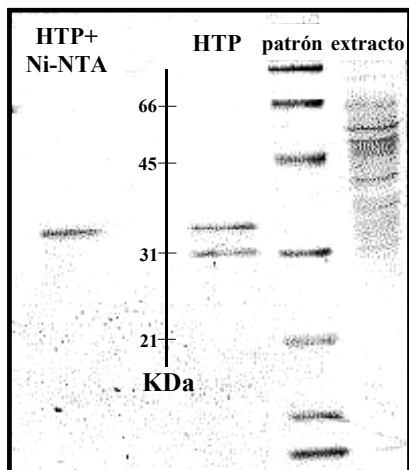


resultados experimentales  
y discusión

## 1. Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM

### 1.1. Purificación del Anc2pHis inhibido

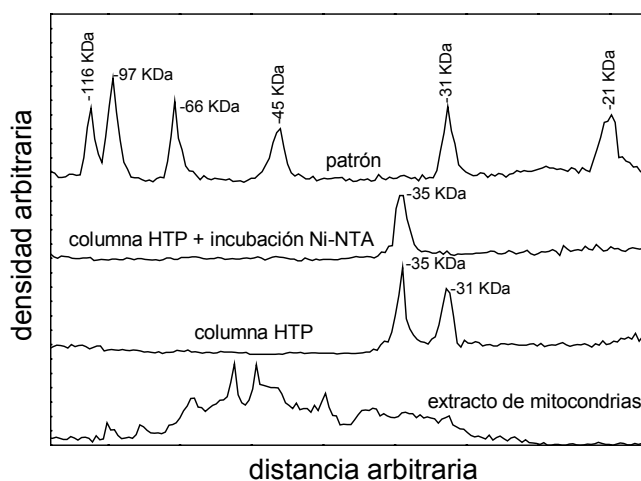


**Figura 1.1.** Gel de SDS-PAGE correspondiente al proceso de purificación del Anc2pHis inhibido con catr. Se presentan las bandas de proteína correspondientes al extracto solubilizado de mitocondrias, al paso por la columna de hidroxilapatita (HTP) y al paso de incubación con la resina de níquel-agarosa (Ni-NTA). Se muestra las bandas de un patrón de masas moleculares.

En el segundo paso de purificación la parte eluida, que contiene el Anc2pHis, se incubó con una resina de níquel/agarosa (Ni-NTA), por la que tendrá afinidad a causa de la cola de polihistidinas. Tras varios lavados, la proteína retenida en la resina se eluyó con un exceso de imidazol. Esta elución contiene sólo la proteína de 35 KDa (ver figura 1.1 y figura 1.2). La presencia en la muestra de proteínas contaminantes se puede considerar menor del 5%.

El transportador Anc2pHis, inhibido con catr, se purificó a partir de un extracto de mitocondrias solubilizadas. Este extracto contiene un gran número de proteínas diferentes, tal como se encontró al correr una alícuota en un gel de poliácridamida/SDS (figura 1.1). La purificación se realizó en dos pasos.

En el primer paso de la purificación se realizó una cromatografía de hidroxapatita del extracto solubilizado de mitocondrias. La mayor parte de proteínas quedan retenidas en la hidroxapatita. La parte eluida contiene sólo dos proteínas, con masa molecular de 35 y 31 KDa, tal como se deduce del gel de poliácridamida/SDS mostrado en la figura 1.1 y del densitograma de la figura 1.2. La proteína de 35 KDa corresponde al transportador Anc2pHis y la de 31 KDa al transportador mitocondrial de fosfato (Fiore et al., 2000). Tras este paso de purificación, la pureza de la muestra en Anc2pHis fue del  $\approx$  60%.



**Figura 1.2.** Densitograma de los diferentes carriles del gel de la figura 1.1. Las señales se han desplazado verticalmente para una mejor visualización.

## 1.2. Película seca del Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM

La figura 1.3A muestra el espectro de absorbancia por transmitancia en el infrarrojo de una película seca del Anc2pHis inhibido con catr y solubilizado con DM. La figura 1.3B muestra una ampliación de la zona de mayor interés. Los máximos de la amida I a  $1657,5 \text{ cm}^{-1}$  y el de la amida II a  $1546,0 \text{ cm}^{-1}$  son coherentes con una proteína donde las estructuras mayoritarias son hélices alfa y/o estructuras al azar. La banda situada a  $1739,7 \text{ cm}^{-1}$  se asigna a fosfolípido retenido por la proteína en el proceso de purificación (ver más adelante).

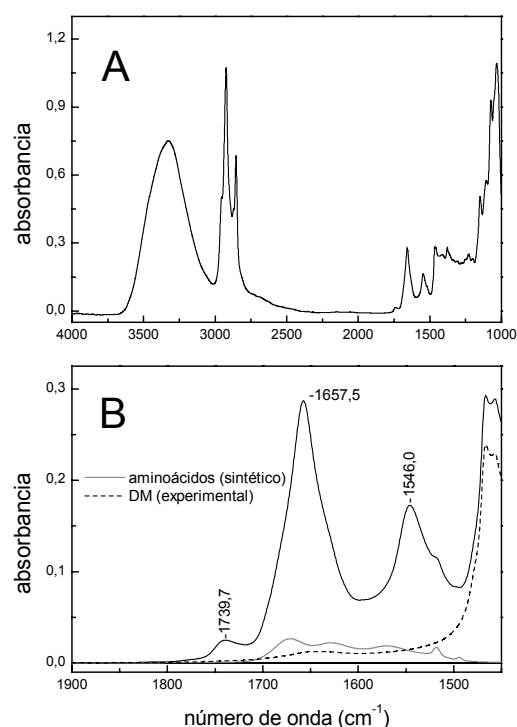
### 1.2.1. Propiedades del espectro

#### 1.2.1.1. Determinación de la relación señal / ruido

Desde el punto de vista de aplicación de métodos matemáticos de análisis, la calidad del espectro se medirá por la relación señal / ruido, donde la señal corresponde a la altura de la banda que nos interesa, y el ruido corresponde a la desviación estándar del ruido en el intervalo que nos interesa. La desviación estándar del ruido puede obtenerse de manera sencilla en una zona del espectro sin bandas. Entre  $1900\text{-}1850 \text{ cm}^{-1}$ , la desviación estándar del ruido es de  $2,8 \times 10^{-5}$  UA. Con este valor podemos obtener la desviación estándar del ruido en zonas próximas, como se describe en Materiales y Métodos. La figura 1.4 muestra la relación absorbancia/ruido (A/R) en función del número de onda. La relación A/R máxima en la amida I es de 6650 y en la amida II de 4850. Para la zona entre  $1840$  y  $1600 \text{ cm}^{-1}$  la relación señal / ruido, que será la relación entre el máximo de la amida I y la desviación estándar del ruido en esta zona, es de 9200.

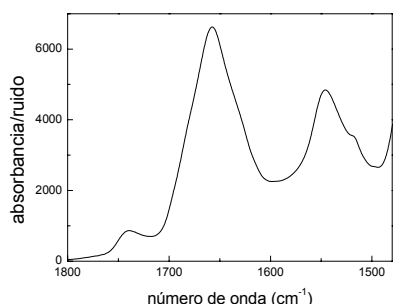
#### 1.2.1.2. Contribuciones en la amida I y amida II

Las bandas que llamamos amida I y amida II contienen las vibraciones relacionadas con el enlace peptídico, las cuales nos pueden dar una información estructural. Hemos de tener en cuenta que tanto



**Figura 1.3.** (A) Espectro de absorbancia por transmitancia de una película seca del Anc2pHis inhibido y solubilizado con DM. (B) Ampliación del espectro (A). Se muestra asimismo un espectro sintético de la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos y un espectro experimental de una película seca del DM.

otras especies, como otros grupos funcionales de la propia proteína, pueden tener contribuciones en la zona de la amida I y amida II.



**Figura 1.4.** Relación entre la absorción y la desviación estándar del ruido para el espectro del Anc2pHis de la figura 1.3.

La figura 1.3B muestra el espectro escalado de una película seca de DM. Su contribución en la amida I y amida II es escasa, limitándose a las alas de las intensas bandas a 1466 y 1457  $\text{cm}^{-1}$  y a una débil banda a 1642  $\text{cm}^{-1}$ . Esta última banda podría ser tanto del O-H del DM como del O-H de agua retenida en la película de DM.

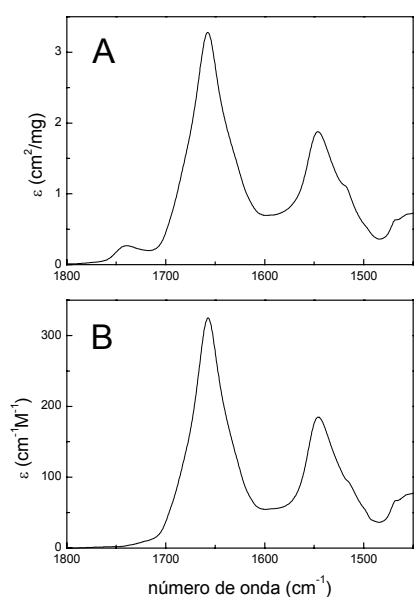
Otra contribución en la zona de la amida I y amida II es la absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos. Los coeficientes de absorción molar para las diferentes cadenas laterales se han publicado (Venyaminov y Kalnin, 1990). Para obtener un espectro de absorción sintético sólo es necesario conocer la concentración y el paso óptico de la muestra de proteína. Teniendo en cuenta el coeficiente neperiano de absorción integrada del DM entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  y que la relación en peso entre el DM y la proteína es de 9,4 / 1, es posible determinar la concentración por paso óptico (en  $\text{mg}/\text{cm}^2$  o en  $\text{mol}/\text{cm}^2$ ) de la proteína sobre la ventana. Esta fue de  $0,084 \pm 0,004 \text{ mg}/\text{cm}^2$ , o para el enlace peptídico de  $7,8 \pm 0,6 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{cm}^2$ . Con este valor obtuvimos el factor para escalar el espectro sintético de la contribución de las cadenas laterales, el cual se muestra en la figura 1.3B.

Existe otra manera de escalar el espectro sintético de las cadenas laterales. Se basa en los datos de Rahmelow et al. (1998), que han tabulado los coeficientes de absorción integrada para las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos y para el enlace peptídico. Teniendo en cuenta la secuencia primaria del Anc2pHis (Brandolin et al., 1993b; Fiore et al., 2000), el 16,7% del área entre 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$  de un espectro de Anc2pHis corresponde a la contribución de las cadenas laterales (una vez restada la contribución de otras especies, como lípido o detergente). Este método tiene la ventaja que no es necesario conocer la concentración y paso óptico. En cualquier caso, ambos métodos coinciden de manera razonable en el factor de escala. Ambos coincidirían perfectamente si el porcentaje del área para las cadenas laterales fuera de 14,3% en vez de 16,7%, o si la densidad de muestra en la ventana fuera de  $0,098 \text{ mg}/\text{cm}^2$  en vez de  $0,084 \text{ mg}/\text{cm}^2$ .

### 1.2.1.3. Coeficiente de absorción molar del enlace peptídico

La figura 1.5A muestra el coeficiente de absorción por concentración (en  $\text{mg}/\text{ml}$ ) del Anc2pHis en función del número de onda para la amida I y la amida II. Este coeficiente es de  $3,3 \pm 0,2 \text{ cm}^2/\text{mg}$  y de  $1,9 \pm 0,1 \text{ cm}^2/\text{mg}$  para el máximo de la amida I y de la amida II, respectivamente. La relación entre el máximo de la amida I y el de la amida II es de 1,75, y la relación entre el área de la amida I (1700-1600

$\text{cm}^{-1}$  con línea base interna) y de la amida II ( $1590\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ ) es de 2,05. El coeficiente integrado entre  $1700\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$  es de  $290 \pm 14\text{ cm/mg}$ .



**Figura 1.5.** (A) Coeficiente de extinción del Anc2pHis. (B) Coeficiente de absorción molar del enlace peptídico del Anc2pHis.

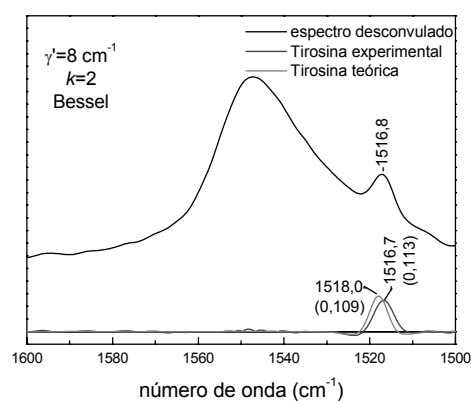
La figura 1.5B muestra el coeficiente de absorción molar para el enlace peptídico del Anc2pHis. Este coeficiente es de  $325 \pm 15\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el máximo de la amida I y de  $185 \pm 9\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el máximo de la amida II. El coeficiente integrado entre  $1700\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$  es de  $26\,500 \pm 1300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ .

**1.2.1.4. La banda de tirosina**

La cadena lateral de la tirosina genera una banda sobre  $1517\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda es muy estrecha, comparada con las bandas que componen la amida II. Por lo tanto si desconvulamos con una anchura pequeña, esta banda se estrechará, pero las que componen la amida II se verán poco afectadas.

La figura 1.6 muestra la amida II tras ser desconvulada en el espacio de Fourier con una banda Lorentziana de anchura  $\gamma_L = 8\text{ cm}^{-1}$ , un factor de estrechamiento de  $k=2$  y un filtro Bessel. La banda de la tirosina aparece a  $1516,8\text{ cm}^{-1}$ . La figura 1.6 muestra la banda tras eliminar la contribución del enlace peptídico mediante una corrección de línea base. Junto a este espectro se muestra la banda teórica que se esperaría a partir de los datos publicados para esta vibración (Venyaminov y Kalnin, 1990). Un desplazamiento hacia números de onda menores se ha de interpretar como un ambiente más hidrofóbico para las tirosinas. Tal como se deduce del trabajo de Fabian et al. (1994). La posición de esta banda no suele presentarse en los espectros de proteína, por lo que es difícil comparar la posición obtenida con la de otras proteínas para obtener información sobre el ambiente en el que se encuentran las trece tirosinas del Anc2pHis (de las cuales siete se encuentran en los segmentos transmembrana putativos y tres de ellas muy próximos a estos segmentos).

Respecto al área, las diferencias entre los datos experimentales y los teóricos son menores del 4%.



**Figura 1.6.** Observación de la posición y área (en paréntesis) de la banda de la tirosina a  $1517\text{ cm}^{-1}$ , y comparación con la banda teórica obtenida a partir de modelos de la cadena lateral de la tirosina (anillo fenólico).

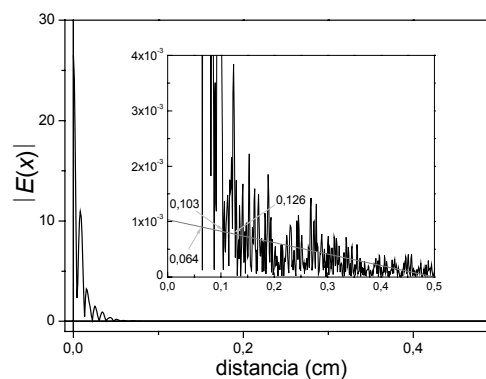
### 1.2.1.5. La banda del C=O de los fosfolípidos

La banda a  $1739,7 \text{ cm}^{-1}$  de la figura 1.3 la hemos asignado a la vibración C=O de fosfolípidos retenidos por la proteína en el proceso de solubilización/purificación por dos motivos: a) Se conoce que el transportador ADP/ATP bovino retiene fosfolípidos en el proceso de purificación y que estos fosfolípidos son necesarios para su funcionamiento en liposomas (Beyer y Klingenberg, 1985; Dress y Beyer, 1988; Horváth et al., 1990; Schlame et al., 1991); b) La posición, forma y anchura coincide con la de la vibración C=O de una película seca de fosfatidil colina de huevo. Utilizando el coeficiente neperiano de absorción molar integrada para esta vibración, se calculó que  $18 \pm 6$  moléculas de fosfolípido por dímero de Anc2pHis son retenidos durante el proceso de solubilización/purificación.

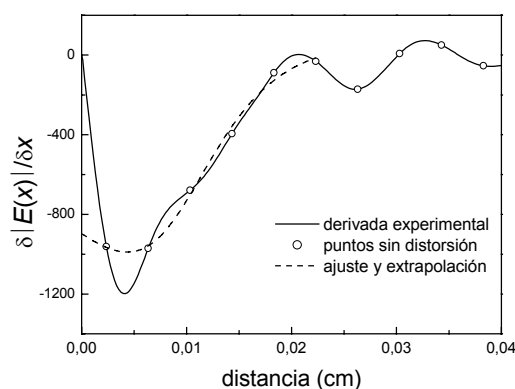
### 1.2.2. Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I

La figura 1.7 muestra el interferograma del espectro de la figura 1.3 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ , reflejado para reducir las discontinuidades. La distancia en la que la señal se iguala por primera vez con el ruido es a  $0,064 \text{ cm}$ , pero la distancia a la que la señal se sumerge en el ruido es a  $0,126 \text{ cm}$  (aunque también podría ser  $0,103 \text{ cm}$ ). Con este valor, suponiendo bandas de forma Lorentziana, se obtiene una estimación de la anchura de las bandas de  $26,4 \text{ cm}^{-1}$ . Si suponemos que la forma de las bandas es Gausiana, la anchura estimada será de  $13,6 \text{ cm}^{-1}$ . Para bandas con forma Voigtiana sólo es posible obtener la relación entre la anchura Lorentziana y la anchura Gausiana.\* Esta relación se muestra en la figura 1.10 para las bandas de la amida I.

La figura 1.8 muestra la derivada del módulo del interferograma del espectro de la figura 1.3 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ . La derivada a  $0 \text{ cm}$  se obtuvo

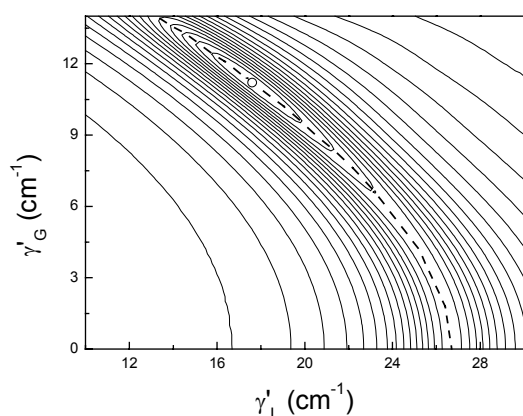


**Figura 1.7.** Módulo del interferograma del espectro de la figura 1.3 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ . En gris se ha marcado la desviación estándar del ruido en el interferograma, y diferentes puntos de corte con la señal.



**Figura 1.8.** Derivada del módulo del interferograma del espectro de la figura 1.3 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ .

\* Ver puntos 1.1.5.3.1.B; 1.2.A; y 1.3.4 de Resultados Teóricos.



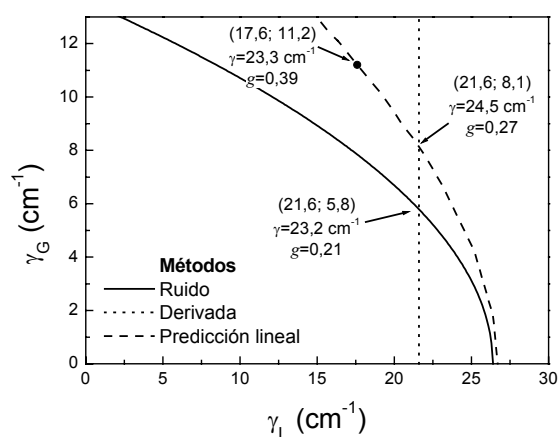
**Figura 1.9.** Calidad de la predicción lineal, respecto a las anchuras de desconvolución utilizadas, mostrada en líneas de contorno. El máximo se ha marcado con un círculo abierto, y en línea discontinua se muestra las combinaciones de anchura Lorentziana y Gaussiana que dan las mejores predicciones.

distorsiones de una discontinuidad. La línea discontinua de la figura 1.9 marca la combinación de anchuras Lorentzianas y Gaussianas que dan buenos resultados en la predicción y son por lo tanto buenos candidatos a ser las anchuras de las bandas de la amida I. Estas combinaciones se muestran en la figura 1.10. La combinación que da una mejor predicción corresponde a una anchura Lorentziana de 17,6  $\text{cm}^{-1}$  y una anchura Gaussiana de 11,2  $\text{cm}^{-1}$ . Podemos también combinar los resultados de la predicción lineal con el método de la derivada. Esto nos da una anchura Lorentziana de 21,6  $\text{cm}^{-1}$  y una Gaussiana de 8,1  $\text{cm}^{-1}$  para las bandas en la zona de la amida I.

Como primera aproximación a la forma y anchura de las bandas de la amida I, se asumirá que su anchura Lorentziana es de 21,6  $\text{cm}^{-1}$  y la

mediante ajuste/extrapolación. Con este valor, se obtuvo una anchura media Lorentziana ponderada al área de 21,6  $\text{cm}^{-1}$ .\* Con este método no es posible obtener información relevante sobre la anchura Gaussiana. La información obtenida por este método se muestra en la figura 1.10. Combinando el método de la derivada y el del ruido obtenemos una estimación de la anchura Lorentziana para las bandas de la amida I de 21,6  $\text{cm}^{-1}$ , y una estimación de la anchura Gaussiana de 5,8  $\text{cm}^{-1}$ .

La figura 1.9 muestra los resultados de la calidad de la predicción lineal en función de la anchura Lorentziana y Gaussiana utilizada para desconvolar.† El interferograma utilizado se obtuvo a partir del espectro de la figura 1.3 entre 1850-1600  $\text{cm}^{-1}$ , reflejado para reducir las



**Figura 1.10.** Combinación de los resultados de diferentes métodos para estimar la anchura Lorentziana y Gaussiana de las bandas de la amida I del espectro de la figura 1.3.

\* Ver puntos 1.1.5.3.1.C; y 1.3.4 de Resultados Teóricos.

† Ver punto 1.1.5.3.1.D; y 1.3.4 de Resultados Teóricos.

de Gaussiana de  $8,1 \text{ cm}^{-1}$  (anchura de  $24,5 \text{ cm}^{-1}$  y factor Gaussiano de  $0,27$ ). Como segunda aproximación aceptaremos una anchura Lorentziana de  $17,6 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gaussiana de  $11,2 \text{ cm}^{-1}$  (anchura de  $23,3 \text{ cm}^{-1}$  y factor Gaussiano de  $0,39$ ).

### 1.2.3. Determinación del número y posiciones de bandas componentes en la amida I

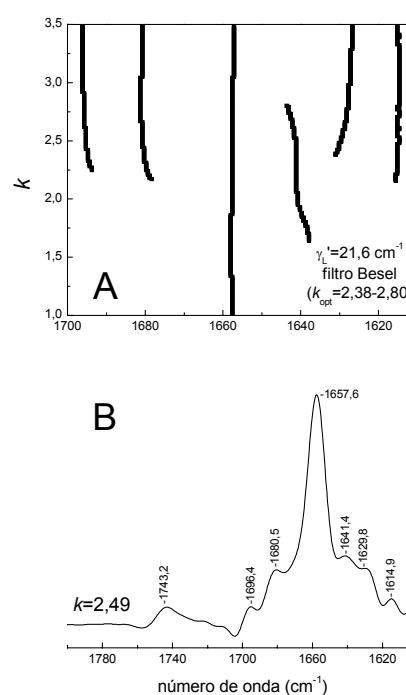
Con el fin de determinar el número y posición de las bandas componentes en la amida I, en esta sección se aplican diversos métodos matemáticos para estrechar bandas. Estos métodos se han descrito en los apartados 1, 2 y 3 de los Resultados Teóricos.

#### 1.2.3.1 Desconvolución de Fourier

Primero consideraremos la desconvolución con bandas Lorentzianas, pues son las bandas utilizadas habitualmente en la desconvolución de Fourier.

Al espectro de la figura 1.3B se le aplicó nuestro método de desconvolución / detección de bandas, desarrollado para obtener el factor de estrechamiento óptimo para desconvular,  $k_{\text{opt}}$ . La figura 1.11A muestra la posición de las bandas detectadas en la amida I del espectro desconvuldo, en función del factor de estrechamiento, para  $\gamma' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro Bessel. Se detecta un máximo de cinco bandas en la amida I, con una  $k_{\text{opt}} = 2,49$ . El espectro correspondiente se muestra en la figura 1.11B. La figura 1.12A muestra la misma situación, pero la detección de las bandas se realiza en la segunda derivada del espectro desconvuldo. Se observan un máximo de seis bandas para una  $k_{\text{opt}} = 2,37$ . El espectro correspondiente y su segunda derivada se muestran en la figura 1.12B.

En estas condiciones,  $\gamma' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro Bessel, el método gráfico<sup>†</sup> sugeriría una  $k_{\text{opt}} = 2,86$ , un valor algo excesivo que reduciría en una las bandas detectadas, tanto en el espectro desconvuldo como en su segunda derivada. El método teórico<sup>‡</sup> sugeriría una  $k_{\text{opt}} = 3,34$  asumiendo condiciones de autodesconvolución, un valor que sumerge casi todas las bandas bajo el ruido.



**Figura 1.11.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvular el espectro de la figura 1.3, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvuldo con el factor de estrechamiento óptimo.

\* Ver punto 1.1.5.2.C de Resultados Teóricos.

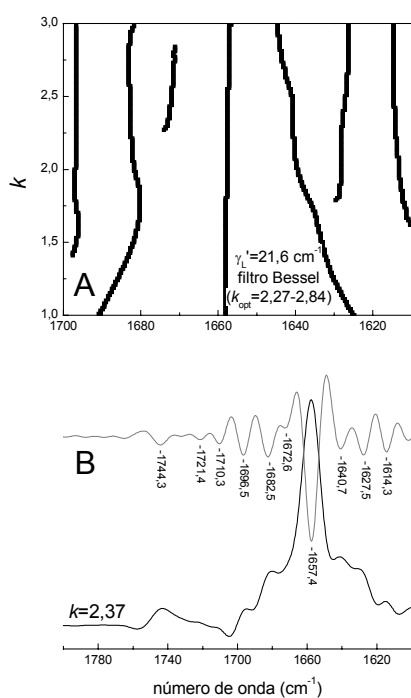
† Ver punto 1.1.5.2.B de Resultados Teóricos.

‡ Ver punto 1.1.5.2.A de Resultados Teóricos.

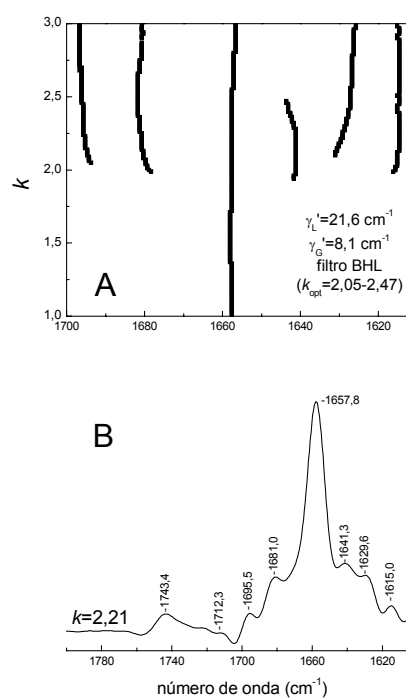


En los Resultados Teóricos\* hemos visto que para una banda Voigtiana se obtienen mayores estrechamientos efectivos si además de desconvolar su carácter Lorentziano se desconvola también su carácter Gausiano. Por lo tanto, si consideramos las bandas componentes de la amida I como bandas Voigtianas será conveniente desconvolar utilizando bandas Voigtianas.

Inicialmente se desconvuló con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 8,1 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando tanto un filtro BHL como uno Bessel. La elección del filtro BHL se realizó para minimizar el posible efecto negativo de la sobredesconvolución en la forma de las bandas.



**Figura 1.12.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido en la segunda derivada del espectro desconvulado, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvulado con el factor de estrechamiento óptimo, y su segunda derivada.

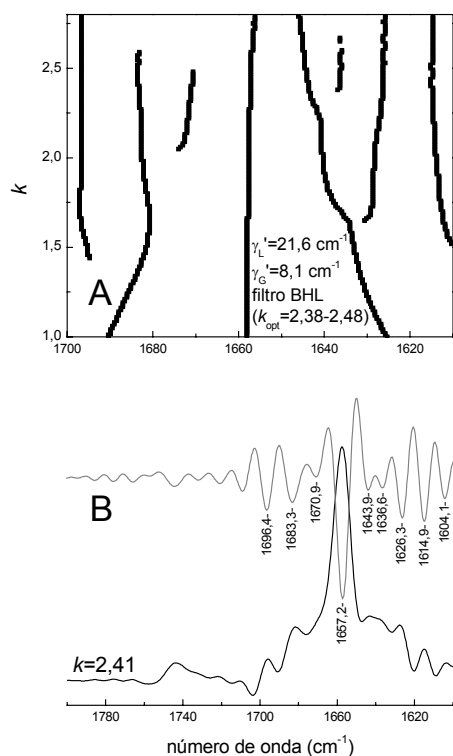


**Figura 1.13.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolar el espectro de la figura 1.3, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvulado con el factor de estrechamiento óptimo.

La figura 1.13A muestra la posición de las bandas detectadas en el espectro desconvulado en función de  $k$ , para el filtro BHL, así como el espectro correspondiente a la  $k_{\text{opt}}$  (figura 1.13B). El máximo número de bandas detectadas es de cinco, con una  $k_{\text{opt}} = 2,21$ , lo cual no mejora los resultados obtenidos al desconvolar con una banda Lorentziana. Sin embargo, cuando la detección de las bandas se realiza con la segunda derivada del espectro desconvulado se detectan un número máximo de siete bandas (figura 1.14), con una  $k_{\text{opt}} = 2,41$ .

\* Sección 1.3.3.

En estas condiciones el método gráfico da una  $k_{\text{opt}} = 2,61$ , un poco elevada, y que nos permitiría detectar sólo cuatro bandas en el espectro desconvuludo y cinco en su segunda derivada. El método teórico da una  $k_{\text{opt}} = 2,13$  asumiendo condiciones de autodesconvolución, un valor un poco bajo, que permite detectar cinco bandas en el espectro desconvuludo y seis en su segunda derivada.



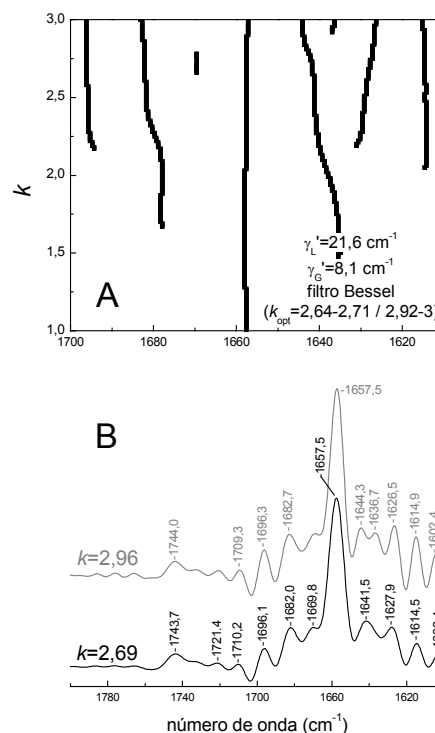
**Figura 1.14.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido en la segunda derivada del espectro desconvuludo, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvuludo con el factor de estrechamiento óptimo, y su segunda derivada.

intervalos óptimos que, en conjunto, consiguen resolver siete bandas en la amida I. Tenemos dos valores de  $k$  óptimos, que son  $k_{\text{opt}} = 2,69$  y  $k_{\text{opt}} = 2,96$ . Sus espectros se muestran en la figura 1.15B.

El método gráfico nos proporciona, en estas condiciones, una  $k_{\text{opt}} = 3,25$ , que resulta excesiva, mientras que con el método teórico se llega a  $k_{\text{opt}} = 2,63$ , adecuada para detectar seis bandas.

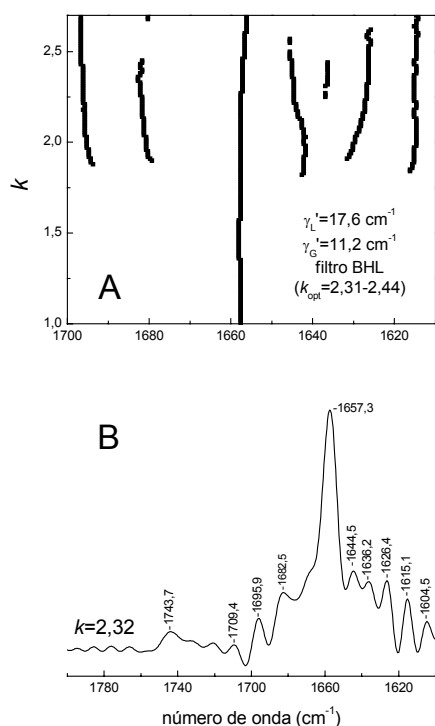
Finalmente probamos desconvular con una Voigtiana de  $\gamma_L' = 17,6 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 11,2 \text{ cm}^{-1}$ . Cuando el filtro es BHL se detectan seis bandas en la zona de la amida I (figura 1.16), con una  $k_{\text{opt}} = 2,32$  (método gráfico  $k_{\text{opt}} = 2,50$ , método teórico  $k_{\text{opt}} = 1,87$ ). Para el filtro Bessel se detectan siete bandas (figura 1.17), con una  $k_{\text{opt}} = 2,68$  (método gráfico  $k_{\text{opt}} = 3,09$ , método teórico  $k_{\text{opt}} = 2,31$ ).

La figura 1.15A muestra las posiciones de las bandas detectadas en el espectro desconvuludo, utilizando un filtro Bessel. Se encuentran dos

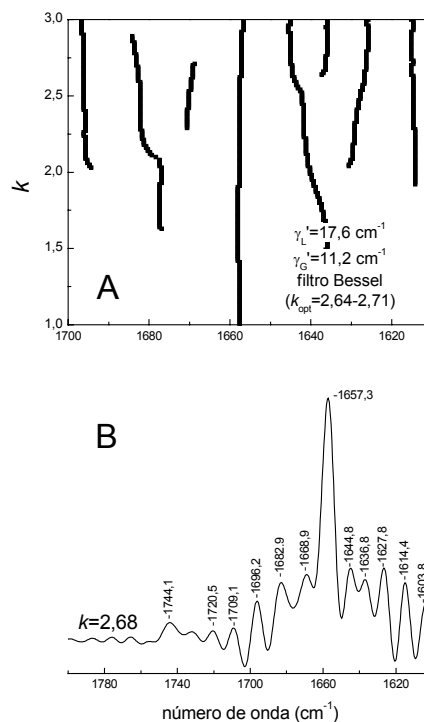


**Figura 1.15.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvular el espectro de la figura 1.3, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvuludos con dos factores de estrechamiento óptimos.

En conclusión, la desconvolución de Fourier es capaz de detectar seis bandas en la amida I cuando se desconvulva con una banda Lorentziana (o en ciertas condiciones con una banda Voigtiana). Cuando la desconvolución se realiza con bandas Voigtianas es posible detectar hasta siete bandas componentes en la amida I. Las posiciones de las bandas encontradas, junto con su variabilidad, se muestran en la tabla 1.1.



**Figura 1.16.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvular el espectro de la figura 1.3, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvulado con el factor de estrechamiento óptimo.



**Figura 1.17.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvular el espectro de la figura 1.3, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvulado con el factor de estrechamiento óptimo.

### 1.2.3.2. Desconvolución regularizada por máxima entropía

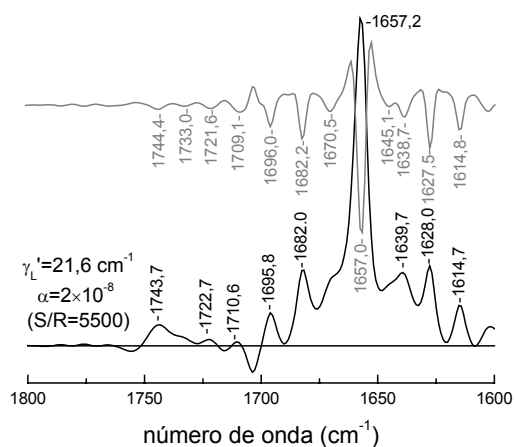
La figura 1.18 muestra el espectro de la figura 1.3 desconvulado con una Lorentziana de anchura  $\gamma' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ . El espectro desconvulado se obtuvo como se detalla en la sección 2.3.2 de Resultados Teóricos. Con el valor del regularizador utilizado en la desconvolución, la relación entre el máximo del espectro y la desviación estándar del residual es de 5500. Para que se cumpliera el criterio de  $\chi^2/N \approx 1$ , esta relación tendría que ser aproximadamente de 9000. Por lo tanto la solución presentada en la figura 1.18 ha de considerarse bastante conservadora.

La manera que utilizaremos para describir una desconvolución, es la relación entre el máximo del espectro original y la desviación estándar del residual de la desconvolución, que llamaremos la relación

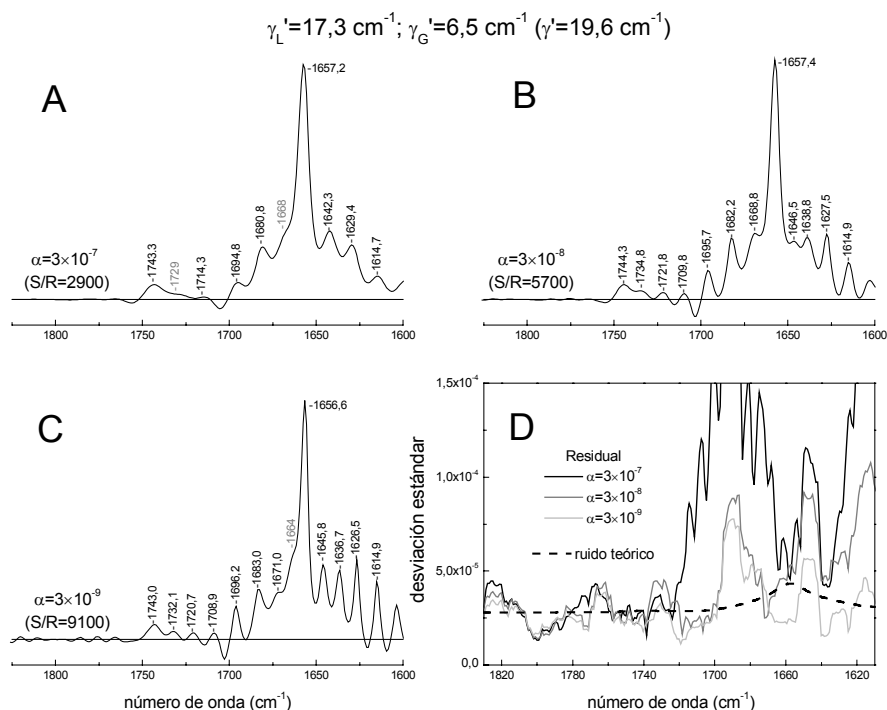
S/R de la desconvolución. Este valor se ha de interpretar como la relación S/R que tendría que tener un espectro para que ésta fuera la desconvolución adecuada en concordancia con el ruido.

En el espectro desconvuelto de la figura 1.18 se resuelven completamente cinco bandas en la amida I. Tras realizar la segunda derivada del espectro desconvuelto se hace evidente la presencia de siete bandas. Las posiciones de estas bandas son semejantes a las encontradas en la desconvolución de Fourier. Sin embargo en la desconvolución regularizada por máxima entropía estas siete bandas se han resuelto desconvolviendo sólo con una banda Lorentziana, además de mantener una apariencia mejor para el espectro desconvolviendo por Fourier (comparar con las figuras 1.11A y 1.12A). Por lo tanto, la desconvolución por máxima entropía representa una mejora evidente respecto a la de Fourier.

Posteriormente, la desconvolución pasó a



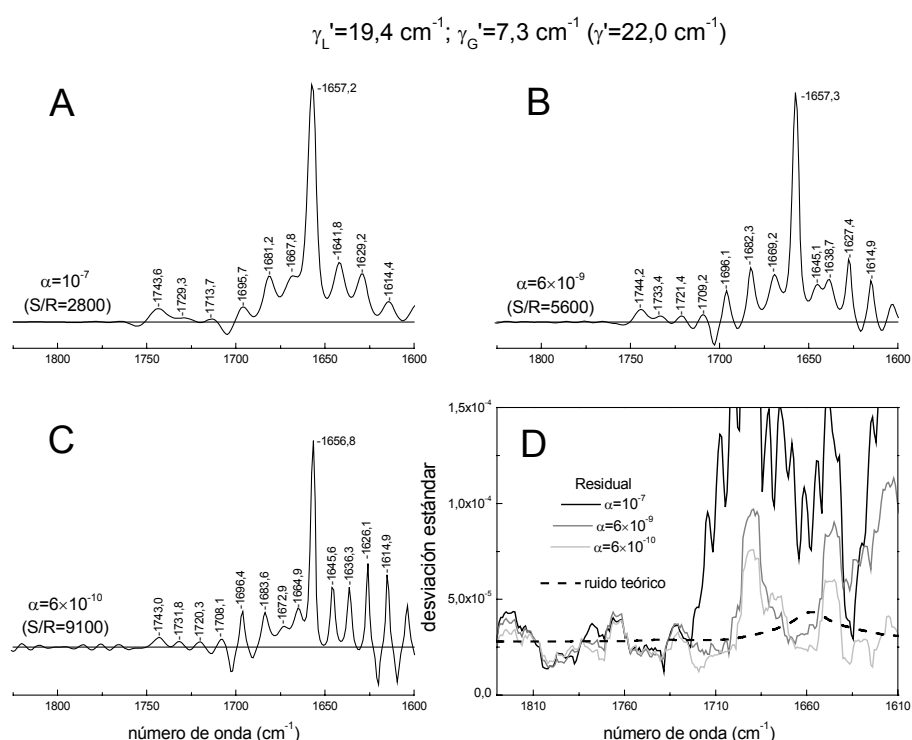
**Figura 1.18.** Espectro de la figura 1.3 desconvuelto por máxima entropía (entropía  $S_2$  generalizada para soluciones sin restricción de signo), y su segunda derivada. Se indica la relación S/R correspondiente a la desconvolución



**Figura 1.19.** (A-C) Espectros desconvueltos por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual en la desconvolución junto con la desviación estándar teórica del ruido en el espectro.

realizarse utilizando una banda Voigtiana. Como la forma de las bandas sobredesconvuladas se ven muy perjudicadas en este método, se decidió desconvular para bandas más estrechas de las esperadas en la amida I.

Assumiendo que las bandas de la amida I tienen una anchura Lorentziana  $\gamma_L = 21,6 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gaussiana  $\gamma_G = 8,1 \text{ cm}^{-1}$ , se realizaron las siguientes desconvoluciones:  $\gamma_L' = 19,4 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 7,3 \text{ cm}^{-1}$  (factor de desconvolución \*  $f = 1,1$ );  $\gamma_L' = 17,2 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 6,5 \text{ cm}^{-1}$  ( $f = 1,25$ ); y  $\gamma_L' = 13,0 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 4,9 \text{ cm}^{-1}$  ( $f = 1,65$ ). También se asumió que para las bandas de la amida I  $\gamma_L = 17,6 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G = 11,2 \text{ cm}^{-1}$ , y se desconvuló con  $\gamma_L' = 14,1 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 9,0 \text{ cm}^{-1}$  ( $f = 1,25$ ).

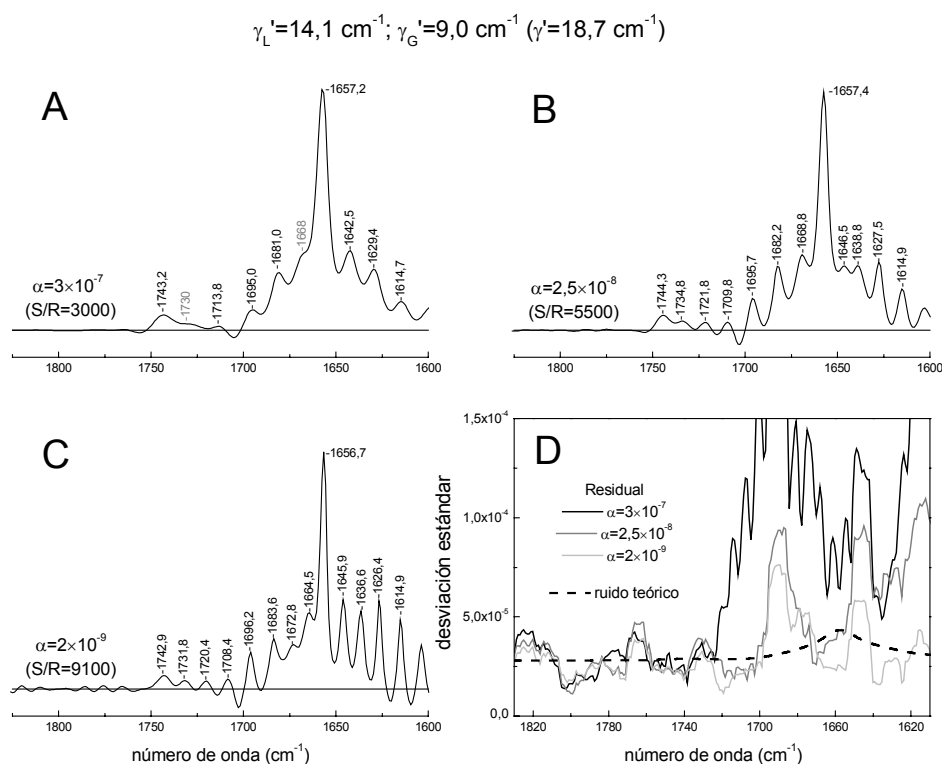


**Figura 1.20.** (A-C) Espectros desconvulados por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual en la desconvolución junto con la desviación estándar teórica del ruido en el espectro.

La figura 1.19 muestra los resultados al desconvular con una banda Voigtiana de  $\gamma_L' = 17,2 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 6,5 \text{ cm}^{-1}$  con tres valores del regularizador diferentes. El más alto correspondería a la desconvolución óptima si la relación S/R de la amida I fuera de 2900 (figura 1.19A). Por lo tanto en nuestro caso es una desconvolución extremadamente conservadora. Se evidencian cinco bandas en la amida I y otra banda es aparente. La desconvolución que corresponde a una relación S/R = 5700 es todavía conservadora (figura 1.19B), sin embargo, la presencia de siete bandas en la amida I es clara, sin necesidad de una segunda derivada. La desconvolución que corresponde a una relación S/R = 9100

\* Ver ecuación 1.9 de Resultados Teóricos.

(figura 1.19C) tendría que considerarse la más adecuada, sin embargo, la presencia de ruido en la solución se hace patente. Aparecen siete bandas resueltas, y se adivina la presencia de una nueva banda a  $\approx 1666$   $\text{cm}^{-1}$ . Estos resultados pueden estar comprometidos por la interpretación de ruido como señal en el proceso de desconvolución.



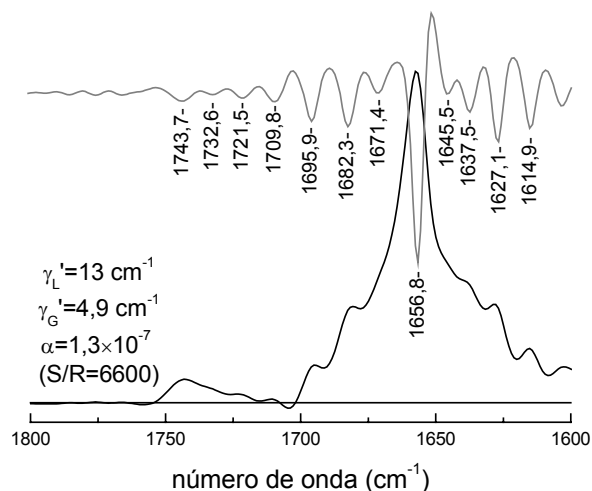
**Figura 1.21.** (A-C) Espectros desconvueltos por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual en la desconvolución junto con la desviación estándar teórica del ruido en el espectro.

La figura 1.19D muestra la desviación estándar teórica del ruido del espectro en función del número de onda, obtenida como se describe en Materiales y Métodos. Para una desconvolución perfecta, la desviación estándar de su residual se asemejaría a esta curva. La semejanza no sería perfecta, pues la desviación estándar teórica del ruido sólo tiende a la teórica para un número muy grande de replicados.

Para las diferentes desconvoluciones mostradas, se calculó la desviación estándar del residual en función del número de onda, promediando con una ventana de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ , para reducir las fluctuaciones de la desviación estándar (suavizarla).

Para la desconvolución más conservadora, la desviación estándar del residual en la amida I es siempre superior a la del ruido esperado, sugiriendo que para todos los números de onda hay señal que se interpreta como ruido, y que por lo tanto, está siendo desaprovechada. La siguiente desconvolución da un residual en el intervalo  $1673\text{-}1669 \text{ cm}^{-1}$  inferior al ruido esperado. En este intervalo posiblemente hay ruido que se está interpretando como señal, mientras que en el resto de la amida I continúa

desaprovechándose información. La última desconvolución muestra dos zonas en la amida I en las que posiblemente se está interpretando ruido como señal:  $1671-1652\text{ cm}^{-1}$  y  $1641-1622\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 1.22.** Espectro desconvulso por máxima entropía, y su segunda derivada.

Estos resultados sugieren que la presencia de siete bandas en la amida I es clara. Cuando la desconvolución se fuerza más, se hace aparente una nueva banda a  $1664\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, al aparecer en la zona entre  $1671-1652\text{ cm}^{-1}$  cabe la posibilidad, que no la seguridad, que esté inducida por el ruido y que no sea real.

La figura 1.20 es semejante a la figura 1.19 pero desconvulso con  $\gamma_L' = 19,4\text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 7,3\text{ cm}^{-1}$ . A medida que se fuerza la desconvolución se resuelven seis, siete o nueve bandas en la zona de la amida I. La figura 1.21

se ha obtenido al desconvulso con  $\gamma_L' = 14,1\text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 9,0\text{ cm}^{-1}$ , con resultados semejantes.

Como muestra de una desconvolución en la que la ausencia de bandas sobredesconvulsadas está bastante asegurada, se desconvulso con  $\gamma_L' = 13,0\text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 4,9\text{ cm}^{-1}$  (anchura de la banda  $14,7\text{ cm}^{-1}$ ). El resultado de la desconvolución corresponde a una relación S/R igual a 6600, y se muestran en la figura 1.22. Debido a que nos hallamos, con toda probabilidad, en condiciones de una importante infradesconvolución, el estrechamiento conseguido no es muy importante. Sólo se resuelven con claridad cuatro bandas en la amida I, aunque se intuye la presencia de tres bandas más. La segunda derivada del espectro desconvulso hace presentes siete bandas en la amida I.

DF		DRME		DFPL
Seis bandas	Siete bandas	Siete bandas	Ocho bandas	Ocho bandas
1696,1±0,5	1696,2±0,2	1695,9±0,2	1696,3±0,1	1696,4±0,2
1681,5±0,9	1683,0±0,4	1682,2±0,1	1683,3±0,3	1684,6±1,2
1671,2±2,0	1670,0±0,8	1669,7±1,2	1672,2±1,1	1675,7±1,7
			1664,5±0,5	1665,8±0,9
1657,6±0,2	1657,3±0,1	1657,2±0,3	1656,7±0,1	1657,4±0,05
	1644,4±0,3	1645,7±0,7	1645,8±0,2	1647,4±0,4
1641,2±0,4	1636,6±0,2	1638,5±0,6	1636,5±0,2	1637,7±0,1
1628,7±1,2	1626,7±0,6	1627,4±0,2	1626,3±0,2	1627,0±0,1

**Tabla 1.1.** Recopilación de las posiciones de las bandas detectadas en la amida I del Anc2pHis solubilizado en película seca. Los métodos utilizados son la desconvolución de Fourier (DF), la desconvolución regularizada por máxima entropía (DRME) y la desconvolución de Fourier seguida de predicción lineal (DFPL).

En resumen, la desconvolución regularizada por máxima entropía detecta con claridad siete bandas en la zona de la amida I. Es posible llegar a la resolución de ocho bandas en la amida I, aunque parece encontrarse cerca del límite de detección impuesto por la presencia de ruido. La tabla 1.1 presenta las posiciones encontradas para las bandas de la amida I.

### 1.2.3.3. Desconvolución de Fourier y predicción lineal

La desconvolución de Fourier se puede combinar con la predicción lineal para obtener estrechamiento de bandas (ver punto 3 de Resultados Teóricos). Una vez deapodizado el interferograma (equivale a desconvular el espectro) una sección de éste (entre 0 y  $l$  cm) se extrapola mediante predicción lineal hasta una distancia que corresponde al factor de estrechamiento deseado. La figura 1.23 muestra una serie de resultados obtenidos desconvulando con  $\gamma_L' = 19,4 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 7,3 \text{ cm}^{-1}$ , y aplicando un factor de estrechamiento de  $k_{PL} = 5$  (el resto de parámetros implicados se detallan en la figura).

Las desconvoluciones de la figura 1.23 muestran diferentes valores de  $l$  (punto de corte del interferograma experimental). En teoría, esta elección afecta sólo a la relación S/R en el espectro desconvulado, aunque en la práctica también afecta al estrechamiento efectivo que sufrirán las bandas. En la figura 1.23, a todos los espectros se les aplicó un estrechamiento  $k_{PL} = 5$ , pero se utilizaron valores de  $l$  de 0,06, 0,08, 0,09 y 0,10 cm. Se observa como al aumentar el valor de  $l$  los espectros aparecen más ruidosos, lo cual se debe a que al aumentar  $l$  se utilizan valores del interferograma con peor relación S/R. También es evidente el mayor estrechamiento obtenido con mayores valores de  $l$ . Así, para  $l = 0,06$  cm se resuelven cuatro bandas en la amida I, para  $l = 0,08$  y 0,09 cm se resuelven seis bandas, y finalmente para  $l = 0,10$  cm se resuelven ocho bandas. Para  $l = 0,11$  cm también se resuelven ocho bandas en la amida I, pero el ruido en el espectro final es excesivo (no mostrado).

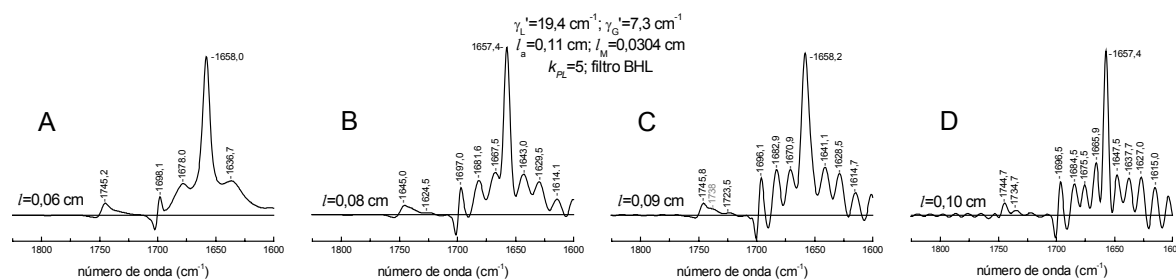
La dependencia del estrechamiento obtenido en función del valor de  $l$ , está causada por el hecho que la función de respuesta al impulso\* utilizada no es la teórica, sino que se obtiene a partir de los datos experimentales. La manera que nosotros hemos considerado adecuada para obtener la función de respuesta al impulso a partir de los datos experimentales se describe en la sección 3 de Resultados Teóricos. Brevemente, una parte del interferograma deapodizado, de longitud  $l_a$ , se divide en dos. La primera parte ha de predecir la segunda parte. La función de respuesta al impulso es aquella que permite que la predicción y los valores reales se asemejan más. Esta manera de obtener la función de respuesta al impulso es muy sensible al ruido en el interferograma y al hecho que éste no es uniforme a causa de la deapodización. Nuestra solución a ambos problemas se ha detallado en el punto 3 de Resultados Teóricos, con las siguientes conclusiones: Conviene utilizar un segmento del interferograma deapodizado que sea lo más grande posible, pero en el que el ruido sea suficientemente pequeño respecto a la señal, es decir,  $l_a$  ha de ser un poco menor que la distancia a la que el ruido supera la señal. El hecho de obtener la función de

---

\* La función de respuesta al impulso es la función que nos dice en que proporciones hemos de combinar los datos conocidos del interferograma para obtener los no medidos, es decir para extrapolar (ver Apéndice 5).



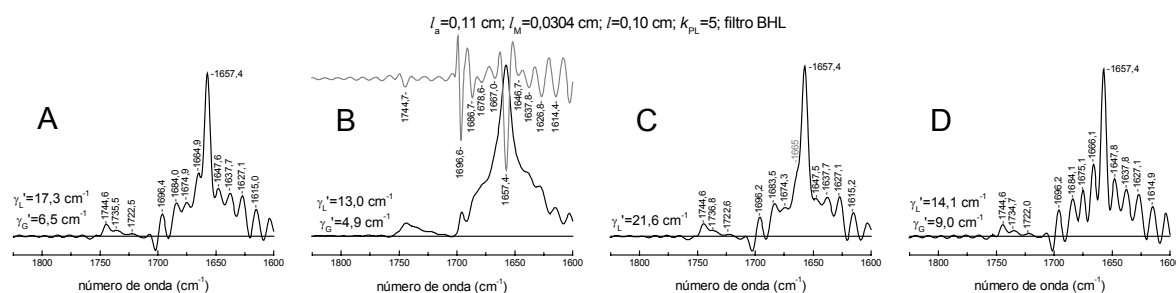
respuesta al impulso mediante una solución regularizada tiene como consecuencia que la señal predicha se extinguirá eventualmente. Es decir, el estrechamiento obtenido será menor del que se obtendría a partir de la función de respuesta al impulso teórica. La señal predicha se extinguirá más lentamente cuanto mayor es el segmento a partir del cual se realiza la predicción. Es por ello que con mayores valores de  $l$  se obtienen mayores estrechamientos.



**Figura 1.23.** Espectros estrechados mediante desconvolución y predicción lineal. Las cuatro desconvoluciones muestran la variación del resultado en función del punto del interferograma donde se inicia la predicción ( $l$ ).

En nuestro caso la señal se sumerge en el ruido a distancias mayores de 0,126 cm. Por ello para obtener la función de respuesta al impulso se ha utilizado una longitud del interferograma  $l_a = 0,11$  cm. Es necesario, al mismo tiempo, fijar la longitud de la función de respuesta al impulso,  $l_M$ . Esta longitud determina el número de puntos del interferograma utilizados para predecir el siguiente valor, y ha de cumplir que  $l_M \leq l$  y  $l_M \leq l_a/2$ . Para nuestro caso hemos elegido  $l_M = 0,0304$  cm.

Finalmente cabe elegir el valor del regularizador. Este valor ha de ser el menor valor posible que produzca una predicción estable. Una solución no estable es muy fácil de detectar, pues los valores predichos comienzan a crecer de amplitud con enorme velocidad superando en varios órdenes de magnitud la amplitud de los valores iniciales. En el espectro esto tiene como consecuencia grandes oscilaciones de alta frecuencia.



**Figura 1.24.** Espectros estrechados mediante desconvolución y predicción lineal. Las cuatro desconvoluciones muestran la variación del resultado en función de las anchuras utilizadas para desconvolar.

Una vez descritos los parámetros envueltos en la predicción lineal, volvemos a la figura 1.23. El nivel de ruido en el espectro permite trabajar con  $l = 0,10$  cm, que nos permite resolver ocho bandas en la amida I. En condiciones de mayor ruido,  $l$  tendría que ser menor, lo que nos llevaría a detectar sólo seis

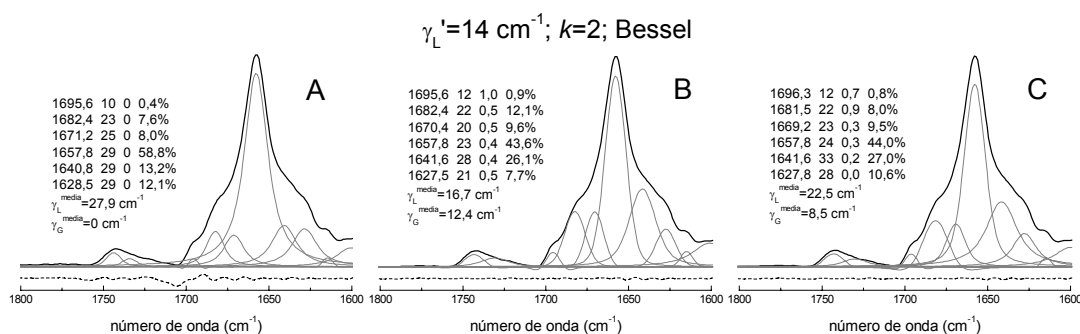
bandas en la amida I. Esto nos lleva a pensar que bien podría ser que con un espectro de mayor calidad resolviéramos más de ocho bandas.

La figura 1.24 muestra los resultados obtenidos con diferentes anchuras de desconvolución. Es interesante observar que con todas ellas es posible detectar ocho bandas en la amida I (en algunos casos hay que recurrir a la segunda derivada del espectro desconvuldo), incluso desconvuldo sólo el carácter Lorentziano.

En resumen, la combinación de la desconvolución y la predicción lineal permite detectar ocho bandas en la zona de la amida I. Las posiciones de las bandas se dan en la tabla 1.1.

#### 1.2.4. Determinación de los parámetros de las bandas componentes

Para determinar los parámetros de las bandas detectadas en la amida I utilizaremos el ajuste de bandas. Principalmente nos interesa el área y posición de las bandas, pues ambos valores serán utilizados para obtener una estimación de los porcentajes de estructura secundaria, así como otras informaciones estructurales. Es también interesante obtener el valor de la anchura de las bandas y del carácter Lorentziano/Gausiano. Esto nos puede ayudar a validar los resultados obtenidos con los métodos para estimar estos valores *a priori*, así como para diseñar mejores condiciones para estrechar las bandas.



**Figura 1.25.** Ajuste de espectro desconvuldo por Fourier del Anc2pHis solubilizado utilizando seis bandas en la amida I, y ajustando con (A) bandas Lorentzianas desconvuldas, (B) bandas Voigtianas (de anchura Gaussiana común) desconvuldas y (C) bandas Voigtianas desconvuldas. Se muestran los parámetros del ajuste y las anchuras medias ponderadas al área de las bandas amida I. El residual del ajuste se muestra desplazado y en línea discontinua.

En primer lugar, consideraremos el ajuste de los espectros desconvuldos en el espacio de Fourier. Antes de realizar el ajuste, es necesario ciertas asunciones sobre el número de bandas y su forma. Además, para obtener ajustes más fiables y robustos es conveniente restringir los valores de las posiciones de las bandas a un cierto intervalo razonable.

Respecto a la forma de las bandas, hemos efectuado tres tipos de asunciones: (a) Las bandas son Lorentzianas; (b) Las bandas son Voigtianas pero la anchura Gaussiana de las bandas asignadas a la amida

I es común; y (c) Todas las bandas son Voigtianas, sin ningún parámetro ligado. El ajuste con las opciones (b) y (c) se realiza a partir del ajuste obtenido con la asunción (a).

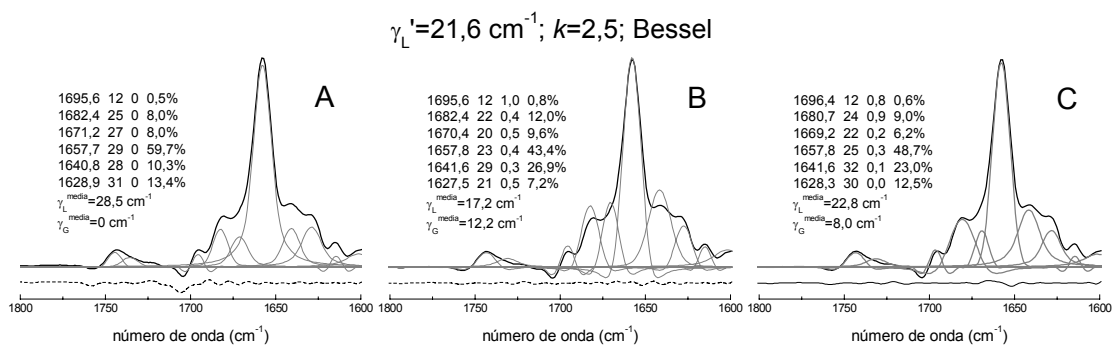


Figura 1.26. Igual a la figura 1.25 pero con otros parámetros de desconvolución.

El ajuste para seis bandas en la amida I se muestra en las figuras 1.25 y 1.26. Las posiciones de las bandas iniciales utilizadas son las obtenidas en la desconvolución de Fourier y recopiladas en la tabla 1.1. Los valores de las posiciones durante el ajuste se restringieron a un intervalo de 4 veces la desviación estándar de las posiciones de las bandas encontradas por la desconvolución de Fourier (ver tabla 1.1). Los parámetros de las bandas ajustadas que se asignan a la amida I se muestran en cada ajuste, así como su anchura media Lorentziana y Gaussiana. La figura 1.25 muestra los resultados al ajustar un espectro desconvuelto con  $\gamma_L' = 14 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2$  y un filtro Bessel. La figura 1.26 muestra los resultados al ajustar

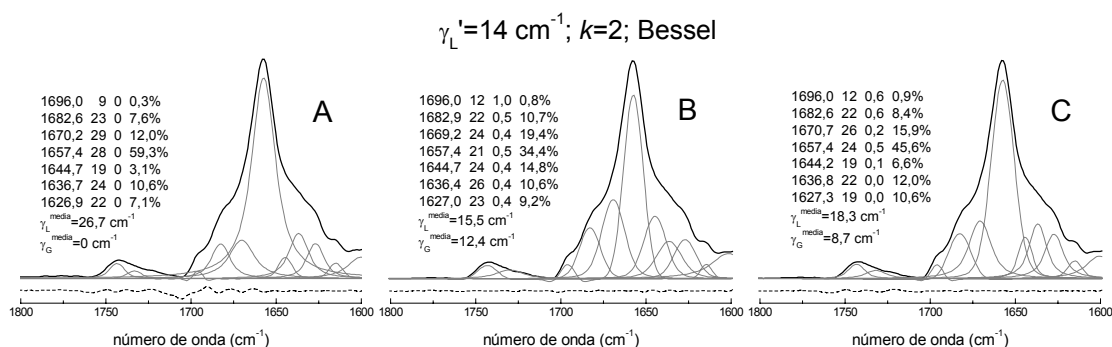
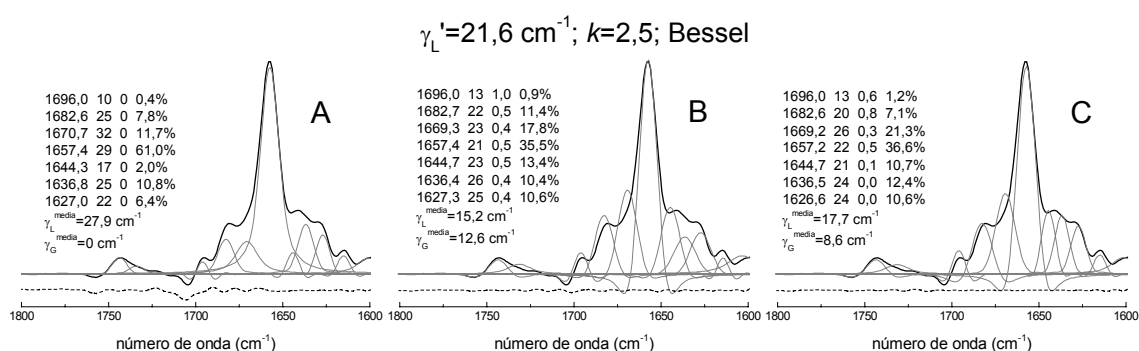


Figura 1.27. Ajuste de espectro desconvuelto por Fourier del Anc2pHis solubilizado, utilizando siete bandas en la amida I, y ajustando con (A) bandas Lorentzianas desconvueltas, (B) bandas Voigtianas (de anchura Gaussiana común) desconvueltas y (C) bandas Voigtianas desconvueltas. Se muestran los parámetros del ajuste y las anchuras medias ponderadas al área de las bandas amida I.

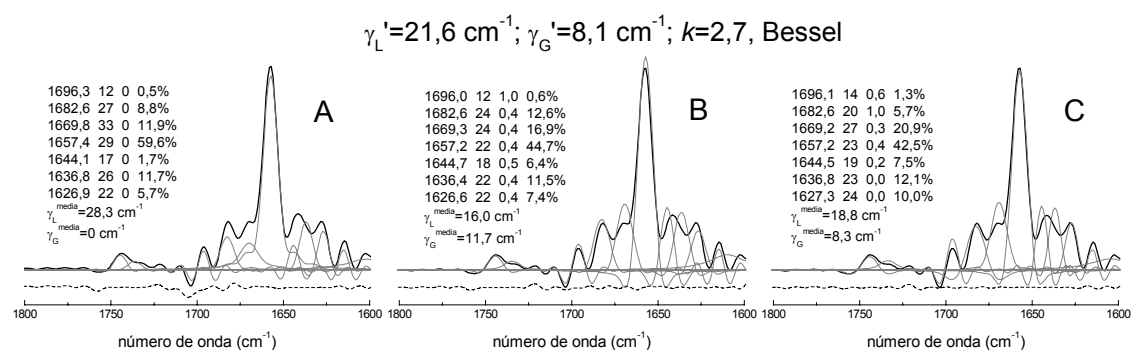
un espectro desconvuelto con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,5$  y un filtro Bessel. Se observa que el resultado del ajuste es bastante sensible a las asunciones respecto a la forma de las bandas. Por otro lado, al comparar los resultados del ajuste entre la figura 1.25 y 1.26 se observa que el uso de diferentes parámetros de desconvolución tiene un efecto menor en los resultados del ajuste. En las Conclusiones Generales se hablará más sobre este hecho.

En algunos de los ajustes aparecen bandas con contribuciones negativas. Esto implica que la banda ajustada corresponde a una banda que ha sido sobredesconvulada, y de ahí el sentido matemático de estas contribuciones negativas. Como mostramos en el punto 4.2.1.2. y en las figuras 4.23A y 4.24B y C de Resultados Teóricos, esta situación no afecta a la capacidad del ajuste de proporcionar los parámetros correctos de las bandas componentes de un espectro.

El ajuste para siete bandas se muestra en las figuras 1.27, 1.28 y 1.29. Las posiciones utilizadas y su incertidumbre son de nuevo las obtenidas mediante la desconvolución de Fourier (tabla 1.1). La figura 1.27 muestra los resultados para una desconvolución con parámetros  $\gamma_L' = 14 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2$  y un filtro Bessel; la figura 1.28 con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,5$  y un filtro Bessel; y la figura 1.29 con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\gamma_G' = 8,1 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,7$  y un filtro Bessel.

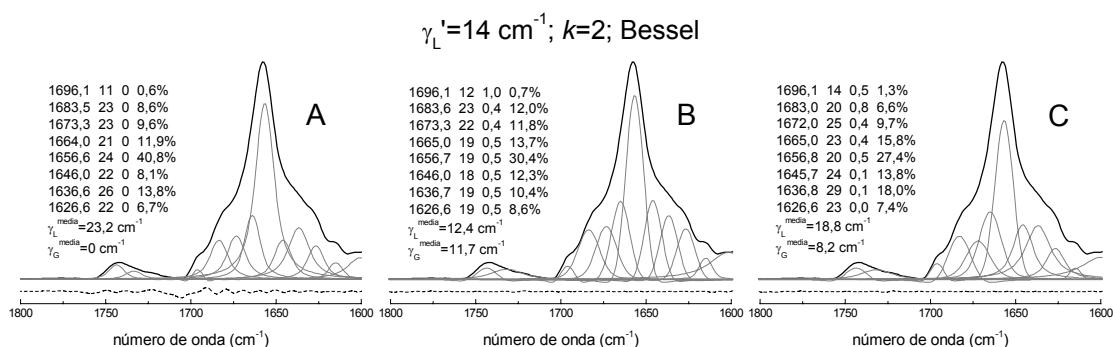


**Figura 1.28.** Igual a la figura 1.27 pero con otros parámetros de desconvolución.

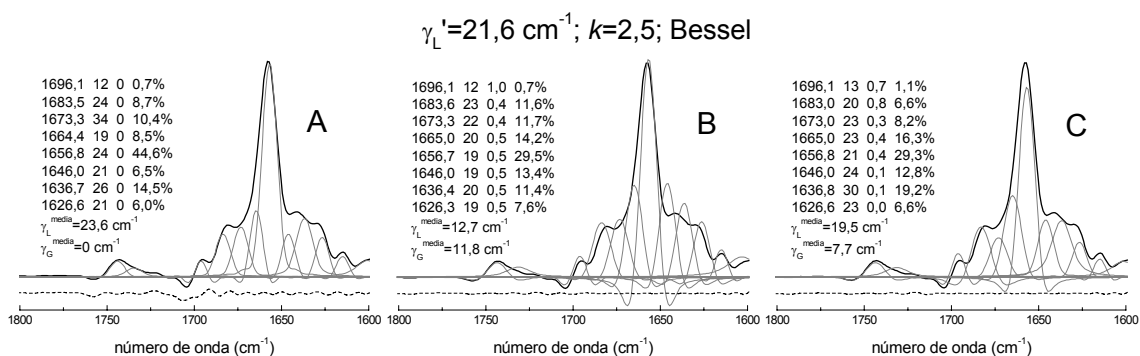


**Figura 1.29.** Igual a la figura 1.27 pero con otros parámetros de desconvolución.

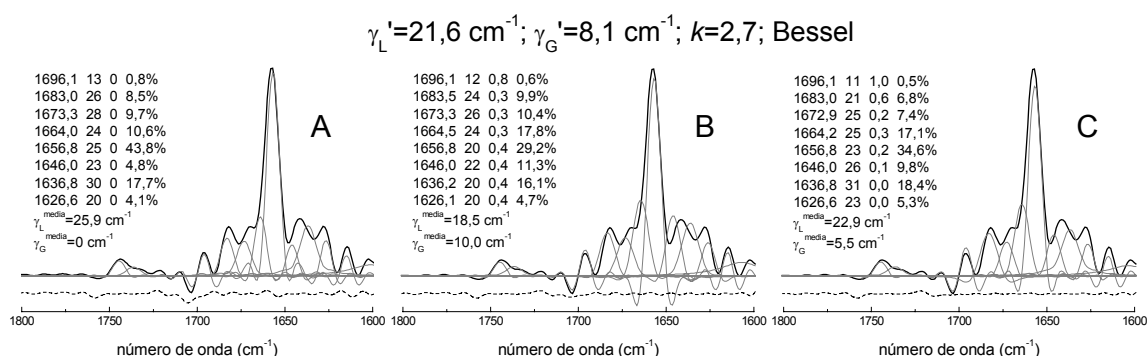
Para el ajuste con ocho bandas, los valores utilizados para las posiciones han sido los obtenidos en la desconvolución regularizada por máxima entropía. Hemos preferido utilizar estos valores en vez de los obtenidos mediante desconvolución y predicción lineal, pues en nuestra experiencia con espectros sintéticos, las posiciones de las bandas resueltas mediante la desconvolución regularizada por máxima entropía son más fiables. La figura 1.30 muestra los resultados con una desconvolución con parámetros  $\gamma_L' = 14 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2$  y un filtro Bessel; la figura 1.31 con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,5$  y un filtro Bessel; y la figura 1.32 con  $\gamma_L' = 21,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\gamma_G' = 8,1 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,7$  y un filtro Bessel.



**Figura 1.30.** Ajuste de espectro desconvoluto por Fourier del Anc2pHis solubilizado, utilizando ocho bandas en la amida I, y ajustando con (A) bandas Lorentzianas desconvolutas, (B) bandas Voigtianas (de anchura Gaussiana común) desconvolutas y (C) bandas Voigtianas desconvolutas. Se muestran los parámetros del ajuste y las anchuras medias ponderadas al área de las bandas amida I.



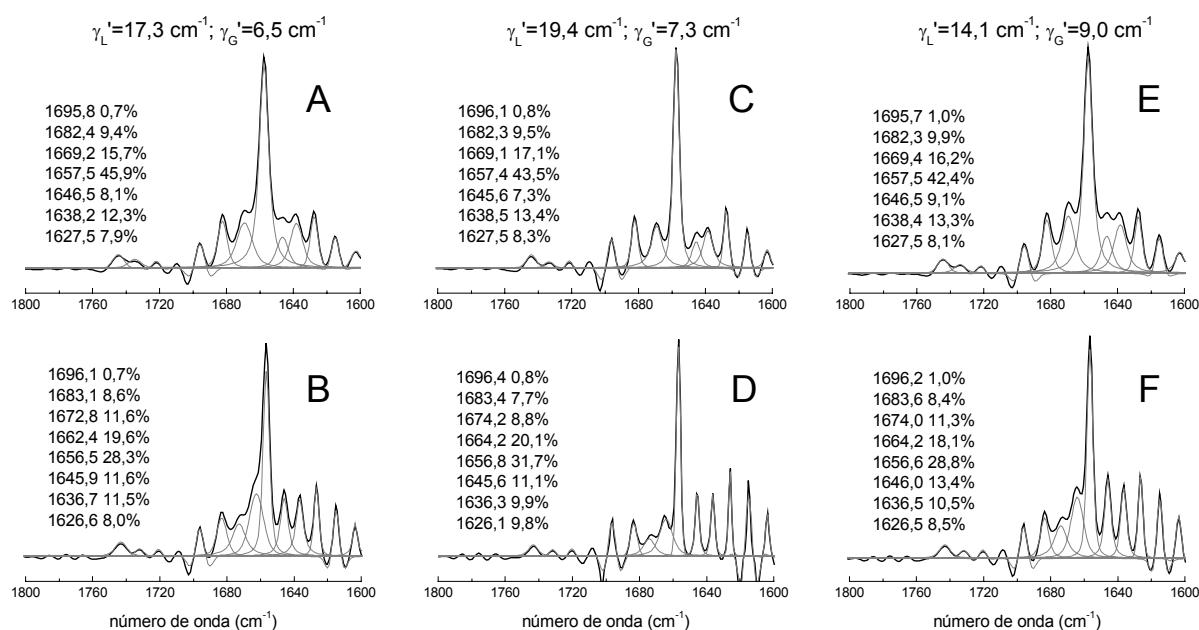
**Figura 1.31.** Igual a la figura 1.30 pero con otros parámetros de desconvolución.



**Figura 1.32.** Igual a la figura 1.30 pero con otros parámetros de desconvolución.

Los ajustes realizados en los espectros desconvolutos en el espacio de Fourier requieren limitar la posición de las bandas durante el ajuste, y son relativamente sensibles a la forma asumida de las bandas. Esto se debe a que los espectros ajustados no están estrechados de manera suficiente como para que el ajuste muestre el adecuado condicionamiento. Por el contrario, las desconvoluciones por máxima entropía

y predicción lineal muestran espectros muy estrechados. Por ello estos espectros fueron ajustados sin restringir el valor de la posición de las bandas durante el ajuste.

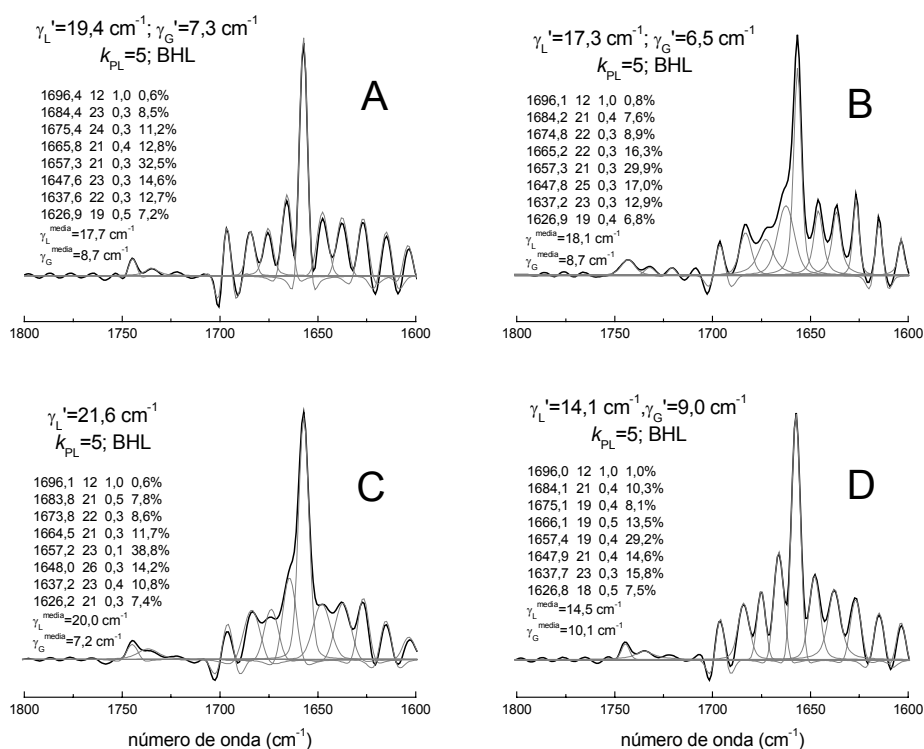


**Figura 1.33.** Ajuste de espectros desconvulados por máxima entropía, utilizando siete bandas en la amida I (A, C y E), u ocho bandas (B, D y F).

La figura 1.33 muestra el ajuste de los espectros desconvulados mediante máxima entropía, utilizando siete o ocho bandas. Estrictamente, no existen bandas adecuadas para realizar el ajuste, y hemos asumido que las bandas Voigtianas son, en cierta medida, adecuadas. El error introducido por esta aproximación se verá minimizado a medida que las bandas aparecen más resueltas. Los resultados de los ajustes confirman lo obtenido en los ajustes de los espectros desconvulados en el espacio de Fourier ajustados utilizando bandas Voigtianas desconvuladas, con y sin anchura Gaussiana ligada.

La figura 1.34 muestra el ajuste de cuatro espectros desconvulados utilizando la predicción lineal. En este caso se puede utilizar el tipo de bandas correctas en el ajuste, siempre asumiendo que la predicción es perfecta. El ajuste se realizó asumiendo que las bandas originales son bandas Voigtianas. En cada ajuste se muestran los resultados obtenidos.

Los resultados de las figuras 1.33 y 1.34 nos sirven para confirmar los resultados obtenidos con el ajuste de los espectros desconvulados por Fourier, pero son los resultados de los ajustes de los espectros desconvulados por Fourier los que consideramos más fiables. Tal como detallaremos y justificaremos en el punto 1 de la Discusión General, consideraremos el ajuste más fiable el realizado utilizando el número máximo de bandas detectadas y asumiendo que las bandas de la amida I tienen forma Voigtiana sin anchura Gaussiana común. Esto es, los ajustes de las figuras 1.30C, 1.31C y 1.32C, y sus parámetros correspondientes.



**Figura 1.34.** Ajuste de espectros estrechados mediante desconvolución y predicción lineal, utilizando ocho bandas en la amida I.

### 1.2.5. Asignaciones de las bandas del Anc2pHis inhibido y solubilizado en DM

La tabla 1.2 muestra los parámetros de las bandas obtenidos para el transportador Anc2pHis solubilizado, junto con las asignaciones realizadas. A continuación entramos en detalles sobre el proceso de asignación. Las asignaciones realizadas se basan en los datos recopilados en el Apéndice 6 y en las referencias allí citadas.

**Banda a  $1696 \text{ cm}^{-1}$  (1% del área):** la banda a  $1696 \text{ cm}^{-1}$  aparece con una posición y anchura ( $12 \text{ cm}^{-1}$ ) propia del modo  $B_1$  de láminas beta antiparalelas planas. El modo  $B_2$ , con un área unas diez veces superior, suele aparecer entre  $1635\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$ . Por ello la banda a  $1627 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\approx 6$  veces mayor que la de  $1696 \text{ cm}^{-1}$  se asignará a este componente. Esta banda puede tener contribución de giros reversos de aproximadamente 0,4% de área.

**Bandas a  $1683 \text{ cm}^{-1}$  (7% del área) y  $1673 \text{ cm}^{-1}$  (8% del área):** La asignación más probable es a giros reversos. A  $1673 \text{ cm}^{-1}$  son las únicas estructuras que pueden dar bandas en estas posiciones, y a  $1683 \text{ cm}^{-1}$  sólo el componente  $B_1$  de las láminas beta antiparalelas onduladas podría contribuir, pero en cualquier caso de una manera muy pequeña. La asignación a giros reversos viene apoyada por su intensidad semejante, coherente con una contribución relativamente uniforme entre  $1685$  y  $1670 \text{ cm}^{-1}$ .

**Banda a  $1664 \text{ cm}^{-1}$  (17% del área):** Su asignación es ambigua. Respecto a las estructuras estándares, tenemos que se encuentra en una zona con contribución de giros reversos. La contribución de giros

reversos a  $1664\text{ cm}^{-1}$  tendrá que ser semejante o inferior a la de las bandas a  $1683$  y  $1673\text{ cm}^{-1}$ . Como consecuencia, el área de esta banda sólo podrá asignarse a giros reversos parcialmente. Sólo un poco menos de la mitad del área de esta banda,  $\approx 8\%$ , es asignable a giros reversos. El resto, un  $9\%$ , ha de asignarse a otra estructura.

No parece adecuado asignar este  $9\%$  a hélices alfa o a estructuras al azar, pues estarían bastante alejadas de sus posiciones habituales. Las láminas beta paralelas tendrán un modo de vibración, el A, sobre  $1670\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$  (el modo A de las láminas beta antiparalelas no es activo en IR). Este componente es unas diez veces de menor intensidad que el modo de vibración, B, que aparecerá entre  $1640\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$ . Por ello, como máximo, sólo el  $2\text{-}1\%$  podría asignarse a este componente. El resto, un  $8\text{-}7\%$  ha de asignarse a otra estructura.

Respecto a estructuras menos habituales, tenemos a las hélices  $\alpha_{II}$ , que aparecen cerca de esta posición. En principio, somos reticentes a asignar esta banda a hélices  $\alpha_{II}$ , pues es una estructura que por ahora sólo se ha propuesto en la bacteriorodopsina, y no en todas las condiciones (Torres et al., 1995).

Por otro lado, una de las asignaciones propuestas para las hélices  $3_{10}$  las sitúa cerca de esta posición. Las hélices  $3_{10}$  son estructuras generalmente poco abundantes, pero podrían tener cierta presencia en el transportador ADP/ATP si los tres últimos y primeros residuos de las hélices transmembrana adoptaran esta conformación. También podría aparecer aislada o junto a hélices alfa en dominios solubles.

Considerando una longitud media de las hélices transmembrana de 25 aminoácidos, un máximo de un  $25\%$  de las supuestas hélices transmembrana podría adoptar una conformación  $3_{10}$ . Aceptando un  $40\%$  de hélices transmembrana, tendríamos un  $10\%$  de hélices transmembrana  $3_{10}$  y un  $30\%$  de hélices transmembrana alfa. Esta asignación parece atractiva. Sin embargo, la asignación de hélices  $3_{10}$  entre  $1665\text{-}1655\text{ cm}^{-1}$  es discutida, y ciertos resultados, que nos resultan más convincentes, apuntan a que ésta aparecerá entre  $1645\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ . Por ello no apoyamos una asignación total o parcial de esta banda a hélices  $3_{10}$ , aunque no es totalmente descartable.

Finalmente, hay evidencias que apuntan que grandes lazos podrían contribuir entre  $1665\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ . Esta asignación sería coherente con el trabajo realizado con el Anc2pHis no inhibido (Lórenz-Fonfría et al., 2003). La proteína no inhibida sufre una inactivación en la que pierde la capacidad de unir sustratos e inhibidores. Esta inactivación va acompañada de la desaparición de una banda a  $1662\text{ cm}^{-1}$  y a la aparición de dos bandas a  $1627$  y  $1696\text{ cm}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que el papel de los lazos topológicos mitocondriales en la unión y transporte de los sustratos ha sido extensamente documentada, se asignó la banda a  $1662\text{ cm}^{-1}$  a un lazo largo que se agrega para forman láminas beta antiparalelas, llevando consigo la inactivación del transportador (Lórenz-Fonfría et al., 2003). Que la banda que desaparece a  $1662\text{ cm}^{-1}$  corresponda a una estructura transmembrana es altamente improbable, pues según nuestro punto de vista su pérdida requeriría una gran reestructuración de la proteína, cosa que no se observa. Sí que sería posible que la banda a  $1662\text{ cm}^{-1}$  correspondiera a una estructura de dominio soluble diferente a un lazo largo. La única alternativa a un lazo largo que podría dar una única banda a  $1662\text{ cm}^{-1}$  serían hélices  $3_{10}$  en



dominios solubles (aceptado su aparición entre 1665-1655  $\text{cm}^{-1}$ ). Asignar el 8% a estructuras de lazos largos, corresponde a unos 26 aminoácidos (cada lazo topológico mitocondrial consta de 40 aminoácidos). Este número de aminoácidos parece algo excesivo para corresponder a hélices  $3_{10}$  en dominios solubles.

En resumen, nuestra asignación principal de esta banda es para giros reversos (8%) y grandes lazos (8%), y como alternativa a esta última asignación, hélices  $3_{10}$  en dominios globulares. La asignación minoritaria es para láminas beta paralelas ( $\leq 2\%$ ).

Posición	Anchura	<i>g</i>	Área	Asignación
1696	12	0.8	1	láminas $\beta$ antiparalelas (giros reversos)
1683	20	0.7	7	giros reversos (láminas $\beta$ antiparalelas)
1673	24	0.3	8	giros reversos
1665	24	0.4	17	giros reversos y lazos largos / hélices $3_{10}$ globulares (láminas $\beta$ paralelas)
1657	22	0.3	30	hélices $\alpha$ transmembrana (giros reversos, hélices $\alpha$ globulares, estructuras al azar)
1647	25	0.1	12	hélices $3_{10}$ y estructuras irregulares
1637	30	0.1	19	láminas $\beta$ y estructuras irregulares
1627	23	0	6	láminas $\beta$ antiparalelas

**Tabla 1.2:** Parámetros de las bandas y asignación para la película seca del Anc2pHis solubilizado. Entre paréntesis se indican contribuciones minoritarias y fuera de él las mayoritarias. La barra “/” separa dos posibles asignaciones. Para más detalle sobre la asignación ver el texto. La posición y anchura se dan en  $\text{cm}^{-1}$ , *g* es el factor Gaussiano de las bandas Voigtianas y el área se da en porcentaje relativo al total del área.

**Banda a 1657  $\text{cm}^{-1}$  (30% del área):** Su posición es típica de hélices alfa de proteínas de membrana. No puede excluirse que esta banda contenga alguna contribución de hélices alfa en dominios solubles, que aparecen sobre 1655-1650  $\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, si la asignación de hélices  $3_{10}$  entre 1665-1655  $\text{cm}^{-1}$  fuera correcta (la cual no apoyamos), éstas podrían tener contribución en esta banda. Sí que parece descartable una contribución relevante de estructuras al azar, que aparecen sobre 1658-1652  $\text{cm}^{-1}$ , pues la anchura de la banda es de unos 21  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que las estructuras al azar suelen generar bandas muy anchas ( $>35 \text{ cm}^{-1}$ ). Hay posibilidad de contribución de giros en este número de onda, pero de poca magnitud. Es de esperar que ésta sea menor del 4% (basándose en las contribuciones de giros reversos entre 1685-1670  $\text{cm}^{-1}$ ).

En resumen, asignamos la totalidad de esta banda a hélices alfa transmembrana, a pesar de varias posibles contribuciones menores (hélices alfa en dominio solubles, estructuras al azar y giros reversos).

**Banda a 1646  $\text{cm}^{-1}$  (12% del área):** Es una banda de difícil asignación, como la banda a 1664  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación a giros reversos o láminas beta antiparalelas no parece adecuada por su posición. Tampoco lo parece para estructuras al azar, pues la posición estaría desplazada a números de onda menores de lo habitual y la anchura de esta banda se sitúa sobre 25  $\text{cm}^{-1}$ , menor de lo que sería esperable si así lo fuera.

La posibilidad de asignar esta banda al modo  $E_1$  de las hélices transmembrana (la banda a  $1657\text{ cm}^{-1}$  sería entonces el modo A) parece descartable. Aunque la intensidad relativa sería la adecuada (A tres veces más intensa que  $E_1$ ), tanto la teoría como los resultados en Raman apuntan a que la separación entre ambos modos será en la práctica menor de  $4\text{ cm}^{-1}$ , y no de  $11\text{ cm}^{-1}$  como se requeriría.

Según nuestra opinión, las asignaciones más plausibles son para hélices  $3_{10}$ , estructuras irregulares, láminas beta paralelas y/o a hélices fuertemente hidratadas o de baja estabilidad (por este orden).

Las hélices  $3_{10}$  se han asignado en proteínas globulares estudiadas en  $\text{H}_2\text{O}$  a  $1643\text{ cm}^{-1}$ . Asignando la mayor parte de esta banda a hélices  $3_{10}$  (y no asignando la banda a  $1664\text{ cm}^{-1}$  a hélices  $3_{10}$ ) el porcentaje de estructuras asignadas a hélices se elevaría al 40%, en concordancia con el porcentaje de hélices necesario para formar las seis hélices transmembrana (sin tener en cuenta diferencias de coeficiente de absorción molar entre estructuras, ver Discusión General). Además, un 10% de hélices  $3_{10}$  sería asumible si todos los extremos de las hélices adoptaran esta conformación.

La única fuente de información totalmente independiente para estructuras irregulares viene de los experimentos de reconocimientos de patrones realizados sobre proteínas solubles, incluidas en el cajón de sastre *resto de estructuras*, situándolas sobre  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, es de esperar que a causa de su naturaleza su contribución sea bastante variable de proteína a proteína, y bien podría contribuir en esta banda a  $1646\text{ cm}^{-1}$ . En los trabajos de desconvolución y ajuste, los cuales generan buenas estimaciones de estructura secundaria, las estructuras desordenadas se asignan en  $\text{H}_2\text{O}$  alrededor de  $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ .

Esta banda también podría asignarse a láminas beta paralelas, que aparecerán sobre  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo parece razonable, teniendo asignaciones mejores, reservar esta asignación para la banda situada a  $1637\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, la asignación de hélices alfa a frecuencias tan bajas es muy poco habitual.

Por lo tanto, nuestra asignación principal es para estructuras hélices  $3_{10}$  y estructuras irregulares.

**Banda a  $1637\text{ cm}^{-1}$  (19% del área):** Esta banda tiene tres posibles contribuciones claras. Por un lado láminas beta antiparalelas onduladas (pero también planas). Su componente de alta frecuencia aparecería escondido entre las bandas asignadas a giros. Por otro lado las láminas beta paralelas, con un componente de alta frecuencia contribuyendo en la banda a  $1664\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente estructuras irregulares. Nuestra idea es que estas tres estructuras contribuyen en esta banda, lo cual sería coherente con su anchura de  $30\text{ cm}^{-1}$ , superior a la anchura de otras bandas y poniendo en evidencia su naturaleza heterogénea.

No parece factible separar las contribuciones de láminas beta de las estructuras irregulares. Por ello nuestra asignación es para ambas estructuras, reflejando esta ambigüedad.

**Banda a  $1627\text{ cm}^{-1}$  (6% del área):** Esta banda se asigna sin dudas al modo  $B_2$  de las láminas beta antiparalelas. Su modo  $B_1$ , a  $1696\text{ cm}^{-1}$ , muestra una separación normal ( $\Delta\nu = 69\text{ cm}^{-1}$ ) y un área 6 veces menor.

### 1.3. Anc2pHis inhibido y solubilizado con DM en disolución acuosa (H<sub>2</sub>O)

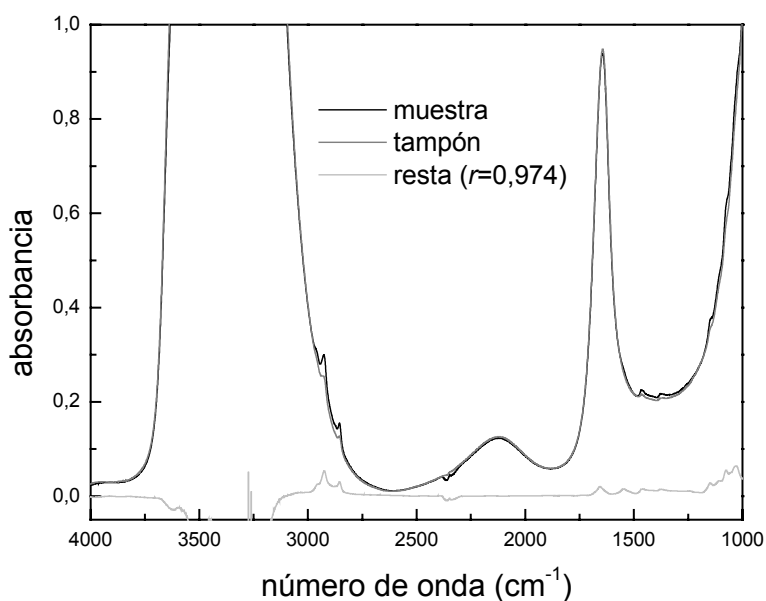
La figura 1.35 muestra el espectro de absorbancia en el infrarrojo de una disolución acuosa de 10 mg/ml Anc2pHis inhibido con catr, 9,4% DM, 50 mM NaCl, 10 mM Mes y pH 6,8 obtenido a 25 °C. El espectro se obtuvo en un experimento de transmitancia, y se determinó que el paso óptico de la muestra era de 8,5  $\mu\text{m}$ . En la misma figura se muestra el espectro del tampón de referencia, que es otra disolución acuosa de 5,0% DM, 50 mM NaCl, 10 mM Mes y pH 6,8 a la misma temperatura.

#### 1.3.1 Propiedades del espectro

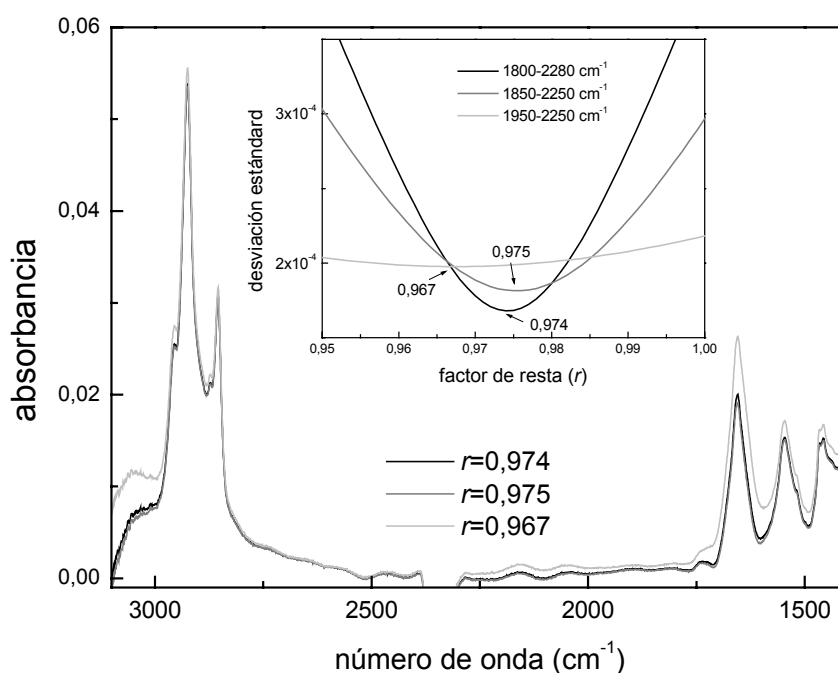
##### 1.3.1.1. Contribuciones en la amida I y amida II

El espectro del tampón se utiliza para eliminar la contribución del agua en el espectro de absorbancia de la muestra. Además de la contribución del agua, la resta del tampón elimina la contribución de sales y otros solutos. Así, en la figura 1.35 se muestra el resultado de restar al espectro de la muestra el espectro del tampón con un factor de resta de 0,974. En esta figura se puede apreciar la dificultad de este proceso, pues las bandas resultantes en la resta son muy poco intensas comparadas con las bandas iniciales. Para este caso, la absorbancia del máximo de la banda amida I es 45 veces menor que el máximo de la banda del agua que solapa con ella.

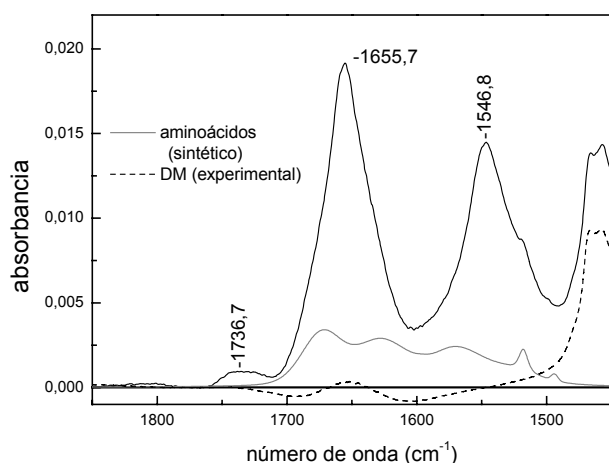
El factor de resta se puede obtener como se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, buscamos que la banda del agua a 2125  $\text{cm}^{-1}$  desaparezca en el espectro restado. Su desaparición la cuantificamos por la planaridad del espectro restado en un intervalo alrededor de 2125  $\text{cm}^{-1}$ . El inserto de la figura 1.36 muestra la aplicación de este método de resta para tres intervalos diferentes y la figura 1.36 muestra los espectros obtenidos al aplicar los factores de resta determinados. Con los intervalos utilizados, los factores de resta van de 0,967 a 0,975, siendo el que nosotros consideramos en principio más fiable 0,974, pues corresponde al intervalo más extenso.



**Figura 1.35.** Espectro de absorbancia por transmitancia de la muestra (Anc2pHis solubilizado en disolución), del tampón y de la resta entre ambos. Esta figura ilustra las dificultades de la resta, pues la absorbancia correspondiente a la proteína es muy inferior a la del tampón.



**Figura 1.36.** Espectro de absorbancia del Anc2pHis, obtenido utilizando diferentes factores de resta. Estos factores de resta se han obtenido como se muestra en el inserto y en Materiales y Métodos.



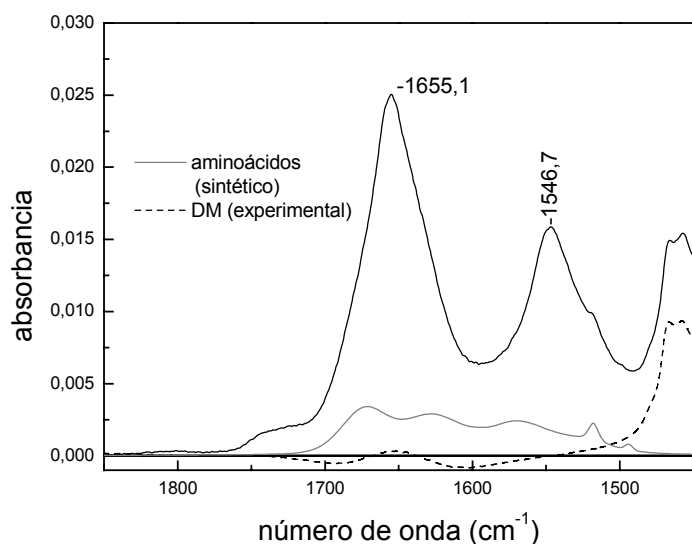
**Figura 1.37.** Espectro de absorbancia del Anc2pHis inhibido con catr y solubilizado con DM, obtenido con un factor de resta de 0,974. Se muestra también un espectro sintético de las contribuciones de las cadenas laterales de los aminoácidos, y un espectro de DM en disolución (tras restar la contribución del tampón).

La figura 1.37 muestra, en detalle, la zona de la amida I y la amida II para el factor de resta 0,974. Se ha marcado la posición del máximo de ambas bandas, así como la de lípidos. Junto a este espectro se muestra el espectro sintético de la absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos y del DM.

Como la concentración de DM en la muestra es superior a la del tampón, su contribución no se elimina completamente en la resta, y por lo tanto aparecerá en el espectro de proteína. La figura 1.37 muestra un espectro de DM en disolución correspondiente a su contribución. Este espectro muestra contribuciones negativas

entre 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ , a causa de que se obtuvo restando la contribución del  $\text{H}_2\text{O}$ .

El espectro de las cadenas laterales de los aminoácidos se ha escalado teniendo en cuenta que la concentración de la proteína es 10 mg/ml y el paso óptico es de 8,5  $\mu\text{m}$ . Se determinó que la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos entre 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$  representa el 24,1% de la absorbancia de la proteína (una vez restada otras contribuciones). Este porcentaje es excesivamente elevado comparado con el predicho utilizando los datos de Rahmelow et al. (1998), que es del 16,7%.



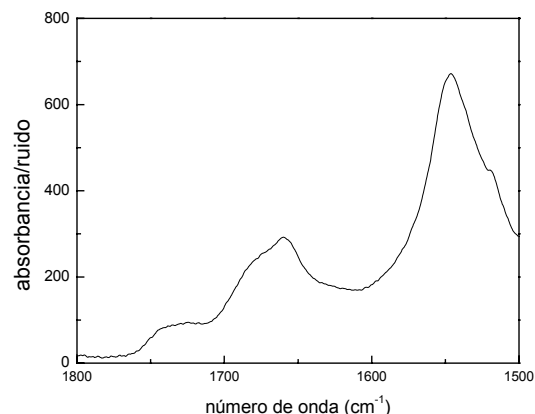
**Figura 1.38.** Igual a la figura 1.37, pero el espectro del Anc2pHis se obtuvo con un factor de resta de 0,967.

Teniendo en cuenta las dificultades de la resta del tampón, no es descabellado pensar que el factor de resta correcto sea algo menor que 0,974. La figura 1.38 muestra los resultados al restar con un factor de 0,967. La contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos representa ahora el 17,8% del área entre 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$ , mucho más próximo al valor esperable de 16,7%. Por ello, parece adecuado considerar que éste es el factor de resta adecuado para eliminar la contribución del agua. Los máximos de la amida I a 1655,1  $\text{cm}^{-1}$  y de la amida II a 1646,7  $\text{cm}^{-1}$  son coherentes con una proteína en la que las hélices alfa y/o estructuras al azar son las principales estructuras. Los máximos de la amida I y de la amida II sufren un desplazamiento de  $-2,4 \text{ cm}^{-1}$  y  $+0,7 \text{ cm}^{-1}$  respectos a los de la película seca (ver figura 1.3). Estos desplazamientos pueden estar causados en una parte por la dificultad de la resta del agua, y en otra parte por un efecto del grado de hidratación de la proteína en la posición de las bandas de la amida I.

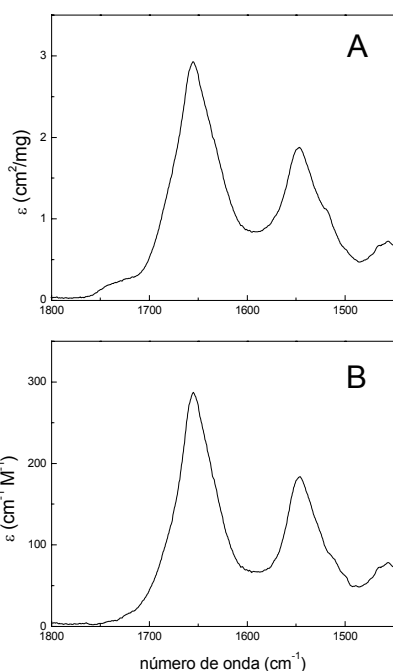
### 1.3.1.2. Determinación de la relación señal / ruido

Respecto a la calidad del espectro de la figura 1.38, ésta no es muy buena. Esto no se debe a que el ruido del espectro sea grande, pues su desviación estándar 1850  $\text{cm}^{-1}$  es de  $1,7 \times 10^{-5}$  UA, sino a dos razones: a) La absorbancia de la proteína es pequeña, pues el máximo de la amida I es de 0,025 UA, lo que ya por sí sólo nos daría una relación S/R de 1450; b) Como el ruido aumenta casi exponencialmente con la absorbancia, las zonas del espectro con bandas con fuerte absorbancia, como entre 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ , muestran un ruido fuertemente incrementado. El espectro de la muestra, antes de restar el tampón, tiene una absorbancia de 0,94 UA a 1645  $\text{cm}^{-1}$ , lo que hará disminuir todavía más la relación S/R para la amida I.

La figura 1.39 muestra la relación entre la absorbancia y la desviación estándar del ruido para la zona de la amida I y amida II. La amida I muestra una relación máxima de 295 y la amida II de 675, lo cual hace patente la baja calidad del espectro. La relación señal/ruido para la zona de la amida I es de  $\approx 630$ . Sería posible aumentar algo este valor. Por ejemplo, si aumentásemos la concentración de proteína de 10 a 20 mg/ml y el paso óptico de la muestra fuera de 6  $\mu\text{m}$ , en vez de 8,5  $\mu\text{m}$ , sería posible obtener una relación S/R para la amida I cercana a 1250. Este valor estaría aún lejos del que puede obtenerse trabajando con películas secas.\* Como consecuencia para espectros obtenidos en disolución será difícil obtener grandes estrechamientos para las bandas de la amida I.



**Figura 1.39.** Relación entre la absorbancia y la desviación estándar del ruido para el espectro del Anc2pHis presentado en la figura 1.38.



**Figura 1.40.** (A) Coeficiente de extinción del Anc2pHis. (B) Coeficiente de absorción molar del enlace peptídico del Anc2pHis.

### 1.3.1.3. Coeficiente de absorción del enlace peptídico

La figura 1.40A muestra el coeficiente de absorción del Anc2pHis por concentración de proteína, en mg/ml. En este espectro se ha mantenido la contribución de los lípidos unidos a la proteína y la de las cadenas laterales de los aminoácidos, y sólo se ha restado la contribución del DM, que consideramos externa al Anc2pHis. Este espectro es útil para determinar concentraciones del Anc2pHis (si el paso óptico es conocido). También sirve para determinar ciertas propiedades que sólo dependan del Anc2pHis, como la relación amida I/amida II (aI/aII) en intensidad y área.

La relación aI/aII en intensidad (intensidad medida respecto a 1850  $\text{cm}^{-1}$ ) es de 1,56, y la de área (intervalo de integración de 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  para la amida I y 1590-1490  $\text{cm}^{-1}$  para la amida II respecto a la línea que une el intervalo de integración) es de 2,05. Estos valores pueden utilizarse

\* Con interferómetros más modernos (como el Bio-rad FTS 6000) es posible obtener espectros con un ruido menor de  $5 \times 10^{-6}$  UA, lo que podría permitir valores de relación S/R para la amida I mayores de 4000.

como criterio de resta, pues dependen mucho del factor de resta utilizado (mucho más que la planaridad alrededor de  $2125\text{ cm}^{-1}$ ). Por ejemplo, al aplicar un factor de resta de 0,974, en vez de 0,967, la relación  $aI/aII$  en intensidad pasa de 1,56 a 1,30, y en área pasa de 2,05 a 1,46.

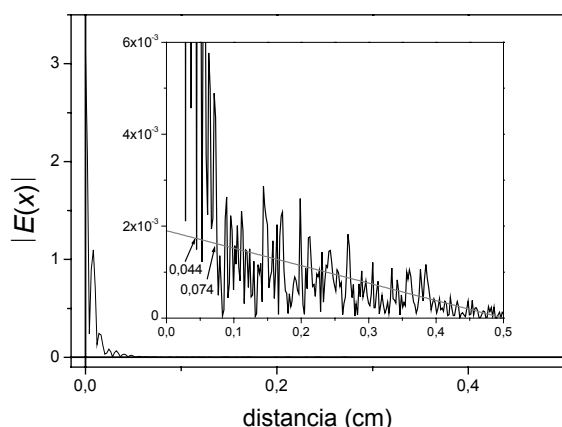
Respecto a cual de los dos parámetros es más adecuado para ser utilizado de forma general como criterio de resta, hemos de tener en cuenta que la relación en intensidad puede variar con cambios en las posiciones, anchuras o áreas de las bandas que componen tanto la amida I como la amida II, mientras que la relación en área será menos sensible a estos cambios. Recordemos que para el Anc2pHis en película seca habíamos obtenidos una relación  $aI/aII$  en intensidad de 1,75, y en área de 2,05. Por ello, consideramos la relación  $aI/aII$  en área el método más adecuado para encontrar el factor de resta del tampón. Este criterio ya ha sido propuesto (Rahmelow y Hübner, 1997a), aunque no tenemos constancia de su uso práctico.

La figura 1.40B muestra el coeficiente de absorción molar para el enlace peptídico del Anc2pHis. El máximo de la amida I corresponde a  $290\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  y el de la amida II a  $185\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Recordemos, que para la película seca del Anc2pHis, teníamos para la amida I  $325\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  y para la amida II  $185\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Para la amida II la diferencia es menor del 3% pero para la amida I el coeficiente de absorción molar es un 12% mayor en película seca que es disolución. Es difícil estar seguros si estas diferencias son significativas, aunque creemos que no.

#### 1.3.1.4. La banda C=O de los fosfolípidos

La banda sobre  $1740\text{ cm}^{-1}$  la hemos asignado a la vibración C=O de fosfolípidos retenidos por la proteína en el proceso de solubilización/purificación. Se calculó que  $15 \pm 2$  moléculas de fosfolípidos son retenidos por dímero de Anc2pHis durante el proceso de solubilización / purificación. Este valor coincide

aproximadamente con el obtenido para la proteína en película seca.



**Figura 1.41.** Módulo del interferograma del espectro de la figura 1.38 entre  $1850\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ . En línea gris se muestra la desviación estándar del ruido y el primer punto de corte con la señal, y el punto donde la señal llega al nivel del ruido.

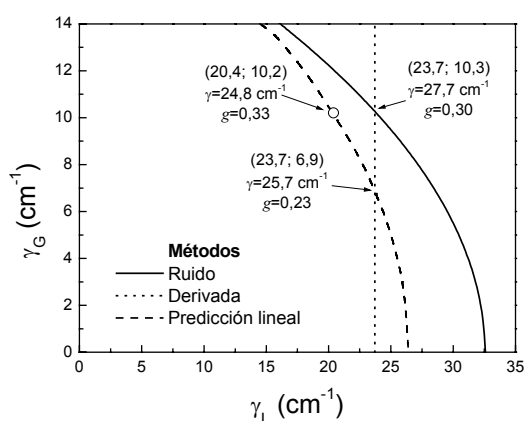
#### 1.3.2. Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I

La figura 1.41 muestra el interferograma del espectro de la figura 1.28 entre  $1850\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ . La distancia en la que la señal se iguala por primera vez con el ruido es a  $0,044\text{ cm}$ , pero la distancia a la que la señal se sumerge en el ruido es a  $0,074\text{ cm}$ . Con este valor, suponiendo bandas de forma Lorentziana, se obtiene una estimación de la anchura de las bandas de  $32,6\text{ cm}^{-1}$ . Si suponemos que la forma de las bandas es

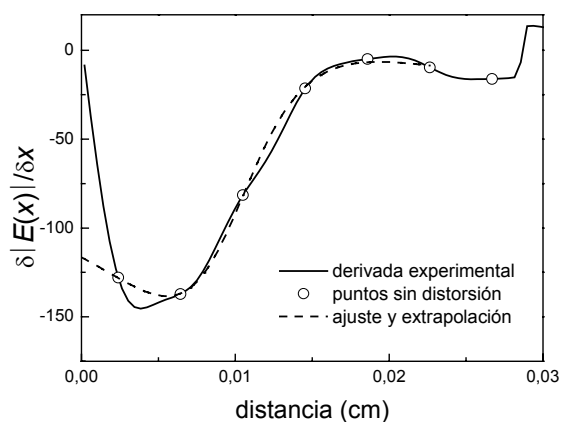
Gausiana, la anchura será de  $19,7 \text{ cm}^{-1}$ . Para bandas con forma Voigtiana sólo es posible obtener la relación entre la anchura Lorentziana y la anchura Gausiana. Ésta se muestra en la figura 1.44 para las bandas de la amida I.

La figura 1.42 muestra la derivada del módulo del interferograma del espectro entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ . La derivada a  $0 \text{ cm}$  se obtuvo mediante ajuste/extrapolación. Con este valor se obtuvo una anchura media Lorentziana ponderada al área de  $23,7 \text{ cm}^{-1}$ . La información obtenida por este método se muestra en la figura 1.44. Combinado el método de la derivada y del ruido podemos obtener una estimación de una anchura Lorentziana de  $23,7 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gausiana de  $10,3 \text{ cm}^{-1}$  para las bandas de la amida I.

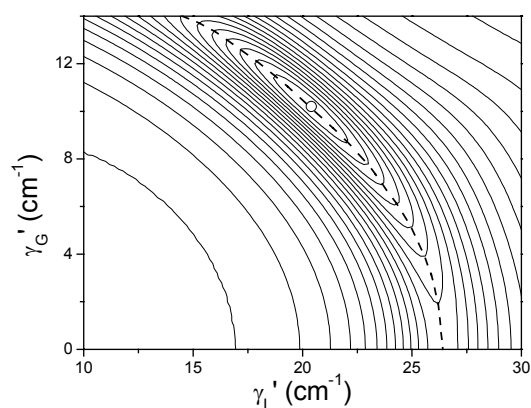
La figura 1.43 muestra los resultados de la calidad de la predicción lineal en función de la anchura Lorentziana y Gausiana utilizada para desconvular. La línea discontinua de la figura 1.43 marca la combinación de anchuras Lorentzianas y Gausianas que dan buenos resultados en la predicción y son, por lo tanto, buenos candidatos a



**Figura 1.44.** Recopilación de los resultados obtenidos por los tres métodos para estimar la anchura de las bandas de la amida I.



**Figura 1.42.** Derivada del módulo del interferograma.



**Figura 1.43.** Calidad de la predicción lineal en función de las anchuras Lorentzianas y Gausianas utilizadas para desconvular.

ser las anchuras de las bandas de la amida I. Estas combinaciones se muestran en la figura 1.44. La combinación que da una mejor predicción es una anchura Lorentziana de  $20,4 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gausiana de  $10,2 \text{ cm}^{-1}$ . Podemos combinar también los resultados de la predicción lineal con el método

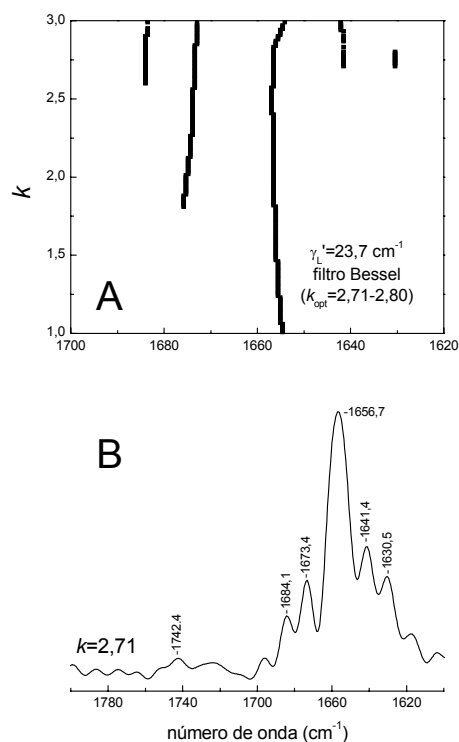


de la derivada. Esto nos da una anchura Lorentziana de  $23,7 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gausiana de  $6,9 \text{ cm}^{-1}$  para las bandas de la amida I (anchura de  $25,7 \text{ cm}^{-1}$  y factor Gausiano de 0,23). Este último valor es el que asumiremos inicialmente para las bandas de la amida I.

### 1.3.3. Determinación del número y posiciones de las bandas componentes en la amida I

#### 1.3.3.1 Desconvolución de Fourier

Recordemos que la desconvolución de Fourier requiere la elección del factor de estrechamiento  $k$ . Es necesario llegar a un compromiso en su elección, pues a valores bajos el estrechamiento conseguido puede ser insuficiente para resolver algunas bandas, y a valores altos la amplificación del ruido puede ocultar bandas. En el punto 1.1.5.2. de Resultados Teóricos hemos tratado este aspecto.

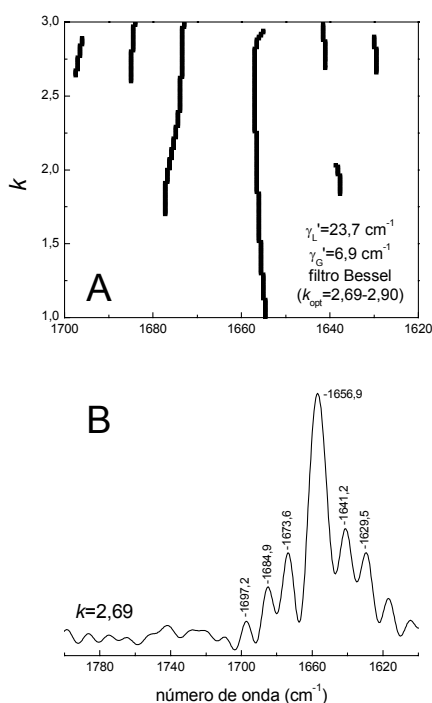


**Figura 1.45.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolucionar el espectro de la figura 1.38, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvolucionado con el factor de estrechamiento óptimo.

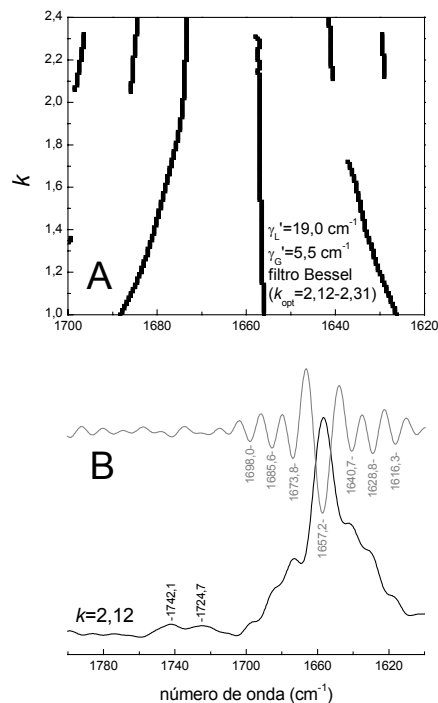
En nuestro método para determinar el valor de  $k$  más adecuado, se determina el número de bandas que se resuelven en la amida I de un espectro desconvolucionado (o en su segunda derivada) en función del valor de  $k$ . La detección de una banda se da cuando su altura supera un cierto umbral (habitualmente tres veces la altura media de los máximos inducidos por el ruido). En la detección de las bandas se tiene en cuenta que la desviación estándar del ruido varía con el número de onda. Para este caso, este hecho es muy importante, pues a  $1645 \text{ cm}^{-1}$  el ruido será casi seis veces más intenso que a  $1800 \text{ cm}^{-1}$ . Máximos que visualmente consideremos que se hallan por encima del ruido no lo estarán en realidad.

Cuando este método se aplicó para una desconvolución con  $\gamma' = 23,7 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro Bessel, el número de bandas detectadas en la amida I fue sólo de tres, a pesar que la presencia de más bandas en el espectro desconvolucionado parecía bastante clara. Por ello, reducimos el umbral de detección de tres a dos veces la desviación estándar de los máximos inducidos por el ruido. La figura 1.45A indica las posiciones bandas detectadas en la amida I para este nuevo umbral. Un máximo de cinco bandas se detectan en la zona de la amida I, para una  $k$  entre 2,71 y 2,80. El espectro

correspondiente a  $k = 2,71$  se muestra en la figura 1.45B. En este espectro se observa que, si bien sólo cinco bandas se detectan en la amida I, se resuelven bandas no detectadas. Estas bandas no detectadas podrían ser bandas verdaderas, pero fácilmente podrían ser máximos inducidos por el ruido.



**Figura 1.46.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolutar el espectro de la figura 1.38, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvoluto con el factor de estrechamiento óptimo.



**Figura 1.47.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido en la segunda derivada del espectro desconvoluto, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectro desconvoluto con el factor de estrechamiento óptimo.

Posteriormente se desconvoluyó utilizando bandas Voigtianas. La desconvolución se realizó con

DF	DRME
$1697,1 \pm 1,0$	$1698,2 \pm 0,9$
$1684,9 \pm 0,8$	$1683,9 \pm 0,8$
$1673,6 \pm 0,2$	$1674,0 \pm 1,2$
$1656,9 \pm 0,3$	$1657,0 \pm 0,1$
$1641,1 \pm 0,4$	$1641,6 \pm 1,2$
$1629,6 \pm 0,9$	$1630,0 \pm 0,3$

**Tabla 1.3.** Recopilación de las posiciones de las bandas detectadas en la amida I del Anc2pHis solubilizado en disolución.

$\gamma_L' = 23,7 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 6,9 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando un filtro Bessel. El uso del filtro BHL se descartó por hallarnos en una situación en que es crítico mantener el ruido en el espectro desconvoluto al mínimo. Tal como se muestra en la figura 1.46A se detectaron seis bandas en la amida I. La figura 1.46B muestra el espectro desconvoluto con  $k = 2,69$ .

Finalmente, se desconvoluyó con  $\gamma_L' = 19,0 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 5,5 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando un filtro Bessel, y detectando las bandas en la segunda derivada del

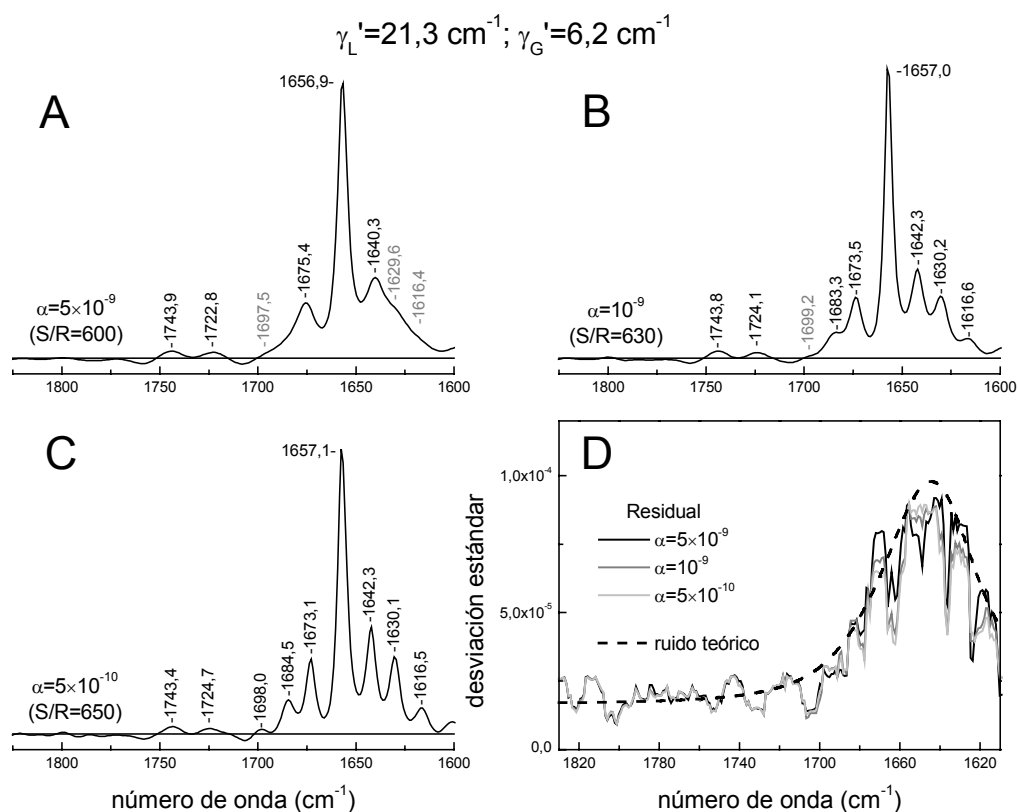
espectro desconvuelto. Los resultados se muestran en la figura 1.47. Se detectan seis bandas en la amida I para valores de  $k$  entre 2,12 y 2,31 (figura 1.47A). La figura 1.47B muestra el espectro desconvuelto  $k = 2,12$ , junto con su segunda derivada.

Por lo tanto, es posible determinar que en la amida I se encuentran compuesta por un mínimo de seis bandas. Las posiciones de estas bandas, junto con su variabilidad, se muestran en la tabla 1.3.

### 1.3.3.2. Desconvolución regularizada por máxima entropía

La figura 1.48 muestra el resultado de desconvolar el espectro de la figura 1.38 utilizando una Voigtiana de parámetros  $\gamma_L' = 21,3 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 6,2 \text{ cm}^{-1}$ , y diferentes valores del parámetro de regularización. Tras la desconvolución se resuelven seis bandas en la amida I (las mismas bandas encontradas mediante la desconvolución de Fourier). De acuerdo con el nivel de ruido, la desconvolución de la figura 1.48C es excesiva. Aún así, se realizó para forzar algo más estrechamiento de las bandas. Las posiciones de las bandas detectadas, junto con su variabilidad, se muestran en la tabla 1.3.

Comparando la tabla 1.3 con la tabla 1.1 para seis bandas, se observa que sólo las bandas a 1685 y 1674  $\text{cm}^{-1}$  ven afectada su posición al pasar de disolución a una película seca. Estas bandas pueden asignarse principalmente a giros, que serán las únicas estructuras que parecen afectadas en el proceso de deshidratación.

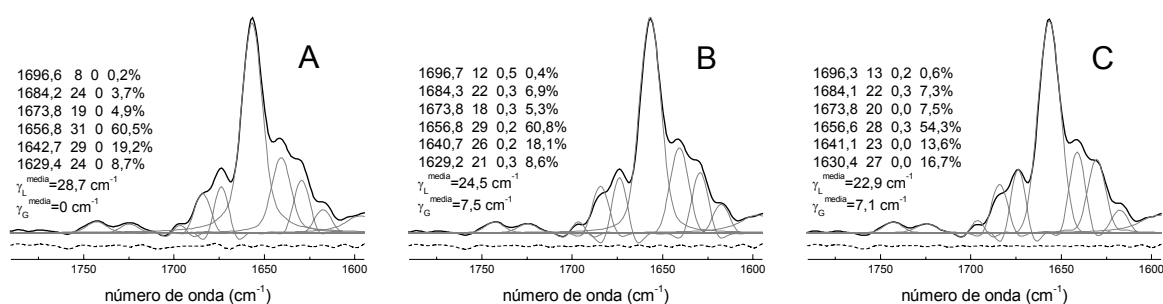


**Figura 1.48.** (A-C) Desconvolución por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual para las desconvoluciones, junto con la desviación estándar teórica del ruido.

### 1.3.4. Determinación de los parámetros de las bandas componentes

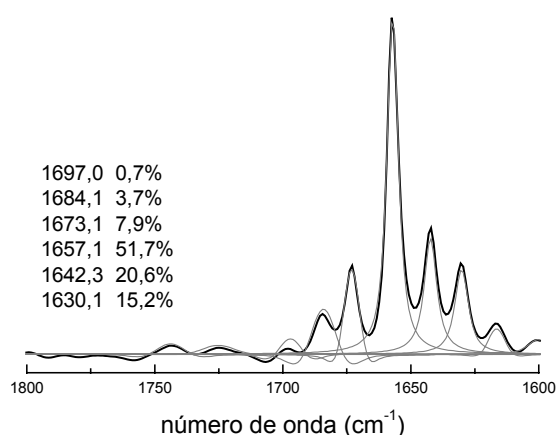
Para obtener los parámetros de las bandas que componen la amida I realizamos los siguientes ajustes.

El primer ajuste se realizó sobre un espectro desconvuelto por Fourier. La figura 1.49 muestra el resultado de ajustar un espectro desconvuelto con  $\gamma_L' = 23,7 \text{ cm}^{-1}$ ,  $k = 2,4$  y un filtro Bessel. Los tres ajustes de la figura 1.49 difieren en la forma que asumen para las bandas que componen la amida I. El ajuste (A) asume que el espectro original se compone de bandas Lorentzianas, el ajuste (B) asume que se compone de bandas Voigtianas de anchura Gaussiana común, y el ajuste (C) asume que se compone de bandas Voigtianas. En cada figura se muestra los parámetros obtenidos en el ajuste para las bandas de la amida I, así como la anchura media Lorentziana y Gaussiana de dichas bandas.



**Figura 1.49.** Ajuste de espectro desconvuelto presentado en la figura 1.47B, utilizando seis bandas en la amida I, y ajustando con (A) bandas Lorentzianas desconvueltas, (B) bandas Voigtianas (de anchura Gaussiana común) desconvueltas y (C) bandas Voigtianas desconvueltas. Se muestran los parámetros del ajuste y las anchuras medias ponderadas al área de las bandas amida I.

Finalmente, se ajustó uno de las desconvoluciones regularizadas por máxima entropía. El ajuste se



**Figura 1.50.** Ajuste del espectro desconvuelto por máxima entropía presentado en la figura 1.48C.

muestra en la figura 1.50. Como se ha comentado en el punto 1.3.4, no existen bandas estrictamente correctas para realizar este ajuste. Por ello, se han utilizado bandas Voigtianas como modelo aproximado. En la figura se muestra los valores de las posiciones y áreas de las bandas ajustadas.

Para la proteína solubilizada en disolución, la baja calidad del espectro impide la resolución de más de seis bandas. Además, esta baja calidad afectará a los parámetros obtenidos en el ajuste. En estas condiciones, realizar una asignación estructural no es difícil, pero nos dará poca información y de

poca calidad. Por otro lado, los resultados para películas secas son mucho más claros, pero pueden generar importantes dudas sobre su significado. Por ello, creemos que es interesante discutir hasta que punto es necesario y posible invertir tiempo y esfuerzos en obtener espectros en disolución de suficiente calidad, ya que los espectros obtenidos en películas secas podrían ser perfectamente válidos para obtener información estructural significativa de la proteína. A ello dedicamos el siguiente apartado.

#### **1.4. ¿Película seca del Anc2pHis o Anc2pHis en disolución? Ventajas y desventajas de su estudio por espectroscopia de IR**

Estudiar películas secas de proteínas por IR tiene dos ventajas prácticas respecto a trabajar en disolución: no es necesario restar la contribución del agua, y la relación señal / ruido es muy superior.

Al trabajar en disolución es necesario restar la contribución del tampón acuoso. Para este proceso nosotros hemos aplicado una elección objetiva del factor de resta, mientras que la mayoría de trabajos realizan una resta del visual tampón. Esta elección es la planaridad de cierto intervalo en el que sólo contribuye el tampón acuoso. Dependiendo del intervalo elegido, los factores de resta varían <1%. Esta variación puede parecer pequeña, pero este paso es tan delicado que esta pequeña variabilidad en los factores de resta generan espectros significativamente diferentes. Por ello, hemos concluido que el mejor criterio de resta se basa en la constancia de la relación amida I / amida II en área. Como la contribución del agua en la zona de la amida I es mucho mayor que en la zona de la amida II, este criterio es equivalente a que la contribución neta del área del agua en la zona de la amida I sea nula (siempre que la resta se haya realizado con un valor adecuado de  $aI / aII$ ). Esta es la resta óptima, en el sentido de que la contribución del agua en la zona de la amida I se elimina en la medida de lo posible. Esta resta no asegura que el agua está ausente en el espectro restado, pues puede tener contribuciones positivas y negativas en la zona de la amida I, con área total nula. La aplicación de este método requiere definir un intervalo para la zona de la amida I y de la amida II, y un valor para su relación en área cuando no hay contribución del agua. Por todo esto, la resta del agua será imperfecta y el espectro obtenido tendrá en la zona de la amida I una línea base compleja, que afectará en mayor o menor medida al análisis de la amida I.

Por otro lado, la presencia de agua tiene un efecto definitivo en la relación S / R del espectro de proteína. En primer lugar, para mantener la absorbancia en la zona de la amida I por debajo de 1 es necesario pasos ópticos menores de 9  $\mu\text{m}$ . Como consecuencia de estos pasos ópticos tan cortos la señal de la amida I será forzosamente pequeña. En segundo lugar, a causa de la fuerte absorbancia del agua en la zona de la amida I, el ruido se verá bastante incrementado. Por lo tanto, en disolución acuosa la señal de la amida I se ve fuertemente reducida y el ruido aumentado de manera importante. El resultado final es un espectro con una relación S / R muy inferior de la obtenible en películas secas. El valor de la relación S / R es crítico para la aplicación de los métodos matemáticos de estrechamiento de bandas, además de afectar a la precisión de los parámetros en un ajuste de bandas. Como consecuencia, a partir de un espectro de proteína en disolución es posible extraer menos información, y menos fiable, que de un espectro de una película seca de proteína.

La información obtenida en películas secas, aunque más fiable, siempre puede generar dudas sobre su significado. ¿Es la información obtenida para una película seca de proteína relevante, cuando en condiciones fisiológicas la proteína se encuentra en un ambiente con exceso de agua? Aparte del debate de si estudiar un sistema en condiciones no fisiológicas puede aportar información para entender el

funcionamiento de un sistema en condiciones fisiológicas, nosotros queremos mostrar que una película seca de una proteína de membrana no está tan lejos de sus condiciones fisiológicas, o de otras condiciones no-fisiológicas aceptadas por la comunidad científica (como los cristales de proteínas).

En primer lugar, en una película seca de proteína se elimina el agua en exceso, mientras que la que interacciona con grupos no volátiles quedará retenida en gran medida. Por lo tanto, no es una muestra estrictamente seca. Para las proteínas solubles lisozima y  $\alpha$ -lactalbúmina, si nos fijamos en la banda amida I, que será sensible tanto a cambios de estructura como a la eliminación de puentes de hidrógeno que puedan formar los C=O de las partes más externas de la proteína con el agua, ésta no sufre modificaciones por encima de una hidratación de 0,13 g agua/g proteína (Poole y Finney, 1984). Niveles menores de hidratación comienzan a afectar a la banda amida I. Para otras muchas proteínas solubles, el nivel mínimo de hidratación sin efecto en la amida I es de  $\approx 0,25$  g agua/g proteína (de Jongh et al., 1996). Según estudios de RMN, unas 180 moléculas de agua se encuentran unidas al lisozima (0,2 g agua/g proteína), coincidiendo con la primera capa de hidratación (Kakalis y Baianu, 1988; Goormaghtigh et al., 1994a) y con la hidratación mínima para que realice su función (Frauenfelder y Gratton, 1986). Por otro lado, el proceso de intercambio H/D parece realizarse a la misma velocidad en disolución y en muestras con una hidratación mínima de 0,15 g agua/g proteína (Schinkel et al., 1985). Finalmente, es importante observar que en los cristales de proteínas utilizados para obtener estructuras tridimensionales, la relación entre el agua y la proteína será bastante semejante a la encontrada en películas secas (Goormaghtigh et al., 1999).

Por lo tanto, parece que una proteína soluble en una película seca se halla tan hidratada como en disolución, para niveles de hidratación de 0,2 g agua / g proteína o superiores. Para proteínas de membrana este valor será necesariamente inferior, por dos motivos. En primer lugar una parte importante de la superficie de la proteína se encontrará en un ambiente hidrofóbico (ya sea en contacto con las cadenas alifáticas del fosfolípidos o del detergente), y por ello la cantidad de aguas necesarias para cubrir la primera capa de hidratación será bastante inferior que para proteínas solubles. En segundo lugar las proteínas de membrana son habitualmente mayores que las solubles, y por ello su relación superficie/volumen es menor. Como consecuencia, para obtener una capa de hidratación se necesitarán valores menores de relación agua / proteína (masa / masa).

Por otro lado, Sarver y Krueger (1993) han demostrado, mediante métodos de reconocimiento de patrones, que la amida I de proteínas globulares secadas y depositadas sobre una película de polietileno, y la amida I de proteínas en disolución, muestran la misma correlación con los porcentajes de estructuras secundarias cristalográficas. Es decir, la información estructural de la amida I, que permite estimaciones de estructura secundaria en concordancia con las de las estructuras cristalográficas dentro de un 5-10%, se preserva en la formación de la película seca. Es importante comentar que en este trabajo las proteínas globulares se secaron bajo una atmósfera de nitrógeno seco. La preservación de la correlación entre la

amida I y la estructura secundaria cristalográfica se da incluso en proteínas globulares liofilizadas, en las que el proceso de secado es mucho más agresivo (Forato et al., 1998).

Respecto a la película seca de Anc2pHis solubilizada, no fue posible determinar el grado de hidratación. Aún en el caso de que éste fuera excesivamente bajo, la presencia del DM protegerá contra cualquier efecto de deshidratación, pues su grupo polar es un azúcar y está descrito que los azúcares protegen contra cambios estructurales en proteínas inducidos por la eliminación del agua (Carpenter & Crowe, 1989; Goormaghtigh et al., 1999).

Respecto a la película seca de Anc2pHis reconstituido (ver punto 2 y 3) el nivel de hidratación estimado fue de 0,05 g agua/g proteína. Aunque no podemos excluir la existencia de cambios estructurales por el bajo nivel de hidratación, hemos de pensar en que este nivel pueda ser suficiente para una proteína de membrana, y esperar que las aguas que interaccionen con la proteína no se eliminen en el proceso de secado.





## 2. Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas de PC/PA

### 2.1 Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación no polarizada ( $H_2O$ )

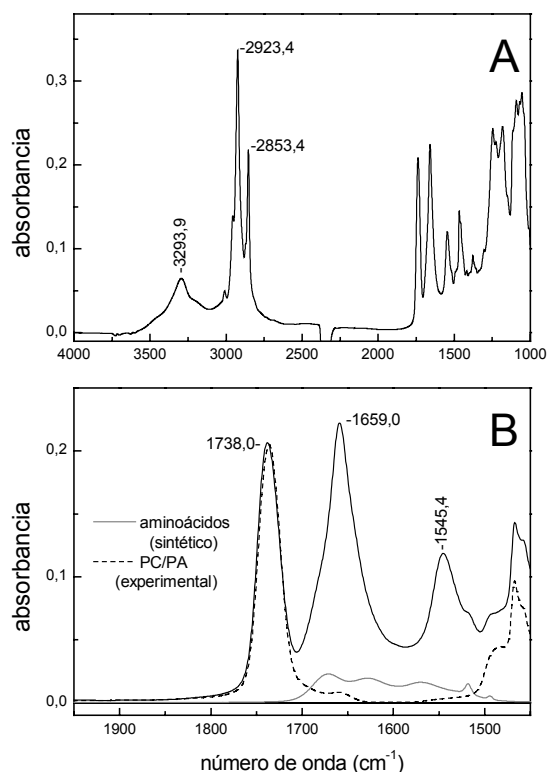
La figura 2.1 muestra el espectro de absorbancia de infrarrojo del Anc2pHis inhibido con catr y reconstituido en liposomas, obtenido mediante un accesorio de reflexión total atenuada (RTA). La muestra se extendió sobre el cristal de RTA y se dejó en contacto con la atmósfera ambiente. Tras unos minutos se evapora el agua de la muestra, formándose una película de material sobre el cristal de RTA. Posteriormente la muestra se puso en contacto con una atmósfera de nitrógeno seco, para forzar más la evaporación del agua. El resultado final fue una película seca de proteoliposomas, en la cual el agua no está ausente, pero su presencia es baja.

#### 2.1.1. Propiedades del espectro

En el Anc2pHis reconstituido, la posición de la amida A, amida I y amida II a 3293,9, 1659,0 y 1545,4  $cm^{-1}$ , respectivamente, es coherente con un predominio de las estructuras hélices alfa y/o estructuras al azar (ver figura 2.1).

##### 2.1.1.1. Grosor de la película

En los experimentos de RTA es importante estimar el grosor de la película de muestra, para saber qué teoría se ha de aplicar (ver punto 4 de Materiales y Métodos). En Materiales y Métodos (punto 5.1.5) se detalla una manera de obtenerlo, lo que nos lleva a un grosor de la película de  $l \approx 0,5 \mu m$ . Como la distancia de penetración,  $d_p$ , a 1600  $cm^{-1}$  es  $\approx 0,4 \mu m$ , la película se puede considerar gruesa según el criterio habitualmente aceptado, pues  $l/d_p = 1,25 > 1$ .



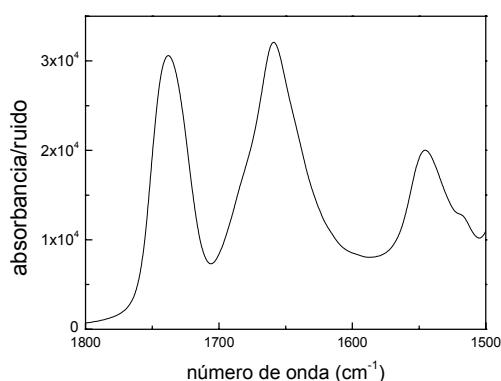
**Figura 2.1.** (A) Espectro de absorbancia, obtenido por reflexión total atenuada, del Anc2pHis inhibido con catr y reconstituido en liposomas de PC/PA (9/1). (B) Ampliación del espectro de la figura (A), donde se muestra, además, un espectro sintético de la contribución de las cadenas laterales y un espectro experimental de la contribución del PC/PA (9/1).

### 2.1.1.2. Grado de hidratación de la película

El grado de hidratación de la película puede seguirse por la absorción a 3500 cm<sup>-1</sup> respecto a la de la amida I o amida II, y se determinó que aproximadamente quedan retenidas en la muestra 0,05 g H<sub>2</sub>O/g Anc2pHis, lo que representa unas 200 moléculas de agua por dímero de Anc2pHis.

### 2.1.1.3. Estado del PC/PA en la película

Las bandas de vibración CH<sub>2</sub> del lípido aparecen a 2923,4 y 2853,4 cm<sup>-1</sup> (ver figura 2.1A). Estos valores coinciden con los obtenidos para una película hidratada de PC/PA (2923,4 y 2853,3 cm<sup>-1</sup>), que corresponde a PC/PA en fase cristal líquido (no mostrado). Por lo contrario, para una película seca de PC/PA (en el que el lípido adoptará una fase gel)\* las bandas de vibración CH<sub>2</sub> aparecen a 2922,9 y 2852,9 cm<sup>-1</sup> (no mostrado). Este hecho se interpreta como que la presencia de la proteína estabiliza la fase cristal líquido, y por lo tanto sugiere que la proteína se ha incorporado correctamente en los liposomas, y de manera uniforme, tal que no hay dominios de lípidos con la proteína excluida.



**Figura 2.2.** Relación entre la absorbancia y la desviación estándar del ruido para el espectro de la figura 2.1.

### 2.1.1.3. Determinación de la relación señal / ruido

Entre 1900-1850 cm<sup>-1</sup>, la desviación estándar del ruido es de 5×10<sup>-6</sup> UA. Con este valor podemos obtener la desviación estándar del ruido en otras zonas del espectro, como se describe en Materiales y Métodos. La figura 2.2 muestra la relación absorbancia/ruido (A/R) en función del número de onda. La relación A/R máxima en la amida I es de 32 000 y en la amida II de 20 000. Para la zona entre 1840 y 1600 cm<sup>-1</sup> la relación señal/ruido, que será la relación entre el máximo de la amida I y la

desviación estándar del ruido en esta zona, es de 39 000. Este valor es enorme y, en principio, abre la posibilidad de obtener grandes estrechamientos mediante métodos de desconvolución.

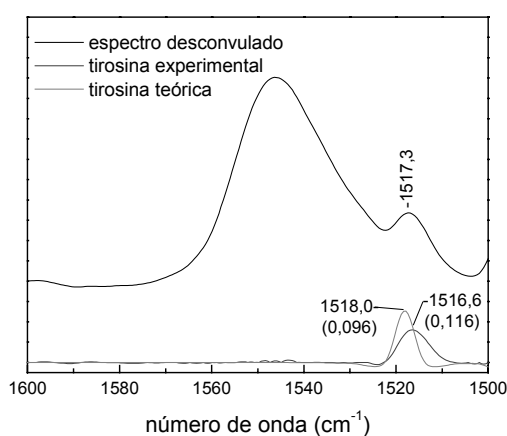
Existe una diferencia entre los espectros de absorbancia obtenidos por RTA y por transmitancia, que afectará, principalmente, al ruido aparente en un espectro desconvuludo. Hemos de recordar que en transmitancia las bandas de vapor se anulan mediante una adquisición alternada. En RTA el espectro de absorbancia de la muestra contiene bandas de vapor, que se restan posteriormente de manera digital. Las bandas más intensas de vapor solapan con la amida I. Estas bandas, si no se eliminan completamente,

\* En muestras secas de lípido se suele adoptar un estado seudocristalino, en el que toda la cadena alifática se encuentra en todo trans para los enlaces saturados, semejante a una fase gel.

perturbarán en gran medida cualquier método de desconvolución, pues al ser tan estrechas sufrirán una fuerte sobredesconvolución. Para eliminarlas, restamos un espectro de vapor, comprobando en zonas sin absorción que las bandas de vapor desaparecen en el ruido. Estas bandas de vapor que aparecen en zonas sin absorción, son menos intensas que las situadas en la amida I, o están situadas en zonas del espectro donde el ruido es mayor que en la amida I. Como consecuencia, tras la resta, no podemos asegurar que las bandas de vapor situadas en la amida I queden al nivel del ruido. Por ello, la aplicación de métodos matemáticos de estrechamiento no queda limitada sólo por la relación señal/ruido en la amida I, sino también por la posible resta imperfecta del vapor de agua.

#### 2.1.1.4. Contribuciones en la amida I y amida II

La figura 2.1B muestra el espectro de una película seca de PC/PA (9/1), para apreciar su contribución en la zona de la amida I y amida II. Esta contribución es escasa, tanto en la amida I como en la amida II. Restando esta contribución, la relación entre el máximo de la amida I y el de la amida II es de 1,99, y la relación entre el área de la amida I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  con línea base interna) y de la amida II (1590-1490  $\text{cm}^{-1}$ ) es de 2,48 (estos dos valores han sido corregidos por el efecto  $1/\nu$ )\*. Existe una diferencia entre estos valores y los obtenidos para la proteína solubilizada (ver sección 1.2.1.3). La existencia de diferencias es importante, si pensamos que tiene que haber un valor de la relación en área aI/aII común a



**Figura 2.3.** Observación de la posición y área de la banda de la tirosina a 1517  $\text{cm}^{-1}$ , y comparación con la banda teórica obtenida a partir de modelos de la cadena lateral de la tirosina (anillo fenólico).

una proteína en todas sus condiciones, lo cual nos permitiría desarrollar un método mucho más sensible para restar la contribución del agua en los experimentos de transmitancia. Estas diferencias podrían deberse en parte a una orientación preferencial de la proteína.

La figura 2.1B muestra también la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos. Este espectro sintético se escaló utilizando los datos de Rahmelow et al. (1998a) (el 16,7% del área entre 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$  del espectro del Anc2pHis ha de corresponder a la contribución de las cadenas laterales).

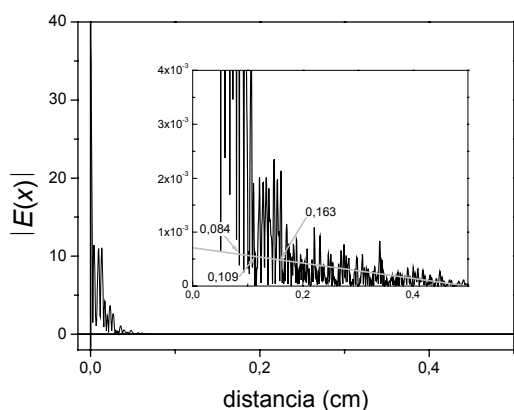
\* El paso óptico efectivo en RTA disminuye al aumentar la frecuencia de la radiación en función de  $1/\nu$ . Como consecuencia, en comparación con un espectro de absorbancia por transmitancia, un espectro de absorbancia por RTA ve sus bandas disminuidas en intensidad a números de onda altos, y a números de onda bajos, aumentadas.

### 2.1.1.5. La banda de tirosina

La figura 2.3 muestra la amida II tras ser desconvulada en el espacio de Fourier con un banda Lorentziana de anchura  $\gamma_L' = 8 \text{ cm}^{-1}$ , un factor de estrechamiento de  $k = 2$  y un filtro Bessel. La banda de la tirosina aparece a  $1517,3 \text{ cm}^{-1}$ . La figura 2.3 muestra la banda tras eliminar la contribución del enlace peptídico, mediante una corrección de línea base. Junto a este espectro se muestra la banda teórica obtenida a partir de modelos del anillo fenólico (Venyaminov y Kalnin, 1990). Como esta banda no es estudiada habitualmente es difícil obtener información a partir de su posición, pero coincide, por ejemplo, con la posición para el transportador de glucosa (Alvarez et al., 1987). La posición obtenida también es semejante a la que muestra la proteína solubilizada en DM, aunque hay un desplazamiento de unos  $+0,5 \text{ cm}^{-1}$ , que indican que el ambiente de las tirosinas es más hidrofílico en la proteína reconstituida.

Respecto al área las diferencias entre los datos experimentales y los teóricos son menores del 20%.

### 2.1.2. Estimación de la anchura de las bandas componentes en la amida I



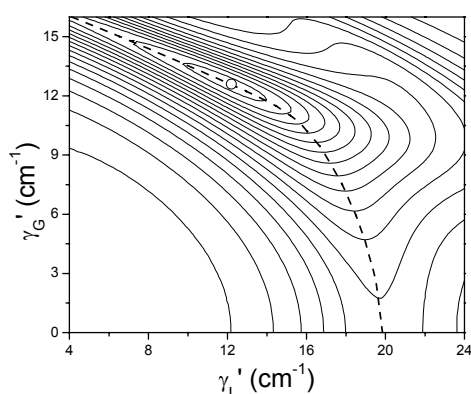
**Figura 2.4.** Módulo del interferograma del espectro de la figura 2.1 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ . En línea gris se muestra la desviación estándar del ruido y se ha marcado el primer punto de corte con la señal, y dos posibles puntos donde la señal llega al nivel del ruido.

Lorentziana, se obtiene una estimación de la anchura de las bandas de entre  $22,0 \text{ cm}^{-1}$  y  $32,3 \text{ cm}^{-1}$ . Si suponemos que la forma de las bandas es Gaussiana la anchura estará entre  $10,9 \text{ cm}^{-1}$  y  $16,2 \text{ cm}^{-1}$ . Para bandas con forma Voigtiana sólo es posible obtener la relación entre la anchura Lorentziana y la anchura Gaussiana. Ésta se muestra en la figura 2.6.

Respecto al método de la derivada, no se puede obtener una estimación fiable de la anchura Lorentziana, pues el intervalo utilizado incluye dos bandas. La causa de esta limitación se explica en Resultados Teóricos (sección 1.1.5.3.C). Cortar el intervalo para incluir sólo la amida I introduciría a su vez distorsiones por el trunco.

La figura 2.4 muestra el interferograma del espectro de la figura 2.1 entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, el intervalo utilizado incluye tanto la amida I como la banda del C=O del lípido. Como consecuencia, la información obtenida se referirá a ambas bandas, a pesar de que nosotros estamos interesados sólo en la de la amida I.

En la figura 2.4, la distancia en la que la señal se iguala por primera vez con el ruido es a  $0,084 \text{ cm}$ . Nos interesa sin embargo, la distancia a la que la señal se sumerge en el ruido. Esta distancia no es siempre clara y puede ser ambigua, como en este caso. Tanto es posible que esta distancia sea  $0,163$  como  $0,109 \text{ cm}$ , según qué consideremos ruido. Con estos valores, suponiendo bandas de forma



**Figura 2.5.** Calidad de la predicción lineal en función de las anchuras utilizadas para desconvular, mostrada con líneas de contorno. El máximo se ha marcado con un círculo abierto, y la línea discontinua señala las combinaciones de anchura Lorentziana y Gaussiana que dan las mejores predicciones.

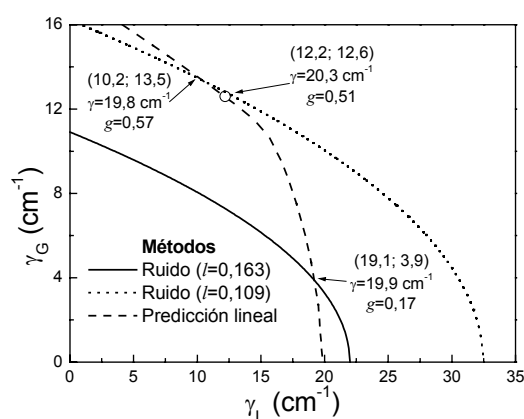
a ser las anchuras de las bandas entre 1850-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Estas combinaciones se muestran en la figura 2.6. La combinación que da una mejor predicción es una anchura Lorentziana de 12,2  $\text{cm}^{-1}$  y una Gaussiana de 12,6  $\text{cm}^{-1}$ .

Podemos combinar los resultados de la predicción lineal con el método del ruido. Esto nos da una anchura Lorentziana de 19,1  $\text{cm}^{-1}$  y una Gaussiana de 3,9  $\text{cm}^{-1}$ , o una anchura Lorentziana de 10,2  $\text{cm}^{-1}$  y una Gaussiana de 13,5  $\text{cm}^{-1}$ , para las bandas de la amida I y C=O en conjunto.

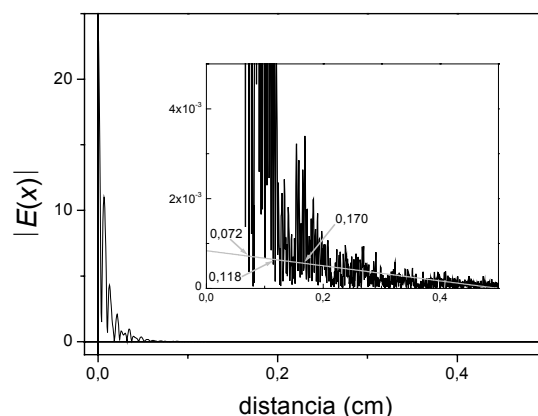
Para obtener una estimación de las anchuras Lorentziana y Gaussiana de las bandas de la amida I se restó la contribución del lípido, con intención de eliminar la banda de C=O. La eliminación no fue perfecta, pues la banda de C=O muestra un máximo y una forma diferentes cuando tenemos lípido puro que cuando tenemos proteína.

La figura 2.7 muestra el interferograma del espectro sin la banda de C=O. La distancia a la que por primera vez el módulo del interferograma se

La figura 2.5 muestra los resultados de la calidad de la predicción lineal en función de la anchura Lorentziana y Gaussiana utilizada para desconvular. El interferograma utilizado fue obtenido a partir del espectro entre 1850-1600  $\text{cm}^{-1}$ . La línea discontinua de la figura 2.5 marca la combinación de anchuras Lorentzianas y Gaussianas que dan buenos resultados en la predicción y son por lo tanto buenos candidatos



**Figura 2.6.** Recopilación de los resultados obtenidos por dos de los tres métodos para estimar la anchura de las bandas del espectro entre 1850 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  (amida I y C=O).



**Figura 2.7.** Módulo del interferograma del espectro de la figura 2.1 entre 1850-1600  $\text{cm}^{-1}$  una vez restada la contribución del lípido. En línea gris se muestra la desviación estándar del ruido y se ha marcado el primer punto de corte con la señal, y dos posibles puntos donde la señal llega al nivel del ruido.

igual a la desviación estándar del ruido es 0,071 cm. La distancia a la que la señal se sumerge en el ruido depende de nuevo de qué consideramos señal y que ruido. Esta distancia puede ser tanto 0,170 cm como 0,118 cm. Con estos valores, suponiendo bandas de forma Lorentziana, se obtiene una estimación de la anchura de las bandas de la amida I de entre 20,0 cm<sup>-1</sup> y 28,4 cm<sup>-1</sup>. Si suponemos que la forma de las bandas es Gausiana la anchura será de entre 10,2 cm<sup>-1</sup> o de 14,6 cm<sup>-1</sup>. Para bandas con forma Voigtiana sólo es posible obtener la relación entre la anchura Lorentziana y la anchura Gausiana. Ésta se muestra en la figura 2.10 para las bandas de la amida I.

La figura 2.8 muestra la derivada del módulo del interferograma, a partir de la cual pudimos obtener una estimación de la anchura Lorentziana de las bandas de la amida I de 20,5 cm<sup>-1</sup>.

La figura 2.9 muestra los resultados de la calidad de la predicción lineal respecto a las anchuras Lorentzianas y Gausianas de desconvolución. Las anchuras óptimas corresponden a una anchura Lorentziana de 18,4 cm<sup>-1</sup> y una Gausiana de 10,4 cm<sup>-1</sup>. Existe además un conjunto de parejas de anchuras Lorentzianas y de anchuras Gausianas que dan una buena

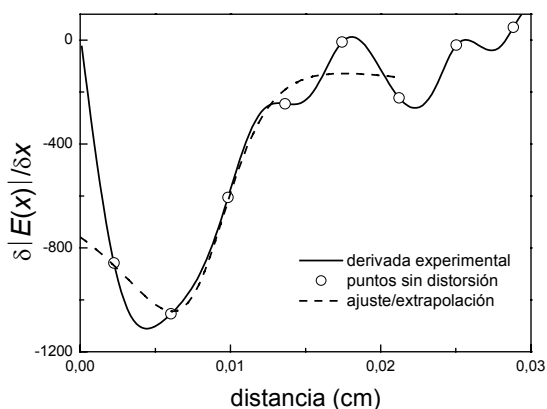


Figura 2.8. Derivada del módulo del interferograma.

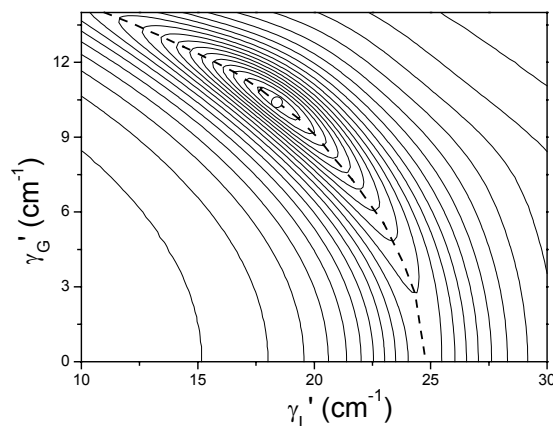


Figura 2.9. Calidad de la predicción lineal en función de las anchuras utilizadas para desconvolver, mostrada con líneas de contorno. El máximo se ha marcado con un círculo abierto, y la línea discontinua señala las combinaciones de anchura Lorentziana y Gausiana que dan las mejores predicciones.

predicción y se han marcado con línea discontinua. Estas parejas se muestran en la figura 2.10 junto con el punto óptimo.

La figura 2.10 muestra la combinación de los tres métodos, aparte del punto óptimo obtenido mediante predicción lineal, queremos destacar la combinación de la predicción lineal con el método de la derivada

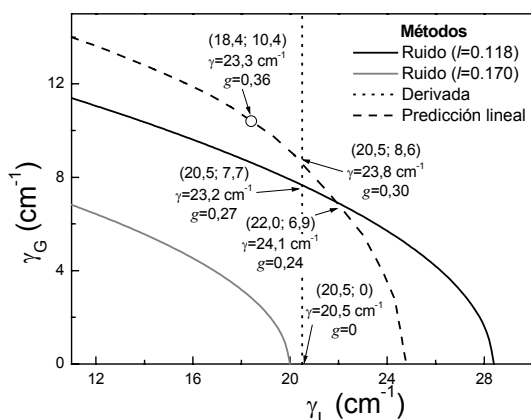


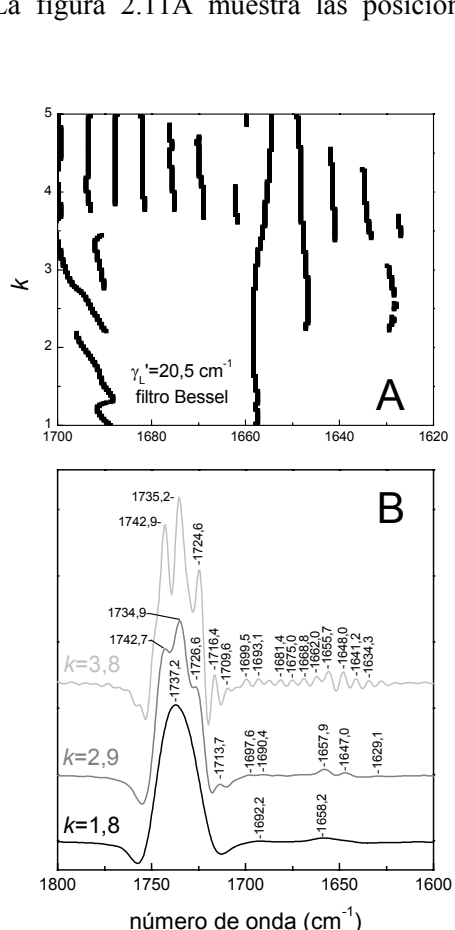
Figura 2.10. Recopilación de los resultados obtenidos por los tres métodos para estimar la anchura de las bandas de la amida I.

que nos da una anchura Lorentziana de  $20,5 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gaussiana de  $8,6 \text{ cm}^{-1}$ , y una de las combinaciones del método de la derivada con el método de ruido, que nos da anchura Lorentziana de  $20,5 \text{ cm}^{-1}$  y una anchura Gaussiana de  $0 \text{ cm}^{-1}$ . Estas dos posibilidades serán las que consideremos inicialmente como las anchuras de las bandas de la amida I. Como se observa, hay una importante discrepancia en la estimación de la anchura Gaussiana de las bandas de la amida I.

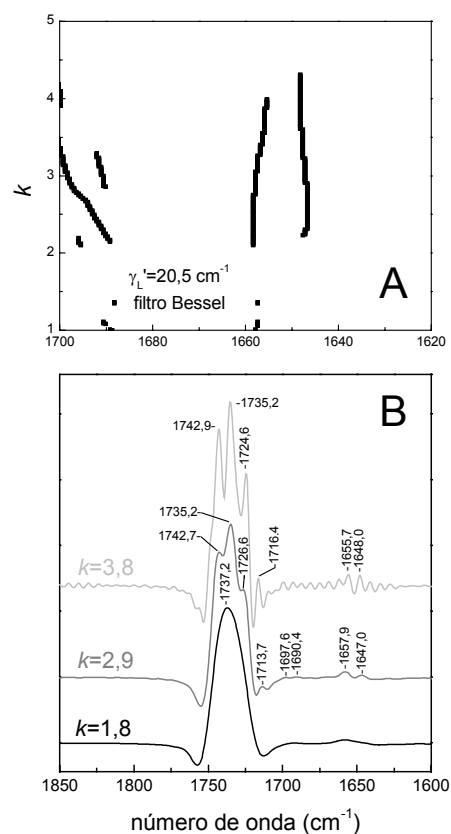
### 2.1.3. Determinación del número y posiciones de bandas componentes entre $1800\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ para la PC / PA

El objetivo de esta identificación de bandas del fosfolípido es doble. Por un lado identificar las bandas que da el C=O del lípido cuando se halla seco e hidratado, y así poder comparar estos resultados con los obtenidos en presencia de proteína. Por otro lado evidenciar cómo la resta de las bandas del vapor de agua afecta al aumento del ruido aparente al desconvular.

La figura 2.11A muestra las posiciones de las



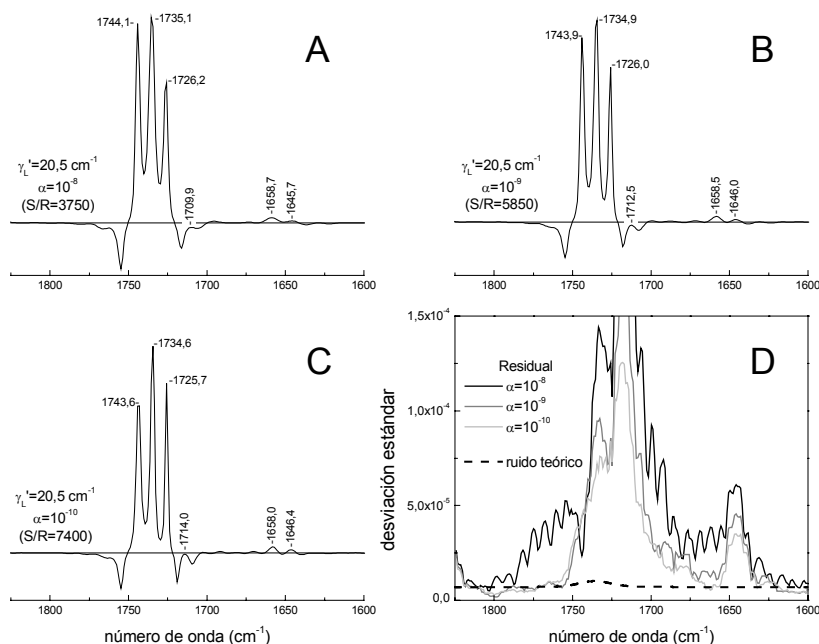
**Figura 2.11.** (A) Bandas detectadas sobre el ruido entre  $1700$  y  $1620 \text{ cm}^{-1}$  en un espectro desconvuludo de una película seca de PC/PA, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvuludos para tres valores del factor de estrechamiento. Se han marcado las posiciones de las bandas detectadas sobre el ruido.



**Figura 2.12.** (A) Bandas detectadas sobre el ruido entre  $1700$  y  $1620 \text{ cm}^{-1}$  en un espectro de una película seca de PC/PA desconvuludo, en función del factor de estrechamiento aplicado. El sistema de detección de las bandas utilizado en la figura 2.11 fue modificado. (B) Espectros desconvuludos para tres valores del factor de estrechamiento. Se han marcado las posiciones



bandas detectadas entre 1700-1620 cm<sup>-1</sup> (la zona de la amida I) al desconvolar un espectro de una película seca de PC/PA. Esta detección de bandas se realizó con nuestro método.\* La figura 2.11B muestra los espectros desconvueltos para tres valores de  $k$ . Se puede observar que el número de bandas detectadas en la amida I aumenta enormemente para  $k > 3,5$ , y lo hace de una manera poco creíble.



**Figura 2.13.** (A-C) Desconvoluciones mediante máxima entropía del espectro de una película seca de PC/PA, para varios valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual de la desconvolución y del ruido teórico.

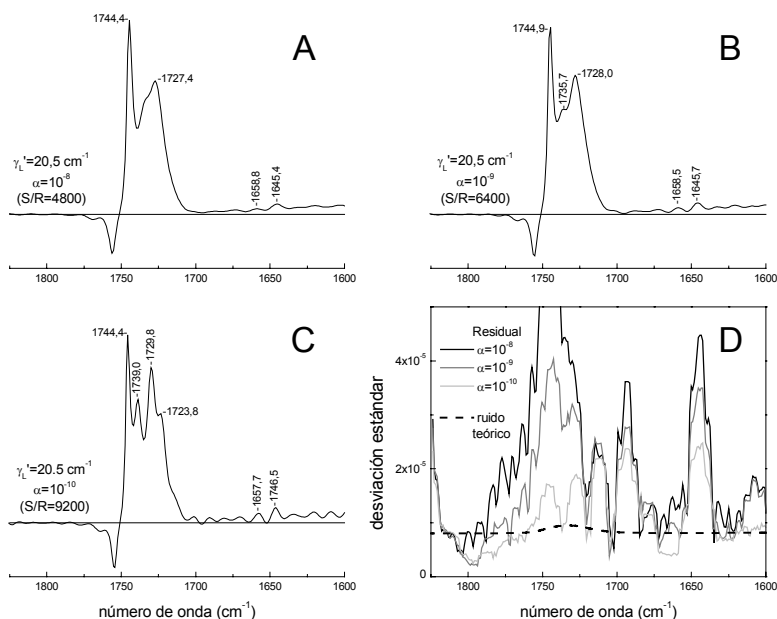
Este hecho, creemos que se debe a la presencia de vapor que no se ha restado perfectamente. Por ello, se introdujo una variación en el método de detección de bandas. Como anteriormente, para detectar una banda, su altura ha de ser tres veces mayor que la altura media de los máximos inducidos por el ruido. Además, ha de ser unas dos veces y media mayor que la altura de los máximos entre 1860-1815 cm<sup>-1</sup>, donde hay bandas de vapor unas dos veces y media menores que las que hay entre 1700-1600 cm<sup>-1</sup>.

Los resultados con este criterio de detección nuevo, se muestran en la figura 2.12A. Ahora, las bandas detectadas son razonables. Por ello, éste es el criterio que utilizaremos para detectar bandas en la amida I. En la figura 2.12B se representan los espectros desconvueltos para tres valores de  $k$ , junto con las posiciones de las bandas detectadas. Se observa que alrededor de 1850 cm<sup>-1</sup> el ruido para  $k = 3,8$  es mucho más intenso que a 1800 cm<sup>-1</sup>. En nuestra opinión, esto se debe a la presencia de vapor restado de manera imperfecta. Para  $k < 3,5$  este vapor mal restado es menos intenso que el ruido, y no representa un problema.

\* Ver sección 1.1.5.2.C de Resultados Teóricos.

Respecto a las bandas detectadas en la zona del C=O, se encontraron tres, con posiciones aproximadas de  $1743\text{ cm}^{-1}$ ,  $1735\text{ cm}^{-1}$  y  $1725\text{ cm}^{-1}$  y otra menor a  $1718\text{ cm}^{-1}$ .

La figura 2.13 muestra los resultados obtenidos mediante la desconvolución por máxima entropía de la película seca de PC/PA. Los resultados son muy buenos, pues el estrechamiento en la zona del C=O es enorme, además, en la zona entre  $1700\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$  (donde aparece la amida I cuando hay proteína) parece muy suave. Como pasaba en la figura 2.12, se detectan cuatro bandas en la zona del C=O, con posiciones a  $1744\text{ cm}^{-1}$ ,  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1726\text{ cm}^{-1}$  y  $1714\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 2.14.** (A-C) Desconvoluciones mediante máxima entropía del espectro de una película húmeda de PC/PA, para varios valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual de la desconvolución y del ruido teórico.

grado de estrechamiento, se resuelven tres o cuatro bandas en la zona del C=O. Para tres bandas las posiciones son  $1744\text{ cm}^{-1}$ ,  $1736\text{ cm}^{-1}$  y  $1728\text{ cm}^{-1}$ . Estas posiciones coinciden con las obtenidas para el C=O del PC/PA seco, pero no así sus contribuciones relativas ni sus anchuras aparentes. Para cuatro bandas detectadas las posiciones son  $1746\text{ cm}^{-1}$ ,  $1739\text{ cm}^{-1}$ ,  $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1724\text{ cm}^{-1}$ .

## 2.1.4. Determinación del número y posiciones de bandas componentes de la amida I

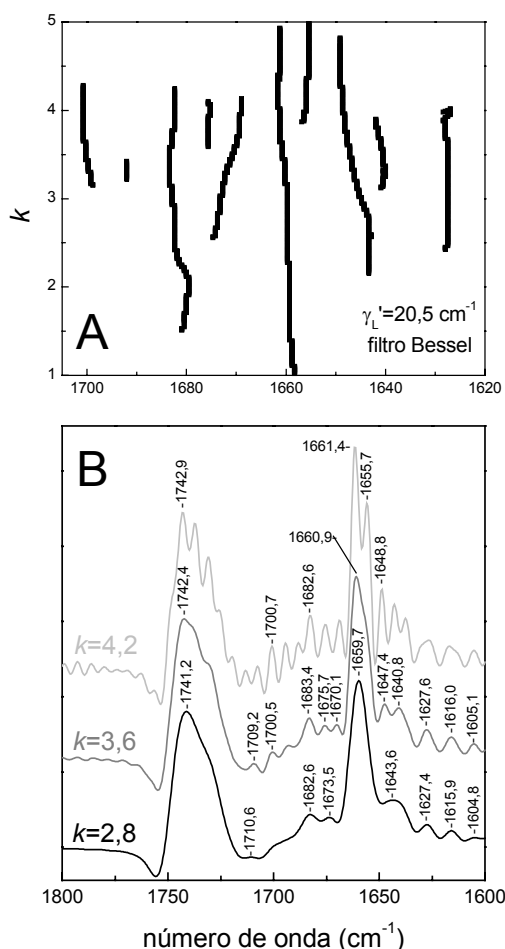
### 2.1.4.1. Desconvolución de Fourier

La figura 2.15A muestra las bandas detectadas en función de  $k$  para una desconvolución, con  $\gamma_L' = 20,5\text{ cm}^{-1}$  y un filtro Bessel, del espectro de la figura 2.1. La detección de bandas se realizó teniendo en cuenta la presencia de vapor restado. La figura 2.15B muestra los espectros desconvulados para tres valores de  $k$  seleccionados, en los que se detectan diferentes bandas. Combinando las diferentes

desconvoluciones se detectan diez bandas en la zona de la amida I. Resulta especialmente interesante la detección de dos bandas a 1661 y 1656 cm<sup>-1</sup> a valores elevados de  $k$ , las cuales aparecen en la zona asignada a hélices alfa. Este hecho es poco habitual, y según nuestro conocimiento, para proteínas de

membrana, sólo se ha visto en la bacteriorodopsina (Cladera et al., 1992) y en el transportador de melibiosa (Dave et al., 2000). Más adelante se hablará con más detalle de ambas bandas.

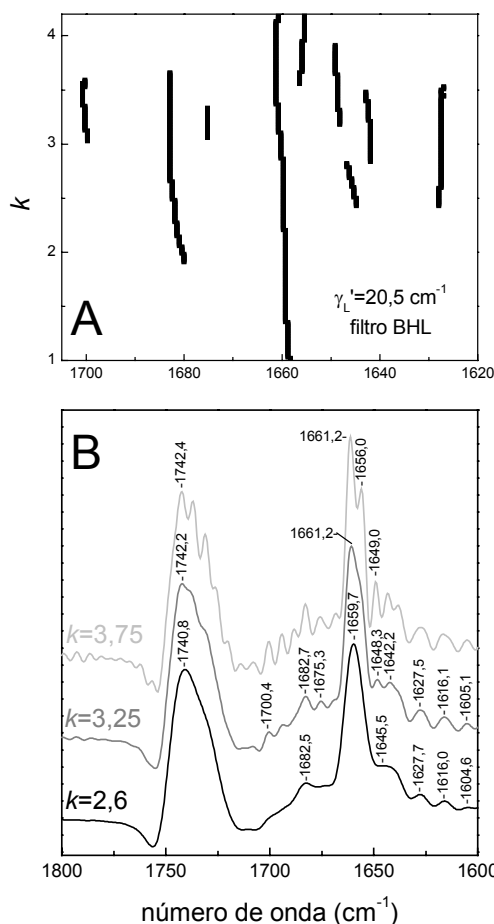
Las figuras 2.16 y 2.17 muestran el mismo proceso para diferentes desconvoluciones. En la figura 2.16 se desconvolvió con  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro BHL. Se detectan un máximo de ocho



**Figura 2.15.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolar el espectro del Anc2pHis de la figura 2.1, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvueltos con tres factores de estrechamientos representativos.

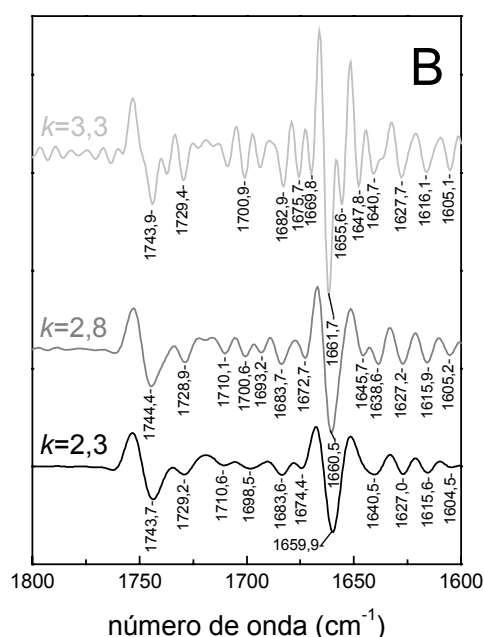
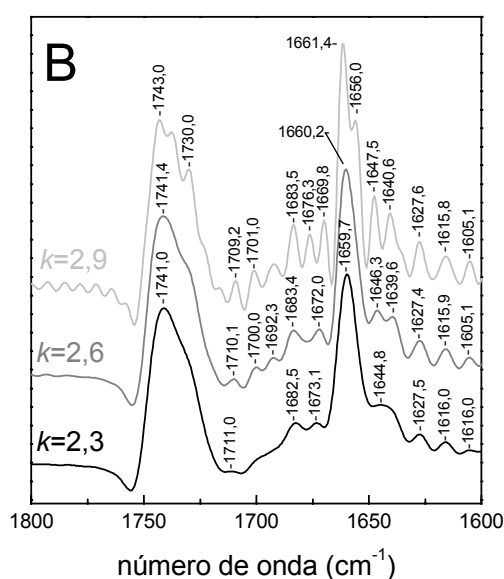
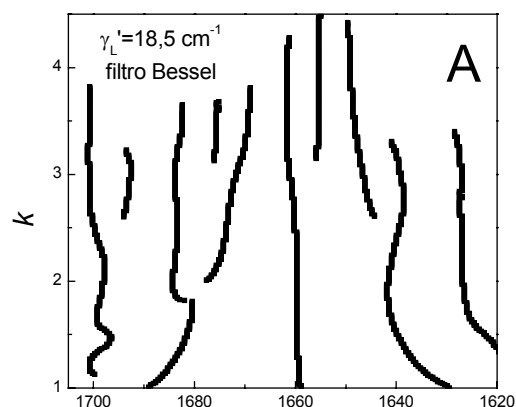
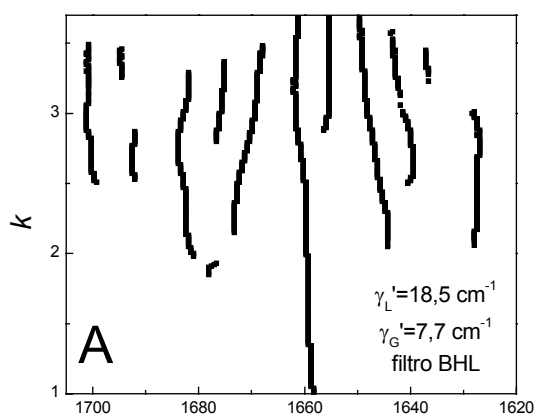
bandas en la zona de la amida I. En la figura 2.17 la desconvolución se realizó con  $\gamma_L' = 18,5 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\gamma_G' = 7,7 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro BHL. Un máximo de diez bandas se detectan en la zona de la amida I.

Finalmente, la figura 2.18 muestra la detección de bandas utilizando la segunda derivada del espectro desconvuelto con  $\gamma_L' = 18,5 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro



**Figura 2.16.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolar el espectro del Anc2pHis de la figura 2.1, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvueltos con tres factores de estrechamientos representativos.

Bessel. Se detectan diez bandas como máximo en la zona de la amida I.



**Figura 2.17.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolutar el espectro del Anc2pHis de la figura 2.1, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvolutados con tres factores de estrechamientos representativos.

**Figura 2.18.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido en la segunda derivada del espectro del Anc2pHis desconvolutado, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Segundas derivadas de los espectros desconvolutados con tres factores de estrechamientos representativos.

En resumen, es posible detectar con claridad entre ocho y diez bandas en la zona de la amida I, dependiendo de la desconvolución realizada y el método de detección. En la tabla 2.1 se recogen las posiciones aproximadas para las diez bandas.

#### 2.1.4.2. Desconvolución regularizada por máxima entropía

La figura 2.19 muestra el espectro del Anc2pHis reconstituido (figura 2.1) desconvolutado con  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$  y diversos valores del parámetro de regularización. Se resuelven un máximo de diez

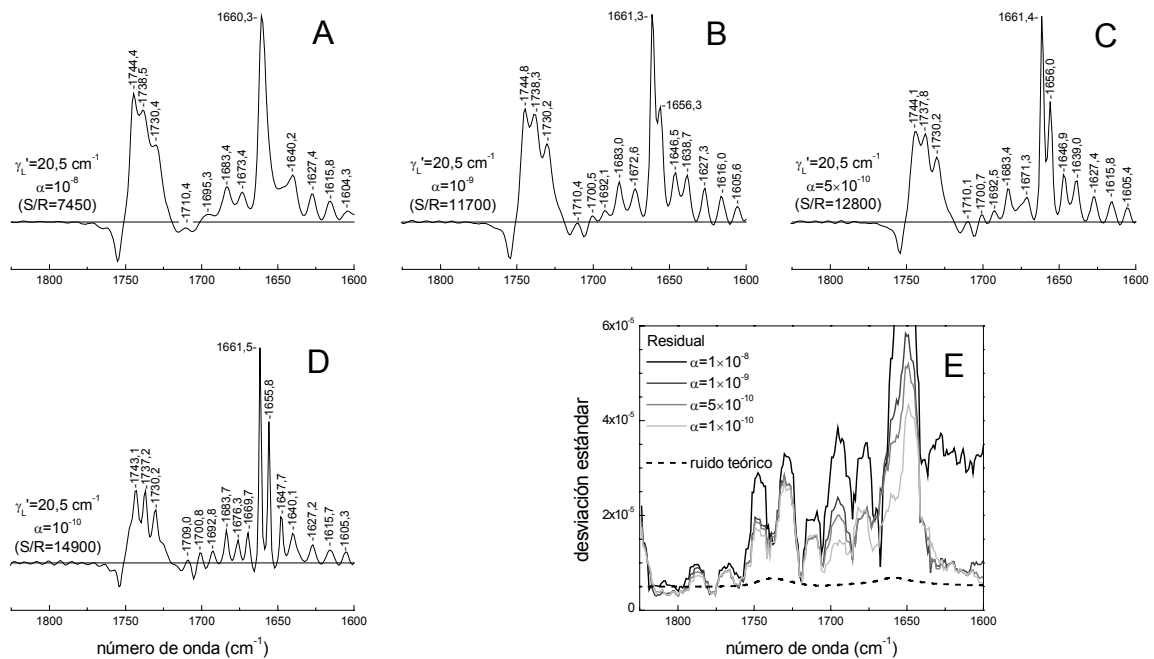


Figura 2.19. (A-D) Espectros del Anc2pHis desconvulados por máxima entropía, para diferentes valores del parámetro de regularización. (E) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.

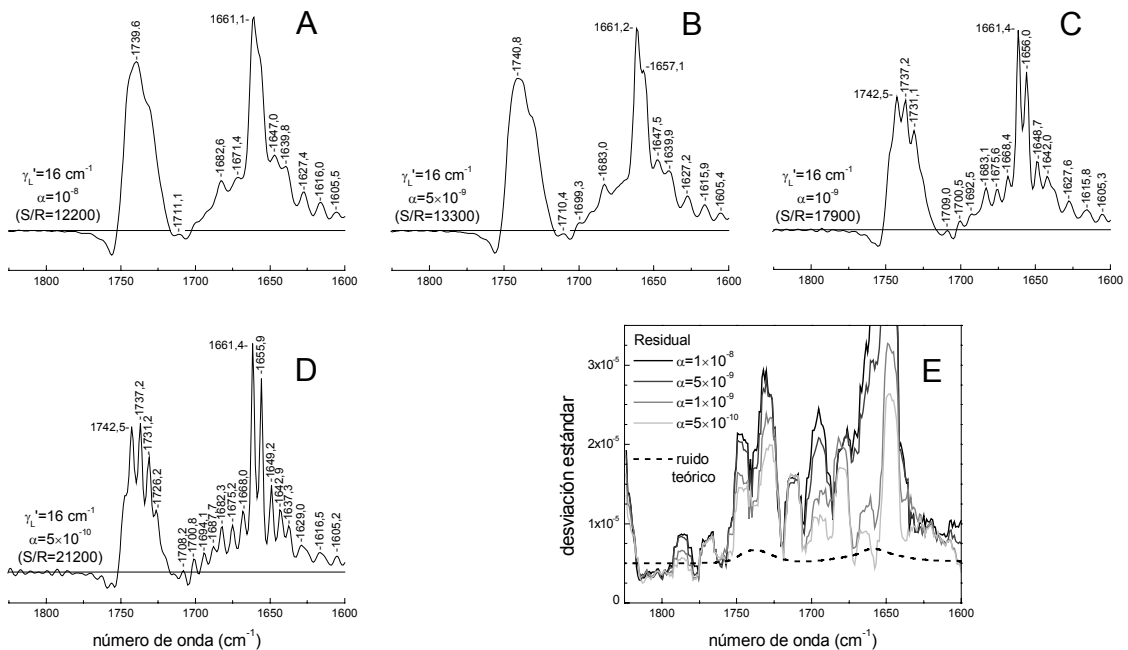
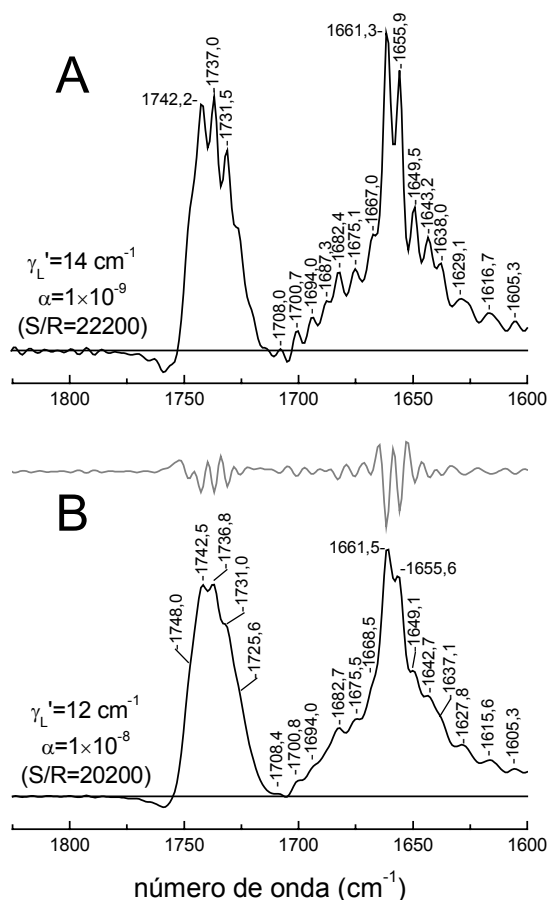


Figura 2.20. (A-D) Espectros del Anc2pHis desconvulados por máxima entropía, para diferentes valores del parámetro de regularización. (E) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.

bandas en la zona de la amida I. A pesar de lo que pudiera pensarse, todas las desconvoluciones mostradas han de considerarse conservadoras, pues la relación S/R que cumplen las desconvoluciones es

muy inferior a 39 000, la relación S/R del espectro. Este hecho puede observarse en la figura 2.19E, donde se muestra la desviación estándar del residual en la desconvolución y se compara con la desviación estándar teórica del ruido para el espectro. Hemos de recordar que, a causa de que la presencia de bandas de vapor de agua en el espectro se elimina por resta, su resta imperfecta puede actuar como ruido aparente. Por ello, en la práctica, la relación S/R del espectro para la zona de la amida I será menor de 39 000. De manera muy conservadora, podemos considerar una relación S/R para el espectro dos veces menor, esto es, de aproximadamente 20 000.



**Figura 2.21.** Espectros del Anc2pHis desconvueltos por máxima entropía para dos valores de la anchura de desconvolución.

de 21 000, aparecen trece bandas en la zona de la amida I (figura 2.20D).

Seguidamente se probó desconvolucionar con  $\gamma_L' = 14 \text{ cm}^{-1}$  y con  $\gamma_L' = 12 \text{ cm}^{-1}$  (ver figura 2.21). En estas condiciones, la posibilidad de sobredesconvolucionar alguna banda, es menor. De hecho, es más probable que en estas condiciones la mayoría de bandas sufran una infradesconvolución importante, lo que llevará a pequeños estrechamientos, tal como es posible observar en la figura 2.21. Para  $\gamma_L' = 12 \text{ cm}^{-1}$  (figura 2.21B), la presencia de once bandas en la zona de la amida I es clara en la segunda derivada del espectro

Para la desconvolución utilizando  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$  (figura 2.19), no fue posible obtener valores de S/R mayores de 16 000, ni utilizando valores para el regularizador de cero. Una causa probable es que, en estas condiciones, algunas bandas están siendo sobre o autodesconvueltas, lo cual, como hemos visto en Resultados Teóricos (sección 2.2), puede causar valores para el residual de la desconvolución excesivamente grandes, y por ello llevar a valores de S/R excesivamente bajos.

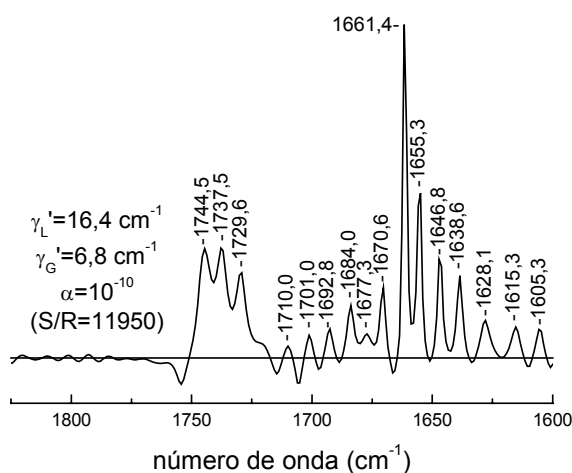
Para evitar una posible sobredesconvolución, se desconvuló con  $\gamma_L' = 16 \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados se muestran la figura 2.20. En estas condiciones los valores de la relación S/R obtenibles son bastante superiores a los obtenidos en la figura 2.19. Todas las desconvoluciones pueden considerarse conservadoras, excepto una de ellas, que muestra una relación S/R de  $\approx 21\ 000$ . En las desconvoluciones con una relación S/R menor de 20 000 se resuelven entre diez y once bandas en la zona de la amida I (figura 2.20A-C). Para la desconvolución con una relación S/R

desconvuludo, mientras que doce bandas lo son el espectro desconvuludo con  $\gamma_L' = 14 \text{ cm}^{-1}$  (figura 2.21A).

Finalmente, se decidió incluir el carácter Gausiano en la desconvolución, desconvuludo para bandas Voigtianas con  $\gamma_L' = 16,4 \text{ cm}^{-1}$  y  $\gamma_G' = 6,8 \text{ cm}^{-1}$ . Fue difícil obtener valores altos para la relación S/R, lo que sugiere sobredeconvolución. Este resultado hace pensar que las bandas de la amida I tendrán una anchura Gausiana pequeña. La figura 2.22 muestra la desconvolución con la que obtuvimos unos de los valores de la relación S/R más altos, que ni tan sólo llega a 12 000. En este espectro desconvuludo se resuelven diez bandas en la amida I.

Respecto a las bandas de lípidos, comparando las figuras 2.13 y 2.14 con la figura 2.19 se puede concluir que la presencia de proteína afecta a sus bandas. Estas diferencias podrían deberse a una interacción del C=O de los fosfolípidos con alguna cadena lateral de la proteína, aunque la causa podría ser otra.

En resumen, mediante la desconvolución regularizada por máxima entropía es posible detectar un mínimo de nueve bandas y un máximo de doce bandas en la amida I. Las posiciones aproximadas para diez y doce bandas se ha recopilado en la tabla 2.1.

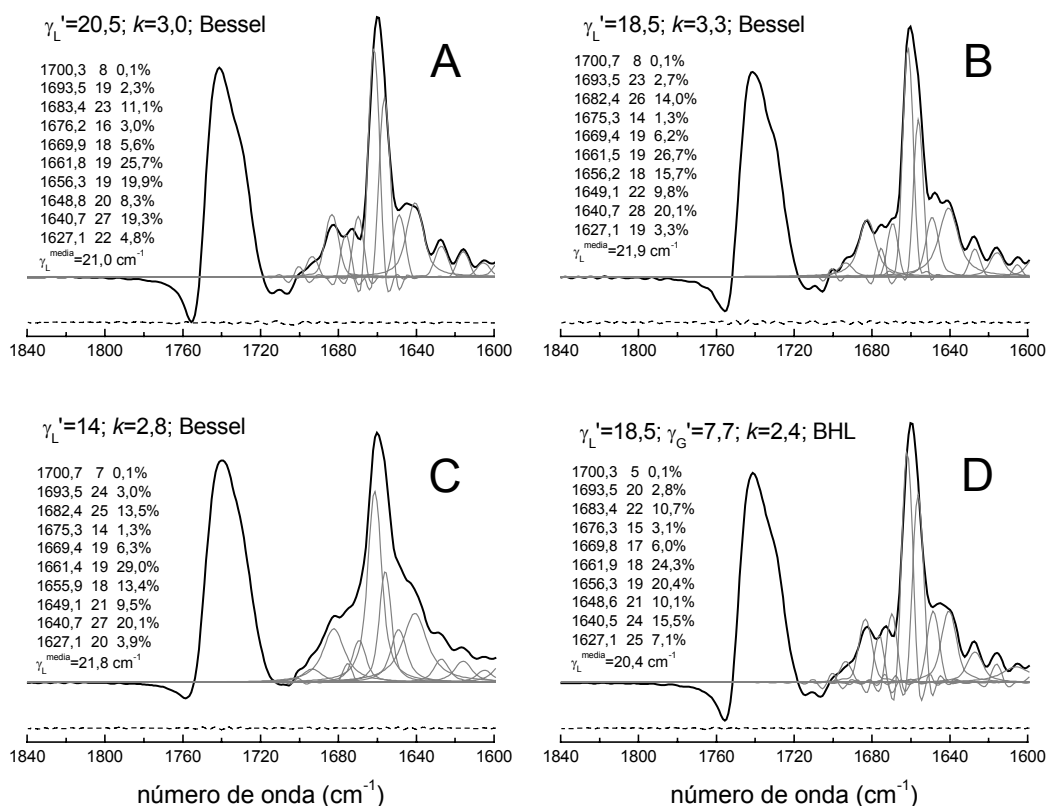


**Figura 2.22.** Espectro del Anc2pHis desconvuludo por máxima entropía.

DF	DRME	
	Diez bandas	Doce bandas
1700,8±0,3	1700,5±0,7	1700,7±0,2
1692,8±0,6	1692,7±0,2	1693,7±0,8
		1687,5±0,3
1682,9±0,4	1682,4±0,4	1682,6±0,4
1675,8±0,4	1676,1±0,8	1675,3±0,3
1669,9±0,2	1670,1±1,1	1668,0±0,7
1661,4±0,2	1661,4±0,1	1661,4±0,1
1655,8±0,2	1656,0±0,7	1655,8±0,2
1648,3±0,7	1647,5±0,8	1649,1±0,4
1641,1±0,8	1639,9±1,3	1642,7±0,8
		1637,3±0,6
1627,6±0,1	1627,6±0,3	1628,4±0,8

**Tabla 2.1.** Posición de las bandas detectadas en la amida I del Anc2pHis reconstituido.

## 2.1.5. Determinación de los parámetros de las bandas componentes en la amida I

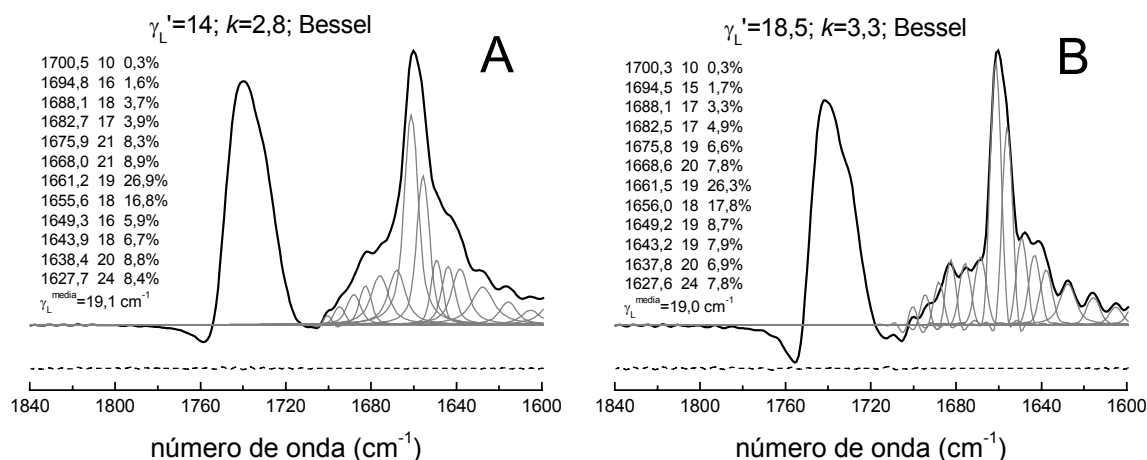


**Figura 2.23.** Ajuste de espectros desconvulados por Fourier utilizando diez bandas en la amida I. Los ajustes se realizaron con bandas Lorentzianas desconvuladas para las bandas amida I y con bandas Voigtianas desconvuladas para el resto de bandas.

La figura 2.23 muestra ajustes a diversos espectros desconvulados por Fourier. Estos ajustes se realizaron utilizando diez bandas en la zona de la amida I, y las posiciones e incertidumbres de las bandas obtenidas mediante la desconvolución de Fourier, recogidas en la tabla 2.1. El ajuste se realizó asumiendo bandas Lorentzianas para las bandas amida, y bandas Voigtianas para el resto de bandas. Con estas asunciones el ajuste es casi perfecto (el residual del ajuste está al nivel del ruido).



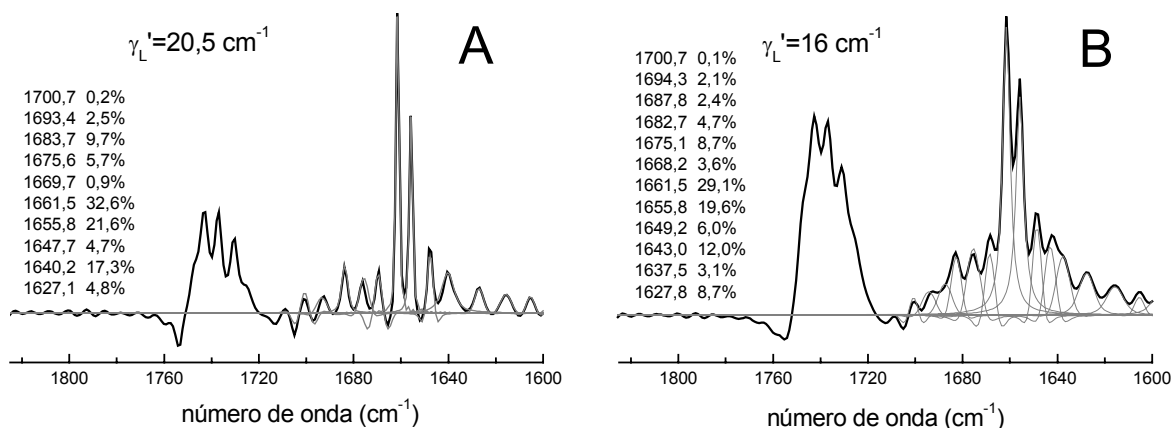
Posteriormente, el ajuste se realizó asumiendo bandas Voigtianas para todas las bandas del espectro.



**Figura 2.24.** Ajuste de espectros desconvolados por Fourier utilizando doce bandas en la amida I. Los ajustes se realizaron con bandas Lorentzianas desconvoladas para las bandas amida I y con bandas Voigtianas desconvoladas para el resto de bandas.

Cuando se realizaron los ajustes, todas las bandas Voigtianas correspondientes a banda amida I mostraron un anchura Gaussiana menor de 2 cm<sup>-1</sup> y factores Gaussianos menores de 0,1 (no mostrado). Por ello, podemos asumir que las bandas amida I para la proteína reconstituida pueden describirse con forma Lorentziana.

Los parámetros obtenidos, cuando se asumió bandas Lorentzianas para las bandas amida I, se muestran en la misma figura 2.23. La posición y el área la utilizaremos más adelante para obtener información estructural. Respecto a la anchura de las bandas amida I, el valor medio obtenido fue  $\gamma_L^{\text{media}} \approx 21,3 \text{ cm}^{-1}$  ( $\gamma_G^{\text{media}} = 0 \text{ cm}^{-1}$ ). Este valor para la anchura Gaussiana es diferente del estimado en el apartado 2.1.2 por la mayoría de datos. Este error en la estimación de la anchura Gaussiana puede achacarse a la presencia de la banda C=O de fosfolípido, pues incluso al restarla muestra contribuciones



**Figura 2.25.** Ajuste de dos espectros del Anc2pHis desconvolados por máxima entropía.

en el espectro. Por lo tanto, para proteínas reconstituidas, la estimación de la anchura Gausiana de las bandas de la amida I no se puede considerar totalmente fiable.

La figura 2.24 muestra el resultado de ajustar trece bandas en la zona de la amida I. Las posiciones e incertidumbres de estas bandas se obtuvieron de las desconvoluciones por máxima entropía recopiladas en la tabla 2.1. El ajuste se realizó asumiendo una forma Lorentziana para las bandas amida I. Posteriormente a las bandas amida se les permitió tener carácter Gausiano, pero para todas las bandas amida la anchura Gausiana se mantuvo próxima a cero, como en los ajustes anteriores. Los valores de los parámetros de las bandas obtenidos en los dos ajustes se muestran en la misma figura 2.24.

La figura 2.25 muestra los resultados al ajustar dos espectros desconvulados por máxima entropía. En la figura 2.25A el espectro se desconvuló con  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$  y el ajuste se realizó para diez bandas en la zona de la amida I. Las posiciones y áreas de las bandas se muestran en la misma figura. La figura 2.25B corresponde al espectro desconvulado con  $\gamma_L' = 16 \text{ cm}^{-1}$  y ajustado con doce bandas en la zona de la amida I.

Los valores de los parámetros de las bandas ajustadas en las figuras 2.24A y B son los que se utilizaron en el siguiente punto, para obtener información estructural del transportador.

#### 2.1.6. Asignación de las bandas amida I del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas de PC/PA (H<sub>2</sub>O)

La tabla 2.2 muestra los parámetros de las bandas obtenidas para el transportador Anc2pHis reconstituido. A continuación entramos en detalles sobre el proceso de asignación. Las asignaciones se han realizado en base a los datos recopilados en el Apéndice 6.

**Banda a 1701 cm<sup>-1</sup> (0,2% del área):** Su asignación es poco relevante a causa de su pequeña área. Podría corresponder al modo B<sub>3</sub> de láminas beta antiparalelas, que es de muy baja intensidad. También podría corresponder a algún tipo de giro reverso poco frecuente en la proteína.

**Banda a 1695 cm<sup>-1</sup> (1,6 % del área):** La asignación principal es para el modo B<sub>1</sub> de las láminas beta antiparalelas. El modo B<sub>2</sub> corresponderá a la banda a 1628 cm<sup>-1</sup>, con el 8% del área. La anchura de la banda (16 cm<sup>-1</sup>) es algo mayor de lo esperable y también su área. Por lo tanto, hemos de considerar una contribución secundaria de giros reveros, que podría corresponder al 0,6-1 %.

**Bandas a 1688 cm<sup>-1</sup> (3% del área), 1683 cm<sup>-1</sup> (5% del área), 1676 cm<sup>-1</sup> (7% del área) y 1668 cm<sup>-1</sup> (8% del área):** Principalmente corresponderán a giros reversos. La banda a 1688 cm<sup>-1</sup> podría tener contribuciones del modo B<sub>1</sub> de las láminas beta antiparalelas onduladas, pero menor del 1% (si toda la banda a 1638 cm<sup>-1</sup> se asigna al modo B<sub>2</sub> de láminas beta antiparalelas onduladas, el modo B<sub>1</sub> ha de ser del 0,8%). La banda a 1668 cm<sup>-1</sup> podría tener contribución del modo A de las láminas beta paralelas, pero también menor del 1% (si toda la banda a 1643 cm<sup>-1</sup> se asigna al modo B de láminas beta paralelas el modo A ha de ser del 0,7%).

**Banda a 1661 cm<sup>-1</sup> (27% del área):** La asignación principal de esta banda correspondería a hélices alfa transmembrana. El número de onda es algo superior a lo habitual, pero se ha descrito que un aumento de la distancia del puente de hidrógeno  $i \rightarrow i+4$  de las hélices alfa aumento su número de onda (ver punto 6 del Apéndice, Zhang et al. (1992) y Tatulian et al. (1997)). Así, en hélices en dominios solubles es posible detectar bandas asignadas a hélices alfa hasta 1659 cm<sup>-1</sup>. Este estiramiento podría estar causado por un conflicto entre el grosor de la bicapa y la longitud de la hélice transmembrana necesaria para atravesarla, para una orientación de la hélice concreta. Es decir, que las hélices transmembrana no distorsionadas sean demasiado cortas para atravesar completamente la membrana lipídica, y por ello tiendan a alargarse para minimizar la inclusión de residuos polares dentro de la membrana.

La asignación a hélices transmembrana está reforzada por el espectro de dicroísmo (ver punto 2.2), donde aparece una banda positiva a 1661 cm<sup>-1</sup>, coherente con una hélice transmembrana (ya sea alfa o 3<sub>10</sub>). Sin embargo, creemos que no sería correcto asignar toda el área de esta banda a hélices transmembrana. Si esto fuera así, la anchura de la banda en el espectro de absorbancia tendría que ser semejante a la del espectro de dicroísmo, y no lo es, pues en el espectro de absorbancia la anchura de esta banda es de 19 cm<sup>-1</sup> y en el dicroísmo se estimó de  $\approx 12$  cm<sup>-1</sup>. Esto indica que alguna estructura sin orientación preferencial contribuirá en esta banda.

Teniendo en cuenta el trabajo realizado con el Anc2pHis no inhibido (Lórenz-Fonfría et al., 2003), donde hay evidencia que lazos largos contribuirían en la proteína reconstituida a 1661 cm<sup>-1</sup> (no es

Posición	Anchura	Área	Asignación
1700	10	0,3	láminas $\beta$ antiparalelas / giros reversos
1695	16	1,6	láminas $\beta$ antiparalelas (giros reversos)
1688	18	4	giros reversos (láminas $\beta$ antiparalelas)
1683	17	4	giros reversos
1676	20	8	giros reversos
1668	21	8	giros reversos (láminas $\beta$ paralelas)
1661	19	27	hélices $\alpha$ transmembrana y lazos largos / hélices 3 <sub>10</sub> globulares
1656	18	17	hélices $\alpha$ transmembrana (giros reversos, hélices $\alpha$ globulares, estructuras al azar)
1649	17	7	hélices 3 <sub>10</sub> transmembrana / hélices $\alpha$ globulares (estructuras irregulares, estructuras al azar)
1644	18	7	láminas $\beta$ paralelas / hélices 3 <sub>10</sub> (estructuras irregulares)
1638	20	8	láminas $\beta$ antiparalelas y estructuras irregulares
1627	23	8	láminas $\beta$ antiparalelas

**Tabla 2.2.** Asignación de las bandas del Anc2pHis reconstituido. Entre paréntesis se indican contribuciones minoritarias y fuera de él las mayoritarias. La barra “/” separa dos posibles asignaciones. Para más detalle sobre la asignación ver el texto.

totalmente descartable que en vez de lazos largos sean hélices  $3_{10}$  en dominios globulares), parece lógico considerar que los lazos largos tendrán una contribución en esta banda.

Por todo esto, y teniendo en cuenta también los resultados en  $D_2O$  (ver punto 3), asignamos de manera tentativa un 21% del área a hélices alfa transmembrana y un 6% a lazos largos (como alternativa a los lazos, hélices  $3_{10}$  globulares).

**Banda a  $1656\text{ cm}^{-1}$  (18% del área):** Esta banda puede asignarse casi en su totalidad a hélices alfa transmembrana no estiradas. Además, en el espectro de dicroísmo aparece una banda positiva a  $1656\text{ cm}^{-1}$  (ver punto 2.2), coherente con una hélice transmembrana. Otras estructuras podrían tener cierta contribución en esta banda, como hélices en dominios solubles, estructuras al azar y/o giros reversos, pero creemos que serán menores. Además, la banda en el espectro de absorbancia muestra una anchura de  $18\text{ cm}^{-1}$  semejante a la anchura de la banda del espectro de dicroísmo (estimada en  $\approx 15\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual es coherente con asignar la totalidad de la banda a  $1656\text{ cm}^{-1}$  a estructuras que mostrarán una orientación preferencial hacia la normal de la bicapa.

Asignando la totalidad de esta banda a hélices alfa transmembrana, y parcialmente la banda a  $1661\text{ cm}^{-1}$ , tendremos un 35% de área asignada a hélices transmembrana (asumiendo coeficientes de absorción semejantes para todas las estructuras). Si la banda a  $1661\text{ cm}^{-1}$  se asignara totalmente a hélices transmembrana, su porcentaje en área sería del 45%.

**Banda a  $1649\text{ cm}^{-1}$  (7% del área):** Las hélices alfa en dominios globulares muestran una frecuencia normalmente superior a  $1651\text{ cm}^{-1}$ , pero las irregularidades o la hidratación pueden disminuir su frecuencia (ver punto 1 del Apéndice, Chirgadze et al. (1976), y Neuskaya y Chirgadze (1976)). Las estructuras al azar suelen aparecer por encima de  $1649\text{ cm}^{-1}$ , pero una hidratación extra podría disminuir su frecuencia. Por otro lado, bandas un poco por debajo de  $1650\text{ cm}^{-1}$  han sido asignadas a estructuras irregulares (Kumosinki y Unruh, 1996).

Resulta curioso que en el espectro de dicroísmo aparezca una banda positiva a  $1648\text{ cm}^{-1}$ , indicando que parte de la estructura asignada a esta banda tendría que mostrar una tendencia a estar orientada (ver punto 2.2). Esto no sería posible asignando totalmente esta banda a una estructura al azar. Aunque es conceptualmente posible que una estructura irregular muestre unos enlaces  $C=O$  con una dirección preferencial (en este caso paralela a la normal de la bicapa), no es esperable. Parece más fácil que esta orientación se dé para una estructura regular, donde la dirección de los enlaces  $C=O$  está ligada a los ejes de la estructura, y es aún más fácil que esta orientación se dé si la estructura en cuestión es transmembrana. Teniendo en cuenta que las hélices  $3_{10}$  en dominios solubles se han asignado a  $1643\text{ cm}^{-1}$  (Holloway y Mantsch, 1989) es posible que en un dominio transmembrana (aunque sea en los extremos) aparezca a  $1648\text{ cm}^{-1}$ .

Por ello creemos que toda o parte del área de esta banda tendrá que asignarse hélices  $3_{10}$  transmembrana. Como alternativa, podría asignarse a hélices alfa globulares (más o menos irregulares y/o hidratadas), pero éstas tendrían que estar orientadas paralelas a la normal de la bicapa. Al no ser de

membrana se tendrían que formar en los lazos topológicos. Para que adoptaran la orientación adecuada, o bien tendrían que estar al inicio de los lazos (cerca de las hélices transmembrana), o por la mitad de los lazos mitocondriales (suficientemente largos para que se dé esta orientación).

**Banda a 1643 cm<sup>-1</sup> (7% del área):** Esta banda podrá tener, en teoría, contribuciones de estructuras irregulares, de hélices  $3_{10}$  o de láminas beta paralelas. El hecho que en el espectro de dicroísmo aparezca una banda a 1642 cm<sup>-1</sup> con signo positivo, y teniendo en cuenta la asignación de la banda a 1649 cm<sup>-1</sup> a hélices  $3_{10}$ , apoyamos una asignación principal a láminas beta paralelas, sin descartarse cierta contribución de estructuras irregulares.

**Banda a 1638 cm<sup>-1</sup> (8% del área):** Esta banda tiene dos posibles contribuciones, correspondientes a láminas beta (posiblemente antiparalelas) y a estructuras irregulares.

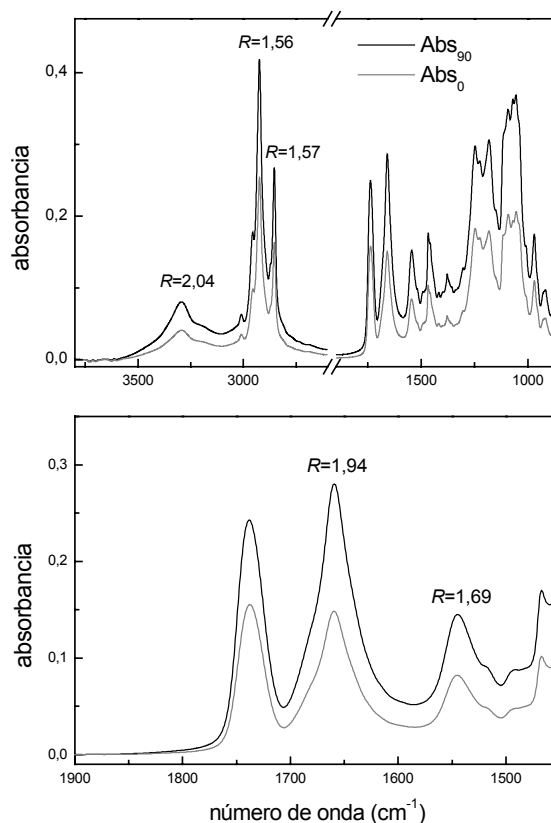
**Banda a 1628 cm<sup>-1</sup> (8% del área):** Esta banda se asigna sin dudas al modo B<sub>2</sub> de las láminas beta antiparalelas. Su modo B<sub>1</sub> a 1695 cm<sup>-1</sup> muestra una separación común (67 cm<sup>-1</sup>).

## 2.2. Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación polarizada ( $H_2O$ )

### 2.2.1. Propiedades del espectro

La figura 2.26 muestra los espectros de absorbancia, utilizando luz polarizada a  $90^\circ$  y a  $0^\circ$ , de la película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas de PC/PA. En la figura 2.26 se ha indicado la razón dicróica para algunas bandas. Estos valores se obtuvieron como se explica en Materiales y Métodos.

La desviación estándar del ruido es aproximadamente de  $1,5 \times 10^{-5}$  UA a  $1850 \text{ cm}^{-1}$ . Este valor es mayor que sin polarización, pues el polarizador atenúa de manera importante el haz infrarrojo. Como consecuencia, los valores de la relación absorbancia/ruido (A/R) son menores que sin polarización (no mostrado). Para la polarización a  $90^\circ$  la relación A/R máxima para la amida I es de 12 200, y para la amida II de 7950. La relación señal/ruido en la zona entre  $1850\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$  es de 16 300. Para la polarización a  $0^\circ$  estos valores son respectivamente 8050, 4900 y 9200.



**Figura 2.26.** Espectro de absorbancia del Anc2pHis inhibido y reconstituido, utilizando radiación polarizada. Se ha indicado la razón dicróica para algunas bandas.

### 2.2.2. Determinación del parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis respecto a la normal de la bicapa

Para determinar el parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis respecto a la bicapa, es necesario conocer el parámetro de orden de la bicapa de proteoliposomas respecto al cristal de RTA y el parámetro de orden de la vibración amida I respecto a las estructuras de la proteína. Si la película de la muestra no es gruesa, es necesario, además, conocer el grosor de la película de muestra.

### 2.2.2.1. Determinación del parámetro de orden de las vibraciones respecto al cristal de RTA

Teniendo en cuenta que la razón dicroica para la amida I es de 1,94 y para la amida II es de 1,69, podemos determinar los parámetros de orden de estas vibraciones respecto al cristal de RTA,  $p_{\phi}^{al}$  y  $p_{\phi}^{all}$ , utilizando la ecuación 5.11 de Materiales y Métodos, lo cual requiere conocer el grosor de la película,  $l$ , depositada sobre el cristal de RTA. Por lo tanto, tenemos dos ecuaciones y tres incógnitas:  $p_{\phi}^{al}$  y  $p_{\phi}^{all}$  y  $l$ .

Podemos ampliar el número de ecuaciones a tres, siendo la nueva ecuación:

$$\frac{p_{\phi}^{al}}{p_{\phi}^{all}} = \frac{p_{\alpha}^{al} \times p_{\beta} \times p_{\gamma}}{p_{\alpha}^{all} \times p_{\beta} \times p_{\gamma}} = \frac{p_{\alpha}^{al}}{p_{\alpha}^{all}} \approx -1,2 \quad (2.1)$$

donde  $p_{\alpha}$  es el parámetro de orden de una vibración respecto al eje de la estructura en la que se encuentra y  $p_{\gamma}$  es el parámetro de orden la normal de la bicapa lipídica respecto a la normal del cristal de RTA. En la simplificación de la ecuación 2.1 se ha utilizado la relación  $p_{\alpha}^{al}/p_{\alpha}^{all} \approx -1,2$  (Marsh et al., 2000). Al resolver el sistema de ecuaciones llegamos a  $l = 0,54 \mu\text{m}$  y a  $p_{\phi}^{al} = 0,044$ . Sustituyendo en la ecuación 2.1 tenemos  $p_{\phi}^{all} = -0,038$ . Estos valores son pequeños. Al sustituirlos en la ecuación 5.21 de Materiales y Métodos, vemos que el efecto de la orientación de la muestra en el análisis cuantitativo en ausencia de polarización (punto 2.1) será casi nulo.

Utilizando  $l = 0,54 \mu\text{m}$ , podemos obtener los valores de  $p_{\phi}$  para diferentes vibraciones, a partir de los correspondientes valores de  $R$ . Así, para la amida A tenemos que  $p_{\phi} = 0,038$ . Para la vibración CH<sub>2</sub> asimétrica del lípido tenemos que  $p_{\phi} = -0,125$  y para la simétrica  $p_{\phi} = -0,120$ .

El punto débil de este análisis es el valor de la relación  $p_{\alpha}^{al}/p_{\alpha}^{all}$ , utilizado para obtener el valor de  $l$ . El valor utilizado es el publicado para las hélices alfa (Marsh et al., 2000), pero para otras estructuras puede variar. Esta elección será totalmente correcta si las únicas estructuras con una orientación neta en la proteína son hélices alfa, y aproximada si son las mayoritarias. Posteriormente comprobaremos que las hélices son, ciertamente, las estructuras orientadas mayoritarias.

### 2.2.2.2. Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto al cristal de RTA

El parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis respecto al cristal de RTA corresponde al valor de  $p_{\beta} \times p_{\gamma}$ . Este valor se puede obtener como  $p_{\phi}^{al}/p_{\alpha}^{al}$  (o como  $p_{\phi}^{all}/p_{\alpha}^{all}$  o  $p_{\phi}^{aA}/p_{\alpha}^{aA}$ ). Utilizaremos los valores de  $p_{\alpha}$  publicados para las hélices alfa (Marsh et al., 2000). Esta elección está justificada si las estructuras con orientación neta son principalmente hélices alfa, u otras estructuras con un valor de  $p_{\alpha}$  semejante. Así, tenemos que  $p_{\phi}^{al}/p_{\alpha}^{al} \approx 0,10$ ,  $p_{\phi}^{all}/p_{\alpha}^{all} \approx 0,10$  y  $p_{\phi}^{aA}/p_{\alpha}^{aA} \approx 0,06$ . El valor utilizando la amida I y la amida II coinciden, pues ésta fue la condición utilizada en la ecuación 2.1. El valor obtenido utilizando la amida A es inferior, y puede justificarse por el solapamiento de la amida A y la banda del agua, que hará que el  $p_{\phi}$  determinado utilizando la amida A sea menor que el valor real.

La vibración CH<sub>2</sub> forma un ángulo de 90° con la dirección de la cadena alifática del lípido (Lewis y McElhaney, 1996; Mylers y Cooper, 1994). Por lo tanto, para esta vibración  $p_{\alpha} = -0,5$ . Para la vibración asimétrica, el parámetro de orden calculado para la cadena alifática respecto a la normal del cristal de RTA,  $p_{\beta} \times p_{\gamma}$ , es igual a 0,25, y el calculado utilizando la vibración simétrica es igual a 0,24. Ambos valores tendrían que coincidir, y de hecho son muy semejantes.

### 2.2.2.3. Determinación del parámetro de orden de la bicapa

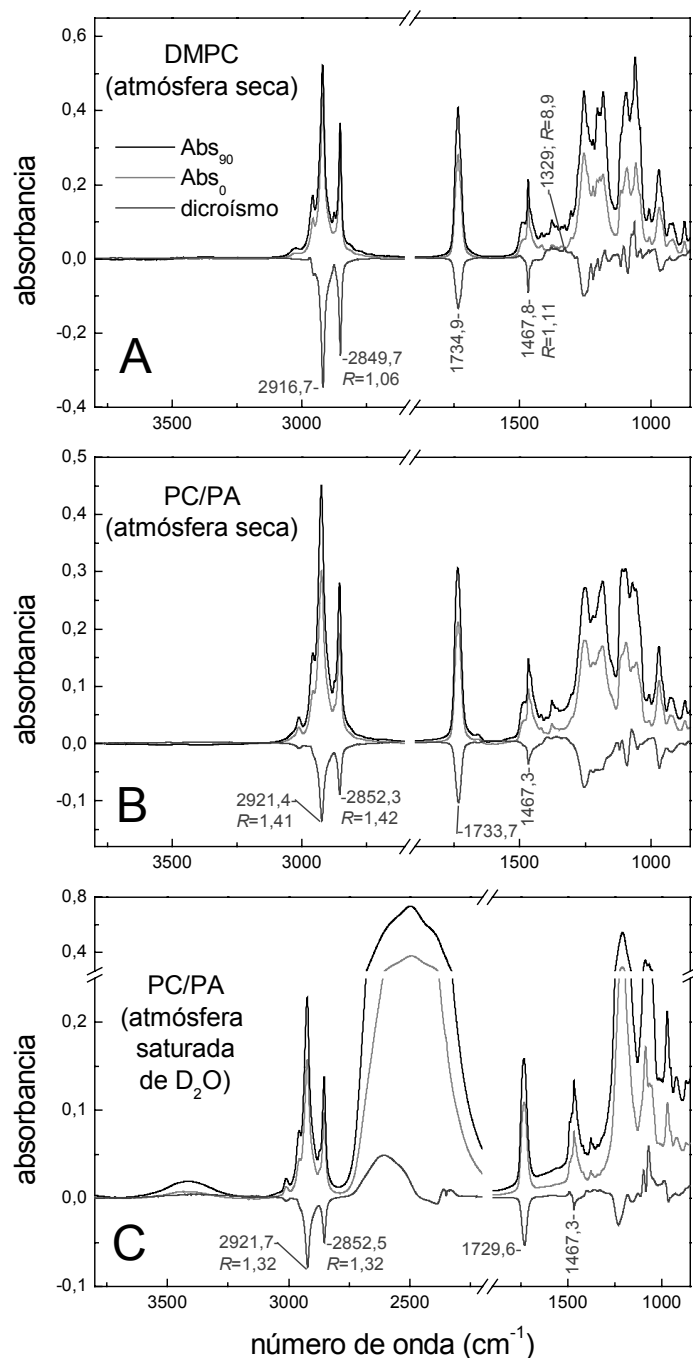
Los resultados anteriores se refieren a parámetros de orden respecto a la normal del cristal de RTA. Para poder obtener parámetros de orden respecto a la normal de la bicapa de proteoliposomas, hemos de determinar el parámetro de orden de la normal de la bicapa de proteoliposomas respecto a la normal del cristal de RTA, es decir  $p_{\gamma}$ .

Podemos obtener  $p_{\gamma}$  si conocemos el valor de  $p_{\beta}$  para la cadena alifática de PC/PA (9/1) en fase cristal líquido, que es la fase en la que se encuentra el PC/PA en la muestra. Nuestros experimentos no permiten obtener directamente este valor, pero sí que podemos obtener una buena estimación mediante extrapolación de valores obtenidos para fosfolípidos conocidos. Para ello, realizamos estudios de polarización de una película seca e hidratada de DMPC, cuyo valor de  $p_{\beta}$  es conocido en estado cristalino, y es 0,93 ( $\beta \approx 12^{\circ}$ ) (Hauser y Poupart, 1992). Una película seca de DMPC se halla en fase pseudocristalina y en disolución, por debajo de 40 °C, en fase gel. Estas dos condiciones son estructuralmente semejantes a la fase cristalina para las colas alifáticas (se encuentran en todo trans) (Lewis y McElhaney, 1996), y por ello esperamos que su parámetro de orden respecto a la normal de la membrana lipídica sea próximo a 0,93 en ambos casos.

La figura 2.27A muestra los espectros de absorbancia a 90° y a 0° de una película seca de DMPC. La cantidad de muestra depositada sobre el cristal fue suficiente para asegurar la presencia de una película gruesa. Por ello, el espectro de dicroísmo (mostrado también en la figura 2.27A) se obtuvo restando al espectro a 90° el espectro a 0° multiplicado por 1,93. Las vibraciones (de estiramiento) del CH<sub>2</sub> (simétrica y asimétrica) y la vibración (de tijeras) del CH<sub>2</sub> son perpendiculares a la dirección de la cola alifática ( $p_{\alpha} = -0,5$ ), mientras que la vibración (de oscilación) del CH<sub>2</sub> tiene la misma dirección ( $p_{\alpha} = 1$ ) (Lewis y McElhaney, 1996; Mylers y Cooper, 1994). A partir del valor de  $R$  para tres de estas bandas, se determinó para las colas de DMPC que  $p_{\beta} \times p_{\gamma} \approx 0,71 \pm 0,03$ . Como consecuencia, el parámetro de orden de la bicapa,  $p_{\gamma}$ , valdrá  $0,77 \pm 0,04$ . Un valor muy semejante se encontró para otras películas de DMPC. Por ello, asumimos que este orden de la bicapa se mantendrá para otros fosfolípidos.

Para la película húmeda de DMPC, en contacto tanto con una atmósfera saturada de H<sub>2</sub>O, como de D<sub>2</sub>O (no mostrado), el valor  $p_{\beta} \times p_{\gamma}$  obtenido fue de  $0,87 \pm 0,4$ . Podemos concluir que en películas húmedas de DMPC el valor de  $p_{\gamma}$  es  $0,94 \pm 0,04$ . Este valor es mayor que en películas secas, y próximo a 1, correspondiente a la disposición perfecta de las bicapas sobre la superficie del cristal de RTA. Esto tiene sentido, pues al hidratarse el agua ocupará las irregularidades de la superficie del cristal.





**Figura 2.27.** (A) Espectro de absorbancia de una película seca de DMPC utilizando radiación polarizada (a 90° y 0°). Se muestra el espectro de dichroísmo lineal, la posición y la razón dichroica para algunas de sus bandas. (B) Igual que (A) pero para una película seca de PC/PA (9/1). (C) Igual que (A) pero para una película húmeda (con D<sub>2</sub>O) de PC/PA (9/1).

Si suponemos que la disposición sobre el cristal de RTA será semejante para las películas de PC/PA puras, podemos utilizar los valores de  $p_\gamma$  encontrados para el DMPC. La figura 2.27B muestra los espectros de absorbancia de una película seca de PC/PA (9/1) para ambas polarizaciones, junto al espectro de dichroísmo. En estas condiciones, el fosfolípido se encuentra en fase gel. La película puede considerarse gruesa, lo que nos lleva a un valor de  $p_\beta \times p_\gamma \approx 0,38$ . Tras asumir un valor de  $p_\gamma \approx 0,77$ , obtenido anteriormente para películas secas de DMPC, tenemos que el valor de  $p_\beta \approx 0,50$  ( $\beta \approx 35^\circ$ ). Este valor es bastante inferior al de DMPC a causa que el PC y PA de huevo son fosfolípidos insaturados.

La figura 2.27C muestra los espectros para una película de PC/PA (9/1) húmeda. En estas condiciones el fosfolípido se encuentra en fase cristal líquido. Para la cadena alifática del fosfolípido tenemos que  $p_\beta \times p_\gamma \approx 0,49$ . Tras asumir que  $p_\gamma \approx 0,94$ , valor obtenidos antes para películas húmedas de DMPC, se obtiene un valor de  $p_\beta \approx 0,52$  ( $\beta \approx 34^\circ$ ). Este valor es prácticamente igual al obtenido para la película seca de PC/PA.

#### 2.2.2.4. Determinación del parámetro de orden de las estructuras moleculares respecto a la normal de la bicapa de proteoliposomas

Hemos determinado el valor  $p_\beta$  como 0,52 para las colas del PC/PA (9/1) en la fase cristal líquido. Esta es la fase en la que se encuentra el lípido en los proteoliposomas, y por lo tanto el valor que utilizaremos para obtener el valor del parámetro de orden de las películas de proteoliposomas. Debido a la presencia de proteína, es de esperar que  $p_\gamma$  sea menor que el obtenido para películas de liposomas, que era de 0,77 para películas secas.

Para la película seca de proteoliposomas, mostrada en la figura 2.26, el valor de  $p_\beta \times p_\gamma$  para las colas de fosfolípido es de 0,25-0,24. Esto nos lleva a un valor de  $p_\gamma \approx 0,47$ . Con este valor podemos obtener el parámetro de orden de las estructuras de la proteína respecto a la bicapa,  $p_\beta$ . Para la amida I este valor puede obtenerse como  $p_\beta = (p_\phi^{al}/p_\alpha^{al})/p_\gamma \approx 0,21$  ( $\beta \approx 47^\circ$ ). Para la amida II se obtiene el mismo resultado. Para la amida A se obtiene que  $p_\beta \approx 0,13$  ( $\beta \approx 50^\circ$ ).

Si consideramos que sólo las hélices transmembrana mostrarán una orientación preferencial, mientras que el resto de estructuras globalmente no la mostrarán, podemos obtener su parámetro de orden respecto a la normal de la bicapa tras una simple corrección. Esta corrección se detalla en Materiales y Métodos (punto 5.1.6) y consiste en dividir  $p_\beta$  de la proteína por la fracción de aminoácidos que se hallan en las hélices transmembrana (para el Anc2pHis supuestamente 0,4).

Tras esta corrección, se calcula, utilizando la amida I y amida II un valor de  $p_\beta$  para las hélices transmembrana de 0,53 ( $\beta \approx 34^\circ$ ). Utilizando la amida A, se calcula un valor de  $p_\beta$  de 0,33 ( $\beta \approx 42^\circ$ ). Teniendo en cuenta que la perturbación de la banda de agua en la obtención de  $R$  para la amida A, parece razonable concluir que el ángulo que forman las hélices transmembrana con la normal de la bicapa lipídica es del orden de  $35^\circ$ .

#### 2.2.3. El espectro de dicroísmo

La figura 2.28A muestra los espectros de absorción a  $90^\circ$  y a  $0^\circ$  de la película seca del Anc2pHis inhibido reconstituido, junto con el espectro de dicroísmo. Este espectro se obtuvo como  $Abs_{90} - R^{iso} \times Abs_0$ , donde  $Abs_{90}$  es el espectro obtenido con polarización a  $90^\circ$ ,  $Abs_0$  con polarización a  $0^\circ$  y  $R^{iso}$  es la razón de dicroica que daría una muestra isotrópica (con  $p_\phi = 0$ ). El valor de  $R^{iso}$  toma el valor de 1,93 para una película gruesa, en nuestras condiciones experimentales. Cuando no es el caso,  $R^{iso}$  varía con el número de onda. El inserto en la figura 2.28A muestra el valor de  $R^{iso}$  en función del número de onda para una película de grosor  $0,54 \mu\text{m}$  en nuestras condiciones experimentales. Se observa que sólo para números de onda superiores a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $R^{iso}$  se aproxima a 1,93, mientras que en la amida I toma valores de  $\approx 1,8$ . Por lo tanto, desde el punto de vista de los espectros de orientación, la película no se puede considerar gruesa a  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , a pesar que  $l/d_p \approx 1,25 > 1$ .

La figura 2.28B muestra una ampliación del espectro de dicroísmo. Este espectro muestra la peculiaridad que sólo aparecen las bandas de vibraciones orientadas ( $p_\phi \neq 0$ ).

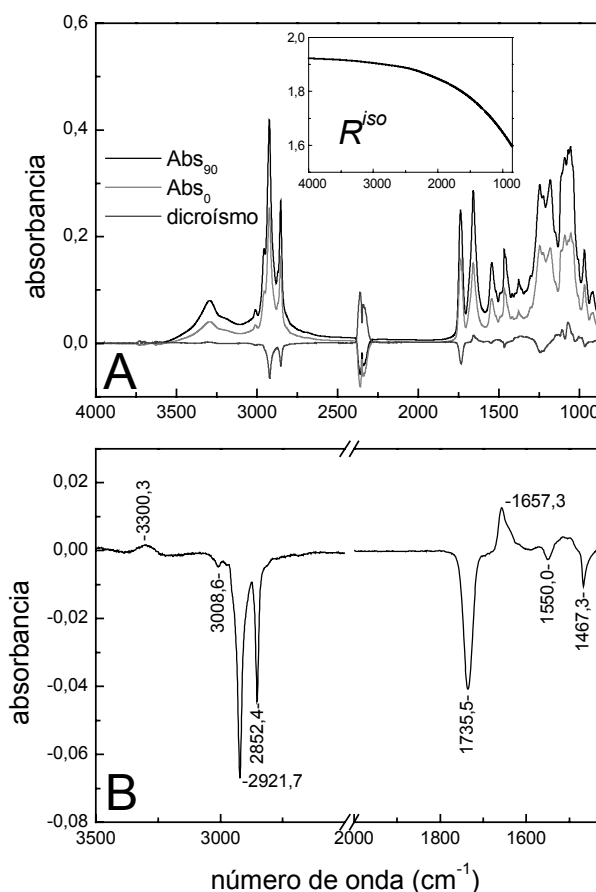
Estrictamente, la absorbancia en un espectro de dicroísmo de una vibración con un coeficiente de absorción molar  $\varepsilon$ , una concentración  $c$  y un parámetro de orden  $p_\phi$ , en un experimento de RTA viene dada por (combinando las ecuaciones 4.7, 4.10 y 5.1 de Materiales y Métodos):

$$Abs_{90} - R^{iso} Abs_0 = c \times \varepsilon \times \frac{n_2 d_p}{2n_1 \cos \theta} \times \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2l}{dp}\right) \right] \times \left[ \langle E(0)^2 \rangle_x (1 - p_\phi) + \langle E(0)^2 \rangle_z (2p_\phi + 1) - \frac{\langle E(0)^2 \rangle_x + \langle E(0)^2 \rangle_z}{\langle E(0)^2 \rangle_y} \times \langle E(0)^2 \rangle_y (1 - p_\phi) \right] = \quad (2.2)$$

$$3p_\phi \times c \times \varepsilon \times \frac{n_2 d_p}{2n_1 \cos \theta} \times \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2l}{dp}\right) \right] \times \langle E(0)^2 \rangle_z$$

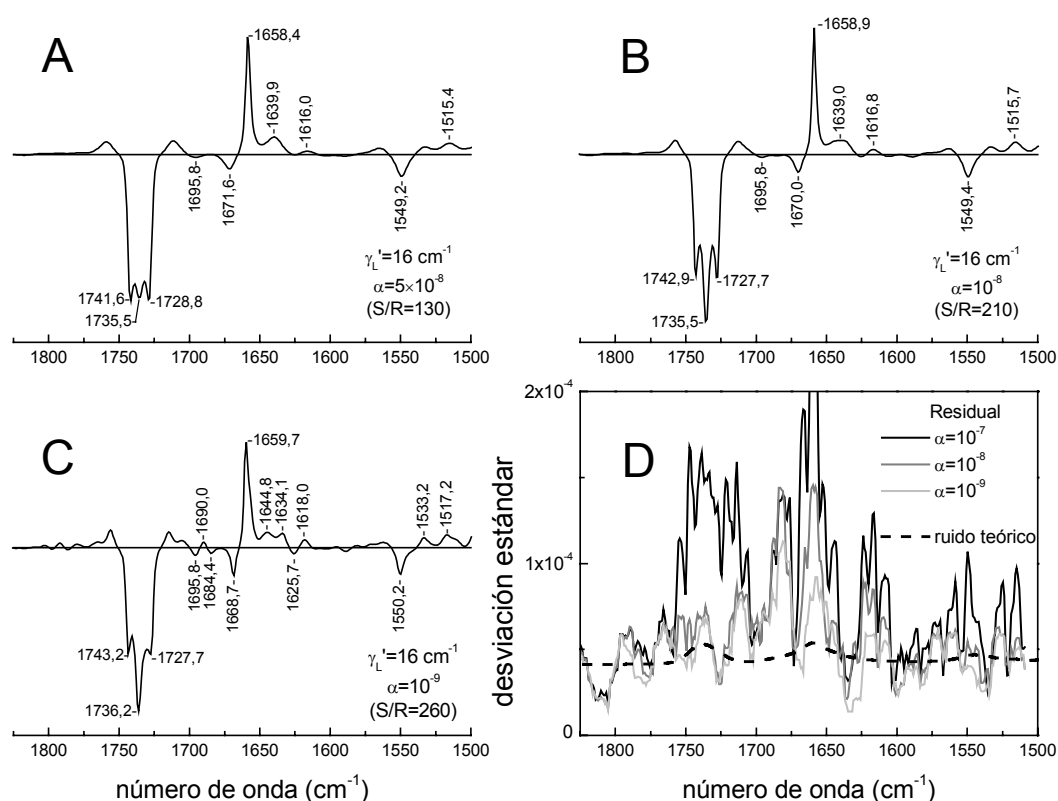
Por lo tanto, la intensidad de una banda en un espectro de dicroísmo es proporcional al valor de  $\varepsilon$ ,  $c$  y  $p_\phi$ . Por ello, en un espectro de dicroísmo las bandas con valores altos de  $|p_\phi|$  incrementan su intensidad con relación a bandas con valores bajos de  $|p_\phi|$ , en comparación con un espectro de absorbancia. Es por lo tanto útil para aumentar la resolución de bandas orientadas. Además, en el espectro de dicroísmo aparecen menos bandas que en un espectro normal, pues las bandas con  $p_\phi \approx 0$  desaparecen. Por el contrario, en el espectro de dicroísmo aparecen tanto bandas positivas como negativas, lo que hace más complejo la identificación de las bandas.

Las bandas que aparecen en el espectro de dicroísmo correspondientes a la proteína son: amida A a 3300,3 cm<sup>-1</sup>, amida I a 1657,3 cm<sup>-1</sup> y amida II a 1550,0 cm<sup>-1</sup>. Estos máximos difieren de los del espectro de absorbancia, que eran, respectivamente, 3293,9 cm<sup>-1</sup>, 1659,0 cm<sup>-1</sup>



**Figura 2.28.** (A) Espectro de absorbancia de una película seca de Anc2pHis, utilizando radiación polarizada (a 90° y 0°). En el inserto se muestra la razón dicroica isotrópica,  $R^{iso}$ , la cual se utilizó para obtener el espectro de dicroísmo lineal. (B) Espectro de dicroísmo lineal del Anc2pHis.

y  $1545,4 \text{ cm}^{-1}$ . Además, las bandas en el espectro de dicroísmo son más estrechas que en el de absorbancia. Por ejemplo, en el espectro de absorbancia la anchura a media alzada para la amida I es de  $42 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que en el espectro de dicroísmo es de  $26 \text{ cm}^{-1}$ . Todas estas diferencias entre el espectro de dicroísmo y el de absorbancia se han de interpretar como que la orientación se concentra selectivamente en ciertas bandas componentes, mientras que otras bandas componentes no muestran orientación, desapareciendo del espectro de dicroísmo.



**Figura 2.29.** (A-C) Desconvoluciones de máxima entropía del espectro de dicroísmo del Anc2pHis presentado en la figura 2.28B. (D) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.

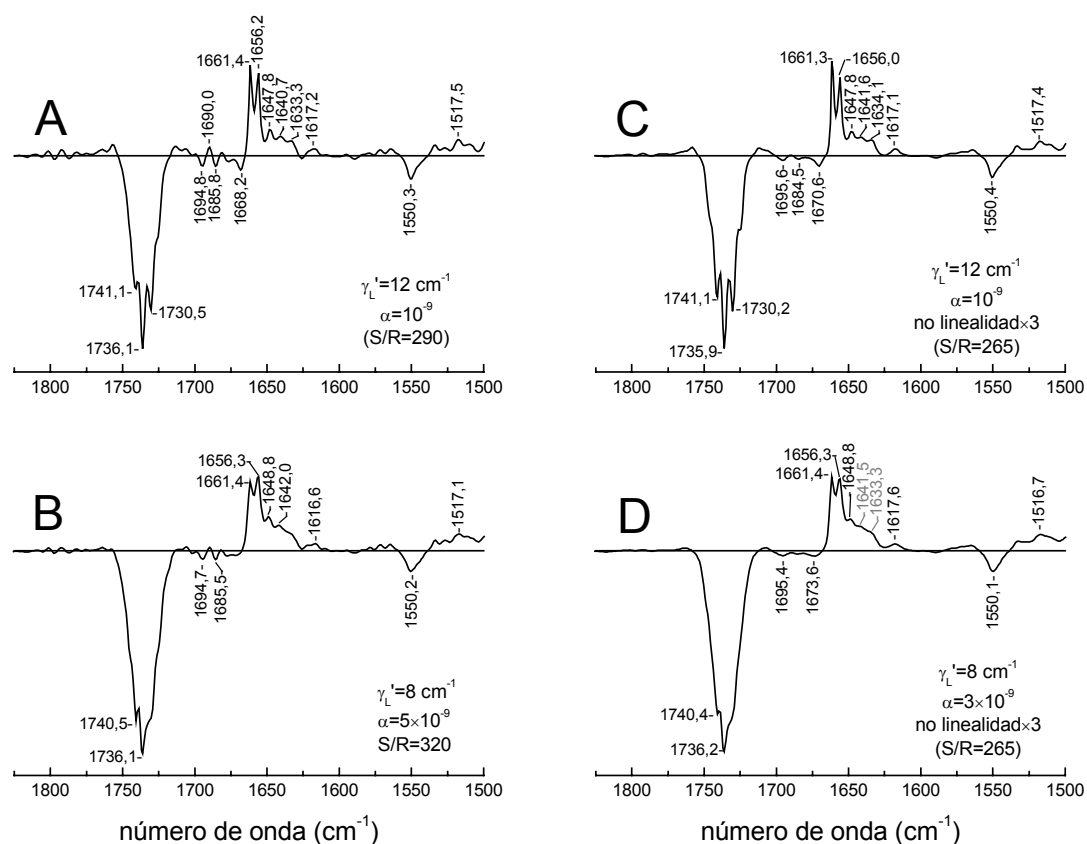
La figura 2.29A-C muestra la desconvolución regularizada por máxima entropía del espectro de dicroísmo entre  $1825\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando  $\gamma_L' = 16 \text{ cm}^{-1}$  y tres valores del regularizador. La relación entre el máximo de la amida I y la desviación estándar del ruido teórico entre  $1825\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$  es de 370. Por lo tanto las tres desconvoluciones mostradas han de considerarse conservadoras (ver también la figura 2.29D), pues muestran valores de S/R de 130, 210 y 260. Mientras que la banda de C=O sigue dando las mismas tres bandas que se resuelven por desconvolución en el espectro de absorbancia, en la zona de la amida I el número de bandas resueltas es muy inferior. Sólo cuatro bandas se resuelven con claridad, con posiciones a 1670, 1659, 1645 y  $1634 \text{ cm}^{-1}$ , siendo la más intensa la banda situada a  $1659 \text{ cm}^{-1}$ . Esta será la banda que corresponde a la estructura con mayor abundancia por orientación ( $c \times p_\phi$  en la ecuación 2.2). La banda a  $1670 \text{ cm}^{-1}$  podría deberse a la sobredesconvolución de la banda a  $1659 \text{ cm}^{-1}$ . Aparece una banda a  $1617 \text{ cm}^{-1}$  corresponde posiblemente a la cadena lateral de la tirosina, pues aparece además otra

banda a 1516 cm<sup>-1</sup> (Rahmelow et al., 1998a). En la zona de la amida II las bandas son más difíciles de interpretar, ya que el espectro de dicroísmo muestra un aparente problema de línea base en esta zona (ver figura 2.28B). En cualquier caso, la banda más intensa aparece a 1550 cm<sup>-1</sup>, con signo negativo. Esta banda estará emparentada con la banda a 1659 cm<sup>-1</sup>.

La figura 2.30A-B muestra la desconvolución del espectro de dicroísmo utilizando  $\gamma_L' = 12 \text{ cm}^{-1}$ , y utilizando también  $\gamma_L' = 8 \text{ cm}^{-1}$ . Con esta elección esperamos alejar la posibilidad de la presencia de bandas sobredesconvueltas, y así poder obtener espectros desconvueltos coherentes con el valor de relación S/R experimental.

La figura 2.30C-D muestra las desconvoluciones al ajustar la no-linealidad del término regularizador. Con este ajuste los espectros desconvueltos aparecen más suaves sin eliminar su potencia resolutive de bandas.

En todas las desconvoluciones de la figura 2.30 aparecen dos bandas a 1661 y 1656 cm<sup>-1</sup>, que recogen la mayor parte del área del espectro de dicroísmo de la amida I ( $\geq 60\%$  entre las dos). Estas dos bandas no se resolvían en la figura 2.29, apareciendo como una sola banda centrada a 1659 cm<sup>-1</sup>. En la zona entre 1650-1620 cm<sup>-1</sup> aparecen tres bandas de menor intensidad, con máximos a 1648, 1641 y 1633 cm<sup>-1</sup>



**Figura 2.30.** Desconvoluciones de máxima entropía del espectro de dicroísmo del Anc2pHis presentado en la figura 2.28B. En (C-D) se aumentó la no-linealidad de la expresión de la entropía.

( $\leq 30\%$  del área entre las tres). En la figura 2.29 resolvíamos dos bandas en este intervalo, a 1644 y 1635  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente en el intervalo 1700-1665  $\text{cm}^{-1}$  aparecen entre dos y cuatro máximos/mínimos, pero bien podrían deberse a la compensación imperfecta de bandas estrechas sin orientación preferencial en el espectro de dicroísmo y/o a la sobredesconvolución de algunas bandas.

Una información interesante es la relación entre el área de la banda a 1661  $\text{cm}^{-1}$  y la banda a 1656  $\text{cm}^{-1}$ . Mientras que en el espectro de absorbancia esta relación vale  $\approx 1,5$ , en el espectro de dicroísmo su valor es de  $\approx 0,9$ . A partir de estos valores, y de la ecuación 2.2, podemos deducir que el parámetro de orden para la banda a 1656  $\text{cm}^{-1}$  es 1,7 veces superior al de la banda a 1661  $\text{cm}^{-1}$ . Esta afirmación se refiere al total de las bandas, sin tener en cuenta si hay contribuciones de estructuras no orientadas para alguna de ellas.

#### 2.2.4. Asignación de bandas del espectro de dicroísmo

Las asignaciones realizadas se muestran en la tabla 2.3. Los porcentajes de área son muy aproximados pues se obtuvieron por integración directa del espectro de dicroísmo desconvulado. Ante la posibilidad que las bandas entre 1700 y 1665  $\text{cm}^{-1}$  deban gran parte de su área a un problema de línea base y/o

Posición	Área	Signo	Asignación
1695?			láminas $\beta$ antiparalelas
1685?			láminas $\beta$ antiparalelas
1670?		-	láminas $\beta$ paralelas
1661	30	+	hélices $\alpha$ transmembrana
1656	35	+	hélices $\alpha$ transmembrana
1648	15	+	hélices $3_{10}$ transmembrana
1642	10	+	láminas $\beta$ paralelas
1634	10	+	láminas $\beta$ antiparalelas
1617		+	tirosina

**Tabla 2.3.** Asignación de las bandas del espectro de dicroísmo del Anc2pHis reconstituido. Se indica el signo de la banda, si es negativa o positiva. Para más detalle sobre la asignación ver el texto.

estructurales no pueden producir una orientación preferencial para las vibraciones amida I. Es por lo tanto esperable que la contribución de los giros desaparezca en los espectros de dicroísmo.

Aunque la intensidad en los espectros desconvulados es próxima a cero, no es exactamente constante. Ciertos máximos y mínimos aparecen con una intensidad algo superior al ruido. Los más claros y

sobredesconvolución, los porcentajes en área se refieren sólo a las bandas detectadas entre 1665 y 1620  $\text{cm}^{-1}$ . En esta asignación se observa que el 80% del área del espectro de dicroísmo se ha asignado a hélices transmembrana. Este hecho justifica la asunción realizada en el punto 2.2.2 para obtener la orientación de las hélices transmembrana.

#### **Región desde 1700 a 1675 $\text{cm}^{-1}$ :**

Los espectros desconvulados muestran una señal próxima a cero en este intervalo, lo cual es lógico si pensamos que la estructura con mayor contribución en esta región son los giros, los cuales por razones

repetitivos son los dos mínimos que aparecen a 1695 y 1685 cm<sup>-1</sup>. Estos mínimos si se aceptan como bandas podrían corresponder a los componentes de alta frecuencia de las láminas beta antiparalelas (planas y onduladas).

**Banda a 1670 cm<sup>-1</sup> (negativa):** Aunque aparece en casi todas las desconvoluciones podría ser un artefacto relacionado con la sobredesconvolución de la banda a 1661 cm<sup>-1</sup>. De hecho su intensidad se ve reducida al disminuir la anchura utilizada en la desconvolución. De aceptarse como banda, sólo parece asignable al componente de alta frecuencia de las láminas beta paralelas.

**Banda a 1661 cm<sup>-1</sup> (positiva, ≈ 30% del área):** Su presencia es bastante clara, aunque en algunas desconvoluciones y para algunos espectros, no se resuelve de la banda a 1656 cm<sup>-1</sup>, dando una única banda a 1659 cm<sup>-1</sup>. En el espectro de absorbancia aparece una banda con esta posición, asignada principalmente a hélices alfa transmembrana. De igual manera asignamos esta banda a hélices alfa transmembrana.

**Banda a 1656 cm<sup>-1</sup> (positiva, ≈ 35% del área):** En el espectro de absorbancia aparece una banda con esta posición. De igual manera asignamos esta banda a hélices alfa transmembrana.

**Banda a 1648 cm<sup>-1</sup> (positiva, ≈ 15% del área):** Respecto a las estructuras ordenadas, esta banda sólo puede ser asignada a hélices. Respecto a las estructuras no ordenadas, las estructuras al azar no podrán aparecer en el espectro de dicroísmo y no es muy probable que las estructuras irregulares aparezcan tampoco. Si la banda ha de asignarse a hélices, su signo implica que corresponde a una hélice con una orientación preferencial paralela a la normal de la bicapa. Comparando las bandas a 1656 y 1648 cm<sup>-1</sup> en el espectro de dicroísmo y en el de absorbancia éstas muestran una relación semejante en ambos. Como consecuencia, esta hélice tendrá que mostrar una orientación semejante a la de una hélice transmembrana. Nuestra asignación es por ello a hélices 3<sub>10</sub> transmembrana. Esta posición es algo superior a la descrita para hélices 3<sub>10</sub> en dominios solubles, pero este desplazamiento es coherente con una disposición transmembranal.

**Banda a 1642 cm<sup>-1</sup> (positiva, ≈ 10% del área):** Esta banda parece sólo asignable a láminas beta paralelas y a hélices 3<sub>10</sub>. La banda a 1648 cm<sup>-1</sup> ya ha sido asignada a hélices 3<sub>10</sub> y por ello hemos asignado esta banda a láminas beta paralelas. Teniendo en cuenta su signo y considerando la banda negativa a 1670 cm<sup>-1</sup> el componente de alta frecuencia, corresponderá a una lámina paralela a la superficie de la bicapa lipídica. En el espectro de absorbancia aparece una banda a una posición muy semejante, 1643 cm<sup>-1</sup>.

**Banda a 1634 cm<sup>-1</sup> (positiva, ≈ 10% del área):** Esta banda parece sólo asignable a láminas beta antiparalelas. Los componentes de alta frecuencia podrían corresponder a los pequeños mínimos localizados a 1695 y 1685 cm<sup>-1</sup>. Esta asignación implica la existencia de láminas beta antiparalelas que se disponen preferencialmente paralelas a la bicapa lipídica. En el espectro de absorbancia no se resuelve ninguna banda a esta frecuencia, pero sí a 1638 y a 1629 cm<sup>-1</sup>. Esto implica que las bandas a 1638 y a 1629 cm<sup>-1</sup> en el espectro de absorbancia tendrán, al menos, un componentes no resuelto entre ambas.

**Banda a  $1617\text{ cm}^{-1}$  (positiva):** La asignamos a tirosinas. Esta asignación viene apoyada por la presencia de una banda positiva a  $1517\text{ cm}^{-1}$ , también asignable a tirosinas. El que las tirosinas aparezca en el espectro de dicroísmo está justificado porque 7 de las 13 tirosinas del transportador están en los segmentos transmembrana propuestos, y por lo tanto pueden tener una orientación preferencial.





### 3. Intercambio hidrógeno/deuterio del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas

Con el fin de inducir el intercambio hidrógeno/deuterio, la película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido en liposomas, se pone en contacto con una atmósfera saturada de vapor de D<sub>2</sub>O. En estas condiciones la película se hidrata con D<sub>2</sub>O, iniciándose el intercambio de los hidrógenos que se hallan en grupos desprotonables, por deuterios. Esta situación se alarga durante unas catorce horas. Posteriormente, se pone en contacto con una atmósfera con baja concentración de vapor de D<sub>2</sub>O, para producir una película seca. En todo momento el sistema se mantiene a 20 °C.

El grupo amida, así como algunos grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos, contiene un hidrógeno que puede verse sustituido por deuterio (Gregory y Rosenberg, 1986). Este hidrógeno es el N-H, que pasa a N-D tras el intercambio. Como se comenta en la introducción, esta sustitución afecta a la posición de las vibraciones amida I, II y A, y por lo tanto puede ser seguida, estudiada y cuantificada por espectroscopia de infrarrojo.

El motivo para realizar experimentos de intercambio H/D es en nuestro caso doble. Por un lado, provoca una nueva distribución de las bandas en la zona de la amida I, tanto para el espectro de absorbancia como para el de dicroísmo. Esto se debe a que el desplazamiento de una banda depende del tipo de estructura a la que pertenece. Esta nueva distribución de bandas en la amida I puede ayudar a resolver ciertas ambigüedades en su asignación. Por otro lado, el nivel de intercambio H/D para el grupo amida, resulta en sí mismo informativo. La causa hay que buscarla en las condiciones en las que este intercambio se da. En primer lugar, el hidrógeno N-H no ha de estar formando puentes de hidrógeno. Como la formación de las estructuras secundarias implica la formación de puentes de hidrógeno del N-H del grupo amida, su intercambio dependerá de la estabilidad de la estructura secundaria en la que se encuentra. En segundo lugar, es necesaria la presencia de D<sub>2</sub>O en la vecindad, lo que requiere una accesibilidad de la estructura en la que se encuentra el grupo amida al disolvente. *A grosso modo*, las estructuras de una proteína que sean muy estables, o que se encuentren protegidas del disolvente, no mostrarán intercambio H/D. Para más información sobre el intercambio H/D en proteínas y la información que puede proporcionar ver Gregory y Rosenberg (1986), Rosenberg (1986), Englander et al. (1996); Bai et al. (1995a); Bai et al. (1995b), Clarke y Itzhaki (1998) y Hvidt y Nielsen (1966).

Además de motivos de estabilidad y de accesibilidad, la velocidad del intercambio depende en gran medida de la temperatura y del pH (Rosenberg, 1986; Hvidt y Nielsen, 1966; Goormaghtigh et al., 1996). La velocidad de intercambio aumenta un orden de magnitud al aumentar en una unidad el pH (para pH>4). También aumenta un orden de magnitud al aumentar la temperatura en 20 °C. Estos valores son aproximados y no tienen en cuenta posibles cambios estructurales en la proteína, que modificarían asimismo la velocidad de intercambio. Esta dependencia en el pH y la temperatura ha de tenerse en cuenta a la hora de comparar resultados con los de la literatura.

### 3.1. Película seca del Anc2pHis inhibido y reconstituido analizada con radiación no polarizada (D<sub>2</sub>O)

La figura 3.1A muestra el espectro de una película seca de Anc2pHis, inhibido con catr y reconstituido en liposomas de PC/PA, tras catorce horas en contacto con una atmósfera saturada de D<sub>2</sub>O. En la figura 3.1B se muestra una ampliación de la zona que incluye la amida I y II, y la vibración C=O del lípido. Se muestran, asimismo, el espectro de una película seca de PC/PA (9/1) y un espectro sintético de la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos, donde los hidrógenos protonables han sido deuterados (Chirgadze et al., 1975).

#### 3.1.1. Propiedades del espectro

##### 3.1.1.1. Grosor de la película

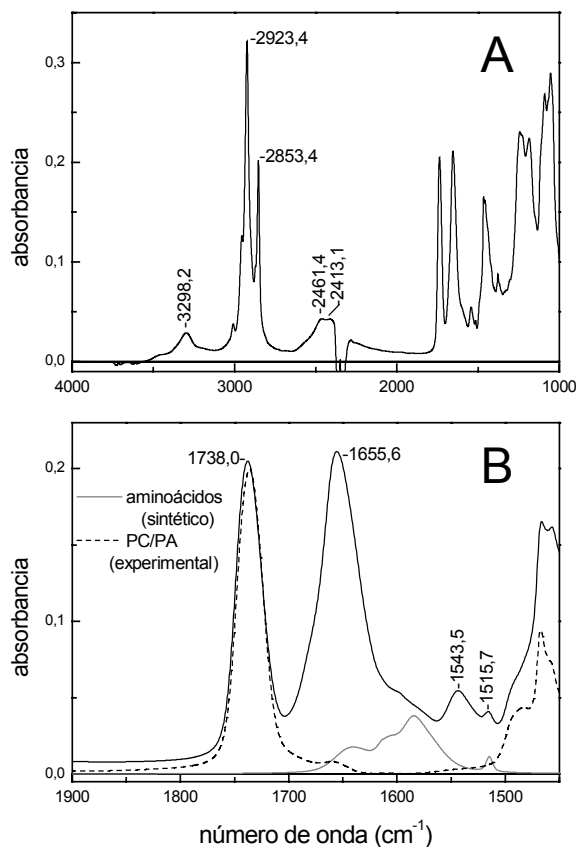
El grosor de la película se ha considerado que no varía en el proceso de hidratación/secado. Es por ello que asumimos que el grosor de la película es de 0,54  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.1.2. Determinación de la relación señal / ruido

La figura 3.2 muestra la relación entre la absorbancia en la zona de la amida I y la desviación estándar del ruido teórica. Para la amida I-I' el máximo es de 30 300, y para la amida II de 8800. La relación entre el máximo de la amida I-I' y la desviación estándar del ruido entre 1830-1580  $\text{cm}^{-1}$  es de 36 800.

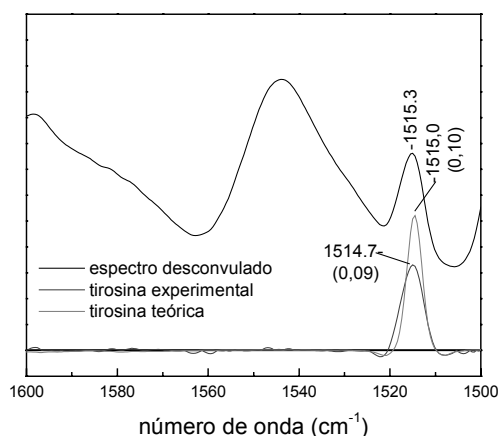
##### 3.1.1.3. La banda de tirosina

La figura 3.3 muestra la amida II tras ser desconvulada en el espacio de Fourier con un banda Lorentziana de anchura  $\gamma' = 6 \text{ cm}^{-1}$ , un factor de estrechamiento de  $k = 2$  y un filtro Bessel. La banda de la



**Figura 3.1.** (A) Espectro de absorbancia, obtenido por reflexión total atenuada, de una película seca con D<sub>2</sub>O del Anc2pHis inhibido con catr y reconstituido en liposomas de PC/PA (9/1). El espectro se obtuvo secando una película humedecida durante 14 horas con D<sub>2</sub>O. (B) Ampliación del espectro de la figura (A), donde se muestran además un espectro sintético de la contribución de las cadenas laterales deuteradas y un espectro experimental de la contribución de una película seca (con H<sub>2</sub>O) de PC/PA (9/1).

tirosina aparece a  $1515,3 \text{ cm}^{-1}$ , sufriendo un desplazamiento de  $2 \text{ cm}^{-1}$  en el intercambio H/D (comparar con figura 2.3.). Se muestra, asimismo, la banda de tirosina, tras eliminar la contribución del enlace peptídico mediante una corrección de línea base. Junto a este espectro, se muestra la banda teórica que se esperaría a partir de modelos para esta vibración (Chirgadze et al., 1975). Se observa una alta coincidencia en la posición de la banda experimental y la teórica. Esto no se ha de tener en cuenta, pues el valor obtenido en modelos fue de  $1517 \text{ cm}^{-1}$  y fue



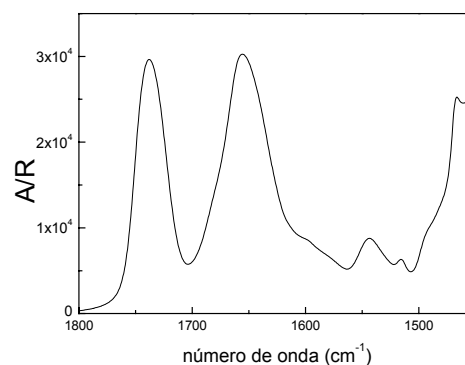
**Figura 3.3.** Observación de la posición y área de la banda de la tirosina a  $1515 \text{ cm}^{-1}$ , y comparación con la banda teórica obtenida a partir de modelos, en  $\text{D}_2\text{O}$ , de la cadena lateral de la tirosina (anillo fenólico).

Para el Anc2pHis el ambiente de las tirosinas es bastante semejante al de la ribonucleasa T1.

Respecto al área, las diferencias entre los datos experimentales y los teóricos son pequeñas, del 10%.

### 3.1.2. Efecto del intercambio H/D en las posiciones de las bandas

Las posiciones de las bandas correspondientes a la vibración  $\text{CH}_2$  y  $\text{C}=\text{O}$  del fosfolípido coinciden con las obtenidas antes del intercambio (comparar la figura 3.1 con la figura 2.1). Se pueden diferenciar tres grupos de bandas amidas: la amida A y amida II corresponden a grupos amida hidrogenados; la amida A' y la amida II' corresponden a grupos amida deuterados; y finalmente la amida I y la amida I', al solaparse, corresponden a todos los grupos amida.



**Figura 3.2.** Relación entre la absorbancia y la desviación estándar del ruido para el espectro de la figura 3.1.

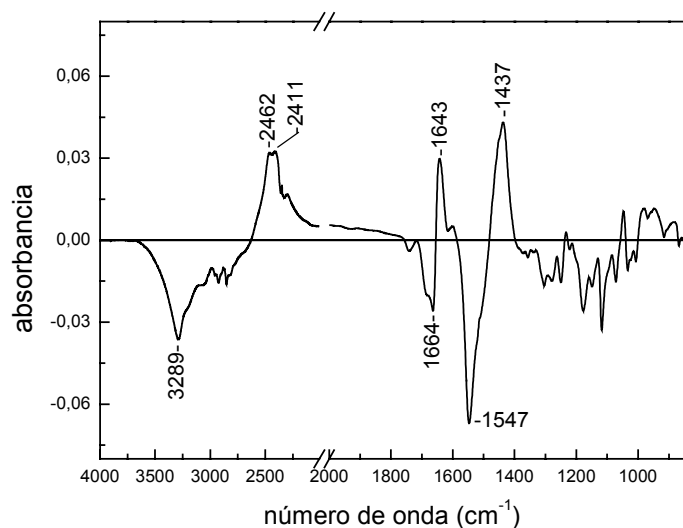
desplazado a  $1515 \text{ cm}^{-1}$  para coincidir con el valor encontrado en proteínas (Chirgadze et al., 1975).

Existen pocos estudios sobre la relación entre la posición de esta banda y el estado de la proteína, pero en uno de estos pocos estudios, Fabian et al. (1994) han mostrado que la ribonucleasa T1 muestran un máximo para la tirosina a  $1515,1 \text{ cm}^{-1}$ , en  $\text{D}_2\text{O}$  y a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Al desnaturizar térmicamente la proteína ésta pierde toda su estructura, adoptando una conformación al azar, con una posición de la tirosina (extrapolada a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de  $1516,0 \text{ cm}^{-1}$ . Un péptido sin estructura muestra una posición de la tirosina, a esta temperatura, a  $1516,4 \text{ cm}^{-1}$ . Estos resultados indican que cuando el anillo de tirosina está en contacto con el agua, su frecuencia aumenta.

El máximo de la banda amida I-I' aparece a 1655,6 cm<sup>-1</sup>. Como el máximo de la amida I aparecía a 1659,0 cm<sup>-1</sup>, por lo tanto, el intercambio hace desplazar el máximo en 3,4 cm<sup>-1</sup>.

El máximo de la banda amida A aparece a 3298,2 cm<sup>-1</sup> y el de la amida II a 1543,5 cm<sup>-1</sup>. Estas posiciones son algo diferentes de los obtenidos para la película seca sin intercambio, que se daban a 3293,2 y 1545,4 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto sugiere que la resistencia al intercambio no es homogénea en toda la proteína, y que ciertas estructuras de la proteína son más resistentes al intercambio que otras. Por la posición de estas bandas podemos deducir que las estructuras resistentes al intercambio son principalmente hélices alfa y/o estructuras al azar.

La banda amida A' da dos bandas a 2461,4 y 2413,1 cm<sup>-1</sup>, que corresponden a estructuras que han sufrido el intercambio H/D. Desgraciadamente, la amida A' es una banda que no se estudia habitualmente, por ello a partir de la posición de sus máximos es difícil deducir el tipo de estructura que sufre mayoritariamente el intercambio H/D, pero la mioglobina, tras 24 en contacto con D<sub>2</sub>O (el intercambio de los hidrógenos amida es parcial) muestra dos bandas en la amida A' a 2468 y 2407 cm<sup>-1</sup>, asignables, en parte, a hélices alfa (Goormaghtigh et al., 1994c). Estas posiciones difieren de las nuestras, pero son próximas y pueden llevar a pensar que una parte importante de las estructuras intercambiadas podrían ser hélices alfa.



**Figura 3.4.** Espectro de diferencia entre el espectro de la figura 3.1 (película seca del Anc2pHis con D<sub>2</sub>O) y el de la figura 2.1 (película seca del Anc2pHis con H<sub>2</sub>O).

proteoliposomas demuestra la corrección de este factor. Este espectro de diferencia ha de interpretarse del siguiente modo: a) Las bandas amida que no sufren intercambio no aparecen en este espectro. b) Las bandas amida negativas corresponden a estructuras hidrogenadas que sufren un intercambio H/D. Al deuterarse estas estructuras dan las correspondientes bandas positivas. c) En el espectro de diferencia aparecen otras bandas relacionadas con la sustitución H/D del medio, pero sin relación con el grupo

La banda amida II', que presumiblemente aparecería sobre 1450 cm<sup>-1</sup>, aparece solapada con una banda de fosfolípidos y con la amida III, y no es por lo tanto directamente observable (en la mioglobina, la amida II' aparece a 1436 cm<sup>-1</sup> (Goormaghtigh et al., 1994c)).

La figura 3.4 muestra un espectro de diferencia entre la película seca de Anc2pHis después del intercambio y antes del intercambio. El factor de resta utilizado fue de uno. La práctica eliminación de las bandas de la vibración CH<sub>2</sub> y C=O de los

amida. El H<sub>2</sub>O retenido en la muestra dará una contribución negativa y el D<sub>2</sub>O una positiva. También aparecerá un espectro de diferencia entre las cadenas laterales de los aminoácidos deuterados e hidrogenados, así como diferencias en diversas bandas causadas por la interacción no equivalente con H<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O.

Las estructuras que se intercambian dan una amida A con un máximo a 3289 cm<sup>-1</sup> y una amida A' con máximos a 2462 y 2411 cm<sup>-1</sup>; una amida II con máximo a 1547 cm<sup>-1</sup> y una amida II' con máximo a 1437 cm<sup>-1</sup>.

Por lo tanto, para la amida A tenemos que las estructuras no intercambiadas dan un máximo a 3298 cm<sup>-1</sup> (figura 3.1A) y las intercambiadas a 3289 cm<sup>-1</sup> (figura 3.4). Para la amida II las estructuras no intercambiadas dan un máximo a 1543,5 cm<sup>-1</sup> (figura 3.1B) y las intercambiadas a 1547 cm<sup>-1</sup> (figura 3.4). Los valores para la amida II son más fáciles de interpretar, pues hay más información en la literatura. De estos datos podemos deducir que tanto las estructuras no intercambiadas como las intercambiadas son principalmente hélices, pero las estructuras no intercambiadas parecen enriquecidas en láminas beta.

### 3.1.3. Determinación del grado de intercambio H/D del grupo amida

Para determinar el grado de intercambio H/D del grupo amida necesitamos una banda cuya área sea proporcional a la cantidad de amida hidrogenada, y cuya área sea nula cuando toda la amida esté deuterada. Esta banda bien puede ser la amida A o la amida II. Necesitamos además una banda cuya área sea proporcional a la cantidad total de grupos amida. Para esta banda podemos utilizar la suma del área de la amida I y amida I', que aparecen en la práctica solapadas. En la medida de las áreas se requiere que no haya contribuciones externas. Para ello es necesario restar, en lo posible, las contribuciones ajenas a las bandas amida. Para minimizar problemas con la línea base y contribuciones ajenas, es conveniente medir el área con una corrección de la línea base.

Como la banda amida A solapa parcialmente con la banda del agua antes del intercambio, su uso no es recomendable, y es preferible utilizar la amida II. La fracción de grupos amida no intercambiados se podrá obtener como:

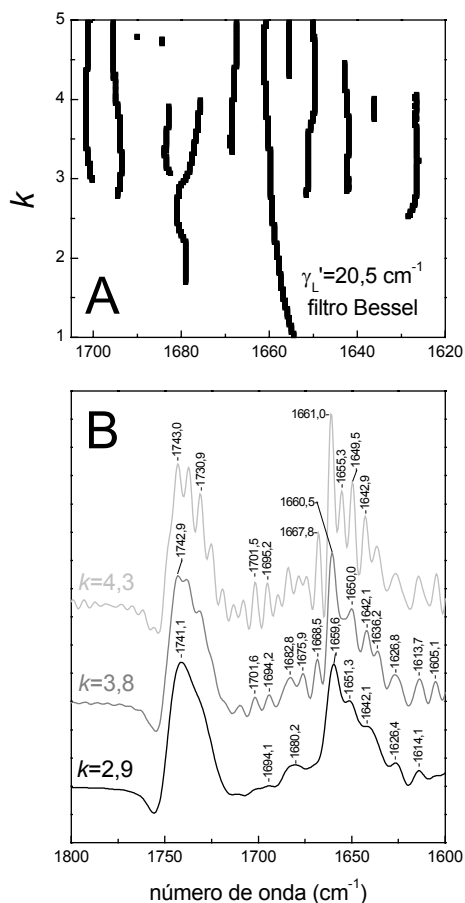
$$\frac{(aI / aII)_D}{(aI / aII)_H} \quad (3.1)$$

donde *aI* es el área en la zona de la amida I; *aII* es el área en la zona de la amida II; el subíndice *D* se refiere a los valores obtenidos para el espectro tras la incubación con D<sub>2</sub>O y el subíndice *H* a los valores obtenidos para el espectro inicial.

Cuando el área de la amida I-I' se midió entre 1690-1620 cm<sup>-1</sup> y el de la amida II entre 1575-1500 cm<sup>-1</sup>, se obtuvo que el 39% de los grupos amida aparecen resistentes al intercambio H/D, tras una incubación en una atmósfera saturada de D<sub>2</sub>O de catorce horas. En la Discusión General se comparará este resultado con los publicados para otras proteínas de membrana.

3.1.4. Determinación del número y posiciones de las bandas componentes de la amida I

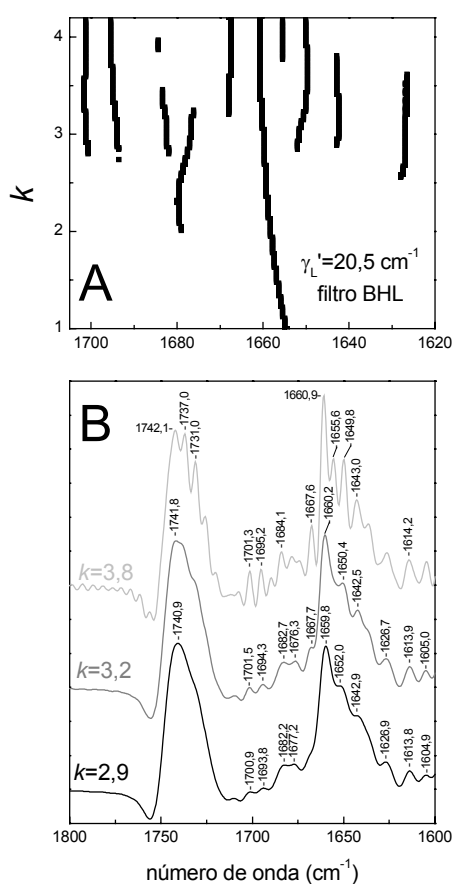
3.1.4.1. Desconvolución de Fourier



**Figura 3.5.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolar el espectro del Anc2pHis de la figura 3.1, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvulados con tres factores de estrechamientos representativos.

de bandas detectadas en la amida I-I' el de once, pero como en otras ocasiones, no existe un valor de  $k$  único en el que estas once bandas se resuelvan al unísono. La figura 3.5B muestra los espectros desconvulados para tres valores de  $k$ , que

La figura 3.5A muestra las posiciones de las bandas detectadas para el espectro del Anc2pHis (figura 3.1B) tras desconvolarlo con  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$  y un filtro Bessel, en función del valor de  $k$ . Recordemos que este es el método propuesto para obtener el valor óptimo de  $k$ .<sup>\*</sup> El número máximo



**Figura 3.6.** (A) Posición de las bandas detectadas sobre el ruido al desconvolar el espectro del Anc2pHis de la figura 3.1, en función del factor de estrechamiento aplicado. (B) Espectros desconvulados con tres factores de estrechamientos representativos.

<sup>\*</sup> Ver sección 1.1.5.2.C de Resultados Teóricos.

consideramos representativos. En estos espectros se han marcado las posiciones de las bandas que sobresalen por encima del ruido. Es conveniente recordar que al haberse adquirido por RTA, al espectro de absorbancia de la muestra se le restó un espectro de vapor. Por ello, el método de detección de bandas se aplicó con la misma modificación que en el apartado 2.1.3.

La figura 3.6 es semejante a la figura 3.5, pero el filtro aplicado fue el BHL. Se detectan un máximo de diez bandas en la zona de la amida I-I'. En la misma figura se muestran los espectros para tres valores de  $k$ .

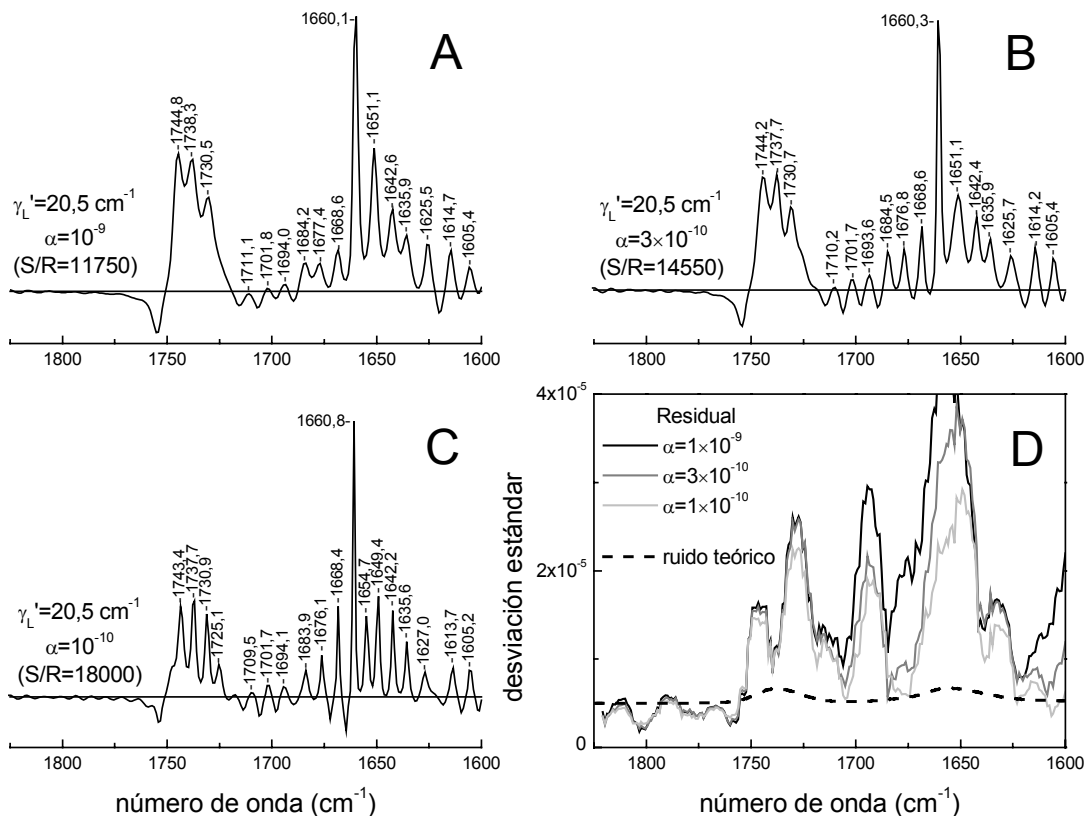
En resumen, es posible detectar hasta once bandas en la zona de la amida I-I'. Sus posiciones se recogen en la tabla 3.1.

DF	DRME
1701,5±0,1	1701,6±0,1
1694,0±1,3	1694,3±0,3
1683,2±0,8	1683,6±0,5
1676,1±0,3	1675,9±0,4
1667,9±0,4	1668,0±0,3
1660,7±0,4	1660,9±0,1
1655,4±0,2	1655,2±0,3
1650,0±0,3	1649,5±0,1
1642,6±0,4	1642,5±0,3
1636,2±0,1	1636,0±0,3
1626,8±0,1	1626,9±0,7

**Tabla 3.1.** Posición de las bandas (en  $\text{cm}^{-1}$ ) detectadas en la amida I de la película seca del Anc2pHis reconstituido tras un intercambio H/D.

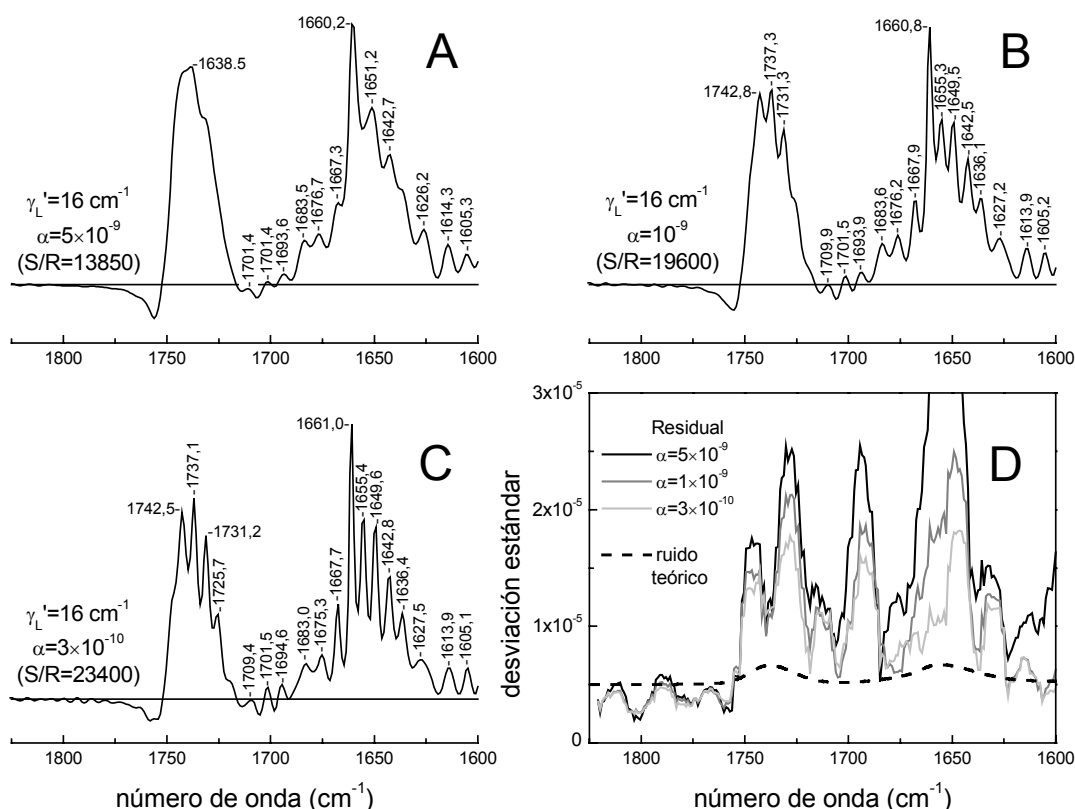
### 3.1.4.1. Desconvolución regularizada por máxima entropía

Las figura 3.7, 3.8 y 3.9 muestran espectros desconvulados por máxima entropía para diversos valores del regularizador y de la anchura Lorentziana.

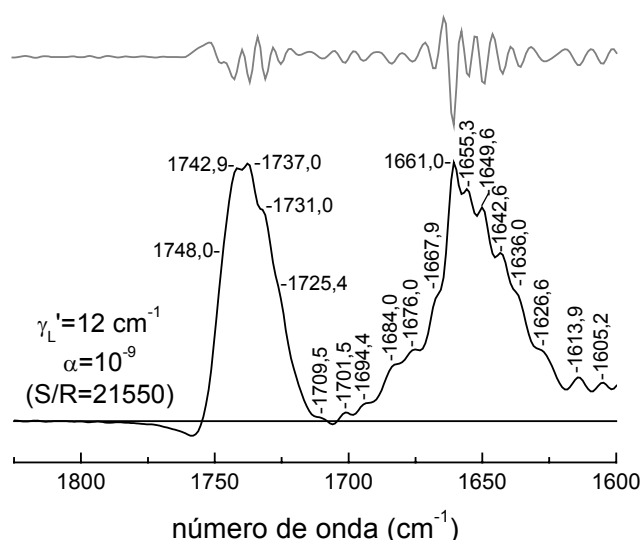


**Figura 3.7.** (A-C) Espectros del Anc2pHis desconvulados por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.





**Figura 3.8.** (A-C) Espectros del Anc2pHis desconvueltos por máxima entropía para diferentes valores del parámetro de regularización. (D) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.

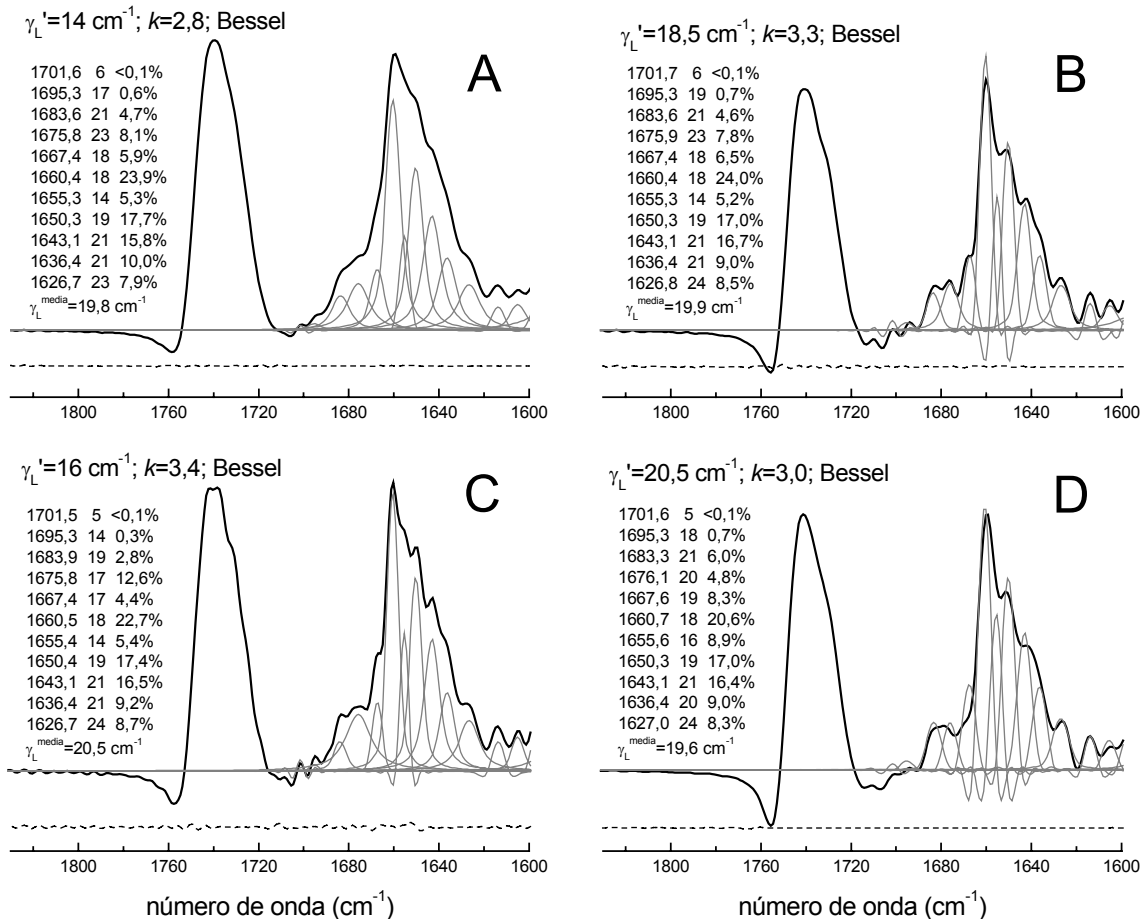


**Figura 3.9.** Espectro desconvuelto por máxima entropía. En gris se muestra su segunda derivada.

La figura 3.7 muestra las desconvoluciones para  $\gamma_L' = 20,5 \text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a desconvoluciones coherentes con diversas relaciones S/R. Todas estas relaciones S/R son menores que las de nuestro espectro, y por ello todas las desconvoluciones han de considerarse conservadoras. En la desconvolución obtenida con un valor menor del regularizador se resuelven con extrema claridad once bandas en la amida I.

La figura 3.8 muestra el mismo proceso para una desconvolución con  $\gamma_L' = 16 \text{ cm}^{-1}$ . Se probó desconvolar con esta anchura porque las desconvoluciones

de la figura 3.7 parecen sobredesconvuladas. Además, los resultados obtenidos para la película seca de la proteína en H<sub>2</sub>O nos informan que la anchura media de las bandas amida I es de  $\approx 19 \text{ cm}^{-1}$ . Los espectros desconvulados con esta anchura muestran una mejor apariencia que los obtenidos en la figura 3.7. El número máximo de bandas resueltas en la amida I es igualmente de once.



**Figura 3.10.** Ajuste de espectros desconvulados por Fourier utilizando once bandas en la amida I-I'. Los ajustes se realizaron con bandas Lorentzianas desconvuladas para las bandas amida I-I' y con bandas Voigtianas desconvuladas para el resto de bandas.

Finalmente, para despejar cualquier posibilidad de sobredesconvolución, el espectro de proteína deuterada se desconvuló con  $\gamma_L' = 12 \text{ cm}^{-1}$ . A causa de un valor tan bajo, los estrechamientos obtenidos serán pobres, tal como se observa en la figura 3.9, donde aparecen pocas bandas resueltas. En la segunda derivada del espectro desconvulado es posible detectar las bandas que aparecen como hombros en el espectro desconvulado, hasta llegar a once bandas detectadas en la amida I.

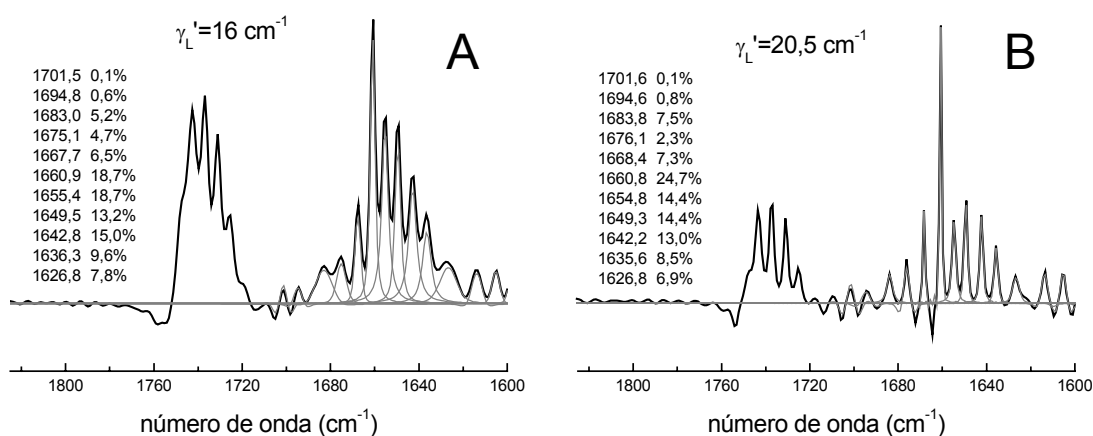
En resumen, se detectan once bandas en la zona de la amida I-I'. Sus posiciones se han recogido en la tabla 3.1.

### 3.1.5. Determinación de los parámetros de las bandas componentes de la amida I

Para determinar los parámetros de las bandas que componen la amida I-I' se realizaron diversos ajustes.

La figura 3.10 muestra cuatro espectros desconvulados por Fourier. Estos espectros se ajustaron utilizando bandas Lorentzianas desconvuladas para las bandas de la amida I-I' y bandas Voigtianas desconvuladas para el resto de las bandas. Se utilizaron once bandas en la amida I-I', con posiciones correspondientes a las recogidas en la tabla 3.1. En las mismas figuras se muestran los parámetros obtenidos en el ajuste para las bandas amida I-I'.

La figura 3.11 muestra el ajuste de espectros desconvulados por máxima entropía. En la misma figura se muestra la posición y el área de las bandas ajustadas.



**Figura 3.11.** Ajuste de dos espectros del Anc2pHis desconvulados por máxima entropía.

### 3.1.6. Asignación de las bandas para el Anc2pHis reconstituido (D<sub>2</sub>O)

El estudio del espectro en D<sub>2</sub>O se suele proponer para resolver ambigüedades en la asignación de las bandas del espectro en H<sub>2</sub>O. En nuestro caso, donde el nivel de intercambio H/D es del 40%, obtendremos una mezcla de amida I y amida I' casi equimolar. A las dificultades de asignación a una estructura encontradas en la amida I (o amida I') habrá que añadir la dificultad de asignar, previamente a su asignación estructural, una banda a la amida I o a la amida I'. Es por ello que, en nuestro caso, la aportación de información adicional a partir del estudio del espectro en D<sub>2</sub>O es pequeña.

En la tabla 3.2 se muestra la asignación de las bandas en D<sub>2</sub>O respecto a si son hidrogenadas o deuteradas, y de qué banda en H<sub>2</sub>O proceden. Dada la presencia de tantas estructuras hidrogenadas como deuteradas esta asignación está lejos de ser única. De hecho, es posible realizar muchas tablas con asignaciones diferentes. Para aumentar la objetividad de las asignaciones, a la vez que descartar muchas de ellas, éstas se realizaron siguiendo cuatro premisas que consideramos lógicas. 1) La banda de una estructura deuterada verá disminuida su posición 5-10 cm<sup>-1</sup>. Para las hélices alfa y estructuras al azar este desplazamiento será más bien de 10 cm<sup>-1</sup> y para láminas beta de 5 cm<sup>-1</sup>. 2) La asignación de bandas ha de

ser coherente con la realizada en H<sub>2</sub>O. 3) Ya que un 40% de los hidrógenos amida no se intercambian, un 40% del área en la amida I ha de ser asignada a estructuras no intercambiadas, es decir a bandas que no sufren ningún desplazamiento. 4) Las bandas correspondientes a estructuras no intercambiadas han de

Posición	Anchura	Área	Asignación
1702	5	<0,1	0,1% 1702- <i>H</i>
1695	17	0,6	0,4% 1695- <i>H</i> y 0,2% 1700- <i>D</i>
1684	20	5	1% 1684- <i>H</i> , 3% 1688- <i>D</i> , 1% 1695- <i>D</i>
1676	21	8	5% 1676- <i>H</i> y 3% 1683- <i>D</i>
1667	18	6	4% 1667- <i>H</i> y 2% 1676- <i>D</i>
1660	18	23	19% 1660- <i>H</i> y 4% 1668- <i>D</i>
1655	14	6	6% 1661- <i>D</i>
1650	19	17	15% 1656- <i>D</i> y 2% 1661- <i>D</i>
1643	21	16	7% 1643- <i>H</i> , 7% 1649- <i>D</i> y 2% 1656- <i>D</i>
1636	21	9	5% 1638- <i>H</i> y 4% 1636- <i>D</i>
1627	24	8	8% 1627- <i>H</i>

**Tabla 3.2.** Asignación de las bandas del Anc2pHis reconstituido (D<sub>2</sub>O). El sufijo *H* indica una contribución correspondiente a una estructura hidrogenada, y el sufijo *D* una contribución que pertenece a una estructura deuterada. Para ver las asignaciones de cada estructura es necesario consultar la tabla 2.2

estar asignadas principalmente a estructuras hélice, y secundariamente a láminas beta, pues la posición de la amida II en D<sub>2</sub>O, 1643 cm<sup>-1</sup>, nos informa que las hélices son las estructuras resistentes al intercambio más numerosas, aunque la contribución de láminas beta también será importante. Las bandas asignadas a estructuras que, en principio, han de ser más accesibles al disolvente, como las estructuras al azar o a giros, tendrán que mostrar un alto grado de intercambio. Las asignaciones realizadas en la tabla 3.2 satisfacen parcialmente estas premisas. Las áreas asignadas a diferentes estructuras son las mismas que en H<sub>2</sub>O. El área de las estructuras no intercambiadas representa un 43% del área total. Aproximadamente el 40% de las estructuras resistentes al intercambio son hélices y aproximadamente el 40% son láminas beta. El 75% de los giros se intercambian y el 100% de los lazos largos (otra estructura posiblemente accesible al disolvente) también se intercambian. Respecto a los desplazamientos con la deuteración, las hélices sufren un desplazamiento medio de ≈10 cm<sup>-1</sup>, los giros de 8 cm<sup>-1</sup> y los lazos largos de 6 cm<sup>-1</sup>. Los desplazamientos de las láminas beta no se llegan a resolver. A continuación detallamos las asignaciones de la tabla 3.2, para más información sobre las asignaciones ver el punto 6 del Apéndice.

**Banda a 1702 cm<sup>-1</sup> (<0,1% del área):** Corresponderá a la banda que aparecía en H<sub>2</sub>O a 1700 cm<sup>-1</sup> resistente al intercambio. En H<sub>2</sub>O mostraba un área de 0,3% y por lo tanto esta banda sufre un intercambio del >70%. Esto apoya su asignación a giros reversos.

**Banda a 1695 cm<sup>-1</sup> (0,6% del área):** El 0,2% corresponderá a la banda que aparecía en H<sub>2</sub>O a 1700 cm<sup>-1</sup> (intercambiada) y el resto (0,4%) a la banda a 1695 cm<sup>-1</sup> resistente al intercambio. Esta banda mostraba en H<sub>2</sub>O un área de 1,6%, y por lo tanto sufre un intercambio del 75%. Esta banda tenía contribuciones de láminas beta antiparalelas y giros reversos y, posiblemente, la parte resistente al intercambio pertenezca a las láminas.

**Banda a 1688 cm<sup>-1</sup> (ausente):** Esta banda, con un área en H<sub>2</sub>O del 4% asignada a giros reversos, sufrirá un intercambio completo, pues está ausente en D<sub>2</sub>O.

**Banda a 1684 cm<sup>-1</sup> (5% del área):** Tendrá contribuciones de dos bandas deuteradas, la de 1695 cm<sup>-1</sup> (1% del área) y la de 1688 cm<sup>-1</sup> (4% del área). No tendrá contribuciones hidrogenadas, y por lo tanto la banda que aparecía en H<sub>2</sub>O a 1683 cm<sup>-1</sup>, con un 4% del área, sufrirá un intercambio total.

**Banda a 1676 cm<sup>-1</sup> (8% del área):** Contendrá la banda deuterada que aparecía en H<sub>2</sub>O a 1683 cm<sup>-1</sup>, asignada a giros reversos (4% de área). El restante 4% corresponderá a la banda a 1676 cm<sup>-1</sup> resistente al intercambio, que en H<sub>2</sub>O mostraba un 8% de área (intercambio del 50%).

**Banda a 1667 cm<sup>-1</sup> (6% del área):** El 4% de área corresponderá a la banda deuterada que aparecía en H<sub>2</sub>O a 1676 cm<sup>-1</sup>. El 2% restante será de la banda a 1668 cm<sup>-1</sup> no deuterada, que en H<sub>2</sub>O mostraba un área del 8%. Esta banda mostrará un intercambio del 75%. A esta banda se le habían asignado contribuciones de láminas beta paralelas, que podrían corresponder a parte de la banda resistente al intercambio.

**Banda a 1660 cm<sup>-1</sup> (23% del área):** Contendrá el 6% del área correspondiente a la banda a 1668 cm<sup>-1</sup> deuterada. El 17% restante pertenece a la banda a 1661 cm<sup>-1</sup> no intercambiada. Esta banda tenía en H<sub>2</sub>O un área del 27%, por lo tanto se intercambia el 37%. A esta banda se le había asignado dos contribuciones, una mayoritaria de hélices transmembrana y una menor de lazos largos. Nuestra asignación era que a las hélices transmembrana corresponde el 21% del área y a los lazos el 6%. Los lazos se intercambiarán totalmente, y por lo tanto el 17% del área resistente al intercambio pertenece a hélices transmembrana. Con esta asignación, sólo el 20% de las hélices transmembrana asignadas a la banda a 1661 cm<sup>-1</sup> se intercambiarán, siendo el 80% resistente al intercambio. Este valor está en concordancia con el encontrado en el espectro de dicroísmo (ver más adelante). El considerar que los lazos largos se intercambian totalmente es coherente con la asignación de la siguiente banda.

**Banda a 1655 cm<sup>-1</sup> (6% del área):** La asignamos completamente a lazos largos deuterados, pues está descrito que aparecerán a esta frecuencia (ver Apéndice 6, Prestrelski et al. (1991b) y Wilder et al. (1992)). Esta asignación completa es coherente con la ausencia de banda a esta frecuencia en el espectro de dicroísmo, que indica que la hélice transmembrana que contribuía a la banda en 1656 cm<sup>-1</sup>, con un área del 17%, se intercambia completamente.

**Banda a 1650 cm<sup>-1</sup> (17% del área):** La banda deuterada correspondiente a la banda que en H<sub>2</sub>O aparece 1657 cm<sup>-1</sup> con un 17% del área y asignada a hélices transmembrana, se esperará que aparezca sobre 1646 cm<sup>-1</sup>. Los datos de dicroísmo apuntan que la forma deuterada se dará sobre 1647 cm<sup>-1</sup> (ver punto 3.2). Por otro lado la parte deuterada de la banda a 1661 cm<sup>-1</sup>, con un 4% del área, es de esperar que

aparezca sobre  $1651\text{ cm}^{-1}$ . Además la banda asignada a hélices  $3_{10}$  resistente al intercambio aparecerá a  $1649\text{ cm}^{-1}$ .

La asignación que realizamos es ciertamente tentativa, y es la siguiente. El 13% del área corresponderá a la banda deuterada proveniente de  $1656\text{ cm}^{-1}$ . El 4% restante se dará en la banda a  $1643\text{ cm}^{-1}$ . Esta diferencia no implica necesariamente que la banda a  $1656\text{ cm}^{-1}$  se compusiera de dos estructuras con desplazamientos en el intercambio diferentes, ya que la separación en dos bandas puede ser artificial a causa que la posible posición de esta estructura, a  $1647\text{ cm}^{-1}$ , se da entre la banda de  $1650$  y la de  $1643\text{ cm}^{-1}$ . El resto del área de esta banda se asigna a la banda de  $1661\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a hélices transmembrana, deuterada. Por lo tanto asignamos que las hélices transmembrana  $3_{10}$  se intercambia total o casi totalmente.

**Banda a  $1643\text{ cm}^{-1}$  (16% del área):** Realizamos las siguientes asignaciones, que como pasaba para la banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  se basan en datos incompletos que no permiten por lo tanto una asignación completamente sólida. Por un lado asumimos que las láminas beta antiparalelas, con una banda a  $1644\text{ cm}^{-1}$  y un 7% de área, no se intercambian. Por otro lado tenemos un 4% de área proveniente de la banda a  $1656\text{ cm}^{-1}$  intercambiada. El 5% restante se asigna a hélices transmembrana  $3_{10}$  deuteradas, provenientes de la banda a  $1649\text{ cm}^{-1}$ . Esta estructura se esperarí a  $1639\text{ cm}^{-1}$  con un área del 7%. De hecho, en el espectro de dicroísmo en  $\text{D}_2\text{O}$  aparece una banda a  $1639\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda se repartirá entre la banda a  $1643\text{ cm}^{-1}$  (5%) y la de  $1636\text{ cm}^{-1}$  (2%).

**Banda a  $1636\text{ cm}^{-1}$  (9% del área):** En primer lugar tendremos un 2% de área de la deuteración de la banda que aparece a  $1649\text{ cm}^{-1}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  asignada a hélices  $3_{10}$  transmembrana. El 7% restante lo asignamos a láminas beta antiparalelas. Esta banda sufre un desplazamiento de  $2\text{ cm}^{-1}$  respecto a la banda en  $\text{H}_2\text{O}$ . Esto hace pensar que quizá contenga componentes deuterados y hidrogenados no resueltos, pues para las láminas el desplazamiento con la deuteración es de sólo  $5\text{ cm}^{-1}$ . Por ello asignamos el 4% a láminas hidrogenadas y el 3% a deuteradas.

**Banda a  $1627\text{ cm}^{-1}$  (8% del área):** Se asigna a láminas beta antiparalelas que no sufren ningún intercambio, y son por lo tanto totalmente resistentes al intercambio H/D.