Benedetti, 1991). Aunque también se han encontrado, en proteínas, hélices  $3_{10}$  con longitudes de 7-12 aminoácidos (Toniolo y Benedetti, 1991).

### 2.2.3.3. Láminas beta

Cuando enlaces peptídicos repetitivos muestran unos ángulos diédricos de  $\phi \approx -130^\circ$  y de  $\psi \approx 120^\circ$  estamos ante una cadena extendida. Cuando dos o más cadenas extendidas forman puentes de hidrógeno entre ellas, ésta estructura se estabiliza, y da lugar a las llamadas láminas beta. Según el sentido relativo de las cadenas que forman la lámina beta, estaremos ante láminas beta paralelas o antiparalelas.

Formalmente, existen dos tipos de láminas beta paralelas y antiparalelas: las planas y las onduladas (Bandekar y Krimm, 1988). El puente de hidrógeno entre el N-H y el C=O de cadenas adyacentes tiene una longitud (H $\cdots$ O) de  $\approx 0,17-0,18$  nm y un ángulo (N-H con C=O) de  $\approx 5-10^\circ$ , excepto para láminas beta antiparalelas onduladas, en los que ambos valores son mayores (Bandekar y Krimm, 1988).

En la práctica, en la determinación de estructuras de láminas beta sólo se diferencian las láminas beta paralelas y las antiparalelas. El criterio principal para detectar láminas beta es el patrón de puentes de hidrógeno que lo caracteriza. Si se detecta un puente de hidrógeno entre enlaces peptídicos a cinco o más aminoácidos de distancia, se considera la presencia de un puente. Varios puentes adyacentes (entre 1 y 5, según el criterio) forman una escalera y una o más escaleras conectadas por aminoácidos comunes forman una lámina beta (Kabsch y Sander, 1983). Es decir, si se detectan puentes de hidrógeno con el patrón

$i + k \rightarrow j + k$  para  $|i - j| > 4$ , donde  $k = 1, 2, \dots, n$ , los aminoácidos desde  $i$  a  $i + n$  y desde  $j$  a  $j + n$  están implicados en láminas beta paralelas. Si el patrón es  $i + k \rightarrow j - k$  se determinan láminas beta antiparalelas (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983).

Otra característica de las láminas beta, es que sus cadenas muestran cierta distancia particular entre ellas, y que se mantienen a lo largo de la estructura. En algunos casos, la distancia entre los átomos  $C^\alpha$  entre los aminoácidos de cadenas adyacentes se utiliza para definir y refinar estructuras reconocidas como láminas beta (Levitt y Greer, 1977).

Cabe comentar que, algunas veces, una cadena extendida no interacciona con otras para formar una lámina beta. En este caso, se suelen detectar puentes de hidrógeno entre  $i \rightarrow i + 2$  (Kabsch y Sander, 1983). Estos puentes de hidrógeno son débiles, pues la orientación entre el N-H y el C=O no es la adecuada. A este tipo de estructura extendida se la conocen como conformación  $C_7$  (Kabsch y Sander, 1983).

Finalmente, cuando nos encontramos ante valores de  $\phi \approx -180^\circ$  y de  $\varphi \approx 180^\circ$  estamos ante una cadena totalmente extendida. Este tipo de cadena extendida podrá interaccionar con otras cadenas totalmente extendidas para dar láminas beta. Sin embargo, por razones estéricas el alineamiento entre ambas será posible sólo si ambas pertenecen a diferentes proteínas, dando lugar a cadenas agregadas intermoleculares (Jackson y Mantsch, 1991).

#### 2.2.3.4. Giros reversos

Los giros reversos son estructuras que implican a cuatro aminoácidos (giros  $\beta$ ) o a tres aminoácidos (giros  $\gamma$ ) que forman puentes de hidrógeno entre ellos, y se caracterizan por producir un cambio en la dirección de la cadena peptídica de  $\approx 180^\circ$  (Krimm y Bandekar, 1986).

Los giros  $\beta$  son los más abundantes, y se caracterizan por mostrar puentes de hidrógeno  $i \rightarrow i + 3$ . Sobre la base de criterios estereoquímicos se han propuesto tres tipos de giros  $\beta$ : I, II y III. En proteínas, además de estos giros, se han observado cuatro tipos más. Los valores de los ángulos  $\phi$  y  $\varphi$  de los enlaces peptídicos de los aminoácidos 2 y 3 del giro, son característicos para los diferentes tipos de giros, aunque en proteínas estos valores muestran una importante variabilidad. Por su parte, los giros  $\gamma$  se caracterizan por mostrar puentes de hidrógeno  $i \rightarrow i + 2$  (Krimm y Bandekar, 1986).

En la práctica, los giros reversos se identifican en una estructura tridimensional por su patrón de enlaces de hidrógeno y por el cambio de dirección que producen a la cadena peptídica. Así, cuando se detectan puentes de hidrógeno  $i \rightarrow i + 3$  o  $i \rightarrow i + 2$  para un número de aminoácidos contiguos inferior a 3-4 se determinan giros reversos (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983). También se considera la presencia de un giro sobre la base de la curvatura de la cadena peptídica. La identificación de un giro se puede realizar por la presencia de dos enlaces peptídicos consecutivos que muestran una curvatura adecuada (Levitt y Greer, 1977). Cuando la curvatura se da sin el patrón de puentes de hidrógeno se habla

de una vuelta o un ángulo (Kabsch y Sander, 1983), pero esta estructura pertenecerá a lo que consideramos estructuras irregulares.

### 2.2.3.5. Estructuras desordenadas

Las estructuras desordenadas (o sin orden, o no ordenadas) suelen definirse como las estructuras que no son ni hélices, ni láminas beta ni giros reversos. Es decir, estructuras que no tienen un patrón estructural identificable. Hélices cortas, o con ciertas irregularidades en el patrón de puentes de hidrógeno, así como láminas beta cortas, se han asignado a este tipo de estructuras, antes del desarrollo de los métodos automáticos de extracción de estructuras secundarias a partir de estructuras tridimensionales.

Dentro de las estructuras desordenadas es importante diferenciar dos grupos. El primer grupo lo identificaremos como estructuras al azar, y el segundo como estructuras irregulares.

En las estructuras al azar los valores  $\phi$  y  $\psi$  de un enlace peptídico no son constantes con el tiempo. Es decir, la conformación del enlace peptídico es altamente dinámica. Las estructuras cristalográficas no suelen mostrar coordenadas para estas estructuras, pues su densidad electrónica será muy baja (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983). Esta situación se da en bastantes estructuras cristalográficas de proteínas, aunque representando un porcentaje pequeño respecto al total de aminoácidos. Por lo tanto las estructuras al azar son poco abundantes, al menos en cristales de proteínas.

En las estructuras irregulares los valores  $\phi$  y  $\psi$  de un enlace peptídico son constantes con el tiempo, pero no son repetitivos entre enlaces adyacentes. A estas estructuras corresponden todos los aminoácidos que, mostrando coordenadas cristalográficas, no cumplen las condiciones para ser considerados parte de una hélice, una lámina beta o un giro. Este tipo de estructuras se dará conectando estructuras secundarias, pues la transición entre dos estructuras secundarias necesitará de habitualmente algún segmento de estructura irregular.

### 2.2.4. Vibraciones de las cadenas laterales de los aminoácidos

El conocimiento de las absorciones de las cadenas laterales de los aminoácidos tiene dos puntos de interés: Por una parte conocer sus interferencias en el estudio de la amida I y II, y por otra parte, porque algunas de las cadenas laterales de los aminoácidos también pueden ser estudiadas por IR. Estos estudios presentan varias dificultades. Muchas de las vibraciones de sus grupos funcionales se superponen con otras bandas más intensas (como la amida I y II), lo cual limita su estudio en muchos casos a espectros de diferencia. Quizá las bandas de cadenas laterales más estudiadas hayan sido la estrecha banda a  $1517\text{ cm}^{-1}$  de la tirosina, y grupos carboxílicos protonados (Glu, Asp) sobre  $1750\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$  (Barth, 2000a).

Para el estudio de la amida I y II, la absorción de los aminoácidos puede representar un problema. En la literatura se han tabulado las absorciones de aminoácidos en el intervalo  $1750\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  tanto en  $\text{H}_2\text{O}$  como en  $\text{D}_2\text{O}$ , y en diferentes estados de protonación (Chirgadze et al., 1975; Venyaminov y Kalnin, 1990; Rahmelow et al., 1998), y en algunos casos puede resultar conveniente restar un espectro sintético de estas absorciones previo estudio de la amida I y II.



### 3. Desconvolución y estrechamiento de bandas

Teniendo en cuenta que la estructura de un polipéptido o proteína viene determinada principalmente por la conformación sucesiva del enlace peptídico y de la red de puentes de hidrógeno que se forman entre el C=O y el N-H de diferentes enlaces peptídicos, es lógico esperar que las vibraciones altamente localizadas en el enlace peptídico serán sensibles a la estructura de la proteína (estructura secundaria y terciaria), como la amida I.

Aunque las frecuencias de vibración dependen de la estructura y fuerzas de los enlaces, invertir completamente el proceso (obtener la estructura a partir de las frecuencias de vibración y fuerza elásticas de los enlaces) es altamente complejo sino imposible. Es posible, sin embargo, obtener cierta información estructural.

Consideremos un polipéptido con una estructura pura y repetitiva. En la zona de la amida I aparecerán tantas bandas como amino ácidos componen la unidad repetitiva (no todas serán necesariamente activas por IR). Estas bandas aparecerán más separadas de lo esperado a causa del acoplamiento dipolar entre los aminoácidos que componen la unidad repetitiva. Se ha de tener en cuenta que estas bandas mostrarán una anchura debido a los procesos de relajamiento  $T_1$  y  $T_2$ . Pequeñas heterogeneidades en la estructura harán que ésta no sea estrictamente repetitiva, causando un ensanchamiento inhomogéneo de las bandas. De esta manera los espectros de polipéptidos de estructura pura o casi pura muestran bandas anchas que ocultan la estructura fina del espectro.

En proteínas, donde siempre hay presente más de una estructura pura, el número de bandas se incrementará. Como primera aproximación, se puede considerar que sólo las estructuras similares darán bandas en posiciones similares en la amida I. La heterogeneidad estructural generará una heterogeneidad espectral, que aunque puede abarcar decenas de  $\text{cm}^{-1}$  será sólo evidente como una asimetría en la amida I, a causa de la anchura de las bandas en la amida I y del número de estructuras presentes en las proteínas.

#### 3.1. Necesidad de desconvolar y estrechar bandas

Si las bandas de la amida I fueran extremadamente estrechas, obtendríamos una serie de bandas que podríamos relacionar (no sin dificultad) con diferentes motivos estructurales. Es por ello que alrededor de la espectroscopia de infrarrojo se han desarrollado una serie de métodos matemáticos cuyo objetivo es eliminar, o al menos reducir, todo ensanchamiento de las bandas que no se deba a la heterogeneidad estructural. Es decir, se pretende eliminar matemáticamente los procesos  $T_1$  y  $T_2$ , así como el ensanchamiento inhomogéneo dentro de una estructura. Dicha situación se presenta en la figura 3.1A, donde se muestra un hipotético espectro de una proteína en ausencia de procesos de relajación, de inhomogeneidades en el medio y adquirido a una resolución instrumental infinita. Las inhomogeneidades del medio perturban la frecuencia de vibración, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 3.1B. La resolución instrumental limitada ensancha éstas vibraciones, así como también lo hacen los procesos

de relajación  $T_1$  y  $T_2$  (ver figuras 3.1C y 3.1D). Las figuras E-F muestran los intentos de revertir todos estos procesos, e intentar reconstruir el espectro de la figura 3.1A a partir del de la figura 3.1D. El éxito de esta reconstrucción será siempre parcial.

Consideremos un espectro de infrarrojo ideal, el cual consiste de una sola banda sin anchura centrada en  $\nu_0$ , con área  $A$ . Esta banda se verá afectada por un proceso de ensanchamiento instrumental  $R(\nu, x_f)$ ,\* y por procesos de ensanchamiento homogéneos e inhomogéneos caracterizados por una forma de banda Lorentziana  $L(\nu, \gamma_L)$  y Gaussiana  $G(\nu, \gamma_G)$ .† El espectro experimental,  $E(\nu)$ , puede expresarse matemáticamente como (Buslov y Nikonenko, 1997):

$$E(\nu) = A\delta(\nu - \nu_0) \otimes L(\nu, \gamma_L) \otimes G(\nu, \gamma_G) \otimes R(\nu, x_f) \quad (3.1)$$

donde  $\delta$  es la función delta de Dirac,  $\otimes$  representa convolución,  $\gamma_L$  es la anchura de la banda Lorentziana,  $\gamma_G$  es la anchura de la banda Gaussiana y  $1/x_f$  es la resolución instrumental. Si consideramos la presencia de  $n$  bandas, el espectro resultante se podrá expresar matemáticamente como:

$$E(\nu) = \sum_{i=1}^n (A^i \delta(\nu - \nu_0^i) \otimes L(\nu, \gamma_L^i) \otimes G(\nu, \gamma_G^i)) \otimes R(\nu, x_f) \quad (3.2)$$

donde se ha considerado que las diferentes bandas pueden mostrar diferentes ensanchamientos Lorentzianos y Gaussianos, pero siempre el mismo ensanchamiento instrumental.

Si se eliminaran todas las fuentes de ensanchamiento, obtendríamos bandas sin anchura (perfectamente estrechas, representadas por deltas de Dirac), con lo cual podríamos conocer la amplitud y frecuencia de todas las vibraciones de la amida I (como en la figura 3.1A). Es por ello que nuestro objetivo es invertir en la medida de la posible, las diferentes convoluciones de las ecuaciones 3.1 y 3.2. Es decir, que a partir del espectro  $E(\nu)$  podamos obtener los valores de  $A \delta(\nu - \nu_0)$  para todas las bandas.

En un sentido amplio la desconvolución es un problema de inversión (ver apéndice 1 y Buslov y Nikonenko (1997)). En efecto, los datos obtenidos en la medida de un espectro pueden simbolizarse por  $g(x)$ , y entonces se cumplirá:

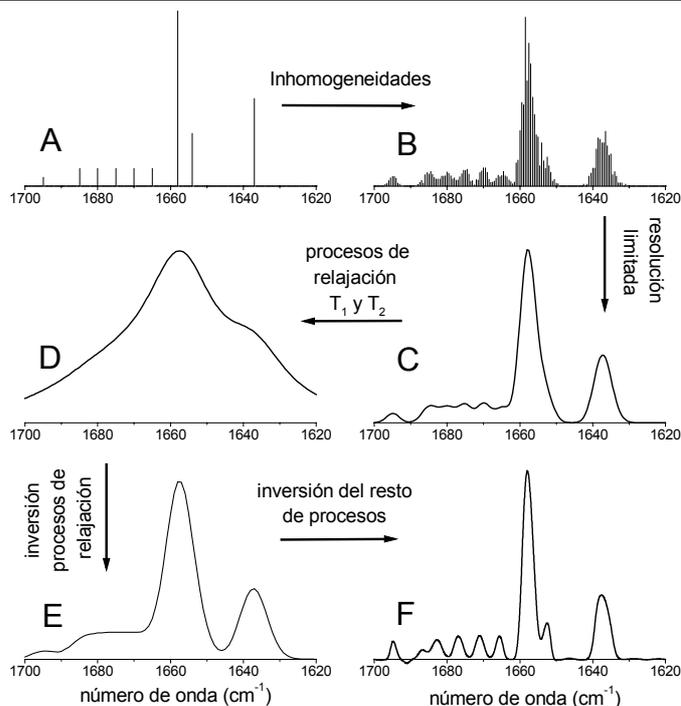
$$g(x) = K(x - y) \otimes f(y) + \varepsilon(x) \quad (3.3)$$

donde  $f(y)$  es el espectro en ausencia de ensanchamiento,  $\varepsilon(x)$  es el error cometido en la medida del espectro, y  $K(x - y)$  es el kernel implícito en el proceso de obtención del espectro. Es decir,  $K(x - y)$  tiene el significado de convolución del valor real de cada punto del espectro con una función de dispersión o desenfoque. Puesto que los datos experimentales  $g(x)$  contienen ruido (errores) la solución de la ecuación 3.3 magnifica tan enormemente el ruido, que la solución obtenida carece de sentido. Otras veces el kernel

---

\* La distancia de interferencia se limita en un interferómetro hasta una distancia máxima de  $x_f$ . Como consecuencia la anchura mínima que mostrará una banda será de  $\approx 1/x_f$ , llamada resolución instrumental nominal (Griffiths y Haseth, 1986 cap.1).

† Estas dos bandas pueden englobarse en una banda Voigtiana de expresión  $V(\nu, \gamma_L, \gamma_G)$ .



**Figura 3.1.** Esquema de los diferentes procesos que afectan a la anchura de las bandas, y la posibilidad de revertirlos matemáticamente.

elimina información y la solución no está definida. En el proceso de inversión es necesario introducir algún criterio que permita controlar y reducir la magnificación del ruido a niveles asumibles. Otras veces es necesario estimar la solución, pues esta no está definida.

A continuación revisaremos varios métodos para desconvolutar (invertir la convolución). Estos métodos son la autodesconvolución en el espacio de Fourier, las desconvoluciones regularizadas y la desconvolución de Fourier combinada con la predicción lineal.

Existen otros métodos para

desconvolutar, como las desconvoluciones iterativas\* (Friesen y Michaelian, 1991; DeNoyer y Dodd, 1991; Jackson y Griffiths, 1991) y las que utilizan la transformada de ondas† (Shao et al., 2000; Shao et al., 2002). Además, existen otras estrategias para estrechar bandas no basadas en la desconvolución, como la derivación (Cameron y Moffatt, 1984; Moffatt y Mantsch, 1992), el incremento de la estructura fina (Barth, 2000b) y la inversión de la transformada de Laplace compleja (Sibisi, 1983).

### 3.2. Autodesconvolución en el espacio de Fourier

#### 3.2.1. Características generales

La desconvolución en el espacio de Fourier es un método de desconvolución combinado con una convolución, la cual estabiliza la solución y modifica la forma de las bandas desconvolutas (Kauppinen et al., 1981a; Marshall y Verdun, 1990). Es principalmente efectivo en el estrechamiento de bandas Lorentzianas, aunque es capaz de estrechar otros tipos de banda con menor efectividad (como Gaussianas o Voigtianas). Por otra parte en ningún caso es capaz de eliminar el ensanchamiento instrumental. De hecho en general lo aumenta (Kauppinen et al., 1981a).

\* A la desconvolución iterativa se le puede añadir ciertas restricciones, pasando a llamarse desconvolución de máxima probabilidad.

† *Wavelet transform* en inglés.

La desconvolución en el espacio de Fourier es especialmente efectiva en eliminar el ensanchamiento cuando todas las bandas del espectro son Lorentzianas con una misma anchura. En el caso de varias bandas Lorentzianas con diferentes anchuras este método pierde efectividad, pues los estrechamientos obtenidos son menores y/o se producen ciertas distorsiones en la forma de las bandas en el proceso. Esta dificultad para tratar con bandas de anchura diferente es común a todos los métodos de estrechamiento basados en la desconvolución, y posiblemente de todos los métodos de estrechamiento de bandas.

La aplicación de la desconvolución de Fourier a un espectro incrementa su ruido en la medida que estrecha sus bandas (Kauppinen et al. 1981c). La principal ventaja de la desconvolución de Fourier respecto otros métodos de desconvolución es su carácter lineal (Kauppinen et al., 1991a). Por ello las conclusiones derivadas de su aplicación a una sola banda pueden extenderse fácilmente a múltiples bandas y a la presencia de ruido (Kauppinen et al. 1981c).

### 3.2.2. Fundamentos teóricos de la autodesconvolución de Fourier

#### 3.2.2.1. La autodesconvolución

La desconvolución de Fourier se basa en el hecho que la convolución en el dominio de los números de onda es una multiplicación en el dominio de la distancia, y una desconvolución en el dominio de los números de onda corresponde, por lo tanto, a una división en el dominio de la distancia. La interconversión entre ambos dominios se realiza por la transformada de Fourier (directa,  $\mathfrak{F}$ , e inversa,  $\mathfrak{F}^{-1}$ ) (Marshall y Verdun, 1990 cap. 2). Así, una función  $E(v)$  puede expresarse en el dominio de las distancias como:  $E(x) = \mathfrak{F}^{-1}\{E(v)\}$ , donde  $x$  es distancia y  $v$  número de onda. Ahora podemos reexpresar la ecuación 3.1 en el dominio de las distancias como:

$$E(x) = \mathfrak{F}^{-1}\{E(v)\} = \mathfrak{F}^{-1}\{A\delta(v-v_0)\}\mathfrak{F}^{-1}\{V(v,\gamma_L,\gamma_G)\}\mathfrak{F}^{-1}\{R(v,x_f)\} = A \exp(i2\pi xv_0) \times V(x,\gamma_L,\gamma_G) \times R(x,x_f) \quad (3.4)$$

donde el ensanchamiento no instrumental viene expresado por una Voigtiana,  $V(v,\gamma_L,\gamma_G)$ . Por lo tanto la transformada de Fourier de una banda consta de un componente oscilatorio (la exponencial imaginaria), cuya amplitud decae de acuerdo con la forma y anchura de la banda, tal como se muestra en la figura 3.2. Cuanto más estrecha es una banda más lento es el decaimiento de su amplitud (observar la figura 3.2).

La desconvolución de la ecuación 3.1 para  $V(v,\gamma_L,\gamma_G)$  puede obtenerse dividiendo  $E(x)$  por  $V(x,\gamma_L,\gamma_G)$  y realizando su transformada de Fourier. De esta manera se obtiene el espectro autodesconvulado,  $E'(v)$ , donde la anchura y forma de banda está determinada sólo por la resolución instrumental (Kauppinen et al., 1981a):

$$E'(v) = \mathfrak{F}^{-1}\left\{\frac{E(x)}{V(x,\gamma_L,\gamma_G)}\right\} = A\delta(v-v_0) \otimes R(v,x_f) \quad (3.5)$$

Por lo tanto, la banda del espectro ve intacta su área y posición en la autodesconvolución, y alterada la anchura y su forma.

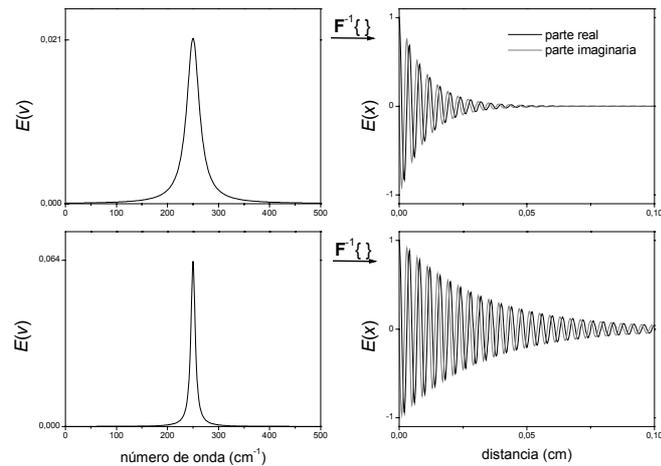
La solución de la ecuación 3.5 representa el estrechamiento máximo posible mediante la autodesconvolución de Fourier, donde la banda esta limitada sólo por la resolución instrumental. La anchura instrumental no es eliminable, al no poder dividirse  $E(x)$  por  $R(x, x_f)$ , pues tanto el valor de  $E(x)$  como el de  $R(x, x_f)$  es cero a distancias mayores de  $x_f$ , y su división está indeterminada.

### 3.2.2.2. El filtro

La solución de la ecuación 3.4 no es generalmente aceptable debido a dos causas. La principal razón se debe a que la función  $V(x, \gamma_L, \gamma_G)$  decrece rápidamente, pudiendo llegar a valores cercanos a cero para  $x = x_f$ , al ser una exponencial negativa de expresión (Saarinen et al., 1995):

$$V(x, \gamma_L, \gamma_G) = \exp\left(-\gamma_L \pi |x| - \left(\frac{\gamma_G \pi x}{2\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right) \quad (3.6)$$

Como cualquier espectro,  $E(\nu)$ , contiene ruido o errores,  $\varepsilon(\nu)$ , de desviación estándar  $\sigma_\nu$ . Por ello su transformada de Fourier,  $E(x)$  contendrá también ruido o errores,  $\varepsilon(x)$ , de desviación estándar  $\sigma_x$ . Al desconvular el espectro  $E(\nu)$ , dividimos  $E(x)$  por  $V(x, \gamma_L, \gamma_G)$ .  $\varepsilon(x)$  aumentará enormemente a valores altos de  $x$  debido a esta división por  $V(x, \gamma_L, \gamma_G)$ . Como consecuencia la desviación estándar del ruido en el espectro desconvulado se incrementará (Kauppinen et al., 1981c) (las expresiones para cuantificar dicho incremento se dan en el apéndice 4).



**Figura 3.2.** Las gráficas de la izquierda muestra dos bandas de diferentes anchura. A su derecha se muestran sus transformadas de Fourier, que se compone de oscilaciones con una amplitud que decae. Se observa que para la banda más estrecha, su trasformada de Fourier decae más lentamente. Este hecho es la base para estrechar bandas en el espacio de Fourier.

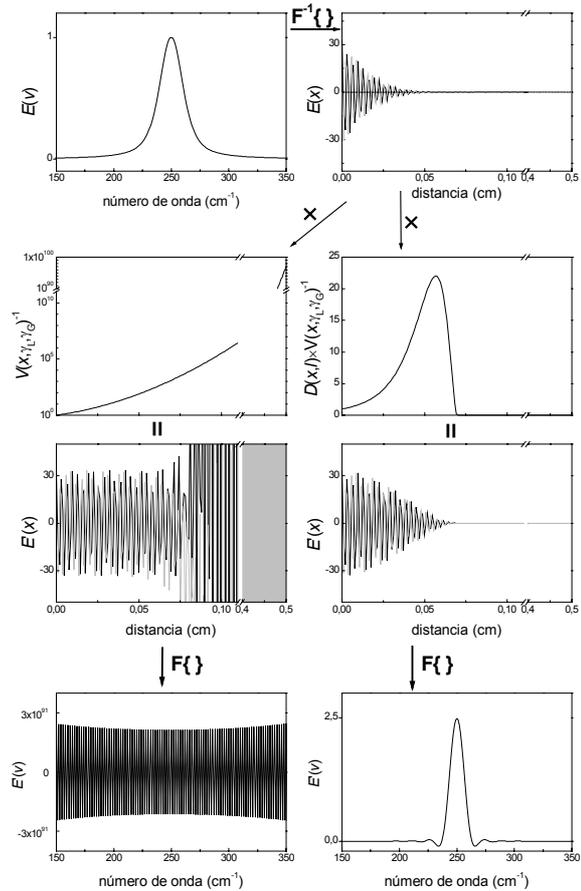
Por ejemplo, al desconvolar un espectro compuesto por una banda con  $\gamma_L = 15 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G = 15 \text{ cm}^{-1}$  obtenido a una resolución nominal de  $2 \text{ cm}^{-1}$  ( $x_f = 0,5 \text{ cm}$ ), el ruido en el espectro aumentará  $2 \times 10^{93}$  veces (el factor de estrechamiento, definido más adelante, será de 14). Este aumento del ruido será evidentemente intolerable, y puede parecer excesivo, pero es que la función  $V(x, \gamma_L, \gamma_G)$  tomará el valor de  $6 \times 10^{-98}$  en  $x_f$ . Esta situación ha sido representada en la columna de la izquierda de la figura 3.3.

No queda más remedio que regular el incremento de  $\varepsilon(x)$  producido en el proceso de desconvolución. Kauppinen *et al.* (1981a) introdujeron una función  $D(x, l)$  que multiplica a  $E(x)$  en la ecuación 3.5. Esta función actúa como un filtro, al eliminar parte del ruido generado en la desconvolución, pero también como una nueva función instrumental, pues controla la resolución y la forma de las bandas del espectro autodesconvulado (Kauppinen *et al.*, 1981a).  $D(x, l)$  tendrá unas propiedades semejantes a  $R(x, x_f)$ . Para los filtros truncados, la mayoría,  $D(x, l)$  vale cero cuando  $x > l$  (a  $l$  se le llama el punto de corte). Para los filtros continuos, la minoría,  $D(x, l)$  toma valores muy pequeños para  $x > l$ . En cualquier caso, la resolución nominal en el espectro desconvulado se puede considerar de  $1/l$ . Como generalmente  $R(x, x_f)$  no es mucho menor que 1 para  $x = l$

su efecto en la forma final de la banda desconvulada es mínimo, y la ecuación 3.4 vendrá dada ahora por:

$$E'(v) = \mathfrak{F}^{-1} \left\{ \frac{E(x)D(x, l)}{V(x, \gamma_L, \gamma_G)} \right\} \cong A \delta(v - v_0) \otimes D(v, l) \quad (3.7)$$

La figura 3.4 presenta la forma de diferentes filtros, tanto en el dominio de las distancias como de los números de onda. Las expresiones analíticas de estos filtros se encuentran en el apéndice 3.



**Figura 3.3.** Desconvoluciones en el espacio de Fourier de un espectro formado por una banda. El proceso de la izquierda representa la desconvolución *ingenue*, en la que no se tiene en cuenta la amplificación del ruido. El resultado es una desconvolución totalmente inútil. El proceso de la derecha representa la desconvolución realista, en la que el incremento del ruido se controla. El resultado es una desconvolución útil, pero con un estrechamiento de la banda limitado.

Si ahora desconvulamos la banda Voigtiana considerada anteriormente, pero utilizando un filtro con  $l = 0,07$  cm, el ruido sólo aumentará 36 veces. Por otra parte el factor de estrechamiento será de 2. Por lo tanto la reducción del aumento del ruido lleva consigo una reducción del estrechamiento, a causa de que la resolución nominal queda reducida. Esta situación ha sido representada en la columna de la derecha de la figura 3.3.

### 3.2.2.3. Estrechamiento, forma y degradación de la relación señal / ruido de las bandas autodesconvuladas

La anchura de una banda en el espectro original viene determinada principalmente por  $V(v, \gamma_L, \gamma_G)$ , mientras que la anchura de la banda en el espectro deconvulado lo hace por  $D(v, l)$ . Por lo tanto, definimos el factor de estrechamiento  $k$  que sufre una banda al aplicar la autodesconvolución de Fourier como (Kauppinen et al., 1981b):

$$k = \frac{\text{anchura}\{E(v)\}}{\text{anchura}\{E'(v)\}} \cong \frac{\text{anchura}\{V(v, \gamma_L, \gamma_G)\}}{\text{anchura}\{D(v, l)\}} \quad (3.8)$$

donde la anchura de la banda está medida a media altura. Teniendo en cuenta que la anchura de  $V(v, \gamma_L, \gamma_G)$  puede expresarse como  $\gamma$ , y la anchura de  $D(v, l)$  como  $a/l$  (Kauppinen et al., 1981c), el factor de estrechamiento vendrá dado por:

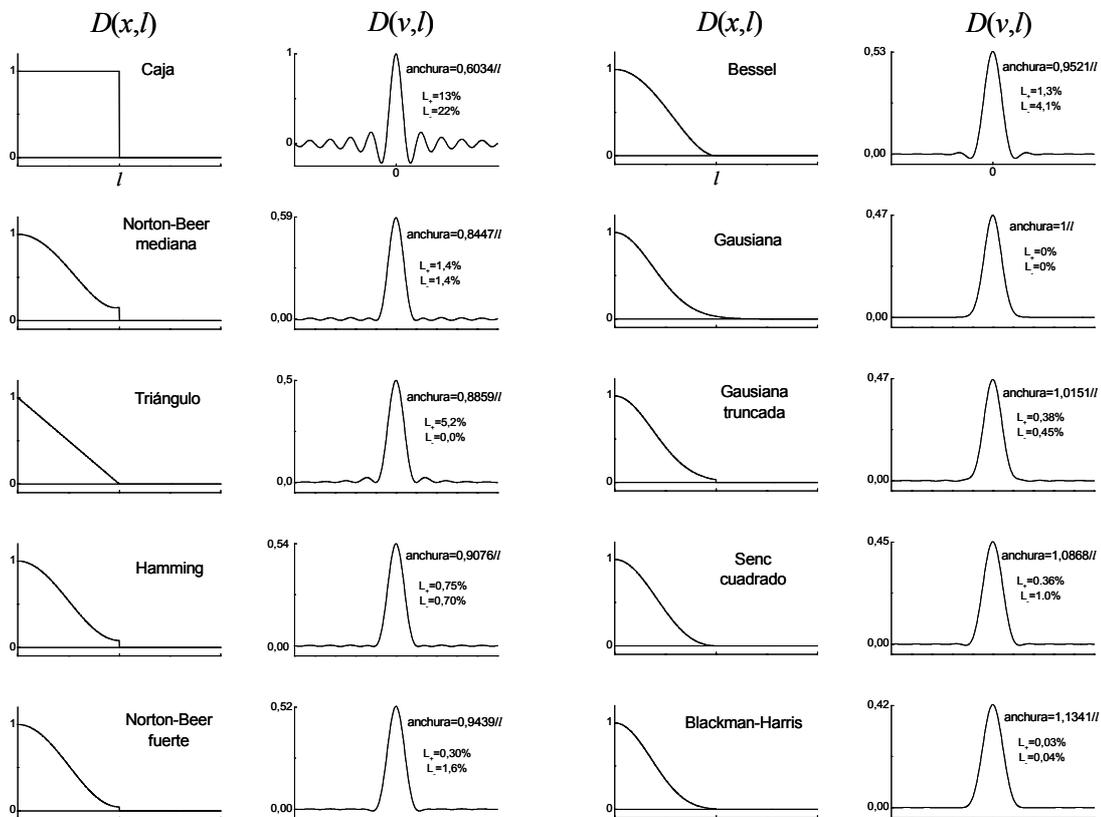
$$k = l \times \gamma / a \quad (3.9)$$

Los valores de  $a$  ha sido tabulados para varios filtros (Kauppinen et al., 1981c; Marshall y Verdun, 1990 cap. 2). La figura 3.4 muestra estos valores para algunos filtros, y son generalmente cercanos a 1. Resulta más cómodo decidir el estrechamiento deseado que el punto de corte. Como ambos están relacionados por la ecuación 3.9, cualquiera de los dos puede ser utilizado como parámetro en la autodesconvolución. La mayor parte de los programas de desconvolución utilizan  $k$  como parámetro, pues de esta manera se controla directamente el estrechamiento obtenido.

Por otra parte, como ya se ha indicado, la forma de la banda después de la autodesconvolución viene determinada por  $D(v, l)$ . Ésta es la transformada de Fourier de  $D(x, l)$ . Si la función  $D(v, l)$  es simétrica, sólo la transformada real es necesaria (Rahmelow y Hübner, 1996a):

$$D(v, l) = 2 \times \int_0^l D(x, l) \cos(2\pi vx) dx \quad (3.10)$$

La forma de  $D(v,l)$  para diferentes  $D(x,l)$  se muestran en la figura 3.4, y en el apéndice se dan sus expresiones analíticas.



**Figura 3.4.** Forma para diversos filtros /apodizaciones en el dominio de las distancias, y las bandas correspondientes que generan en el dominio de los números de onda. Se indica su anchura y la magnitud de los lóbulos positivos negativos respecto al máximo de la banda. Para el dominio de las distancias sólo se ha representado la parte positiva del filtro.

Finalmente, cabe describir la degradación del espectro por el aumento del ruido que se da en la autodesconvolución. La calidad de un espectro es habitualmente descrita como la relación entre la altura (intensidad) de la banda que nos interesa dividida por la desviación estándar del ruido. A esta relación se la conoce por relación señal / ruido (S/R). La desconvolución aumenta el ruido y la intensidad de la banda (ya que estrecha manteniendo el área de la banda constante). Ambos efectos se han de tener en cuenta al estudiar la degradación de la relación S/R (Kauppinen et al., 1981c).

Para un espectro formado por una banda, definiremos como el factor de relación señal/ruido retenido al autodesconvular,  $F_{S/R}$ , como:

$$F_{S/R} = \frac{S/R'}{S/R} \tag{3.11}$$

donde  $S/R'$  es la relación señal / ruido en el espectro desconvulado, y  $S/R$  en el espectro original. El valor del factor  $F_{S/R}$  ha sido estudiado para el caso en que  $\gamma_L > 0$  y  $\gamma_G = 0$  (banda Lorentziana) para diferentes

expresiones del filtro  $D(x,l)$  (Kauppinen et al., 1981c). De los filtros estudiados, los más efectivos en mantener una menor degradación de la relación S/R fueron los filtros Caja, Trapecio, Bessel y el Triángulo, por este orden (Kauppinen et al., 1981c). Por otra parte sólo los filtros Bessel y Triángulo dan bandas con forma adecuada, y por ello son los recomendados en la autodesconvolución de Fourier (Kauppinen et al., 1981c).

### 3.2.3. La desconvolución de Fourier fuera de las condiciones de autodesconvolución

La autodesconvolución en el espacio de Fourier de un espectro con una única banda, requiere que conozcamos la forma y anchura de la banda, o en el caso concreto de una banda con forma Voigtiana, que conozcamos el valor de  $\gamma_L$  y  $\gamma_G$ . Cuando un espectro contiene más de una banda, la autodesconvolución sólo será factible si todas las bandas muestran la misma forma y anchura. Estas condiciones son muy limitadas, pues tanto conocer la forma y anchura de las bandas de un espectro, como que todas ellas coincidan para todas las bandas, es muy improbable.

Aún así, la desconvolución de un espectro se puede realizar en el espacio de Fourier. En vez de desconvular para la forma y anchura de la banda (que no la sabemos o no es común para todas las bandas del espectro), desconvularemos para una estimación de dicha forma y anchura. Ahora hablaremos de desconvolución en el espacio de Fourier, o de desconvolución de Fourier. Por ejemplo, si consideramos que las bandas del espectro son Lorentzianas, desconvularemos con una banda  $V(v,\gamma_L',0)$ . La autodesconvolución para una banda se dará cuando  $\gamma_L' = \gamma_L$ , la sobredesconvolución cuando  $\gamma_L' > \gamma_L$ , y la infradesconvolución cuando  $\gamma_L' < \gamma_L$ .

Las ecuaciones que rigen el estrechamiento, la forma y relación señal/ruido de las bandas autodesconvuladas no serán habitualmente aplicables a las bandas desconvuladas, excepto en el caso de verdadera autodesconvolución. Es por ello que se requiere obtener otras ecuaciones para el concepto más amplio de desconvolución en el espacio de Fourier, que incluyan la sobre e infradesconvolución.

### 3.3. Desconvolución regularizada

Tal como se ha mencionado anteriormente,\* la desconvolución consiste en invertir un proceso de convolución. Este proceso es numéricamente inestable. Como mostramos en el apéndice 1, las soluciones regularizadas permiten la obtención de soluciones estables para la inversión de ciertas transformaciones, donde está incluida la convolución. Por lo tanto, toda la teoría descrita en el apartado de inversión de integrales e inferencias puede aplicarse al problema de la desconvolución. Estas soluciones tienden hacia la solución exacta a medida que el error de los datos se reduce, o visto de otra manera, la solución obtenida convulada sería indistinguible de la solución exacta convulada dentro del nivel de ruido.

Cualquier espectro  $E(v)$  contiene ruido o errores, tal que:

---

\* Ver punto 3.1.

$$E(v) - \hat{E}(v) = \varepsilon(v) \quad (3.12)$$

donde  $\hat{E}(v)$  representa el espectro libre de ruido y errores,  $\varepsilon(v)$ . Si el espectro  $\hat{E}(v)$  fuera desconvoluto por  $V(v, \gamma_L', \gamma_G')$ , obtendríamos  $\hat{E}'(v)$ , la solución exacta de la desconvolución. Por lo tanto:

$$E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G') = \varepsilon(v) \quad (3.13)$$

Podemos obtener la desconvolución exacta resolviendo la ecuación 3.13. Lamentablemente, esto no es posible, pues desconocemos  $\varepsilon(v)$ . Como mucho podemos conocer su desviación estándar  $\sigma_v$ . Por lo tanto:

$$\sqrt{\frac{1}{N} \sum (E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G'))^2} \approx \sigma_v \quad (3.14)$$

donde  $N$  es el número de puntos del espectro; o de manera equivalente, utilizando la función estadística  $\chi^2$ :

$$\frac{\chi^2}{N} = \frac{\sum (E(v) - \hat{E}'(v) \otimes V(v, \gamma_L', \gamma_G'))^2}{N\sigma_v^2} \approx 1 \quad (3.15)$$

Esta condición no es suficiente para determinar  $\hat{E}'(v)$ , pues hay muchas posibles soluciones  $E'(v)$  que la cumplen. Este grupo de soluciones es indistinguible de la solución real dentro de los niveles de ruido (Craig y Brown, 1986 cap. 6; Gilbert, 1990).

La solución regularizada se obtiene seleccionando de este grupo de posibles soluciones que cumple que  $\chi^2/N \approx 1$ , aquella que maximiza (o minimiza) otra función, llamada de regularización. Esta función mide de manera más o menos cuantitativa la suavidad, parsimonia, probabilidad de generarse o información de una solución (Craig y Brown, 1986 cap. 6; Provencher, 1982; Le Besnerais et al., 1994; Gull y Skilling, 1990). En la práctica, la combinación de la función  $\chi^2$  y la función de regularización simplifica cualquier problema de dimensión  $N$  a un problema de dimensión 1, es decir, crean una trayectoria o curva donde se sitúan las soluciones regularizadas que mejor describen los datos. La elección de la solución se reduce a un parámetro, llamado parámetro de regularización, que puede determinarse con la restricción  $\chi^2/N \approx 1$  o con cualquier otro criterio (Press et al, 1996 cap. 18; Hansen, 2000; Hansen 2001).

### 3.4. Desconvolución de Fourier y predicción lineal

#### 3.4.1. Predicción lineal de un interferograma truncado

Consideremos el interferograma de un espectro. Éste estará truncado, es decir, a partir de ciertos valores de distancia no contiene datos (para  $x > x_j$ ). La resolución de este espectro está relacionada con la distancia a la que se trunca el interferograma. Si en ese punto la señal del interferograma no ha decaído prácticamente a cero, habrán bandas cuya detección está limitada por la resolución a la que se ha adquirido el espectro (es decir, aparecerían más estrechas si se obtuvieran datos del interferograma a mayores distancias). Si queremos que esto no pase tendremos que medir los valores del interferograma a

distancias mayores, o ser capaces de predecir los datos que obtendríamos a partir de los que sí hemos medido. Es decir, tenemos un interferograma  $E(x)$  que carece de datos para  $x > x_f$ , generando así un espectro  $E(\nu)$  a una resolución nominal de  $1/x_f$ . Queremos predecir los valores de  $E(x)$  para  $x > x_f$  hasta  $x = x_f^2$ , donde  $1/x_f^2$  será la nueva resolución nominal del espectro. Llamaremos factor de incremento de la resolución,  $R$ , a  $x_f^2/x_f$ . Esta predicción es posible cuando  $E(x)$  es un modelo autorregresivo, tal como se detalla en el apéndice 5.

Los nuevos valores de  $E(x)$ :  $E_j, \dots, E_{j+N-1}$  se obtendrán como combinaciones lineales de los valores anteriores (Marshall y Verdun, 1990 cap. 6; Saarinen et al., 1995):

$$E_j = \sum_{k=1}^M h_k E_{j-k}; \quad E_{j+1} = \sum_{k=1}^M h_k E_{j+1-k}; \quad \dots \quad E_{j+N-1} = \sum_{k=1}^M h_k E_{j+N-1-k} \quad (3.16)$$

donde  $N$  será el número de puntos predichos y el vector  $\mathbf{h}$  es el filtro de predicción o función de respuesta al impulso, de longitud o orden  $M$  (Saarinen et al., 1995).<sup>\*</sup> Si consideramos la presencia de errores en los datos, dados por  $\varepsilon(x)$ , los datos predichos contendrán errores que serán una combinación lineal de los medidos:

$$E_j = \sum_{k=1}^M h_k E_{j-k} + \sum_{k=1}^M h_k \varepsilon_{j-k} \quad (3.17)$$

Por lo tanto, la predicción lineal de una señal con ruido es igual a la suma de la predicción de la señal sin ruido más la predicción del ruido, es decir, como su nombre indica la predicción lineal es un método lineal, con las ventajas que ello tiene.

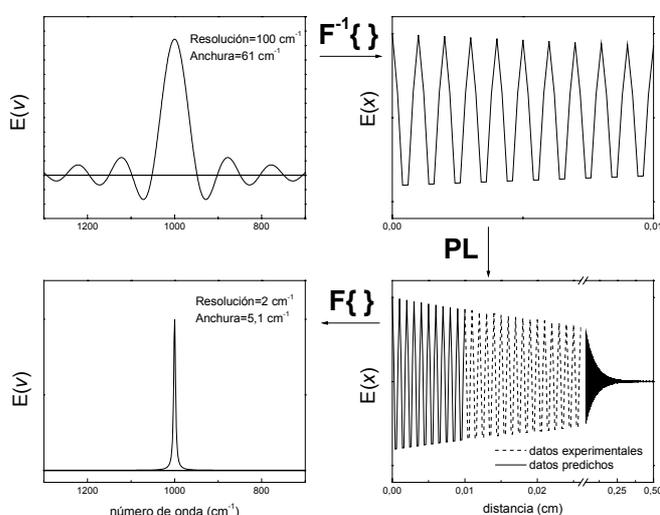
Mediante la predicción lineal podemos aumentar matemáticamente la resolución de un espectro. Es importante recordar la condición que la señal es estacionaria para una correcta predicción (ver apéndice 5). Para ello los datos del interferograma que se utilizan para predecir los puntos no medidos han de estar libres de cualquier apodización que no sea la apodización Caja, la cual no altera la forma del decaimiento del interferograma. Si existiera cualquier otra apodización se ha de eliminar antes del proceso de predicción.

La figura 3.5 muestra un ejemplo. El espectro consiste en una Lorentziana de anchura  $5 \text{ cm}^{-1}$  a una resolución nominal de  $100 \text{ cm}^{-1}$  y una apodización Caja. La parte real del interferograma consiste en una cosenoide con una amplitud amortiguada (la parte imaginaria es una senoide), que no ha decaído a la distancia de  $0,01 \text{ cm}$ , el punto de corte del interferograma. La parte conocida del interferograma consiste en 51 números complejos. Con estos valores se calculó una  $\mathbf{h}$  de orden 20 resolviendo la ecuación 5.3 del apéndice y se predijeron 2449 nuevos valores complejos del interferograma, que pasó a tener valores hasta una distancia de  $0,5 \text{ cm}$ , como se muestra en la gráfica inferior. La figura a su izquierda muestra el espectro correspondiente al interferograma obtenido mediante predicción lineal. La resolución nominal del espectro es de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y la banda aparece muy próxima a una Lorentziana y con una anchura muy

---

<sup>\*</sup> Ver apéndice 5 para más detalles

cercana a  $5 \text{ cm}^{-1}$ . En este ejemplo el factor de incremento de la resolución fue de 50, y el estrechamiento efectivo de la banda fue de aproximadamente 12.



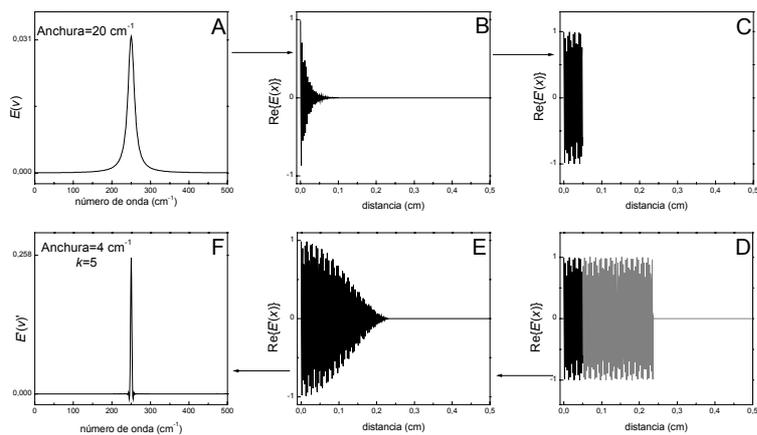
**Figura 3.5.** Se representa una banda Lorentziana a resolución limitada y su transformada de Fourier, la cual queda truncada antes de su decaimiento total. Mediante predicción lineal (PL) es posible extrapolar el interferograma experimental hasta que decaiga, de esta manera se obtiene una banda no limitada por la resolución instrumental, y por lo tanto más estrecha y con una forma más adecuada.

Por lo tanto, este es un método muy potente para estrechar bandas limitadas por la resolución instrumental. En caso contrario es totalmente ineficiente, pues la señal interferométrica de la banda ya habrá decaído y no se obtendrá un estrechamiento prediciendo esta señal (Kauppinen y Saarinen, 1994). Por ejemplo, si la banda de la figura 3.5 hubiese sido obtenida a  $2 \text{ cm}^{-1}$  de resolución y mediante predicción lineal ésta se hubiese incrementado en 50 (resolución de  $0,04 \text{ cm}^{-1}$ ) el estrechamiento efectivo de la banda sería de 1,02. Es por ello que tal como ha sido expuesto, este método no es adecuado para estrechar las bandas de la amida I de proteínas, pues la anchura de éstas no está limitada por la resolución instrumental, sino por procesos de ensanchamiento homogéneo e inhomogéneos

### 3.4.2. Predicción lineal de un interferograma deapodizado y truncado

Cuando tratábamos la autodesconvolución en el espacio de Fourier vimos que el interferograma deapodizado,  $E'(x)$ , tenía que ser filtrado (o apodizado) debido al gran incremento del ruido para valores de  $x$  superiores a  $l$ . En otras palabras para  $x > l$  consideramos conveniente aproximar  $E'(x)$  a cero (o a casi cero), pues consideramos su valor obtenido de escasa fiabilidad, por la creciente presencia de ruido. A causa de esto, el espectro desconvulso se obtiene a una resolución nominal de  $l^{-1}$ . Sin embargo, parece posible obtener una aproximación de  $E'(x)$  para  $x > l$  mejor que suponer que es cero, pues incluso nuestra vista puede proporcionarla.

\* Deapodizar un interferograma equivale a desconvular su espectro.



**Figura 3.6.** (A) Una banda Lorentziana no limitada por la resolución. (B) Su transformada de Fourier, la cual decae antes de su truncamiento. (C) De apodización y trunque del interferograma para que corresponda al de una Lorentziana limitada por la resolución. (D) Extrapolación del interferograma deapodizado / truncado. (E) Multiplicación del interferograma por una función e apodización, la cual controlará la forma de la banda limitada por la resolución. (F) Banda resultante, estrechada mediante la combinación de la desconvolución y de la predicción lineal.

interferograma eliminado la apodización. C) Multiplicamos el interferograma con una función adecuada que elimine el decaimiento de la señal de las bandas (deapodización) y cortamos a la distancia deseada.\* D) Utilizamos la parte deapodizada y seleccionada del interferograma para obtener la función de respuesta al impulso y predecir valores del interferograma hasta la distancia deseada. E) Multiplicamos el nuevo interferograma por el filtro deseado, para tal de tener una forma de banda adecuada. F) Obtenemos el espectro correspondiente al interferograma.

Varios autores han combinado la predicción lineal y la desconvolución para estrechar bandas, aunque no siempre de la misma manera (Palmö et al., 1988; Kauppinen et al., 1991a; Saarinen et al., 1995; Saarinen, 1997).

Por lo tanto, utilizaremos una parte de  $E'(x)$  que muestra la suficiente calidad y que sea suficientemente extensa, para predecir valores de  $E'(x)$  que, o bien no están medidos, o que son de baja calidad. Extender un interferograma equivale a trabajar a mayor resolución, y puesto que las bandas de los espectros desconvueltos suelen estar limitadas por la resolución, podremos obtener importantes estrechamientos.

El proceso será el siguiente y se ilustra en la figura 3.6: A) Tenemos el espectro que deseamos estrechar. B) Pasamos del espectro al

\* Este proceso equivale a autodesconvolver el espectro utilizando un filtro Caja.