

3.2. Película seca del Anc2pHis inhibida y reconstituida analizada con radiación polarizada (D₂O)

3.2.1. Propiedades del espectro

La figura 3.12A muestra el espectro de absorbancia de la película seca del Anc2pHis, obtenido utilizando luz polarizada a 90° y a 0°, tras catorce horas en contacto con una atmósfera saturada de D₂O. La figura 3.12B muestra una ampliación que incluye la amida I-I', la amida II y el C=O del lípido. Se ha indicado la razón dicroica para algunas bandas.

La desviación estándar del ruido es aproximadamente de 2×10^{-5} UA a 1850 cm⁻¹. Como consecuencia, los valores de la relación absorbancia/ruido son menores que sin polarización (no mostrado). Para la polarización 90° la relación A/R máxima para la amida I es de 8800, y para la amida II de 2600. La relación señal/ruido en la zona entre 1850-1600 cm⁻¹ es de 11 500. Para la polarización 0° estos valores son respectivamente 5800, 1550 y 6700.

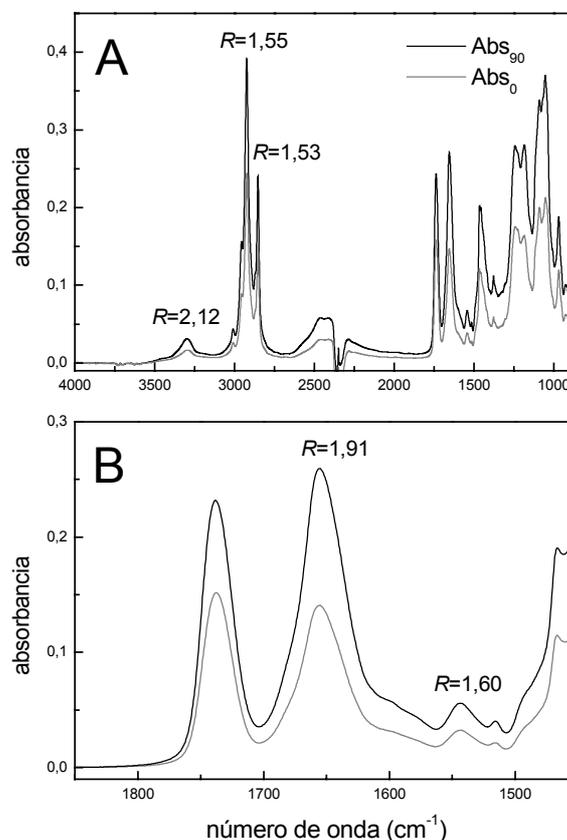


Figura 3.12. Espectro de absorbancia de una película seca con D₂O del Anc2pHis inhibido y reconstituido utilizando radiación polarizada (a 90° y a 0°). Se indicada la razón dicroica para algunas bandas.

3.2.2. 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. Este valor lo obtendremos utilizando para las colas alifáticas del PC/PA (9/1) en fase cristal líquido un valor de su parámetro de orden $p_{\beta} \approx 0,52$, tal como se detalla en el punto 2.1.2.3. Si la película de la muestra no es gruesa es necesario, además, conocer el grosor de la película. Utilizaremos el valor obtenido para la película antes del intercambio, que se determinó como $l = 0,54 \mu\text{m}$. Finalmente se requiere el valor del

parámetro de orden de la vibración amida I respecto a las estructuras de la proteína, lo que a su vez requiere asumir una estructura concreta para las bandas observadas.

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

A partir de la razón dicroica para la amida I-I' podemos obtener la orientación de las estructuras de la proteína, que tendría que coincidir con el valor obtenido en H₂O. Utilizando $R = 1,91$ llegamos a $p_{\phi}^{al-I'} = 0,034$. El valor obtenido en H₂O era de $p_{\phi}^{al} = 0,044$.

Los espectros de absorbancia a 90° y a 0° nos permiten estudiar la orientación en combinación con el intercambio. Así, a partir del valor de R para la amida A y amida II se puede obtener la orientación de estas vibraciones amida respecto al cristal de RTA, que a su vez podrá relacionarse con la orientación de las estructuras resistentes al intercambio. De esta manera obtenemos para la amida A que $p_{\phi}^{aA} = 0,061$, y para la amida II que $p_{\phi}^{aII} = -0,076$.

Para la vibración CH₂ asimétrica del lípido tenemos que $p_{\phi}^{-} = -0,129$ y para la simétrica que $p_{\phi}^{=} = -0,136$.

3.2.2.2. 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 $p_{\phi}^{al-I'}/p_{\alpha}^{al}$. Utilizaremos el valor de p_{α}^{al} publicado para las hélices alfa. Esta elección está justificada si las estructuras con orientación neta son principalmente hélices alfa, o otras estructuras con un valor de p_{α} semejante, hecho que hemos comprobado en el punto 2.1.4. Así tendremos que $p_{\phi}^{al-I'}/p_{\alpha}^{al} \approx 0,079$.

El parámetro de orden de las estructuras del Anc2pHis resistentes al intercambio respecto a la normal del cristal de RTA pueden obtenerse como $p_{\phi}^{aII}/p_{\alpha}^{aII}$ o $p_{\phi}^{aA}/p_{\alpha}^{aA}$. Utilizando los valores de p_{α} para hélices alfa llegamos a $p_{\phi}^{aII}/p_{\alpha}^{aII} \approx 0,21$ y $p_{\phi}^{aA}/p_{\alpha}^{aA} \approx 0,094$. Estos dos valores tendrían que ser iguales, pues representan el mismo orden. Por las dificultades de medida puede justificarse que el valor obtenido para la amida A es menos fiable.

Para la vibración CH₂, tenemos que forma un ángulo de 90° con la dirección de la cadena alifática del lípido. Por lo tanto para esta vibración $p_{\alpha} = -0,5$. Utilizando la vibración asimétrica tendremos que el parámetro de orden de la cadena alifática respecto a la normal del cristal de RTA, $p_{\beta} \times p_{\gamma}$, será de 0,26, y utilizando la vibración simétrica será de 0,27.

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

Para la película seca de proteoliposomas mostrada en la figura 3.12, el valor de $p_\beta \times p_\gamma$ para las colas de fosfolípido es de 0,27-0,26. Como para PC/PA en fase cristal líquido hemos determinado que $p_\beta = 0,52$, esto nos lleva a un valor para el parámetro de orden de la bicapa de $p_\gamma \approx 0,51$.

Podemos obtener el parámetro de orden de las estructuras de la proteína respecto a la bicapa, p_β , como $p_\beta = p_\phi^{al-1} / (p_\alpha^{al} \times p_\gamma) \approx 0,15$ ($\beta \approx 49^\circ$). Si consideramos que sólo las hélices transmembrana muestran una orientación preferencial, mientras que el resto de estructuras globalmente no la muestran, podemos obtener su parámetro de orden respecto a la normal de la bicapa tras una simple corrección. Tras esta corrección tenemos que p_β para las hélices transmembrana valdría 0,38 ($\beta \approx 40^\circ$). El ángulo obtenido a partir de los espectros de polarización para la película seca en agua (H₂O) fue de 34° , por lo tanto podemos esperar que el eje de las hélices transmembrana muestra una inclinación media entre 34° y 40° .

El parámetro de orden de las estructuras resistentes al intercambio respecto a la bicapa, p_β , puede

obtenerse utilizando valores de la amida II (más fiables) o de la amida A (menos fiables). Utilizando la amida II tenemos que $p_\beta \approx 0,41$ ($\beta \approx 39^\circ$), y utilizando la amida A que $p_\beta \approx 0,18$ ($\beta \approx 48^\circ$). La orientación de las estructuras resistentes al intercambio obtenida utilizando la amida II es semejante a la estimada para las hélices transmembrana. Este hecho refuerza la conclusión de una inclinación de entre 34° y 40° para las hélices transmembrana.

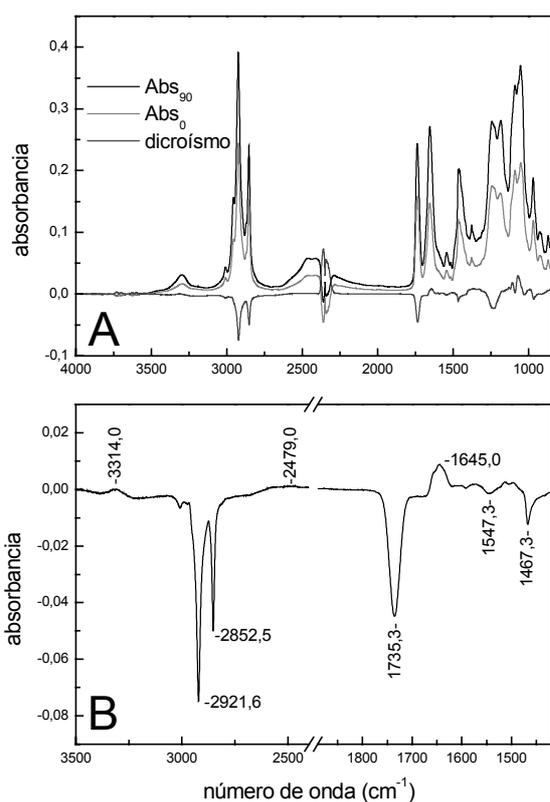


Figura 3.13. (A) Espectro de absorbancia de una película seca (con D₂O) de Anc2pHis utilizando radiación polarizada (a 90° y 0°), y espectro de dichroísmo lineal. (B) Espectro de dichroísmo lineal del Anc2pHis tras 14 horas en una película humedecida con D₂O.

3.2.3. El espectro de dichroísmo

La figura 3.13 muestra los espectros de absorción a 90° y a 0° de la película seca del Anc2pHis (inhibido y reconstituido), junto con el espectro de dichroísmo. Este espectro se obtuvo como $Abs_{90} - R^{iso} \times Abs_0$, donde Abs_{90} es el espectro de absorbancia obtenido con polarización a 90° , Abs_0 con polarización a 0° y R^{iso} es la razón de dichroica que daría una muestra isotrópica (con $p_\phi = 0$) de grosor $l = 0,54 \mu\text{m}$.

Las bandas que aparecen en el espectro de

dicroísmo correspondientes a la proteína son: amida A a $3314,0 \text{ cm}^{-1}$, amida A' a $\approx 2479 \text{ cm}^{-1}$ (es muy débil), amida I-I' a $1645,0 \text{ cm}^{-1}$ y amida II a $1547,3 \text{ cm}^{-1}$ (la amida II' se solapa con bandas del lípido). Estos máximos difieren de los máximos del espectro de absorbancia, que eran respectivamente $3298,2 \text{ cm}^{-1}$, $2461,4 \text{ cm}^{-1}$, $1655,6 \text{ cm}^{-1}$ y $1543,5 \text{ cm}^{-1}$ (ver figura 3.1). Estas diferencias entre las posiciones de las bandas en el espectro de dicroísmo y en el de absorbancia se han de interpretar como que la orientación se concentra selectivamente en ciertas bandas componentes.

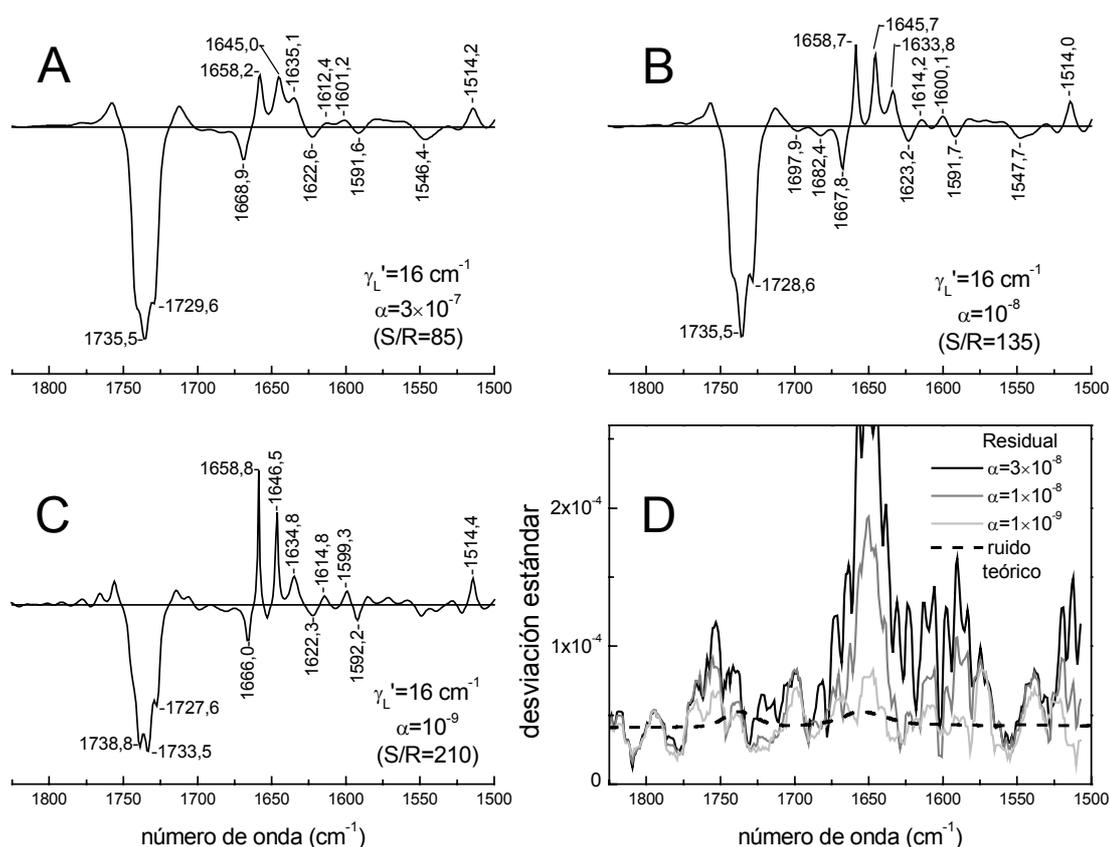


Figura 3.14. (A-C) Desconvoluciones de máxima entropía del espectro de dicroísmo del Anc2pHis presentado en la figura 3.13B. (D) Desviación estándar del residual de las desconvoluciones y del ruido teórico.

A su vez, las posiciones en el espectro de dicroísmo de la proteína intercambiada difieren de los obtenidos para la proteína en H_2O . En H_2O teníamos la amida A a $3300,3 \text{ cm}^{-1}$, la amida I a $1657,3 \text{ cm}^{-1}$ y la amida II a $1550,0 \text{ cm}^{-1}$ (ver figura 2.28). La diferencia más interesante aparece en la amida I, pues su máximo en el espectro de dicroísmo sufre un corrimiento de $-12,3 \text{ cm}^{-1}$. Como conclusión, es evidente que una parte importante de las estructuras orientadas se intercambian. Esta conclusión viene apoyada por las diferencias existentes en las posiciones de la amida A y amida II. Así, la amida II de las estructuras orientadas muestra un máximo a $1550,0 \text{ cm}^{-1}$, mientras que la de las estructuras orientadas resistentes al intercambio aparece a $1543,5 \text{ cm}^{-1}$, una posición bastante diferente, que sugiere que si bien la mayor parte

de estructuras orientadas resistentes al intercambio serán hélices, habrá también una importante proporción de láminas beta.

Para obtener más información, se desconvolvió el espectro de dicroísmo entre 1825 y 1500 cm⁻¹. La figura 3.14 muestra la desconvolución utilizando $\gamma_L' = 16$ cm⁻¹ y tres valores del regularizador. La relación entre el máximo de la amida I y la desviación estándar del ruido teórico entre 1825-1500 cm⁻¹ es de 200. Por lo tanto, dos de las tres desconvoluciones mostradas han de considerarse conservadoras. En la zona de la amida I se detectan cuatro bandas claras, y otras tres menos seguras. Las bandas claras aparecen a 1667, 1659, 1646 y 1636 cm⁻¹. La banda a 1614 cm⁻¹ corresponde con gran seguridad a la tirosina, pues otra banda positiva aparece a 1514 cm⁻¹.

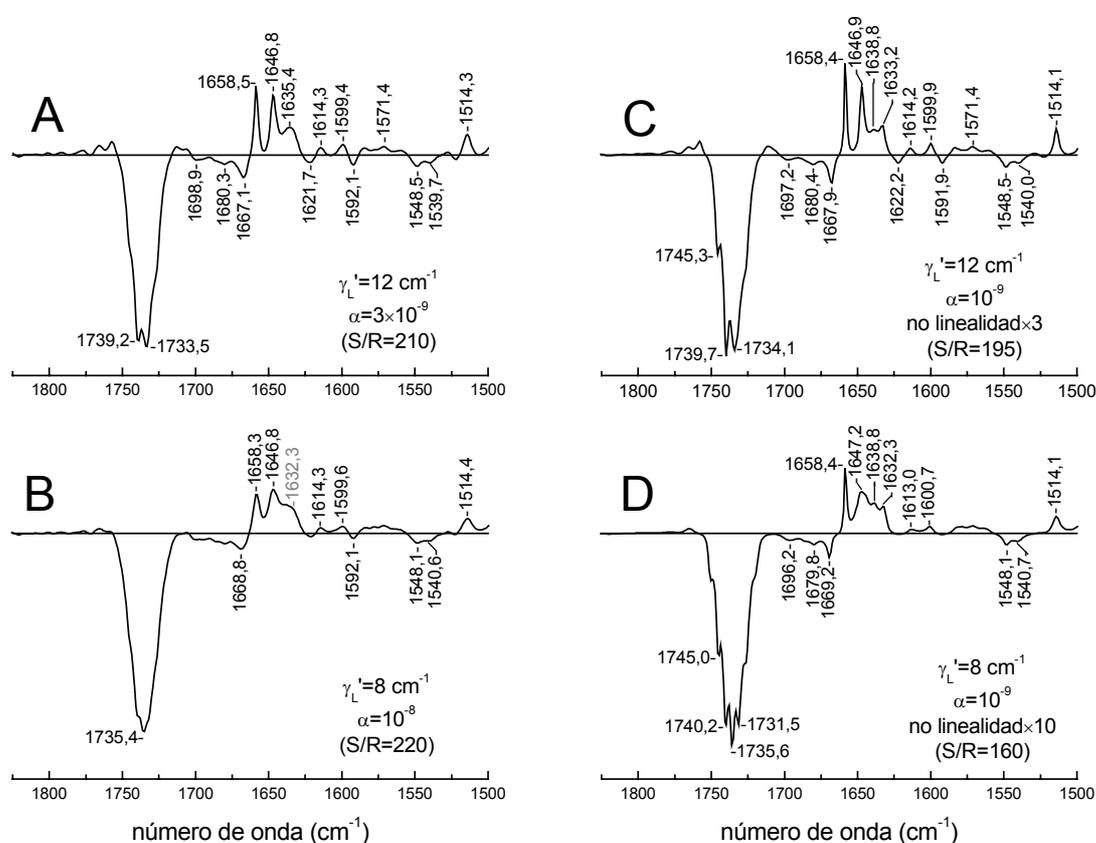


Figura 3.15. Desconvoluciones de máxima entropía del espectro de dicroísmo del Anc2pHis presentado en la figura 3.14B. En (C-D) se aumentó la no-linealidad de la expresión de la entropía.

La figura 3.15A-B muestra el espectro de dicroísmo desconvuelto con $\gamma_L' = 12$ cm⁻¹ por un lado, y con $\gamma_L' = 8$ cm⁻¹ por otro. El objetivo de estos valores es reducir al máximo una posible sobredesconvolución que pudiera ocultar bandas o crear bandas artificiales. La figura 3.15C-D muestra los espectros desconvueltos para las mismas anchuras, pero variando la no-linealidad de la entropía en la desconvolución.

En resumen, es posible resolver con claridad cuatro bandas en el espectro de dicroísmo localizadas en la zona de la amida I, con posiciones: $1667,9 \pm 1,1$, $1658,5 \pm 0,2$, $1646,4 \pm 0,8$, y $1634,3 \pm 1,3$ y $1613,9 \pm 0,9$ cm^{-1} . Además, otras dos bandas se resuelven en algunos casos a $1697,6 \pm 1,1$ y $1680,5 \pm 1,1$ cm^{-1} . Cuando se varía la no-linealidad de la entropía de banda a 1634 cm^{-1} se separa en dos bandas a $1638,8 \pm 0,1$ y $1632,8 \pm 0,6$ cm^{-1} .

3.2.4. Asignaciones de bandas para el espectro de dicroísmo (D_2O)

La tabla 3.3 recoge las asignaciones realizadas para el espectro de dicroísmo. Los porcentajes de área son muy aproximados pues se obtuvieron por integración directa del espectro de dicroísmo desconvulado. Antes la posibilidad que las bandas entre 1700 y 1665 cm^{-1} deban gran parte de su área a un problema de línea base combinado con una posible desconvolución, los porcentajes en área se refieren sólo a las bandas detectadas entre 1665 y 1620 cm^{-1} .

Bandas a 1697 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} (negativas): En coherencia con la asignación en H_2O se asignan a los componentes de alta frecuencia de las láminas beta antiparalelas (planas y onduladas). Estas bandas aparecen resistentes, total o casi totalmente, al intercambio.

Banda a 1669 cm^{-1} (negativa): Se asigna al componente de alta frecuencia de las láminas beta paralelas, como en H_2O . Dependiendo de la anchura de desconvolución utilizada su intensidad varía. Para anchura de desconvolución mayores parte de su intensidad se deberá a la sobredesconvolución de la banda a 1659 cm^{-1} . Esta banda también parece total o parcialmente resistente al intercambio.

Banda a 1659 cm^{-1} (positiva, $\approx 30\%$ del área): Esta banda corresponderá principalmente a la banda observada a 1661 cm^{-1} en H_2O , pues la hélice transmembrana asignada a esta banda en el espectro de absorbancia muestra un intercambio de sólo el 20% (una resistencia al intercambio del 80%). Este dato concuerda con que el porcentaje del área de esta banda representa el 90% (sin redondeos) del de la banda a 1661 cm^{-1} en H_2O . El desplazamiento observado de 2 cm^{-1} entre ambas bandas puede deberse a un efecto del D_2O sin relación con el intercambio. La posibilidad que esta banda pudiera contener las dos

Posición	Área	Signo	Asignación
1697			láminas β antiparalelas-H
1680			láminas β antiparalelas-H
1669		-	láminas β paralelas-H
1659	30	+	hélices α transmembrana-H
1647	40	+	hélices α transmembrana-D y láminas β paralelas-H
1639	15	+	hélices 3_{10} transmembrana-D
1632	15	+	láminas β antiparalelas-H
1614		+	tirosina-D

Tabla 3.3. Asignación de las bandas del espectro de dicroísmo obtenido para una película seca en D_2O del Anc2pHis inhibido con catr y reconstituido. Se indica el signo de la banda, si es negativa o positiva. El sufijo *H* indica una estructura hidrogenada y el *D* estructura deuterada.

bandas encontradas en H₂O 1661 cm⁻¹ y 1656 cm⁻¹ no resueltas, con una contribución mayor de la banda a 1661 cm⁻¹ se discute en el siguiente punto.

Banda a 1656 cm⁻¹ (ausente): En el espectro de absorbancia se observa que esta banda pasa de un área del 17% en H₂O a una del 6% en D₂O. Además, este 6% es muy posible que corresponda a los lazos largos intercambiados (así se ha asignado en la tabla 3.2), desplazados desde 1661 cm⁻¹, y por lo tanto sin orientación. Según esta interpretación, la banda a 1656 cm⁻¹ no estará presente en el espectro de dicroísmo. Si este 6% se asignara a hélices transmembrana no intercambiadas aparecerían en el espectro de dicroísmo con una intensidad tres veces menor que la que mostraba en H₂O. Esta disminución de su intensidad podría causar que esta banda no se resolviera de la banda a 1659 cm⁻¹. Los espectros desconvueltos muestran en algunas ocasiones la banda a 1659 cm⁻¹ con una anchura de 1,5 cm⁻¹ (extremadamente estrecha) sin la aparición de ninguna banda u hombro, lo cual apoya la interpretación que la banda a 1656 cm⁻¹ está total o casi totalmente ausente en el espectro de dicroísmo.

Banda a 1647 cm⁻¹ (positiva, ≈ 40% del área): Es una banda que podrá contener muchas contribuciones. La principal será de hélices alfa transmembrana deuteradas, provenientes de la banda a 1656 cm⁻¹ en H₂O. Tendrá también contribución de las pocas hélices transmembrana deuteradas provenientes de la banda a 1661 cm⁻¹. Finalmente podrá tener contribuciones de las bandas que aparecían a 1648 y 1642 cm⁻¹ H₂O (hélices 3₁₀ y láminas beta paralelas respectivamente) que se muestren resistentes al intercambio. El área de esta banda es sólo un poco mayor que el área de la banda a que aparecía a 1656 cm⁻¹ en H₂O, la cual cosa indica que la banda a 1648 cm⁻¹ que aparecía en H₂O, y se asignaba a hélices 3₁₀ transmembrana, sufre un intercambio H/D mayoritario o total.

Banda a 1639 cm⁻¹ (positiva, ≈ 15% del área): Sólo aparece en algunas desconvoluciones junto a otra banda a 1632 cm⁻¹. En la mayoría de desconvoluciones no se resuelven, dando una única banda a 1635 cm⁻¹. De ser esta separación correcta, esta banda a 1639 cm⁻¹ sólo puede asignarse a estructuras intercambiadas. Por un lado, puede asignarse a las hélices 3₁₀ transmembrana, que en H₂O aparecían a 1648 cm⁻¹. Esta asignación esta apoyada por el hecho que la banda a 1647 cm⁻¹ en D₂O no tiene suficiente área para tener una importante contribución de hélices 3₁₀ transmembrana resistentes al intercambio. Por otro lado, puede asignarse también a láminas beta paralelas, que en H₂O aparecían a 1642 cm⁻¹. Esta última asignación parece no estar apoyada por el hecho que sigue apareciendo una banda negativa a 1670 cm⁻¹, lo cual sugiere que las láminas beta paralelas serán en gran parte resistentes al intercambio. Esta resistencia es coherente también con las asignaciones de intercambio realizadas en la tabla 3.2.

Banda a 1632 cm⁻¹ (positiva, ≈ 15% del área): Corresponderá a láminas beta antiparalelas no intercambiadas, en coherencia con las bandas que aparecen a 1697 y 1680 cm⁻¹ y la banda que aparecía en el espectro de dicroísmo en H₂O a 1633 cm⁻¹.

Banda a 1614 cm⁻¹ (positiva): corresponderá a la tirosina. Este desplazamiento de 3 cm⁻¹ es coherente con la sustitución del O-H del anillo de la tirosina por O-D. Esta asignación viene apoyada por la banda positiva que aparece a 1514 cm⁻¹, que también sufre un desplazamiento de 3 cm⁻¹.

Finalmente, cabe comentar que en esta asignación se deduce que de las bandas asignadas a hélices transmembrana en H_2O , sólo la banda a 1661 cm^{-1} muestra resistencia al intercambio, mientras que la mayor parte de láminas beta lo muestran. Esta observación viene apoyada por la posición de la amida II en los espectros de dicroísmo desconvulados en D_2O . En el espectro de dicroísmo en H_2O sólo se observaba una banda a 1550 cm^{-1} , coherente con unas estructuras orientadas que son principalmente hélices (más del 70% según nuestra asignación). En D_2O , donde en la amida II sólo aparecerán las estructuras orientadas resistentes al intercambio, aparecen dos máximos, el más intenso a 1548 cm^{-1} y el menos intenso a 1540 cm^{-1} . Esto da a entender que entre las estructuras orientadas resistentes al intercambio hay una proporción importante de láminas beta en coherencia con lo que hemos deducido a partir de la amida I (algo menos del 50%, según nuestra asignación).

discusión general

1. El problema del ajuste de la amida I. Efecto del número, forma de las bandas y desconvolución realizada en los resultados del ajuste

En el punto 4 de Resultados Teóricos se ha dando una extensa explicación del ajuste de bandas desconvuladas por Fourier, aisladas y solapadas. Sin embargo, dos puntos muy importantes para su aplicación práctica se han dejado de lado o tocado muy poco, como son la elección y efecto del número de bandas y la forma de éstas en el ajuste. Por otra parte, la posibilidad teórica de ajustar espectros desconvulados por máxima entropía o con predicción lineal no se ha tocado, pero estos ajustes se han realizado en Resultados Experimentales.

Los siguientes apartados los dedicaremos a discutir estos puntos, utilizando para ello los resultados obtenidos en el ajuste de la película seca del Anc2pHis solubilizado en DM (ver punto 1.2.4 de Resultados Experimentales), pero intentando extraer conclusiones generales.

1.1. Número de bandas en el ajuste

Es uno de los puntos más delicados de cualquier ajuste de bandas. Al aumentar el número de bandas en el ajuste, tendremos bandas en posiciones en las que antes no las había, con un área que anteriormente se repartían el resto de bandas. Al eliminar una banda ocurrirá el proceso contrario. Evidentemente, esta aparición/desaparición de bandas en ciertas posiciones y redistribución de áreas supone una reinterpretación continua de los parámetros de las bandas componentes.

El proceso de ajuste es capaz de determinar los parámetros de las bandas (con mayor o menor error), pero es

incapaz de determinar el número de bandas, que debe ser asumido *a priori*. Nosotros nos hemos basado a la hora de determinar el número y posiciones aproximadas de bandas componentes en los resultados obtenidos en los diferentes métodos de desconvolución, tras lo cual, parte de las supuestas bandas componentes de la amida I se estrechan lo suficiente para resolverse parcialmente. Como la sensibilidad a errores de un ajuste aumenta con el número de bandas incluidas, y es especialmente grande si la forma de

Seis bandas		Siete bandas		Ocho bandas	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1695,6	0,5	1696,1	0,4	1696,1	0,7
1682,4	7,8	1682,5	8,1	1683,3	8,6
1671,2	8,0	1670,2	11,9	1673,3	9,9
1657,8	59,3	1657,4	60,0	1664,1	10,3
1640,8	10,3	1644,4	2,3	1656,7	43,1
1628,7	13,4	1636,8	11,0	1646,0	6,5
		1626,9	6,4	1636,7	15,3
				1626,6	5,6

Tabla 1.1. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis asumiendo que las bandas originales eran Lorentzianas, utilizando seis, siete y ocho bandas en amida I. Los cuadrados punteados marcan el grupo de bandas principalmente afectado al aumentar en uno el número de bandas, cuya área total se ve más o menos conservada.

Seis bandas		Siete bandas		Ocho bandas	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1695,6	0,9	1696,0	0,8	1696,1	0,7
1682,4	12,1	1682,7	11,6	1683,6	11,2
1670,4	9,6	1669,3	18,0	1673,3	11,3
1657,8	43,5	1657,3	38,2	1664,8	15,2
		1644,7	11,5	1656,7	29,7
1641,6	26,5	1636,4	10,8	1646,0	12,3
1627,5	7,4	1627,0	9,1	1636,4	12,6
				1626,3	7,0

Tabla 1.2. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis asumiendo que las bandas originales eran son Voigtianas, con una anchura Gausiana común para todas las bandas amida I. Los cuadrados punteados marcan el grupo de bandas principalmente afectado al aumentar en uno el número de bandas, cuya área total se ve más o menos conservada.

Seis bandas		Siete bandas		Ocho bandas	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1696,3	0,7	1696,0	1,1	1696,1	1,0
1681,1	8,5	1682,6	7,1	1683,0	6,7
1669,2	7,9	1669,7	19,4	1672,6	8,4
1657,8	46,4	1657,3	41,6	1664,7	16,5
		1644,5	8,3	1656,8	30,4
1641,6	25	1636,7	12,2	1646,9	12,1
1628,1	11,6	1627,1	10,4	1636,8	18,5
				1626,6	6,4

Tabla 1.3. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis asumiendo que las bandas originales son Voigtianas. Los cuadrados punteados marcan el grupo de bandas principalmente afectado al aumentar en uno el número de bandas, cuya área total se ve más o menos conservada.

las bandas es optimizada en el ajuste, los valores de las posiciones de las bandas componentes se han limitado a los obtenidos en los espectros desconvulados, dejando un margen de variación durante el ajuste. Como los métodos de desconvolución se ven limitados, entre otros factores, por la relación S/R, siempre hemos de considerar los resultados como revisables, pues para un espectro con mayor relación S/R, o al aplicar un método de desconvolución con mayor capacidad de estrechamiento para la misma relación S/R, seremos capaces de detectar más bandas conociendo al mismo tiempo sus nuevas posiciones aproximadas. Esto llevará a un nuevo ajuste con parámetros de las bandas diferentes.

La relación entre número de bandas y resultados del ajuste es lo que se ha intentado evidenciar realizando el ajuste del espectro de la película seca del Anc2pHis solubilizado utilizando seis, siete u ocho bandas en la amida I (ver figuras 1.25-1.32 del punto 1.2.4. de Resultados Experimentales). Las tablas 1.1-1.3 comparan los resultados obtenidos al ajustar seis, siete u ocho bandas al espectro desconvulado por

Fourier, para tres asunciones diferentes para la forma de las bandas (Lorentzianas, Voigtianas con anchura Gausiana común, y Voigtianas). La tabla 1.4 compara los resultados al ajustar siete u ocho bandas al espectro desconvulado mediante máxima entropía.

Siete bandas		Ocho bandas	
Posición	Área	Posición	Área
1695,9	0,8	1696,2	0,8
1682,3	9,6	1683,4	8,2
1669,2	16,3	1673,7	10,6
		1663,6	19,3
1657,5	43,9	1656,6	29,6
1646,2	8,2	1645,8	12,0
1638,4	13,0	1636,5	10,6
1627,5	8,1	1626,4	8,8

Tabla 1.4. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados mediante máxima entropía de la película seca del Anc2pHis.

Una mirada a las tablas 1.1-1.4 muestra lo siguiente: el aumento en uno del número de las bandas, se caracteriza principalmente como una separación asimétrica de una banda en dos, o de dos bandas en tres, aunque a veces bandas lejanas a la nueva banda ven afectada su área. Generalmente, hay una conservación del área de las bandas a cierto nivel, es decir, el área no se mueve más allá de ciertos intervalos de número de onda. Esto se ha mostrado en las tablas 1.1-1.3, marcando las bandas cuya área se ve afectada individualmente por la nueva banda añadida, pero no como grupo. Por ello, cuanto mayor sea el número de bandas que somos capaces de resolver, el resolver una nueva banda producirá movimientos del área de menor número de onda, afectando en menor medida a la interpretación estructural de

las bandas en el ajuste. En este sentido, es de gran importancia obtener espectros con alta relación S/R, y utilizar métodos de estrechamiento tan potentes como sea posible.

1.2. Forma de las bandas en el ajuste

La forma de las bandas puede decidirse al inicio del ajuste, o bien puede introducirse un parámetro ajustable que la determina. Inicialmente, nosotros hemos supuesto que las bandas amida I tienen forma Lorentziana y por ello el ajuste de los espectros desconvulados se tendrá que realizar con bandas Lorentzianas desconvuladas.

De manera más general, se puede asumir que las bandas amida I tienen forma Voigtiana, que engloba desde una Lorentziana hasta una Gaussiana. En el punto 2 de la Introducción se justifica el hecho que las bandas en IR puedan tener

forma Voigtiana, pues hay procesos que generan carácter Gaussiano para las bandas. Así, los espectros desconvulados se pueden ajustar utilizando bandas Voigtianas desconvuladas. Este ajuste es mucho más delicado que para bandas Lorentzianas desconvuladas, pues las bandas Voigtianas tienen un parámetro

ajuste A		ajuste B		ajuste C	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1695,6	0,5	1696,3	0,7	1695,6	0,9
1682,4	7,8	1681,1	8,5	1682,4	12,1
1671,2	8,0	1669,2	7,9	1670,4	9,6
1657,8	59,3	1657,8	46,4	1657,8	43,5
1640,8	10,3	1641,6	25	1641,6	26,5
1628,7	13,4	1628,1	11,6	1627,5	7,4

Tabla 1.5. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis utilizando seis bandas amida I. El ajuste **A** se realizó asumiendo que las bandas originales eran Lorentzianas y el **B** y **C** asumiendo que son Voigtianas. En **C** se asumió además que la anchura Gaussiana de las bandas Voigtianas es común para todas las bandas amida I.

más para cada banda, el cual les da mucha versatilidad. Como consecuencia, durante el proceso de ajuste la tendencia en reducir la discrepancia espectro/ajuste puede causar que las bandas ajustadas adopten soluciones improbables. Estas soluciones se caracterizan, entre otras cosas, por posiciones de las bandas muy alejadas de las iniciales, obtenidas a partir de los espectros desconvulados. Por ello, se decidió limitar la posición de las bandas a un cierto intervalo alrededor de los valores obtenidos en los espectros desconvulados en todos los ajustes.

Entre la asunción de bandas Lorentzianas para las bandas amida I, y bandas Voigtianas, hemos utilizado una asunción intermedia. Consiste en asumir que las bandas amida I son bandas Voigtianas, pero con una anchura Gausiana común para todas. De este modo, el número de parámetros del ajuste se ve incrementado sólo en uno, pero asumimos bandas Voigtianas.

Las figuras 1.25-1.32 del punto 1.2.4. de Resultados Experimentales muestran que la elección de la forma de las bandas tiene una repercusión importante en las bandas ajustadas. Observando, no tanto la apariencia del ajuste como los resultados obtenidos, la diferencia no es tan grande como podría parecer. Las tablas 1.5-1.7 comparan los resultados del ajuste para las tres asunciones sobre la forma de las bandas (para seis, siete u ocho bandas amida I). Para el ajuste asumiendo bandas Voigtianas, con anchura Gausiana común o independiente, la semejanza es razonable (ver tablas 1.5-1.7). Para el ajuste asumiendo bandas Lorentzianas o bandas Voigtianas, existen diferencias importantes. Estas diferencias se concentran alrededor de un grupo de bandas, de tal manera que en su conjunto el área de estos grupos no se ve afectada por la elección del tipo de banda. Evidentemente, si el grupo se halla en un intervalo de número de ondas suficientemente estrecho para incluir bandas asignables a un solo tipo de estructura secundaria, esta incertidumbre presentará un problema menor a la hora de obtener una estimación de estructura secundaria. Este es el caso para en el ajuste con ocho bandas en la amida I (tabla 1.7) donde las bandas a 1664 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1646 cm^{-1} son principalmente asignables a hélices y/o estructuras desordenadas.

Una vez visto como afecta la forma de las bandas al ajuste, queda determinar qué asunción dará los resultados más correctos; esto dependerá de la robustez del modelo y de su corrección. La asunción de bandas Lorentzianas será la elección más robusta. La corrección de los resultados estará sin embargo

ajuste A		ajuste B		ajuste C	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1696,1	0,4	1696,0	1,1	1696,0	0,8
1682,5	8,1	1682,6	7,1	1682,7	11,6
1670,2	11,9	1669,7	19,4	1669,3	18,0
1657,4	60,0	1657,3	41,6	1657,3	38,2
1644,4	2,3	1644,5	8,3	1644,7	11,5
1636,8	11,0	1636,7	12,2	1636,4	10,8
1626,9	6,4	1627,1	10,4	1627,0	9,1

Tabla 1.6. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis utilizando siete bandas amida I. El ajuste **A** se realizó asumiendo que las bandas originales eran Lorentzianas y el **B** y **C** asumiendo que son Voigtianas. En **C** se asumió además que la anchura Gausiana de las bandas Voigtianas es común para todas las bandas amida I.

condicionada a la corrección del modelo. Para saber si este modelo es correcto para un ajuste, nos fijaremos en tres aspectos: el residual del ajuste, los valores estimados *a priori* para la anchura Lorentziana y Gausiana de las bandas de la amida I, y en la anchura Gausiana obtenida en el ajuste asumiendo bandas Voigtianas con anchura Gausiana común a todas las bandas amida I.

Si el residual del ajuste es mayor que el ruido, esto sugiere que el modelo es incorrecto, o al menos incompleto, lo cual puede deberse entre otras causas a una forma de las bandas inadecuada. En el ajuste de los espectros de la película seca de Anc2pHis solubilizado se da este hecho, mientras que para la proteína reconstituida el residual del ajuste asumiendo bandas Lorentzianas para las bandas amida I está al nivel del ruido.

Hemos revisado, ampliado y desarrollado métodos para una estimación previa de la anchura Lorentziana y Gausiana de las bandas en la zona de la amida I. Al aplicar estos métodos al espectro de la película seca de Anc2pHis solubilizado obtuvimos valores para la anchura Lorentziana de $21,6 \text{ cm}^{-1}$ y para la Gausiana de $8,1 \text{ cm}^{-1}$. El valor de la anchura Gausiana nos indica por sí mismo que las bandas de la amida I tendrán un cierto carácter Gausiano y que, por lo tanto, se tendrán que describir con bandas Voigtianas. Además, en el ajuste utilizando bandas Lorentzianas la anchura media Lorentziana obtenida fue de $26 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, superior de la estimada *a priori*. Por otro lado, al ajustar utilizando bandas Voigtianas, la anchura media Lorentziana de las bandas amida I fue de $20 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, y la Gausiana de $8 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Estos valores coinciden con los estimados *a priori*. Para la proteína reconstituida, la estimación previa de la anchura Gausiana no es fiable, por las razones indicadas en Resultados Experimentales.

El ajuste con bandas Voigtianas con anchura Gausiana común será prácticamente tan robusto como el ajuste para bandas Lorentzianas, pues sólo incluye un parámetro más. Este ajuste nos podrá indicar la necesidad de incluir carácter Gausiano en las bandas de la amida I para obtener un residual menor en el ajuste. Para la película seca de Anc2pHis solubilizado, el ajuste nos da una anchura Gausiana común de $12 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, haciendo evidente la necesidad del carácter Gausiano para ajustar el espectro. Para la proteína

ajuste A		ajuste B		ajuste C	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1696,1	0,7	1696,1	1,0	1696,1	0,7
1683,3	8,6	1683,0	6,7	1683,6	11,2
1673,3	9,9	1672,6	8,4	1673,3	11,3
1664,1	10,3	1664,7	16,5	1664,8	15,2
1656,7	43,1	1656,8	30,4	1656,7	29,7
1646,0	6,5	1646,9	12,1	1646,0	12,3
1636,7	15,3	1636,8	18,5	1636,4	12,6
1626,6	5,6	1626,6	6,4	1626,3	7,0

Tabla 1.7. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por Fourier de la película seca del Anc2pHis utilizando ocho bandas amida I. El ajuste **A** se realizó asumiendo que las bandas originales eran Lorentzianas y el **B** y **C** asumiendo que son Voigtianas. En **C** se asumió además que la anchura Gausiana de las bandas Voigtianas es común para todas las bandas amida I.

reconstituida, la anchura Gausiana común es menor de 2 cm^{-1} , y por lo tanto no es necesario incluir el carácter Gausiano para que el ajuste describa los datos experimentales.

Todos estos datos indican que para la proteína solubilizada serán más fiables los resultados obtenidos asumiendo bandas Voigtianas para la amida I en el ajuste, mientras que para la proteína reconstituida serán más fiables (por ser correctos y más robustos) los resultados asumiendo bandas Lorentzianas.

1.3. Efecto del tipo de desconvolución realizada y parámetros de desconvolución utilizados en el ajuste

Para la desconvolución de Fourier los resultados del ajuste, para un mismo número y forma de las bandas, es prácticamente independiente de los parámetros utilizados para realizar la desconvolución, tal como se observa en las figuras 1.25-1.32 de apartado 1.2.4. de Resultados Experimentales. Estudios previos habían indicado una importante dependencia entre la desconvolución realizada y las bandas obtenidas en el ajuste (Griffiths et al., 1987; Pierce et al., 1990; Jackson y Griffiths, 1991; Goormaghtigh et al., 1994b), pero estos estudios no utilizaban las bandas adecuadas para ajustar espectros desconvulados, las cuales hemos introducido en Resultados Teóricos.

DF		DRME		DFPL	
Posición	Área	Posición	Área	Posición	Área
1696,1	1,0	1696,2	0,8	1696,2	0,7
1683,0	6,7	1683,4	8,2	1684,1	8,6
1672,6	8,4	1673,7	10,6	1674,8	9,2
1664,7	16,5	1663,6	19,3	1665,4	13,6
1656,8	30,4	1656,6	29,6	1657,3	32,6
1646,9	12,1	1645,8	12,0	1647,8	15,1
1636,8	18,5	1636,5	10,6	1637,4	13,1
1626,6	6,4	1626,4	8,8	1626,7	7,2

Tabla 1.8. Resumen del ajuste de los espectros desconvulados por DF (Fourier), DMEM (máxima entropía) y DFLP (Fourier con predicción lineal) de la película seca del Anc2pHis utilizando ocho bandas amida I. El ajuste para DF y DFLP se realizó asumiendo que las bandas originales eran Voigtianas.

Además de ajustar espectros desconvulados por Fourier, se han ajustado espectros desconvulados por máxima entropía y en algunos casos espectros desconvulados por predicción lineal.

En el ajuste de espectros desconvulados por máxima entropía el principal problema es la ausencia de bandas analíticamente correctas para realizar el ajuste. Como consecuencia, introduciremos errores en la forma de las bandas a la hora de realizar el ajuste, y en éste no será posible

estimar ni la forma y la anchura de las bandas de la amida I antes de realizar la desconvolución. Estos problemas pueden llegar a ser secundarios, pues el gran estrechamiento obtenido en esta desconvolución hace que los errores en la forma de las bandas afecten poco a los resultados obtenidos en el ajuste, y por otro lado nos interesa principalmente la posición y área de las bandas, no su anchura o forma. Como ventaja respecto al ajuste de espectros desconvulados por Fourier tenemos que no es necesario limitar las posiciones de las bandas ajustadas, pues en estos espectros las bandas están tan resueltas que el ajuste es muy robusto. Siempre que las bandas aparezcan suficientemente resueltas, el ajuste será prácticamente

independiente de los parámetros utilizados para desconvular, tal como se muestra en la figura 1.33 del punto 1.2.4. de Resultados Experimentales.

En el ajuste de espectros desconvulados por predicción lineal nos encontramos, en teoría, próximos a las condiciones de espectros desconvulados por Fourier, pues existen formas analíticas de las bandas a utilizar en el ajuste. En la práctica, las distorsiones generadas durante la predicción nos acercan a la situación del ajuste de espectros desconvulados por máxima entropía. En cualquier caso, siempre que el estrechamiento de las bandas sea suficiente, el ajuste será relativamente independiente de estos errores en la forma de las bandas. Además el ajuste podrá realizarse sin limitar la posición de las bandas.

La tabla 1.8 compara los resultados obtenidos en el ajuste del espectro de la película seca del Anc2pHis solubilizado, obtenidos a partir de los espectros desconvulados por Fourier, por máxima entropía y por predicción lineal. Los resultados son semejantes, con algunas diferencias. En principio hemos de pensar que los resultados más fiables serán los obtenidos ajustando los espectros desconvulados por Fourier, pues son los únicos que cumplen las condiciones para un ajuste correcto. Los resultados obtenidos con los otros métodos de desconvolución son útiles para confirmar los resultados obtenidos en la desconvolución de Fourier, pues la posición de las bandas no está restringida durante el ajuste.

2. Estimación de la estructura secundaria del transportador ADP/ATP

Las asignaciones realizadas en las tablas 1.2, 2.2 y 3.2 de Resultados Experimentales pueden reducirse a una serie de estructuras secundarias. En esta estimación todas las contribuciones se asignan o bien a hélices, a láminas beta, a giros reversos y a otras estructuras. Queremos señalar que este proceso es un proceso de reducción de la información obtenida, pues la información estructural derivada de las asignaciones excede la mera estimación de la estructura secundaria. Por ejemplo, para el Anc2pHis se diferencia entre varios tipos de hélices transmembrana.

Para pasar de los valores de las tablas 2.2, 3.2 y 4.2 a las estimaciones de estructura secundaria es necesario utilizar los coeficientes de absorción integrada relativos para las diferentes estructuras. Si los porcentajes de las tablas 1.2, 2.2 y 3.2 se suman directamente, estamos asumiendo que todas las estructuras tienen los mismos coeficientes de absorción integrada. Si esta asunción de coeficientes de absorción iguales no es correcta, las estructuras con un coeficiente de absorción mayor se sobreestiman y las de menor se infraestiman. Para evitar este error, una vez asignadas las bandas en la amida I, hemos de ponderarlas por su coeficiente de absorción molar integral relativo.

En el punto 7 del Apéndice se muestra una recopilación de las informaciones respecto a los coeficientes de absorción de las diferentes estructuras secundarias. Tras esta recopilación, se ha concluido utilizar, para obtener una estimación de los porcentajes de estructura secundaria para láminas beta, hélices, giros reversos, estructuras irregulares y estructuras al azar, unos coeficientes relativos de 1 / 0,75 / 0,55 / 0,45 / 0,65 respectivamente.

2.1. Anc2pHis inhibido y solubilizado

Para el transportador solubilizado, el área asignada a hélices varía del 30% al 42%, según si nada o toda el área de la banda a 1647 cm^{-1} se asigna a hélices. El área asignada a láminas beta va del 19% al 27%, según si la mitad o toda el área de la banda a 1637 cm^{-1} se asigna a láminas beta. El área asignada a giros reversos es del 23%. El área asignada a otras estructuras va del 8% al 28%, según si sólo se considera la contribución asignada a lazos, o también se considera que toda el área de la banda a 1647 cm^{-1} y la mitad del área de la banda a 1637 cm^{-1} corresponde a estructuras irregulares.

Con estos valores, y utilizando los coeficientes de absorción relativos propuestos, se obtiene una estimación de estructura secundaria de 25-39% hélices, 12-19% láminas beta, 26-29% giros reversos y 13-38% otras estructuras. Estos valores se recogen en la tabla 2.1.

2.2. Anc2pHis inhibido y reconstituido

Para el transportador reconstituido, el 45% del área de la amida I se asigna a hélices. Este valor podría ser algo menor, a costa de la presencia de estructuras al azar en la banda a 1656 cm^{-1} y de estructuras

Estado	Hélices	Láminas	Giros	Otras
<i>Solubilizado</i>	39-25	19-12	29-26	38-13
<i>Reconstituido</i>	42-39	17-11	32-30	20-9

Tabla 2.1. Porcentajes de estructura secundaria estimadas para el transportador Anc2pHis inhibido.

irregulares en la banda a 1649 cm^{-1} . El 24% se asigna a láminas beta. Este valor es una estimación por lo alto, pues es probable la

presencia de segmentos irregulares en algunas de las bandas asignadas a láminas beta, que podrían llegar representar un 8% del área, dejando el área asignada a láminas beta en un 16%. Los giros se asignan al 25% del área. Finalmente las estructuras irregulares irán desde el 6% (asignado sólo los lazos largos) al 14%.

Con estos valores, utilizando los coeficientes de absorción relativos propuestos, se obtiene una estimación de estructura secundaria de 39-42% hélices, 11-17% láminas beta, 30-32% giros reveros y 9-20% otras estructuras. Estos valores se presentan en la tabla 2.2.

3. Discusión sobre la estructura del transportador ADP/ATP reconstituido

3.1. Las hélices transmembrana: número de onda, orientación e intercambio H/D

La estimación de un 39-42% de aminoácidos formando hélices transmembrana concuerda con la presencia de seis hélices transmembrana por monómero de Anc2pHis (22-23 aminoácidos por hélice) que representan el 41% de la proteína. Estas hélices forman un grupo heterogéneo, pues muestran tres tipos de vibración diferentes. Así el 45% de las hélices aparecen a 1660 cm^{-1} , el 40% a 1656 cm^{-1} y el 15% a 1649 cm^{-1} . Que todas estas bandas pertenecen a hélices transmembrana viene apoyada no sólo por su frecuencia y por la suposición que el 40% de las estructuras ha de adoptar estructuras hélices, sino por el espectro de dicroísmo. Este espectro descarta además que estas bandas provengan de los diferentes modos de vibración de un mismo tipo de hélice, pues en este caso las bandas resueltas mostrarían signo opuesto en el espectro de dicroísmo. Una vez hemos dejado claro que la existencia de estas tres bandas implica hélices transmembrana estructuralmente diferentes queda interpretar estas diferencias estructurales, pero antes recopilaremos informaciones de la orientación y el intercambio H/D.

Comparando el área de estas tres bandas en el espectro de absorbancia y en el de dicroísmo se observa que mantienen una relación semejante. Como hemos comentado, en el espectro de absorbancia los porcentajes son del 45%, 40% y 15%, y en el de dicroísmo los porcentajes son del 35%, 45% y 20%. Esto implica que estas tres hélices tienen aproximadamente la misma orientación, que hemos calculado en $34\text{-}40^\circ$ respecto a la normal de la bicapa, aunque quizás la hélice a 1661 cm^{-1} estará menos orientada que las otras.

Se ha deducido, a partir de los espectros de absorbancia en D_2O , que sólo el 38% de las hélices transmembrana son resistentes al intercambio (14 horas, 20°C , pH 6,8). Combinando información del espectro de absorbancia y del de dicroísmo hemos determinado el grado de intercambio de las diferentes hélices transmembrana. Las hélices que generan la banda a 1660 cm^{-1} son resistentes al intercambio, y tras 14 horas a 20°C sólo el 20% se intercambia. Por el contrario, las hélices a 1656 cm^{-1} muestran un intercambio que podemos considerar completo. Respecto a la banda a 1649 cm^{-1} debido a su menor intensidad los resultados son menos claros, pero apuntan a un intercambio completo o por lo menos mayoritario.

3.1.1. Diferencias estructurales entre las hélices transmembrana

Considerando la banda a 1656 cm^{-1} correspondiente a una hélice transmembrana estándar, cabe preguntarse a qué tipo de hélice corresponde la banda a 1660 cm^{-1} . Normalmente, se identifica un aumento de la frecuencia de una hélice con un aumento de la distancia de los puentes de hidrógeno $i \rightarrow i+4$

(Jackson y Mantsch, 1991). Esta es la causa normalmente asumida que explica la frecuencia mayor para las hélices α_{II} respecto a las α_I . En las pocas ocasiones en que se han descrito dos bandas asignadas a hélices, la banda a mayor frecuencia ha sido habitualmente asignada a hélices con puentes de hidrógeno más débiles (Tatulian et al., 1997; Prestrelski et al., 1991a). Este debilitamiento puede ser causado por un aumento de la distancia (estiramiento de la hélice) o por una mala orientación de los grupos N-H y C=O (por distorsiones de la hélice). En nuestro caso, los datos experimentales concuerdan, o no se contradicen, con esta interpretación.

La amida A es una vibración N-H pura (aunque acoplada mediante una resonancia Fermi con la amida B), por lo tanto su frecuencia depende directamente de la fuerza del enlace N-H. Si éste se debilita, por ejemplo al aumentar la fuerza del puente de hidrógeno N-H \cdots O=C, su frecuencia aumenta. La amida A en el espectro de dicroísmo aparece en H₂O a 3300 cm⁻¹. Esta posición corresponde a las tres hélices transmembrana. En D₂O, la posición de la amida A, donde sólo contribuye las estructuras orientadas resistentes al intercambio (principalmente la hélice a 1660 cm⁻¹), se da a 3314 cm⁻¹. Este resultado es coherente con un debilitamiento de los puentes de hidrógeno para la hélice a 1660 cm⁻¹ respecto a las otras dos, aunque los datos de la amida A son siempre difíciles de interpretar. Como su posición depende en parte de su acoplamiento con la amida B, y éste se verá afectado por el intercambio H/D, la posición de la amida A puede variar sin relación con la variación de la fuerza del enlace N-H, condicionando el significado del desplazamiento observado en los espectros de dicroísmo.

Respecto a los datos de intercambio H/D, estos nos dicen que la única hélice resistente al intercambio es la de 1660 cm⁻¹. Ya que el intercambio H/D requiere la rotura del puente de hidrógeno N-H \cdots O=C, parece lógico pensar que su debilitamiento acelerará el intercambio, cosa contraria a lo observado. El proceso de intercambio es sin embargo más complejo, pues la rotura del puente de hidrógeno es un proceso cooperativo que depende principalmente de la estabilidad de la estructura, y la estabilidad de una estructura depende de otros factores a parte de la fuerza del puente de hidrógeno N-H \cdots O=C.

En conjunto, estas dos observaciones son coherentes y no se contradicen con asignar la hélice a 1660 cm⁻¹ a una hélice en la que los puentes de hidrógeno amida se debilitan, pero no por ello es menos estable.

Respecto a la banda a 1649 cm⁻¹ la hemos asignado a hélices 3₁₀. Esta asignación no está de acuerdo con algunos resultados publicados (Dwivedi et al., 1984). Sin embargo, teniendo en cuenta que las hélices 3₁₀ muestran un puente de hidrógeno N-H \cdots O=C más corto y mejor orientado que el de una hélice alfa parece lógico pensar que aparecerá a menor frecuencia que ésta. Esta hélice, que corresponde a un 15% de las hélices transmembrana, bien puede aparecer en los extremos de algunas hélices o bien formar una hélice transmembrana completa. Dada la naturaleza poco frecuente de esta estructura la primera interpretación merece más crédito.

3.1.2 Diferencia de estabilidad / accesibilidad al disolvente de las hélices transmembrana

La velocidad de intercambio de un hidrógeno amida implicado en un puente de hidrógeno en una estructura cooperativa depende principalmente de la estabilidad de la estructura, pero también de la accesibilidad del disolvente al grupo amida (Bai et al., 1995b; Englander et al., 1996). Muchas veces sólo se tiene en cuenta la relación entre intercambio y accesibilidad, olvidando la estabilidad de una estructura. Esto sólo es correcto si el H que se intercambia no está implicado en un puente de hidrógeno relacionado con el mantenimiento de una estructura. Éste no es el caso para los hidrógenos amida, donde la estabilidad juega el papel más importante. Por lo tanto, una diferencia en el grado de intercambio se puede interpretar como una diferencia de estabilidad o como una diferencia de accesibilidad, o como una combinación de ambos efectos.

Si consideramos una estabilidad semejante para todas las hélices transmembrana, las diferencias observadas en el grado de intercambio H/D se podrán interpretar como una diferencia de accesibilidad. Por lo tanto, la hélice que da una banda a 1660 cm^{-1} será mucho menos accesible al disolvente que las hélices a 1656 y 1649 cm^{-1} . Sin embargo, por muy accesibles que sean las hélices a 1656 y 1649 cm^{-1} su prácticamente total intercambio sólo se puede explicar por una baja estabilidad. De hecho, estructuras que se encontrarán probablemente en el dominio globular de la proteína, como las láminas beta, muestra un intercambio pequeño o nulo, de un nivel semejante al de la hélice a 1660 cm^{-1} . Incluso estructuras como los giros reversos, que se encuentran forzosamente accesibles al disolvente y son poco cooperativas (y por ello difícilmente muy estables), muestran un intercambio del 75%, alto pero incompleto. Como consecuencia, hemos de pensar que las hélices a 1656 y 1649 cm^{-1} han de ser estructuras poco estables. Con una estructura poco estable queremos referirnos a una estructura en la que la probabilidad que se rompan alguno de sus puentes de hidrógeno amida es relativamente alta, por lo menos tan alta como en un giro reverso. Quizás la palabra estructuras dinámicas sea más adecuada que la palabra estructuras inestables.

Por ello, consideramos que las hélices a 1656 y 1649 cm^{-1} serán inestables (o dinámicas) y relativamente accesibles al disolvente. La hélice a 1660 cm^{-1} será relativamente estable y puede o no ser accesible al disolvente.

En este punto, es quizás interesante comentar que en los segmentos transmembrana propuestos se incluyen cuatro prolinas. Dos de ellas se encuentran entre los tres primeros/últimos aminoácidos del segmento transmembrana I y V, y las otras dos son más interiores, en los segmentos II y IV (ver figura 1.1 de la Introducción). Si existe alguna relación entre las hélices dinámicas/inestables y la presencia de prolinas es una posibilidad no descartable (ni demostrable).

3.2. Los lazos topológicos y extremos terminales

Los lazos topológicos representan aproximadamente el 45% (≈ 145 a.a.) de la estructura del transportador y los extremos terminales el 15% (≈ 50 a.a.). Los tres lazos topológicos mitocondriales son largos, de unos 42 aminoácidos cada uno, representando el 39% del transportador y el 63% de los segmentos no transmembrana. Los dos lazos citosólicos, de unos 15 aminoácidos cada uno, representan el 7% del transportador y el 11% de los segmentos no transmembrana. Finalmente las cadenas C y N terminal, de unos 24 aminoácidos cada una, representan el 20% del transportador, y el 32% de los segmentos no transmembrana

Aproximadamente el 49-55% (95-105 a.a.) de los segmentos no transmembrana adoptarán la conformación de giros reversos. Este porcentaje es muy grande y asegura que gran parte de los lazos topológicos y segmentos terminales tendrán muchos cambios de dirección. Este hecho podría ser importante para permitir que alguno de los lazos mitocondriales se introduzca parcialmente en la bicapa lipídica, tal como se cree que sucede en la conformación CATR del transportador y en la forma inhibida con c-atr.

Las láminas beta representarán entre un 18% y un 29% (35-55 a.a.) de la estructura de estos lazos topológicos y extremos terminales. Las láminas beta paralelas representarán el 8% (15 a.a.) y las antiparalelas entre el 10 y el 21% (20-40 a.a.). Es difícil predecir dónde se situarán estos segmentos. Podrían darse entre los lazos topológicos (mitocondriales o citosólicos) de una misma proteína o con los lazos de su compañera, con la que forma el dímero. Las láminas antiparalelas también podrán darse dentro de un mismo lazo o dentro de un mismo segmento terminal. Según los resultados de difracción, las láminas beta paralelas y algunas de las antiparalelas se situarán más o menos paralelas a la bicapa lipídica.

Las estructuras irregulares representarán entre el 16 y el 33% (30-65 a.a.). Estas estructuras corresponderán a lazos largos, una estructura extendida que aparece conectando estructuras secundarias. Nosotros hemos propuesto que esta estructura es la responsable de la gran inestabilidad del transportador cuando se halla solubilizado sin presencia de inhibidor. La agregación de esta estructura, sin ningún otro cambio estructural, producirá la pérdida de los sitios de unión del transportador a sustratos y a inhibidores (Lórenz-Fonfría et al., 2003). Dada su longitud y su importancia en la función del transportador, su localización es con gran seguridad alguno de los lazos topológicos mitocondriales. Nosotros hemos propuesto como máximo candidato el lazo mitocondrial M1, no implicado en la unión de los sustratos / inhibidores pero que puede regular el acceso al sitio de unión. El resto de estructuras irregulares representará entre el 0% y 17% ($\approx 0-35$ a.a.)

3.3. Comparación del grado de intercambio H/D del transportador ADP/ATP con otras proteínas de membrana

Comparar el grado de intercambio entre diferentes proteínas es interesante, pero presenta dificultades, pues depende de ciertos parámetros experimentales, como el tiempo de determinación, la temperatura y el pH de trabajo. Además existen otras diferencias experimentales a la hora de determinar el nivel de intercambio. Aunque prácticamente todos los autores utilizan la relación entre el área de la amida I y de la amida II antes y después del intercambio (donde el área se mide utilizando una línea base adecuada), no todos restan la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta resta parece justificada por el hecho que las cadenas de aminoácidos deuterados tienen importantes contribuciones alrededor de 1580 cm^{-1} , extremo utilizado en la medida del área de la amida II. Según nuestra experiencia no restar la contribución de aminoácidos eleva el grado de intercambio medio en un 10-20% en valor absoluto (según el intervalo utilizado para medir el área de la amida II), es decir, si en nuestro caso hemos determinado que un 60% de los hidrógenos amida se intercambia, no restar esta contribución aumentaría el porcentaje al 70-80%. La resta de la contribución de las cadenas laterales de los aminoácidos se realiza asumiendo que éstas se intercambian totalmente. Esto es más que probable pues los grupos funcionales implicados son en la mayor parte intrínsecamente más susceptibles al intercambio H/D que el grupo amida (por razones de pK), y además raramente las cadenas laterales se verán implicadas en puentes de hidrógeno cooperativos para el mantenimiento de una estructura, y por lo tanto su intercambio no se verá ralentizado por la estabilidad de las estructuras, aunque sí por la accesibilidad al disolvente (Englander et al., 1996; Bai et al., 1993; Hvidt y Nielsen, 1966).

Consideramos tres tipos de proteínas de membrana: las proteínas de membrana que transportan sustratos hidrofílicos, las proteínas de membrana que actúan como canales o poros acuosos y las proteínas de membrana no transportadoras.

Como ejemplo de proteínas de membrana que transportan sustratos hidrofílicos tenemos el transportador de glucosa, con un 85% de intercambio (Alvarez et al., 1987); el transportador de lactosa, con 100% de intercambio (Patzlaff et al., 1998); y el transportador de melibiosa, con un 60% de intercambio (Dave et al., 2002). Sólo en este último caso se restó la contribución de aminoácidos, por lo tanto hemos de situar el intercambio entre el 60 y el 80% para este tipo de proteínas de membrana.

Como ejemplo de proteínas de membrana que actúan como poros o canales acuosos, tenemos la porina, con 35% de intercambio (Kleffel et al., 1985); la acuoporina-1, con un 40% de intercambio (Cabiaux et al., 1997a); y la aerolisina, con un 30% de intercambio (Cabiaux et al., 1997b). Por lo tanto los canales muestran un intercambio del 30-40%. En nuestra opinión, estos niveles de intercambio tan bajos para proteínas que forman canales acuosos y con una grado de accesibilidad de las estructuras al agua grande, pone de manifiesto la importancia de la estabilidad en el intercambio H/D. En estas proteínas los segmentos transmembrana han de aportar una estructura rígida que dé lugar a un poro de tamaño constante. En contra, los transportadores realizan el paso de grandes moléculas a través de la

membrana pero sin dejar un poro fijo. Esto requerirá estructuras transmembrana dinámicas, moldeables o inestables.

Finalmente, como ejemplo de proteína de membrana que no transporta sustratos (pero sí protones) tenemos la bacteriorodopsina. Ésta muestra un nivel de intercambio menor del 30% (Cabiliaux et al., 1997a).

conclusiones

Desconvolución

1. La teoría de la autodesconvolución de Fourier puede ampliarse para tratar la infradesconvolución y la sobredesconvolución. Se han desarrollado fórmulas para obtener la forma final de las bandas, su estrechamiento efectivo y la degradación de la relación señal/ruido en función de los parámetros de desconvolución (factor de estrechamiento y anchura de desconvolución). Asimismo, se ha revisado, completado y ampliado diferentes métodos para determinar de manera objetiva y *a priori* los parámetros de desconvolución.
2. Las desconvoluciones regularizadas por máxima entropía permiten obtener mayores estrechamientos y/o una mejor supresión del ruido que la desconvolución de Fourier. Sin embargo, al restringir la solución a ser positiva no siempre proporciona soluciones adecuadas. Por ello, se ha desarrollado una nueva expresión de la entropía para soluciones sin restricción de signo. Con esta expresión de la entropía es posible obtener mayores estrechamientos y/o una mejor supresión del ruido que en la desconvolución de Fourier.
3. Se ha considerado la combinación de la desconvolución con la predicción lineal como método para estrechar bandas. Las posibilidades del poder de estrechamiento de este método son, en teoría, ilimitadas. Sin embargo, su uso práctico presenta muchas limitaciones y dificultades, que no se han podido superar completamente.

Ajuste de bandas

1. Se ha desarrollado una estrategia general para obtener modelos de bandas a resolución limitada, suavizadas, apodizadas y desconvuladas. Utilizando estos modelos, los parámetros de una banda pueden obtenerse con exactitud, independientemente de si ésta ha sido obtenida a resolución limitada, suavizada, apodizada o desconvulada.
2. Respecto al ajuste de Lorentzianas solapadas, linealizando el problema se ha introducido el concepto del condicionamiento del sistema, que permite conocer en qué condiciones el ajuste de espectros desconvulados será más robusto que el ajuste del espectro original.
3. Respecto al ruido, se ha comprobado que su efecto en los parámetros obtenidos en el ajuste de una banda Lorentziana puede obtenerse de manera fiable a partir de los errores asintóticos, pero sólo si el ruido es blanco. Las manipulaciones que afectan a la distribución de las frecuencias del ruido, como la apodización y la desconvolución, desvían los errores asintóticos de los reales. Para bandas Lorentzianas solapadas, tanto si el ruido es blanco como si no lo es, los errores asintóticos son aproximados. La obtención de los errores correctos requiere simulaciones de Monte Carlo.

4. Los errores en los parámetros, causados por la presencia de ruido en los datos, son mayores en el ajuste de un espectro desconvulado que en el ajuste del espectro original. Existen unas combinaciones de parámetros de desconvolución que minimizan esta diferencia. Éstos son los parámetros de desconvolución óptimos desde el punto de vista del ajuste de bandas.

Transportador ADP/ATP

1. Los porcentajes de estructura secundaria determinados para la forma inhibida con catr y solubilizada con docecil maltósido son: 25-40% hélices, 10-20% láminas beta, 25% giros reversos y 15-35% estructuras irregulares, observándose un solo tipo de hélices alfa. La proteína solubilizada retiene unas 15 moléculas de lípido por dímero.
2. Los porcentajes de estructura secundaria para la forma inhibida con catr y reconstituida en liposomas de fostatidil colina y ácido fosfatídico (9/1 p/p) son: 39-42% hélices, 11-17% láminas beta, 30-32% giros reversos y 9-20% estructuras irregulares. El 40% de hélices es coherente con la presencia de seis hélices alfa transmembrana.
3. La orientación de las hélices transmembrana es de 34-40° respecto a la normal de la bicapa lipídica.
4. Las hélices transmembrana pueden agruparse en tres grupos con propiedades diferentes: 45% hélices alfa estiradas y estables, 40% hélices alfa no estiradas y dinámicas, y 15% hélices 3_{10} . Todas ellas parecen mostrar una orientación semejante. En los segmentos no transmembrana hay láminas beta que se situarán paralelas a la superficie de la bicapa lipídica.
5. El nivel de intercambio hidrógeno / deuterio del transportador es del 60% (14 horas, 20 °C, pH 6,8), y es comparable con el de otros transportadores de moléculas hidrofílicas, y bastante superior al de los canales. El nivel de intercambio es semejante entre los segmentos transmembrana y no transmembrana.

referencias

A

Abrams, M. C., Toon, G. C., and Schindler, R. A. (1994) Practical example of the correction of Fourier-transform spectra for detector nonlinearity. *Appl. Opt.* 33, 6307-6314

Alvarez, J., Lee, D. C., Baldwin, S. A., and Chapman (1987) Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 262, 3502-3509

Arrondo, J. L. R., and Goñi, F. M. (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367-405

Arrondo, J. L. R., Muga, A., and Goñi, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 59, 23-56

Asplund, M. C., Zanni, M. T., and Hochstrasser, R. M. (2000) Two-dimensional infrared spectroscopy of peptides by phase-controlled femtosecond vibrational photon echoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8219-8224

Axelsen, P. H., Kaufman, B. K., McElhaney, R. N., and Lewis, R. N. A. H. (1995) The infrared dichroism of transmembrane helical polypeptides. *Biophys. J.* 69, 2770-2781

Axelsen, P. H., and Citra, M. J. (1996) Orientational order determinations by internal reflection infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 66, 227-253

B

Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englader, S. W. (1993) Primary structure effects on the peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 17, 75-86

Bai, Y., Englader, J. J., Mayne, L., Milne, J. S., and Englader, S. W. (1995a) Thermodynamic parameters from hydrogen exchange measurements. *Methods Enzymol.* 259, 344-356

Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L., and Englader, S. W. (1995b) Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange. *Science* 269, 192-197

Bandekar, J., and Krimm, S. (1988) Normal mode spectrum of the parallel-chain β -sheet. *Biopolymers.* 27, 909-921

Barth, A. (2000a) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 74, 141-173

Barth, A. (2000b) Fine-structure enhancement – assessment of a simple method to resolve overlapping bands in spectra. *Spectrochim. Acta A.* 56, 1223-1232

Bates, J. B. (1976) Fourier transform infrared spectroscopy. *Science* 191, 31-37

Bechinger, B., Ruyschaert, J.-M., and Goormaghtigh, E. (1999) Membrane helix orientation from linear dichroism of infrared attenuated total reflection spectra. *Biophys. J.* 76, 552-563

Becker, E. D., and Farrar, T. C. (1972) Fourier transform spectroscopy. *Science* 178, 361-368

Bernath, P. F. (1995) Spectra of atoms and molecules. Oxford University Press.

REFERENCIAS

Bertie, J. E., Ahmed, M. K., and Eysel, H. (1989) Infrared intensities of liquids. 5. Optical and dielectric constants, integrated intensities, and dipole moment derivatives of H₂O and D₂O at 22 °C. *J. Phys. Chem.* 93, 2210-2218

Bertie, J. E., and Lan, Z. (1996) Infrared intensities of liquids XX: The intensity of the OH stretching band of liquid water band revisited, and the best current values of the optical constants of H₂O(l) at 25 °C between 15,000 and 1 cm⁻¹. *Appl. Spectrosc.* 50, 1047-1057

Beyer, K., and Klingenberg, M. (1985) ADP / ATP carrier protein from heart mitochondrial has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 24, 3821-3826

Biemond, J., Lagendijk, R.L., and Mersereau, M. (1990) Iterative methods for image deblurring. *Proceeding of the IEEE* 78, 856-883

Blaudez, D., Boucher, F., Buffeteau, T., Desbat, B., Grandbois, M., and Salesse, C. (1999) Anisotropic optical constants of bacteriorhodopsin in the mid-infrared: Consequence on the determination of a α -helix orientation. *Appl. Spectrosc.* 53, 1299-1304

Block, M. R., Zaccai, G., Lauquin, G. J.-M., and Vignais, P. V. (1982) Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 471-477

Block, M. R., Lauquin, G. J.-M., Vignais, P. V. (1983) Use of 3'-O-naphthoyladenine 5'-diphosphate to probe distinct conformational states of membrane-bound adenosine 5'-diphosphate / adenosine 5'-triphosphate carrier. *Biochemistry* 22, 2202-2208

Bogner, W., Aquila, H., and Klingenberg, M. (1986) The transmembrane arrangement of the ADP/ATP carrier as elucidated by the lysine reagent pyridoxal 5-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 161, 611-602

Boncheva, M., and Vogel, H. (1997) Formation of stable polypeptide monolayers at interfaces: Controlling molecular conformation and orientation. *Biophys. J.* 73, 1056-1072

Brandolin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Vignais, P. V., and Lauquin, G. J.-M. (1993a) Biochemical characterisation of the isolated Anc2 adenine nucleotide carrier from *Saccharomyces Cerevisiae* mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 143-150

Brandolin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. and Vignais, P. V. (1993b) Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 459-472

Brochon, J.-C. (1994). Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. *Methods Enzymol.* 240, 262-311

Buslov, D. K., and Nikonenko, N. A. (1997) Regularized method of spectral curve deconvolution. *Appl. Spectrosc.* 51, 666-672

Buslov, D. K., and Nikonenko, N. A. (1998) *A priori* estimation of the parameters of the method of spectral curve deconvolution. *Appl. Spectrosc.* 52, 613-620

Byler, M., and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487

C

Cabiaux, V., Oberg, K. A., Pancoska, P., Walz, T., Agre, P., and Engel, A. (1997a) Secondary structures comparison of aquaporin-1 and bacteriorhodopsin: a Fourier transform infrared spectroscopy study of two-dimensional membrane crystals. *Biophys. J.* 73, 406-417

Cabiaux, V., Buckley, J. T., Wattiez, R., Ruyschaert, J.-M., Parker, M. W., and van der Goot, F. (1997b) Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry* 36, 15224-15232.

Cameron, D. G., and Moffatt, D. J. (1984) Deconvolution, derivation, and smoothing of spectra using Fourier transforms. *J. Test. Eval.* 12, 78-85

Carpenter, J. F., and Crowe, J. H. (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28, 3916-3922

Carter III, R. O., Lindsay, N. E., and Beduhn, D. (1990) A solution to baseline uncertainty due to MCT detector nonlinearity in FT-IR. *Appl. Spectrosc.* 44, 1147-1151

Chirgadze Yu.N., Fedorov O.V., and Trushina N.P. (1975). Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* 14, 679-694

Chirgadze, Yu, N., Brazhnikov, E. V., and Nevskaya, N. A. (1976) Intramolecular distortion of the α -helical structure of polypeptides. *J. Mol. Biol.* 102, 781-792

Citra, M. J., and Axelsen, P. H. (1996) Determination of molecular order in supported lipid membranes by internal reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 71, 1796-1805

Cladera, J., Sabés, M., and Padrós, E. (1992) Fourier transform infrared analysis of bacteriorhodopsin secondary structure. *Biochemistry* 31, 12363-12368

Clarke, J., and Itzhaki, L. S. (1998) Hydrogen exchange and protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 112-118

Coates, J. (1998) Vibrational spectroscopy: Instrumentation for infrared and Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* 33, 267-425

Cornwell, T. J., and Evans, K. F. (1985) A simple maximum entropy deconvolution algorithm. *Astron. Astrophys.* 143, 77-83

Craig, I. J. D., and Brown, J. C. (1986) Inverse problems in astronomy. A guide to inversion strategies for remotely sensed data. (Hilger A., Ed), Adam Hilger Ltd, Bristol. Chap. 6

D

Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J., and Vignais, P. V. (1988) Mapping of the nucleotide-binding sites in the ADP/ATP carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[α -³²P]adenosine diphosphate. *Biochemistry* 27, 5141-5149

Daum, G., Bohni, P. C., and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13028-13033

REFERENCIAS

Dave, N., Troullier, A., Mus-Veteau, I., Duñach, M., Lablanc, G., and Padrós, E. (2000) Secondary structure components and properties of the melibiose permease from *Escherichia coli*: A Fourier transform infrared spectroscopy analysis. *Biophys. J.* 79, 747-755

Dave, N., Lórenz-Fonfría, V. A., Villaverde, J., Lemonnier, R., Leblanc, G., and Padrós, E. (2002) Study of amide-proton exchange of *Escherichia coli* melibiose permease by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 277, 3380-3387

De Jongh, H. H. J., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J-M. (1996) The different molar absorptivities of the secondary structure types in the amide I region: An attenuated total reflection infrared study on globular proteins. *Anal. Biochem.* 242, 95-103

DeNoyer, L. K., and Dodd, J. G. (1991) Maximum likelihood deconvolution for spectroscopy and chromatography. *Am. Lab.* 23, D24

Dianaux, A.-C., Noel, F., Fiore, C., Trézéguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M., Lauquin, G. J.-M., and Brandolin, G. (2000) Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl- $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$. Identification of the binding segments by Mass spectrometry. *Biochemistry* 39, 11477-11487

Dong, A., Huang, P., and Caughey, W. S. (1990) Protein secondary structure in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29, 3303-3308

Dousseau, F., Therrien, M., and Pérolet, M. (1989) On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Appl. Spectrosc.* 43, 538-542

Dousseau, F., and Pérolet, M. (1990) Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry* 29, 8771-8779

Dress, M., and Beyer, K. (1988) Interaction of phospholipids with detergent-solubilized ADP / ATP carrier protein as studied by spin-label electron spin resonance. *Biochemistry* 27, 8584-8591

Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Fux, J. P., Sluse, F. E., and Liebecq, C. (1980) Kinetic mechanism of the exchanges catalysed by the adenine-nucleotide carrier. *Eur. J. Biochem.* 106, 1-6

Dwivedi, A. M., Krimm, S., and Malcolm, B. R. (1984) Vibrational analysis of peptides, polipeptides, and proteins. XVIII. Conformation of poly(α -aminoisobutyric acid). *Biopolymers* 23, 2025-2065

E

Ekgasit, S. (1998) Technique for an accurate estimation of the mean square electric field in ATR FT-IR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 52, 773-776

Ekgasit, S. (2000) ATR spectral intensity: What is the upper limit of a weak absorption? *Appl. Spectrosc.* 54, 756-758

Englader, S. W., Sosnick, T. R., Englader, J. J., and Mayne, L. (1996) Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 18-23

F

Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., and Naumann, D. (1994) Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 33, 10725-10730

Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Noel, F., Lauquin, G. J-M., Brandolin, G., and Vignais, P. V. (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: Structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* 80, 137-150

Fiore, C., Trézéguet, V., Roux, P., Le Saux, A., Noël, F., Schwimmer, C., Arlot, D., Dianoux, A-C., Lauquin, G. J-M., and Brandolin, G. (2000) Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: Influence of the conformational states of the C-terminal region. *Protein Express. Purif.* 19, 57-65

Forato, L. A., Bernardes-Filho, R., and Colnago, L. A. (1998) Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* 259, 136-141

Frauenfelder, H., and Gratton, E. (1986) Proteins dynamics and hydration. *Methods Enzymol.* 127, 207-216

Friesen, W. I., and Michaelian, K. H. (1991) Deconvolution and curve-fitting in the analysis of complex spectra: The CH stretching region in infrared spectra of coal. *Appl. Spectrosc.* 45, 50-56

Fringeli, U. P. (1992) *In situ* infrared attenuated total reflection (IR ATR) spectroscopy: a complementary analytical tool for drug design and drug delivery. *Chimia.* 46, 200-214

Fu, F.-N., DeOliveira, D. B., Trumble, W. R., Sarkar, H. K., and Singh, B. R. (1994) Secondary structure estimation of proteins using the amide III region of Fourier transform infrared spectroscopy: Application to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin. *Appl. Spectrosc.* 48, 1432-1441

G

Gácsér, J., and Sztraka, L. (1997) The advantage and limit of extension of the LOMEP line-narrowing method. *J. Mol. Struct.* 408/409, 517-520

García-García, J., Corbalán-García, S., and Gómez-Fernández, J. C. (1999) Effect of calcium and phosphatidic acid binding on the C2 domain of PKC α as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 38, 9667-9675

Gilbert, A. S. (1990) Data manipulation in spectroscopy. *In* Computed methods in UV, visible and IR spectroscopy. The Royal Society of Chemistry. Chap. 4, 37-52

Golonzka, O., Khalil, M., Demirdöven, N., and Tokmakoff, A. (2001) Vibrational anharmonicities revealed by coherent two-dimensional infrared spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 86, 2154-2157

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J-M. (1990) Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur. J. Biochem.* 193, 409-420

Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J. M. (1990) Polarized attenuated total reflection infrared spectroscopy as a tool to investigate the conformation and orientation of membrane components. *In*

REFERENCIAS

Molecular description of biological membranes by computer-aided conformational analysis (Brasseur, R., Ed.) Vol 1, pp 285-329, CRC Press Inc., Florida.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.-M. (1994c) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* 23, 329-362

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.-M. (1994a) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. *Subcell. Biochem.* 23, 363-403

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. and Ruyschaert, J.-M. (1994b) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.* 23, 405-450

Goormaghtigh, E., de Jongh, H. H. J., and Ruyschaert, J.-M. (1996) Relevance of protein thin films prepared for attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: Significance of the pH. *Appl. Spectrosc.* 50, 1519-1521

Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J.-M. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 105-185

Gray, C., Tatulian, S. A., Wharton, S. A., and Tamm, L. (1996) Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation, and interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.* 70, 2275-2286

Gregory, R. B., and Rosenbeng, A. (1986) Protein conformational dynamics measured by hydrogen isotope exchange techniques. *Methods Enzymol.* 131, 448-508

Griffiths, P. R. (1974) Interferometry in the seventies. *Anal. Chem.* 46, 645A-654A

Griffiths, P. R. (1983) Fourier transform infrared spectrometry. *Science* 222, 297-302

Griffiths, P. R., and de Haseth, J. A. (1986) Fourier transform infrared spectroscopy. John Wiley & Sons.

Griffiths, P. R., Pierce, J. A., y Hongjin, G. (1987) Curve fitting and Fourier self-deconvolution for the quantitative representation of complex spectra. *In* Computed-enhanced analytical spectroscopy. Plenum Press. Chap. 2, 29-54

Grimard, V., Vigano, C., Margolles, A., Wattiez, R., van Veen, H. W., Konings, W. N., Ruyschaert, J.-M., and Goormaghtigh, E. (2001) Structure and dynamics of the membrane-embedded domain of LmrA investigated by coupling polarized ATR-FTIR spectroscopy and $^1\text{H}/^2\text{H}$ exchange. *Biochemistry* 40, 11876-11886

Gropp, T., Brustovetsky, N., Klingenberg, M., Müller, V., Fendler, K., and Bamberg, E. (1999) Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys. J.* 77, 714-726

Gull, S. F., and Skilling, J. (1990) Quantified maximum entropy MemSys5 user's manual. Maximum Entropy Data Consultants Ltd.

H

Hackenberg, H., and Klingenberg, M. (1980) Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* 19, 548-555

- Hamm, P., Lim, M., DeGrados, W. F., and Hochstrasser, R. M. (1999) The two-dimensional IR nonlinear spectroscopy of a cyclic penta-peptide in relation to its three-dimensional structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2036-2041
- Hamm, P., Lim, M., DeGrados, W. F., and Hochstrasser, R. M. (2000) Pump/probe self heterodyned 2D spectroscopy of vibrational transitions of a small globular peptide. *J. Chem. Phys.* 112, 1907-1916
- Hancer, M., Sperline, R. P., and Miller, J. D. (2000) Anomalous dispersion effects in the IR-ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 54, 138-143
- Hansen, C. (2000) Numerical aspects of deconvolution. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 71 pages
- Hansen, C (2001) Regularization tools: A Matlab package for analysis and solution of discrete ill-posed problems. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 109 pages
- Hatanaka, T., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y., and Terada, H. (1999) Functional expression of the tandem-repeated homodimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 726-730
- Hauser, H., and Poupart, G. (1992) Lipid structure. In *The structure of biological membranes*. CRC Press. Chap. 1
- Heimburg, T., Esmann, M., and Marsh D. (1997) Characterization of the secondary structure and assembly of the transmembrane domains of the trypsinized Na,K-ATPase by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 272, 25685-25692.
- Hering, J. A., Innocent, P. R., and Haris, P. I. (2002) Automatic amide I frequency selection for rapid quantification of protein secondary structure from Fourier transform infrared spectra of proteins. *Proteomics* 2, 839-849
- Hoch, J. (1989) Modern spectrum analysis in nuclear magnetic resonance: Alternatives to the Fourier transform. *Methods Enzymol.* 176, 216-241
- Hollas, J. M. (1996) *Modern spectroscopy*. 3th Ed. John Wiley & Sons.
- Holloway, P. W., and Mantsch, H. H. (1989) Structure of cytochrome b_5 in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 28, 931-935
- Horlick, G., and Malmstadt, H. V. (1970) Basic and practical considerations for sampling and digitizing interferograms generated by a Fourier transform spectrometer. *Anal. Chem.* 42, 1361-1369
- Horváth, L., Drees, M., Beyer, K., Klingenberg, M., and Marsh, D. (1990) Lipid-protein interactions in ADP-ATP carrier / egg phosphatidylcholine recombinants studied by spin-label ESR spectroscopy. *Biochemistry* 29, 10664-10669
- Huang, S.-G., Odoy, S., and Klingenberg, M. (2001) Chimers of two fused ADP/ATP carrier monomers indicate a single channel for ADP/ATP transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 67-75
- Hübner, W., and Mantsch, H. H. (1991) Orientation of specifically $^{13}\text{C}=\text{O}$ labelled phosphatidylcholine multilayers from polarized attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. *Biophys. J.* 59, 1261-1272
- Hvidt, A., and Nielsen, S. O. (1966) Hydrogen exchange in proteins. *Advances in Protein Chemistry* 21, 287-386

J

Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1991) Protein secondary structure from FT-IR spectroscopy: correlation with dihedral angles from three-dimensional Ramachandran plots. *Can. J. Chem.* 69, 1639-1642

Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1992) Bio-analytical applications of Fourier transform infrared spectroscopy. *Trends in analytical chemistry.* 11, 206-210

Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95-120

Jackson, M., Haris, P. I., and Chapman, D. (1989) Fourier transform infrared spectroscopic studies of lipids, polypeptides and proteins. *J. Mol. Struct.* 214, 329-355

Jackson, R. S., y Griffiths, P. R. (1991) Comparison of Fourier self-deconvolution and maximum likelihood restoration for curve-fitting. *Anal. Chem.* 63, 2557-2563

Johnson, M. L., and Faunt, L. M. (1992) Parameters estimation by least-squares methods. *Methods Enzymol.* 117, 1-37.

K

Kabsch, W., and Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637

Kakalis, L. T., and Baianu, I. C. (1988) Oxygen-17 and deuterium nuclear magnetic relaxation studies of lysozyme hydration in solution: Field dispersion, concentration, pH / pD and protein activity dependences. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 829-841

Kauppinen, J. K., and Saarinen, P. E. (1994) True linear prediction by use of a theoretical impulse response. *J. Opt. Soc. Am. B.* 11, 1631-1638

Kauppinen, J. K., Moffat, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1981a) Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl. Spectrosc.* 35, 271-276

Kauppinen, J. K., Moffat, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1981b) Fourier transforms in the computation of self-deconvoluted and first-order derivative spectra of overlapped band contours. *Anal. Chem.* 53, 1454-1457

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Cameron D. G., and Mantsch H. H. (1981c) Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl. Opt.* 20, 1866-1879

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1982) Smoothing of spectral data in the Fourier domain. *Appl. Opt.* 21, 1866-1872

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Hollberg, M. R., and Mantsch, H. H. (1991a) A new line-narrowing procedure based on Fourier self-desconvolution, maximum entropy, and linear prediction. *Appl. Spectrosc.* 45, 411-416

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Hollberg, M. R., and Mantsch, H. H. (1991b) Characteristics of the LOMEP line-narrowing method. *Appl. Spectrosc.* 45, 1516-1521

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., and Mantsch, H. H. (1992) Nonlinearity of the maximum entropy method in resolution enhancement. *Can. J. Chem.* 70, 2887-2894

- Kauppinen, J. K., Saarinen, P. E., and Hollberg, M. R. (1994) Linear prediction in spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 324, 61-74
- Kawata, S., Minami, K., and Minami, S. (1983) Superresolution of Fourier transform spectroscopy data by the maximum entropy method. *Appl. Opt.* 22, 3593-3598
- Kleffel, B., Garavito, R. M., Baumeister, W., and Rosenbusch, J. P. (1985) Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *E. coli* outer membranes. *EMBO J.* 4, 1589-1592
- Klingenberg, M. (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 1-14
- Klingenberg, M., and Nelson, D. R. (1994) Structure-function relationships of the ADP / ATP carrier. *Biochem. Biophys. Acta* 1187, 241-244
- Krämer, R., and Palmieri, F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 974, 1-23
- Krimm, S. and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 3, 181-364
- Kumosinski, T. F., and Unruh, J. J. (1996) Quantitation of the global secondary structure of globular proteins by FTIR spectroscopy: comparison with X-ray crystallographic structure. *Talanta.* 43, 199-219

L

- Lambert, O., Levy, D., Ranck, J.-L., Leblanc, G., and Rigaud, J.-L. (1998) A new "gel-like" phase in docecyl maltoside-lipid mixtures: Implications in solubilization and reconstitution studies. *Biophys. J.* 74, 918-930
- Lavialle, F., Adams, R. G., and Levin, I. W. (1982) Infrared spectroscopic study of the secondary structure of melittin in water, 2-chloroethanol, and phospholipid bilayer dispersions. *Biochemistry* 21, 2305-2312
- Lee, D. C., Haris, P. I., Chapman, D., and Mitchell, R. C. (1990) Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra. *Biochemistry* 29, 9185-9193
- Lee, H.-N., and Marshall, A. G. (2000) Theoretical maximal precision for mass-to-charge ratio, amplitude, and width measurements in ion-counting mass analyzers. *Anal. Chem.* 72, 2256-2260
- Le Besnerais, G., Bercher, J.-F., and Demoment, G. (1994) A new look at the entropy for solving linear inverse problems. Scientific Literature Digital Library. <http://citeseer.nj.nec.com>
- Levitt, M., and Greer, J. (1977) Automatic identification of secondary structure in globular proteins. *J. Mol. Struct.* 114, 181-293
- Lewis, R. N. A. H., and McElhaney, R. N. (1996) Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. *In* Infrared spectroscopy of biomolecules. Wiley-Liss. Chap. 7, 159-202
- Liang, Z., and Marshall A. G. (1990) Time-domain (interferogram) and frequency-domain (absorption-mode and magnitude-mode) noise and precision in Fourier transform spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 44, 766-775.

REFERENCIAS

Lórenz, V. A., Villaverde, J., Trézéguet, V., Lauquin, G. J-M., Brandolin, G., and Padrós, E. (2001) The secondary structure of the inhibited mitochondrial ADP/ATP transporter from yeast analyzed by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 40, 8821-8833.

Lórenz-Fonfría, V. A., Villaverde, J., Trézéguet, V., Lauquin, G. J-M., Brandolin, G., and Padrós, E. (2003) Structural and functional implications of the instability of the ADP/ATP transporter from mitochondria during purification as revealed by FTIR spectroscopy. *Biophys. J.* in press

Ludlam, C. F. C., Arkin, I. T., Liu, X.-M., Rothman, M. S., Rath, P., Aimoto, S., Smith, S. O., Engelman, D. M., and Rothschild, K. J. (1996) Fourier transform infrared spectroscopy and site-direct isotope labeling as a probe of local secondary structure in the transmembrane domain of phospholamban. *Biophys. J.* 70, 1728-1736

Luo, S., Huang, C.-Y. F., McClelland, J. F., and Graves, D. J. (1994) A study of protein secondary structure by Fourier transform infrared/photoacoustic spectroscopy and its application for recombinant proteins. *Anal. Biochem.* 216, 67-76

M

Maddams, W. F. (1980) The scope and limitations of curve fitting. *Appl. Spectrosc.* 34, 245-266

Mantsch, H. H., Moffatt, D. J., and Casal, H. (1988) Fourier transform methods for spectral resolution enhancement. *J. Mol. Struct.* 173, 285-298

Marsh, D. (1999) Quantitation of secondary structure in ATR infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 77, 2630-2637

Marsh, D., Müller, M., and Schmitt, F.-J. (2000) Orientation of the infrared transition moments for an α -helix. *Biophys. J.* 78, 2499-2510

Marsh, D., and Páli, T. (2001) Infrared dichroism from the X-Ray structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 80, 305-312

Marshall, A. G., and Verdun, F. R. (1990) Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry: A user's handbook. Elsevier.

Mayingner, P., Winkler, E., and Klingenberg, M. (1989) The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett.* 244, 412-426

Miller, F. A. (1992) Reminiscences of pioneers and early commercial IR instruments. *Anal. Chem.* 64, 824A-831A

Minami, K., Kawata, S., and Minami, S. (1985) Superresolution of Fourier transform spectra by autoregressive model fitting with singular value decomposition. *Appl. Opt.* 24, 162-167

Mitchell, D. C., and Litman, B. J. (1998) Molecular order and dynamics in bilayers consisting of highly polyunsaturated phospholipids. *Biophys. J.* 74, 879-891

Moffat, D. J., and Mantsch, H. H. (1992) Fourier resolution enhancement of infrared spectra data. *Methods Enzymol.* 210, 192-200

Müller, V., Basset, G., Nelson, D. R., Klingenberg, M. (1996) Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on oxidative phosphorylation and AAC expression. *Biochemistry* 35, 16132-16143

Mylers, A. B. (1998) Molecular electronic spectral broadening in liquids and glasses. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 49, 267-295

Mylers, C. W. M., and Cooper, S. L. (1994) Analysis of some errors in the calculation of orientation functions for polymers from infrared dichroism measurements. *Appl. Spectrosc.* 48, 72-78

N

Nakamoto, K. (1997) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Part A: Theory and applications in inorganic chemistry. 5th Ed. John Wiley & Sons.

Narayan, R., and Nityananda, R. (1986). Maximum entropy image restoration in astronomy. *Annual Reviews in Astronomy and Astrophysics* 24, 127-170

Nevskaya, N. A., and Chirgadze, Yu. N. (1976) Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of a α -helix. *Biopolymers* 15, 637-648

O

Owrutsky, J. C., Raftery, D., and Hochstrasser, R. M. (1994) Vibrational relaxation dynamics in solutions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 45, 519-555

Oxtoby, D. W. (1981) Vibrational relaxation in liquids. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 32, 77-101

P

Palmö, K., Mannfors, B., and Pietilä, L.-O. (1988) A comparison of methods for decomposing overlapping bands in Raman spectra. *J. Mol. Struct.* 174, 101-106

Patzlaff, J. S., Moeller, J. A., Barry, B. A., and Brooker, R. J. (1998) Fourier transform infrared analysis of purified lactose permease: A monodisperse lactose permease preparation is stably folded, α -helical, and highly accessible to deuterium exchange. *Biochemistry* 37, 15363-15375

Pelton, J. T., and McLean, L. R. (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* 277, 167-176

Penny, J., and Lindfield, G. (1995) Numerical methods using Matlab. Ellis Horwood Ltd.

Picard, F., Buffeteau, T., Desbat, B., Auger, M., and Pérolet, M. (1999) Quantitative orientation measurements in thin films by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 76, 539-551

Pierce, J. A., Jackson, R. S., Van Every, K. W., and Griffiths, P. R. (1990) Combined deconvolution and curve fitting for quantitative analysis of unresolved spectral bands. *Anal. Chem.* 62, 477-484

Poole, P. L., and Finney, J. L. (1984) Sequential hydration of dry proteins: A direct difference IR investigation of sequence homologs lysozyme and α -lactalbumin. *Biopolymers* 23, 1647-1666

Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992) Numerical recipes in C: The art of scientific computing. 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge-New York-Melbourne.

Prestrelski, S. J., Byler, D. M., and Thompson, M. P. (1991a) Infrared spectroscopic discrimination between α - and 3_{10} -helices in globular proteins. *Int. J. Peptide Protein Res.* 37, 508-512

REFERENCIAS

Prestrelski, S. J., Byler, D. M., and Liebman, M. N. (1991b) Comparison of various molecular forms of bovine trypsin: correlation of infrared spectra with X-ray crystal structures. *Biochemistry* 30, 133-143

Provencher, S. W. (1982). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*. 27, 213-227

R

Rahmelow, K., and Hübner, W. (1996a) Fourier self-deconvolution: parameter determination and analytical band shapes. *Appl. Spectrosc.* 50, 795-804

Rahmelow, K., and Hübner, W. (1996b) Secondary structure determination of proteins in aqueous solution by infrared spectroscopy: A comparison of multivariate data analysis methods. *Anal. Biochem.* 241, 5-13

Rahmelow, K., and Hübner, W. (1997a) Infrared spectroscopy in aqueous solution: difficulties and accuracy of water subtraction. *Appl. Spectrosc.* 51, 160-170

Rahmelow, K. (1997b) Electronic influences on an infrared detector signal: nonlinearity and amplification. *Appl. Opt.* 36, 2123-2132

Rahmelow K., Hübner Wigand, and Ackermann T. (1998). Infrared absorbances of protein side chains. *Anal. Biochem.* 257, 1-11

Rosenberg, A. (1986) Use of hydrogen exchange kinetics in the study of the dynamic properties of biological membranes. *Methods Enzymol.* 131, 630-648

S

Saarinen, P. E. (1997) Spectral line narrowing by the use of the theoretical impulse response. *Appl. Spectrosc.* 51, 188-200

Saarinen, P. E., Kauppinen, J. K., and Partanen, J. O. (1995) New method for spectral line shape fitting and critique on the Voigt line shape model. *Appl. Spectrosc.* 49, 1438-1453

Sane, S. U., Cramer, S. M., and Przybycien, T. M. (1999) A holistic approach to protein secondary structure characterization using amide I band Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* 269, 255-272

Saraster, M., and Walker, J. E. (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in ADP/ATP translocase. *FEBS lett.* 144, 250-254

Sarver, R. W. Jr., and Krueger, W. C. (1991) Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: a data base analysis. *Anal. Biochem.* 194, 89-100

Sarver, R. W. Jr., and Krueger, W. C. (1993) Infrared investigation on the conformation of proteins deposited on polyethylene films. *Anal. Biochem.* 212, 519-525

Schinkel, J. E., Downer, N. W., and Rupley, J. A. (1985) Hydrogen exchange of lysozyme powders. Hydration dependence of internal motions. *Biochemistry* 24, 352-366

Schlame, M., Beyer, K., Hayer-Hartl, M., Klingenberg, M. (1991) Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids: Is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP / ATP carrier? *Eur. J. Biochem.* 199, 459-466

- Severcan, M., Severcan, M., and Haris, P. I. (2001) Estimation of protein secondary structure from FTIR spectra using neural networks. *J. Mol. Struct.* 565-566, 383-387
- Shao, L., Lin, X., and Shao, X. (2002) A wavelet transform and its application to spectroscopic analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.* 37, 429-450
- Shao, X., Gu, H., Wu, J., and Shi, Y. (2000) Resolution of the NMR spectrum using wavelet transform. *Appl. Spectrosc.* 54, 731-738
- Sibisi, S. (1983) Two-dimensional reconstructions from one-dimensional data by maximum entropy. *Nature* 301, 134-136
- Sibisi, S., Skilling, J., Brereton, R. G., Laue, E. D., and Staunton, J. (1984) Maximum entropy signal processing in practical NMR spectroscopy. *Nature* 311, 446-447
- Sievänen, O.-P. (1997) Estimating optimum filter length in linear prediction. *Appl. Spectrosc.* 51, 718-720
- Sievänen, O.-P. (1999) Resolution enhancement of Raman spectra of solids using true linear prediction and deconvolution. *Appl. Spectrosc.* 53, 144-149
- Skilling, J., and Gull, S. F. (1985) Algorithms and applications. In *Maximum-entropy and Bayesian methods in inverse problems*. D. Reidel Publishing Company. pages 83-132
- Smeller, L., Goossens, K., and Heremans, K. (1995) How to minimize certain artifacts in Fourier self-deconvolution. *Appl. Spectrosc.* 49, 1538-1542
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goake, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- Sperline, R. P. (1991) Analytical accuracy in unpolarized ATR spectroscopy: Effects of the spectrometer polarization ratio. *Appl. Spectrosc.* 45, 677-681
- Straume, M., and Johnson, M.L. (1992) Monte Carlo method for determining complete confidence probability distributions of estimated model parameters. *Methods Enzymol.* 210, 119-129
- Surewicz, W. K., and Mantsch, H. H. (1988) New insight into protein secondary from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 115-130
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., and Chapman, D. (1993) Determination of protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394
- Susi, H., and Byler, D. M. (1986) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.* 130, 290-311

T

- Tamm, L. K. and Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 30, 365-429
- Tatulian, S. A., Biltonen, R., and Tamm, L. K. (1997) Structural changes in a secretory phospholipase A₂ induces by membrane binding: A clue to interfacial activation? *J. Mol. Biol.* 268, 809-815
- Toniolo, C., and Benedetti, E. (1991) The polypeptide 3₁₀-helix. *TIBS.* 16, 350-353
- Torres, J., Sepulcre, F., and Padrós, E. (1995) Conformational changes in bacteriorhodopsin associated with protein – protein interactions: A functional α_1 - α_{II} switch? *Biochemistry* 34, 16320-16326

Trézéguet, V., Le Saux, A., David, C., Gourder, C., Fiore, C., Dianoux, A.-C., Brandolin, G., and Lauquin, G. J.-M. (2000) A covalent tandem dimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier is functional in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 81-93

V

Venyaminov, S.Y., and Kalnin, N.N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* 30, 1243-1257.

Venyaminov, S. Yu., and Prendergast, F. G. (1997) Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Anal. Biochem.* 248, 234-245

Villalaín, J., Gómez-Fernández, J. C., Jackson, M., and Champman, D. (1989) Fourier transform infrared spectroscopic studies on the secondary structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Acta* 978, 305-312

W

Walker J.E. (1992) The Mitochondrial Transporter Family. *Current Opinion in Structural Biology* 2, 519-526.

Wilder, C. L., Friedrich, A. D., Potts, R. O., Daumy, G., O., and Francoeur, M. L. (1992) Secondary structural analysis of two recombinant murine proteins, interleukins 1 α and 1 β : is infrared spectroscopy sufficient to assign structure? *Biochemistry* 31,27-31

Wilks, P. A. Jr. (1992) The evolution of commercial IR spectrometers and the people who made it happen. *Anal. Chem.* 64, 833A-838A

Williams, D. J., and Hall, K. B. (2000) Monte Carlo applications to thermal and chemical denaturation experiments of nucleic acids and proteins. *Methods Enzymol.* 321, 330-352

Williams, R. (1995) Spectroscopy and the Fourier transform: An interactive tutorial. VCH.

Z

Zhang, X. Q., Zheng, J. B., and Gao, H. (2000) Comparison of wavelet transform and Fourier self-deconvolution (FSD) and wavelet FSD for curve fitting. *The Analyst.* 125, 915-919

Zhang, Y.-P., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (1992) Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane α -helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: Differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies. *Biochemistry* 31, 11579-11588

Zhang, Z. M., Zhu, C. J., and Hanssen, L. M. (1997) Absolute detector calibration applied to nonlinearity error correction in FT-IR measurements. *Appl. Spectrosc.* 51, 576-579

apéndices

1. Teoría de la inversión de integrales e inferencias

1.1. Introducción.

La ciencia se basa en gran medida en el concepto de la inferencia, pues las propiedades medibles son limitadas y muchas veces no se corresponden con las propiedades que contienen información para el científico.

Por ejemplo, las constantes de intercambio H/D del hidrógeno amida de una proteína son datos estrechamente relacionados con sus propiedades dinámicas y termodinámicas, y por tanto su medida puede resultar interesante. Sin embargo, no existe ningún experimento para obtener directamente esta información. Nos hemos conformado con una propiedad medible relacionada de manera conocida con las constantes de intercambio. Ésta puede ser, por ejemplo, la variación del porcentaje de hidrógenos amida con el tiempo tras una sustitución del agua del medio por agua deuterada.

En otras ocasiones la propiedad que nos interesa es medible, pero por razones prácticas o disponibilidad técnica, nos es más conveniente medir una propiedad relacionada. Este es el caso en IR-TF, donde se prefiere medir el interferograma del haz que atraviesa a la muestra en función de la distancia, en vez de la energía del haz en función de la frecuencia, aunque ésta es la información que deseamos.

1.2. Inversión de integrales

1.2.1. Forma integral del operador y el problema de su inversión

La mayor parte de los experimentos científicos son indirectos, pues el vector de datos medidos experimentalmente, \mathbf{y} , están relacionados con el vector de la información deseada, \mathbf{x} , mediante un operador O ,

$$\mathbf{y} = O(\mathbf{x}) \quad (1.1)$$

Esta ecuación se puede expresar de forma integral, sustituyendo vectores por funciones, y donde el operador es una integral del tipo,

$$g(t) = \int_a^b K(t,s, f(s)) ds \quad (1.2)$$

donde $g(t)$ es la función conocida, $f(s)$ es la función no conocida y K es el kernel. Para el caso en que el operador es lineal, es decir

$$\mathbf{y}_1 + \mathbf{y}_2 = O(\mathbf{x}_1) + O(\mathbf{x}_2) = O(\mathbf{x}_1 + \mathbf{x}_2) \quad (1.3)$$

la ecuación 1.2 se reduce a:

$$g(t) = \int_a^b K(t, s) f(s) ds \quad (1.4)$$

que es una integral Fredholm del primer tipo.

Nos interesan especialmente tres tipos de kernel:

$$\begin{aligned} (a) \quad K(t, s) &= \exp(i2\pi st) = \cos(2\pi st) + i \operatorname{sen}(2\pi st) \\ (b) \quad K(t, s) &= \exp(-st) \\ (c) \quad K(t, s) &= K(t-s) \end{aligned} \quad (1.5)$$

El kernel (a) corresponde a la transformada de Fourier, el kernel (b) a la transformada de Laplace, y el kernel (c) a la convolución. La convolución que más nos interesa es la de una banda Lorentziana de anchura γ , con un kernel dado por:

$$K(t-s) = \frac{2\gamma}{\pi(\gamma^2 + 4(t-s)^2)} \quad (1.6)$$

Es importante entender la función del kernel, pues la ecuación 1.4 puede resultar demasiado abstracta. Esta función es el mapeo la función $f(s)$ en $g(t)$. La naturaleza de este mapeo se puede comprender mejor considerando una $f(s) = \delta(s-s_0)$, es decir nula excepto con valor de uno cuando $s = s_0$. Es ese caso,

$$g(t) = K(t, s_0) \quad (1.7)$$

Por lo tanto, la transformada de Fourier mapea los puntos en s como sinusoides en t y la transformada de Laplace lo hace como exponenciales decrecientes. La convolución de una Lorentziana convierte cada punto en s en una Lorentziana con posición s .

Para obtener un kernel inverso aplicable a datos numéricos, es necesario que el kernel no sea integrable. Cuando el kernel es integrable existen perturbaciones arbitrariamente grandes en $f(s)$ que producen un cambio arbitrariamente pequeño en $g(s)$. Por lo tanto, la transformación de $g(s)$ a $f(s)$ no será posible si $g(s)$ no se conoce analíticamente.

Para los tres tipos de kernel mostrados en la expresión 1.5, sólo el kernel (a) no es integrable. Por ello, sólo existe una transformada inversa, aplicable a datos numéricos, para la transformada de Fourier.

Los siguientes puntos están centrados en la obtención, o mejor dicho, en la estimación de $f(s)$ a partir de valores numéricos de $g(t)$ para kernels integrables.

1.2.2. Forma matricial del operador y el problema de su inversión

Cuando $g(t)$ es conocido experimentalmente para N valores de t , obtenemos N ecuaciones con M incógnitas, donde M es el número de valores que deseamos conocer de $f(s)$. Es más conveniente expresar el problema en forma matricial:

$$\mathbf{y} = \mathbf{A}\hat{\mathbf{x}} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (1.8)$$

donde \mathbf{y} y $\hat{\mathbf{x}}$ son el vector conocido y el buscado, respectivamente, \mathbf{A} es una matriz $N \times M$ construida a partir del kernel que transforma $f(s)$ en $g(t)$. Como novedad, se ha incluido la presencia de errores, $\boldsymbol{\varepsilon}$, en la

medida de \mathbf{y} , que naturalmente no son conocidos. La solución formal, \mathbf{x} , se obtiene para el caso que M es igual a N como:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}^{-1}\mathbf{y} = \hat{\mathbf{x}} + \mathbf{A}^{-1}\boldsymbol{\varepsilon} \quad (1.9)$$

La matriz \mathbf{A} es generalmente singular o casi singular, y por lo tanto su inversa puede no existir o ser difícil de obtener de manera precisa. La presencia de errores en \mathbf{y} perturbará la solución, de manera que:

$$\frac{\|\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{x}\|}{\|\hat{\mathbf{x}}\|} \leq \|\mathbf{A}\|\|\mathbf{A}^{-1}\| \frac{\|\boldsymbol{\varepsilon}\|}{\|\mathbf{y} - \boldsymbol{\varepsilon}\|} \quad (1.10)$$

El factor $\|\mathbf{A}\| \times \|\mathbf{A}^{-1}\|$ es el factor de magnificación de la perturbación relativa de los datos en la perturbación relativa de la solución. Se le conoce como el número de condición de la matriz, y es un número muy grande para matrices casi singulares e infinito para singulares.

Tomemos un ejemplo basado en la transformada de Laplace, donde \mathbf{y} es conocido para $t = 0$ y desde $t = 1$ a $t = 1000$ a valores espaciados logarítmicamente, tal que $N = 500$. Queremos obtener \mathbf{x} para valores espaciados logarítmicamente entre $s = 1$ y $s = 0,001$, tal que $M = 500$, y $\hat{\mathbf{x}}$ (la solución correcta) es una δ de Dirac con posición $s_0 = 0,01$. El condicionamiento de la matriz \mathbf{A} resultante del problema es de 5×10^{21} . Para este ejemplo, la perturbación de la solución $\hat{\mathbf{x}}$ es 1×10^{19} veces mayor que la perturbación de los datos \mathbf{y} . Por otro lado en la transformada directa e inversa de Fourier el condicionamiento es siempre 1, y el ruido se mantiene entre las transformaciones.

Una manera de aumentar el condicionamiento de \mathbf{A} es reducir su número de columnas (M) de tal manera que el sistema esté sobredeterminado. Además al reducir el número de columnas estas reducen su dependencia lineal. La solución por mínimos cuadrados es,

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{y} = \hat{\mathbf{x}} + (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \boldsymbol{\varepsilon} \quad (1.11)$$

donde $\hat{\mathbf{x}}$ es la solución en ausencia de errores y \mathbf{x} en su presencia.

La relación entre la perturbación de los datos no se puede obtener como anteriormente, al no ser \mathbf{A} una matriz cuadrada. De manera aproximada podemos esperar que:

$$\frac{\|\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{x}\|}{\|\mathbf{x}\|} \approx \|(\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1}\| \frac{\|\boldsymbol{\varepsilon}\|}{\|\mathbf{y} - \boldsymbol{\varepsilon}\|} \quad (1.12)$$

Tomemos de nuevo la transformada de Laplace, pero ahora $M = 20$. La magnificación del ruido predicha es de 6×10^6 , mientras que la obtenida para el caso descrito anteriormente fue de 7×10^6 . Si reducimos M a 10, la magnificación predicha es sólo de 30 (la obtenida de 20) aunque el detalle de la solución es muy pobre, al contar con sólo 10 puntos.

La sensibilidad al ruido puede reducirse restringiendo la solución a un dominio. Por ejemplo, en algunos casos es de esperar una solución positiva. En este caso la solución es:

$$\begin{aligned} \text{mínimo de } & \|\mathbf{Ax} - \mathbf{y}\|^2 = (\mathbf{Ax} - \mathbf{y})^T (\mathbf{Ax} - \mathbf{y}) \\ \text{para } & \mathbf{x} \geq \mathbf{0} \end{aligned} \quad (1.13)$$

Aun así, \mathbf{x} ha de contener un número bajo de puntos para obtener una solución estable, con lo que ésta resulta muy poco detallada.

1.2.3. ¿Por qué las soluciones clásicas no funcionan? Una visión geométrica de la inversión

Consideremos la función χ^2 , que viene determinada por,

$$\chi^2(\mathbf{x}) = \frac{1}{\sigma^2} \|\mathbf{Ax} - \mathbf{y}\|^2 \quad (1.14)$$

donde σ es la desviación estándar de los errores en \mathbf{y} . La función χ^2 es una función de M variables, y que está relacionada con la probabilidad de los datos experimentales para una solución \mathbf{x} (en el punto 1.3.1 y 2.2 se explica con mayor detalle este hecho). La solución \mathbf{x} más probable es aquella que genera una menor χ^2 , es decir la solución por mínimos cuadrados. Como hemos visto, esta solución no es adecuada. Esto se debe a que la solución correcta muestra la siguiente característica

$$\chi^2(\hat{\mathbf{x}}) = \frac{1}{\sigma^2} \|\mathbf{A}\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{y}\|^2 = N \pm \sqrt{2N} \quad (1.15)$$

Es decir, la probabilidad de encontrar la solución real en función del valor de la χ^2 es máxima en N , aunque esta probabilidad dividida por el volumen correspondiente es máxima en el mínimo de la χ^2 . Esta diferencia no es generalmente un problema, pero para una matriz \mathbf{A} mal condicionada (o cuando los errores en \mathbf{y} son grandes) la solución real (situada en algún lugar de $\chi^2 \approx N$) puede llegar a estar a muchos ordenes de magnitud alejada del mínimo de la χ^2 .

Para ilustrar el problema consideremos el siguiente sistema lineal:

$$\mathbf{y} = \begin{pmatrix} 1 & 0,8 \\ 0,8 & 1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -0,69 \\ 0,86 \\ 1,25 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1,11 \\ 2,66 \\ 3,25 \end{pmatrix} \quad (1.16)$$

cuya solución es $\hat{\mathbf{x}} = (1 \ 1)$, y los datos experimentales incluyen errores normales de desviación estándar $\sigma = 1$. El número de condicionamiento de la matriz \mathbf{A} no es muy alto (de 11), pero como el error si lo es, $\|\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{x}\| / \|\hat{\mathbf{x}}\|$ será del orden de 5.

La solución por mínimos cuadrados es $\mathbf{x} = (-2,6 \ 5,14)$, bastante alejada de la solución real. Si incluimos la restricción de positividad la solución es $\mathbf{x} = (0 \ 2,57)$, disminuyendo algo el error en la solución.

La figura 1.1 muestra un mapa de contorno del $\log(\chi^2/N)$. La solución real se sitúa cerca de la línea de contorno situada a cero pues $\chi^2(\hat{\mathbf{x}})/N = 0,93$. La solución de mínimos cuadrados se sitúa en $\chi^2(\mathbf{x})/N = 0,28$. Como se observa, ambas soluciones se encuentran bastante separadas. Por lo tanto, el mínimo de χ^2 no es una buena elección como solución, sino que parece lógico elegir una solución que se

sitúe en $\chi^2/N \approx 1$. Desgraciadamente si el mínimo de la χ^2 es único (dimensión 0), la dimensión del problema $\chi^2/N = 1$ es de $M - 1$.

1.2.4. Solución mediante regularizadores

Hemos visto en el punto anterior que la solución real cumple que $\chi^2(\hat{\mathbf{x}})/N \approx 0,93$, luego una posible solución ha de cumplir esta condición. El problema se puede reducir a seleccionar una solución adecuada de entre aquellas que cumplan esta condición.

La presencia de errores en \mathbf{y} hace que, en los métodos clásicos de resolver un sistema lineal, la segunda norma de la solución \mathbf{x} , $\|\mathbf{x}\|$, sea mucho mayor que segunda norma de la solución real $\|\hat{\mathbf{x}}\|$. Por lo tanto, es lógico pensar que entre dos posibles soluciones que cumplan que $\chi^2/N \approx 1$ se elija aquella que tenga una segunda norma menor. Extendiendo este razonamiento, buscaremos la solución con mínima normal al cuadrado que cumpla que $\chi^2/N = 1$. Es decir,

$$\begin{aligned} &\text{mínimo de } \|\mathbf{x}\|^2 \\ &\text{para } \chi^2(\mathbf{x})/N = 1 \end{aligned} \tag{1.17}$$

Esta ecuación se puede representar en forma matricial como:

$$\text{mínimo de } (\mathbf{Ax} - \mathbf{y})^T (\mathbf{Ax} - \mathbf{y}) + \lambda \mathbf{x}^T \mathbf{x} \tag{1.18}$$

que para un valor adecuado del λ (llamado el parámetro de regularización) es equivalente a la ecuación 1.17. Sin embargo, esta formulación es más general, pues el parámetro λ puede elegirse para cumplir otras condiciones no basadas en χ^2 . La solución de la ecuación 1.18 se obtiene como:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A} + \lambda \mathbf{I})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{y} \tag{1.19}$$

donde \mathbf{I} es una matriz identidad $M \times M$. Aquí vemos la utilidad del regularizador, pues la matriz a ser invertida posee dos partes: Una mal condicionada, $\mathbf{A}^T \mathbf{A}$, que viene del kernel, y otra bien condicionada, $\lambda \mathbf{I}$ (la matrices diagonales están siempre bien condicionadas), correspondiente al regularizador. Este hecho produce que su suma este inmediatamente bien condicionada, aunque disminuyendo su condicionamiento a medida que λ disminuye. Además, la presencia del regularizador permite que M sea

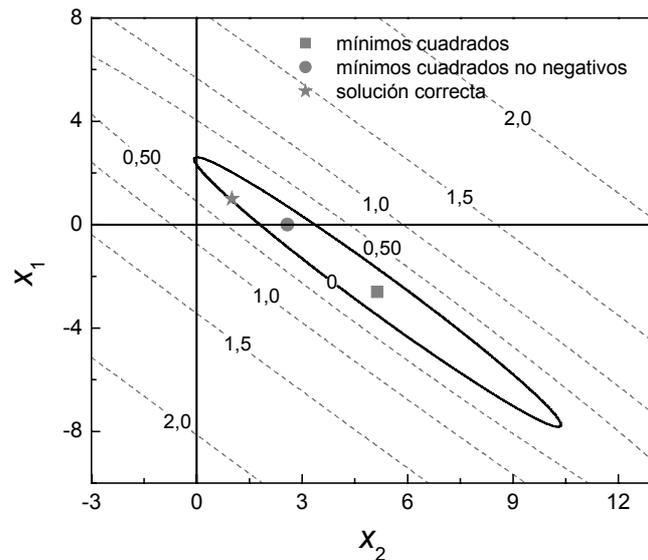


Figura 1.1. Logaritmo decimal de la función χ^2/N para el sistema lineal de la ecuación 1.16. Se ha marcado la solución correcta del sistema lineal, junto con la solución de mínimos cuadrados y de mínimos cuadrados no negativos.

tan grande como se desee sin afectar a la sensibilidad de la solución al ruido presente en los datos y , por lo que la solución puede ser lo suficientemente detallada. La relación entre la perturbación en la solución causada por errores en los datos será aproximadamente:

$$\frac{\|\hat{\mathbf{x}} - \mathbf{x}\|}{\|\hat{\mathbf{x}}\|} \approx \sqrt{\lambda^{-1}} \frac{\|\boldsymbol{\varepsilon}\|}{\|\mathbf{y}\|} \tag{1.20}$$

donde $\hat{\mathbf{x}}$ es la solución obtenida en ausencia de errores.

Para el ejemplo de la transformada de Laplace, visto anteriormente, para $M=100$, el factor de magnificación obtenido por la ecuación 1.20 será de 1, 10, 100 y 1000 cuando λ es 1, 0,01, 10^{-4} y 10^{-6} respectivamente. El obtenido experimentalmente fue de 4, 15, 180 y 1300, en buena concordancia.

Se ha de tener en cuenta que la presencia del regularizador en sí mismo introduce un error, pues preconditiona la solución, en este caso hacia una menor norma. Este error, por su parte, se reduce al disminuir el parámetro de regularización. Cuando λ es igual a cero obtenemos la solución por mínimos cuadrados, mientras que si $1/\lambda$ es cero la solución valdrá cero (el mínimo de $\|\mathbf{x}\|^2$), independientemente del valor de los datos experimentales.

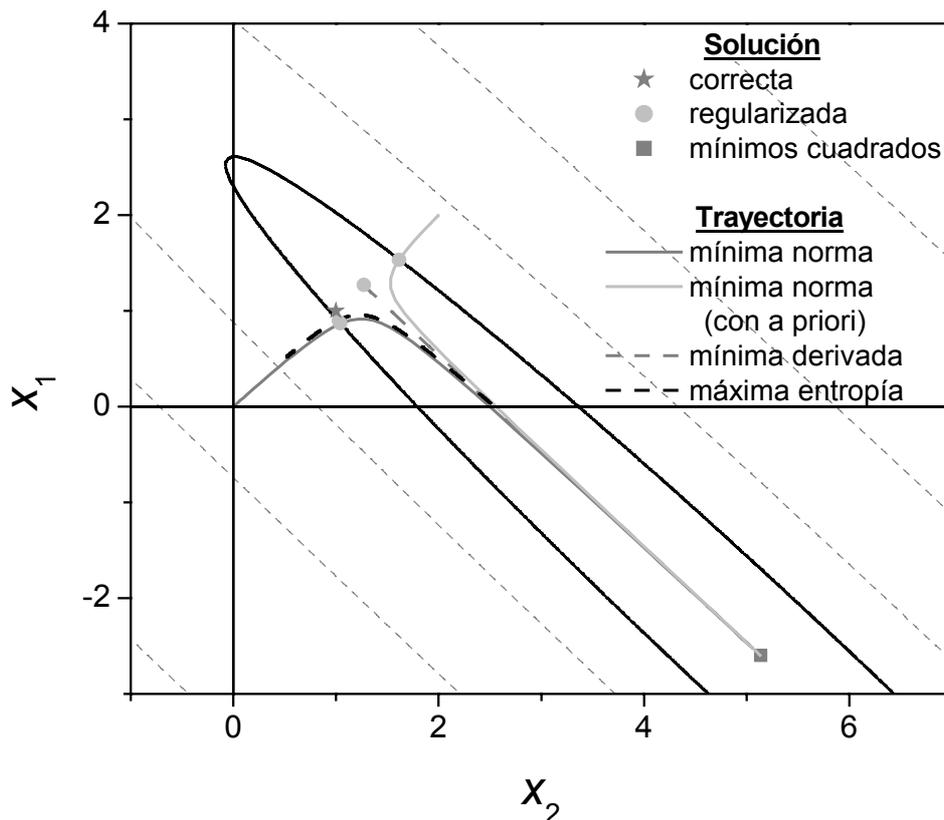


Figura 1.2. Logaritmo decimal de la función χ^2/N para el sistema lineal de la ecuación 1.16. Se ha marcado la solución correcta del sistema lineal, junto con la solución de mínimos cuadrados. Además, se han marcado las trayectorias de varias soluciones regularizadas.

Existe una solución bien definida para cada valor de λ , por lo tanto las posibles soluciones se pueden representar como una curva o trayectoria. Esto se muestra en la figura 1.2, donde se representan las soluciones para diferentes valores de λ . Se ha marcado el punto donde esta trayectoria corta la curva de $\chi^2(\mathbf{x})/N = 1$, y corresponde a $\mathbf{x} = (0,87 \ 1,04)$. Esta solución está próxima a la solución real.

Existen diferentes tipos de regularizadores lineales. Por ejemplo, en vez de minimizar $\|\mathbf{x}\|^2$ es posible minimizar $\|\mathbf{x}-\mathbf{m}\|^2$, donde \mathbf{m} es una solución que consideramos adecuada *a priori*. Es la solución que se obtendrá cuando $1/\lambda$ valga cero. Utilizando este tipo de regularización, la solución se obtendrá como:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A} + \lambda \mathbf{I})^{-1} (\mathbf{A}^T \mathbf{y} + \lambda \mathbf{m}) \quad (1.21)$$

Consideremos el problema anterior utilizando una solución a priori $\mathbf{m} = (2 \ 2)$. La curva con las soluciones se muestra en la figura 1.2. Se ha marcado la solución que cumple que $\chi^2(\mathbf{x})/N = 1$, la cual corresponde a $\mathbf{x} = (1,53 \ 1,62)$. Es evidente que el tipo de regularización afecta a la solución obtenida.

Los regularizadores anteriores se llaman de orden cero. Otro tipo de regularizadores minimiza el cuadrado de la segunda norma de la primera, segunda o superiores derivadas de la solución, y son llamados regularizadores de orden uno, dos, etc. La solución en este caso será, considerando errores en \mathbf{y} de desviación estándar no constante:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{C}^{-2} \mathbf{A} + \lambda \mathbf{B}_n^T \mathbf{B}_n)^{-1} (\mathbf{A}^T \mathbf{C}^{-2} \mathbf{y} + \lambda \mathbf{B}_n^T \mathbf{B}_n \mathbf{m}) \quad (1.22)$$

donde \mathbf{B}_n es una matriz $M \times (M-n)$ que al aplicarla sobre \mathbf{x} nos da su derivada n . Si n es uno, dos o tres, la solución es el vector más “cercano” a una constante, recta o curva cuadrática coherente con los datos experimentales. La matriz \mathbf{C} es una matriz diagonal que contiene las desviaciones estándares de los errores para todos los valores de \mathbf{y} . En la figura 1.2, se muestra la curva de las soluciones regularizadas para un regularizador de orden 1. No hay ninguna solución que cumpla que $\chi^2(\mathbf{x})/N = 1$. La solución más cercana es $\mathbf{x} = (1,27 \ 1,27)$, con $\chi^2(\mathbf{x})/N = 0,68$.

En el caso que sea adecuado, la solución \mathbf{x} puede restringirse a ciertos valores, por ejemplo a valores positivos. Para tal caso conviene volver a expresar el problema, para tal de poder utilizar las herramientas de mínimos cuadrados. Por ejemplo, para el caso del regularizador de orden cero con solución a priori \mathbf{m} , la solución se obtendrá por mínimos cuadrados no negativos:

$$\text{mínimo de } \left\| \begin{pmatrix} \mathbf{A} \\ \lambda \mathbf{I} \end{pmatrix} \mathbf{x} - \begin{pmatrix} \mathbf{y} \\ \lambda \mathbf{m} \end{pmatrix} \right\|^2 \text{ para } \mathbf{x} \geq \mathbf{0} \quad (1.23)$$

Hasta ahora la elección del regularizador se ha basado en nuestro conocimiento o estimación de los errores en los datos. En algunos casos, este método puede no ser adecuado por dos razones: 1) Carecemos de una buena estimación de los errores (en algunos casos necesita ser extremadamente buena). 2) La solución regularizada no corresponde a un residual de desviación estándar constante.

Este segundo caso se puede comprender de la siguiente manera: la solución correcta ha de dar un residual que sea exactamente igual al ruido presente en los datos. Este ruido muestra una cierta desviación

estándar, tanto global como local. La solución regularizada, al fijarse sólo en alcanzar una desviación estándar global puede presentar unas desviaciones estándares locales muy diferentes a las esperables, lo que lleva a que en ciertas zonas la solución este describiendo ruido y en otras la solución esté dejando de describir datos reales. Por ello, a continuación presentaremos algunos modos de determinar el parámetro de regularización sin ninguna referencia al error contenido en los datos.

A. La curva L

Se basa en la representación del logaritmo de la segunda norma de la regularización respecta al logaritmo de la segunda norma del residual, es decir, $\log\|\mathbf{B}\mathbf{x}\|$ respecto a $\log\|\mathbf{A}\mathbf{x}-\mathbf{y}\|$ para diferentes soluciones \mathbf{x} obtenidas con diferentes valores del parámetro de regularización λ . Cuando λ es menor de lo que debería ser la norma del regularizador es muy grande y la del residual muy pequeño. Si aumentamos λ la norma del regularizador disminuirá rápidamente pero la del residual aumentará poco hasta que lleguemos a la λ adecuada. Una vez alcanzado este punto si continuamos aumentando λ el residual aumentará rápidamente, mientras que la norma del regularizador disminuirá lentamente. La representación log-log nos dará algo parecido a una L. La parte con una gran pendiente es la parte donde el error en \mathbf{x} está dominado por el error en los datos, mientras que la zona con pendiente casi nula el error de \mathbf{x} está dominado por el regularizador. El valor óptimo de \mathbf{x} será aquel en que ambos errores sean semejantes, coincidiendo con el punto de mayor curvatura de la curva L.

B. Criterio casi-óptimo

El regularizador óptimo es aquel que minimiza la función Q , dada por:

$$Q \equiv \lambda \left\| \frac{\partial \mathbf{x}}{\partial \lambda} \right\| \tag{1.24}$$

Buscando el mínimo de esta función determinamos el valor del regularizador óptimo, y por lo tanto la solución regularizada óptima.

1.3. Las inferencias y el cálculo Bayesiano de probabilidades.

1.3.1. Introducción

El cálculo Bayesiano es un lenguaje para asignar probabilidades. Así, a cada proposición P se le asigna una probabilidad, dada por $\Pr(P)$. Las reglas generales para tratar con las probabilidades son:

$$\begin{aligned} \Pr(P, Q) &= \Pr(P)\Pr(Q|P) \\ \Pr(P) + \Pr(\bar{P}) &= 1 \end{aligned} \tag{1.25}$$

donde ‘,’ significa ‘y’, ‘|’ significa ‘dado’, y ‘ $\bar{}$ ’ significa ‘no’. Todas las probabilidades se encuentran entre 0 y 1, correspondientes a las afirmaciones ‘falso’ y ‘verdadero’.

En ciencia, muchas veces estamos interesados en usar nuestros datos experimentales D para hacer inferencias sobre diversas hipótesis A, B, C , etc. En particular estamos interesados en obtener las

probabilidades de las diferentes hipótesis de acuerdo a los datos, esto es, en obtener $\Pr(A|D)$, $\Pr(B|D)$, $\Pr(C|D)$. Determinado estas probabilidades podemos elegir la hipótesis con mayor probabilidad.

Usemos h para representar cualquier hipótesis, de tal manera que $\Pr(h|D)$ es una densidad de probabilidad en función de h (también llamada probabilidad posterior), y su máximo nos da la hipótesis con mayor probabilidad (más próxima a ser verdadera). Usando las reglas de manipulación de probabilidades:

$$\begin{aligned}\Pr(h, D) &= \Pr(h)\Pr(D|h) = \Pr(D)\Pr(h|D) \\ \Pr(h|D) &= \frac{\Pr(h)\Pr(D|h)}{\Pr(D)}\end{aligned}\quad (1.26)$$

donde $\Pr(D|h)$ es la probabilidad de los datos dada una hipótesis; $\Pr(h)$ es la probabilidad de la hipótesis h sin tener en cuenta los datos experimentales, es decir, antes de realizar el experimento. $\Pr(D)$ es la probabilidad de los datos sin tener en cuenta las hipótesis.

Si los datos contienen errores Gaussianos, $\Pr(D|h)$ viene dada por:

$$\Pr(D|h) = \frac{1}{\sigma^N (2\pi)^{N/2}} \exp\left(-\frac{\sum_{i=1}^N (D_i - O(h)_i)^2}{2\sigma^2}\right) = \frac{1}{\sigma^N (2\pi)^{N/2}} \exp\left(-\frac{\chi^2(h)}{2}\right)\quad (1.27)$$

donde O es el operador que transforma las hipótesis al dominio de los datos experimentales.

Recordemos que $\Pr(h)$ es la probabilidad de la hipótesis h sin tener en cuenta los datos experimentales, es decir antes de realizar el experimento. Por ello se le conoce como probabilidad a priori o previa. La manera de asignar valores a $\Pr(h)$ depende del tipo de problema y está siempre abierta a discusión. Aun así, siempre se sigue la siguiente regla: cuanto más simple es una hipótesis más probable ha de ser. Este es un principio ampliamente utilizado y aceptado en ciencia.

Finalmente $\Pr(D)$, al no depender de h no se requiere para obtener el máximo de $\Pr(h|D)$, y es simplemente un factor de normalización. Su valor es tal que:

$$\Pr(D) = \sum_h \Pr(h, D)\quad (1.28)$$

1.3.2. El principio de máxima entropía

La entropía de un sistema está relacionada con el número de microestados compatibles con un macroestado. De una manera semejante, consideremos la entropía de una hipótesis como las diferentes maneras en que puede generarse. La hipótesis con mayor entropía es pues la más probable a priori, ya que es la que posee mayor número de *microestados*, es decir, más posibilidades de generarse.

Principalmente se han utilizado dos tipos de expresiones de la entropía para medir la entropía de hipótesis positivas y aditivas, estas son:

$$\begin{aligned}
 S_1(h) &= \sum_{i=1}^M (h_i - m_i - h_i \log(h_i / m_i)) \\
 S_2(h) &= \sum_{i=1}^M (\log(h_i / m_i) + 1 - h_i / m_i)
 \end{aligned} \tag{1.29}$$

donde m es la hipótesis con mayor entropía, y S es máximo cuando $h = m$ (donde $S = 0$). Por lo tanto la entropía de una hipótesis mide cuando se desvía ésta de m .

La entropía S_1 tiene, además, una justificación en la teoría de la información, pues esta expresión cambiada de signo mide la información contenida en h , siendo m la mínima expresión de información. Por lo tanto, S_1 valora también la carencia de información de las diferentes hipótesis h .

Se puede demostrar que $\Pr(h)$ a de ser una función exponencial de $S(h)$. Tras ciertas aproximaciones:

$$\Pr(h) = \left(\frac{\alpha}{2\pi} \right)^{M/2} \exp(\alpha S(h)) \tag{1.30}$$

A la constante α se le conoce como la constante de regularización (por una analogía con las soluciones regularizadas que será evidente más adelante). Esta constante no puede ser determinada *a priori* y por lo tanto ha de ser supuestamente conocida o ha de ser estimada.

La probabilidad posterior, $\Pr(h|D)$, será:

$$\Pr(h, \alpha | D) = \Pr(\alpha | D) \times \left(\frac{\alpha}{2\pi} \right)^{M/2} \frac{1}{\sigma^N (2\pi)^{N/2}} \exp\left(\alpha S(h) - \frac{\chi^2(h)}{2} \right) \tag{1.31}$$

Para cada valor de α existe una hipótesis h_α con máxima probabilidad.

La probabilidad de la constante de regularización, α , puede obtenerse como:

$$\Pr(\alpha | D) = \Pr(\alpha) \frac{1}{\sigma^N (2\pi)^{N/2}} \exp\left(\alpha S(h_\alpha) - \frac{\chi^2(h_\alpha)}{2} \right) \sqrt{(\det \mathbf{B})} \tag{1.32}$$

La matriz \mathbf{B} viene dada por:

$$\mathbf{B} = \mathbf{I} + \alpha^{-1} \text{diag}(\sqrt{\mathbf{h}}) \times \mathbf{A}^T \times \text{diag}(\sigma^{-2}) \times \mathbf{A} \times \text{diag}(\sqrt{\mathbf{h}}) \tag{1.33}$$

donde \mathbf{h} es un vector que contiene una solución hipótesis, \mathbf{A} es la matriz que convierte las hipótesis en datos (el operador), $\text{diag}()$ representa una matriz diagonal, y \mathbf{I} es la matriz identidad de tamaño M .

La probabilidad máxima para la constante de regularización, $\hat{\alpha}$, se dará cuando:

$$\hat{\alpha} = - \frac{\text{traza} \left(\hat{\alpha}^2 \mathbf{B}^{-1} ((\mathbf{B} - \mathbf{I})) \right)}{2S(h_{\hat{\alpha}})} \tag{1.34}$$

donde la función traza suma los elementos de la diagonal.

Considerando sólo el regularizador más probable, asignado como $\hat{\alpha}$, la probabilidad posterior toma la forma de:

$$\Pr(h|D) \propto \exp\left(-\frac{1}{2}(h-h_{\hat{\alpha}})'(\hat{\alpha} \text{diag}(h_{\hat{\alpha}}^{-1}) + \mathbf{A}^T \text{diag}(\sigma^{-2})\mathbf{A})(h-h_{\hat{\alpha}})\right) \quad (1.35)$$

Tomemos de nuevo el ejemplo el problema presentado en la ecuación 1.16. Ahora consideraremos cual es la hipótesis respecto a la solución del sistema lineal más probable. Para ello utilizaremos la entropía S_1 con una solución a priori $\mathbf{m} = (0,5 \ 0,5)$.

La figura 1.3 muestra la probabilidad de la constante de regularización, que posee un máximo a 0,79. Utilizando este valor del regularizador obtenemos el máximo $\Pr(h|D)$ a partir de la ecuación 1.31, que correspondiente a la solución $\mathbf{h}_{\alpha} = (0,94 \ 1,36)$. Con esta solución podemos obtener de manera aproximada la

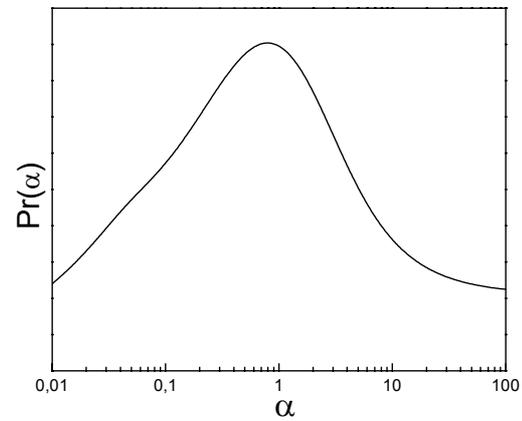


Figura 1.3. Probabilidad del parámetro de regularización.

distribución de $\Pr(h|D)$ utilizando la ecuación 1.35. Así, en la figura 1.4 se muestra con líneas de contorno la probabilidad de las diferentes hipótesis, $\Pr(h|D)$. Integrando en cualquier dimensión se obtiene la distribución de la probabilidad por separado de $h(1)$ y $h(2)$, que son máximas a 0,92 y 1,28 (figura 1.5).

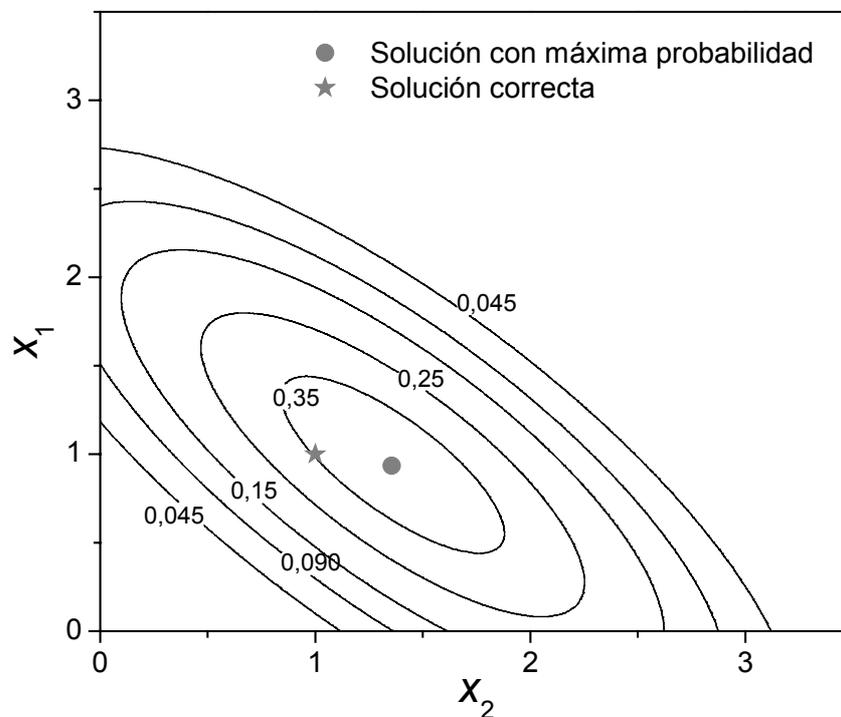


Figura 1.4. Probabilidad posterior de la solución del sistema lineal de la ecuación 1.16.

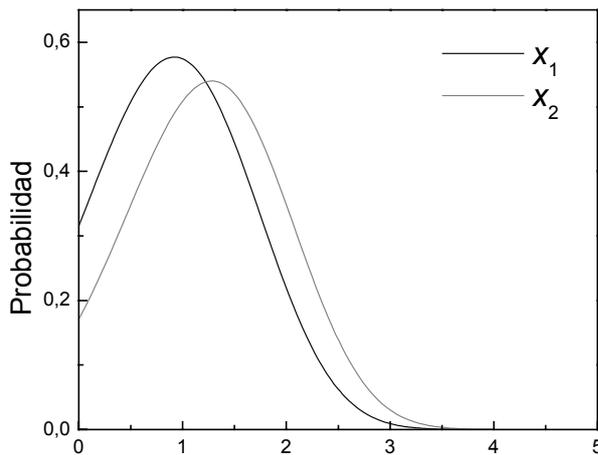


Figura 1.5. Probabilidad posterior de la solución del sistema lineal de la ecuación 1.16.

Otra manera de operar, es maximizar directamente $\Pr(h|D)$ (ecuación 1.31) para un valor arbitrario del parámetro de regularización α . Esta manera de trabajar simplifica la obtención de la solución, al no necesitarse las ecuaciones 1.32-35. Esto lo hace a costa de cierta objetividad y calidad en la solución. Para aumentar la objetividad el valor del regularizador puede elegirse para la solución cumpla que $\chi^2/N = 1$. El problema se reduce a resolver el siguiente sistema:

$$\begin{aligned} &\text{máximo de } S(h) \\ &\text{para } \chi^2(h)/N = 1 \end{aligned} \quad (1.36)$$

El problema también puede ser expresado como:

$$\text{mínimo de } \frac{\chi^2(h)}{2} - \alpha S(h) \quad (1.37)$$

muy semejante a la solución regularizada, donde la entropía hace el papel de regularizador. A pesar de su similitud, la no-linealidad de la entropía requiere métodos iterativos para alcanzar la solución. Cuando la ecuación 1.36 se aplicó al problema planteado en la ecuación 1.16 la solución fue $\mathbf{h} = (0,90 \ 1,02)$. La figura 1.2 muestra las soluciones obtenidas mediante la ecuación 1.37 para diferentes valores del regularizador. Estas soluciones forman la trayectoria de máxima entropía.

Bibliografía

Bretthorst, G. L. (1988) Bayesian spectrum analysis and parameter estimation. *Lecture Notes in Statistics*. 48, 209 pages

Cornwell, T. J., and Evans, K. F. (1985) A simple maximum entropy deconvolution algorithm. *Astron. Astrophys.* 143, 77-83

Craig I.J.D., and Brown J.C. (1986) Inverse problems in astronomy. A guide to inversion strategies for remotely sensed data. (Hilger A., Ed), Adam Hilger Ltd, Briston. Chap. 6

Gull, S. F., and Skilling, J. (1990) Quantified maximum entropy MemSys5 user's manual. Maximum Entropy Data Consultants Ltd.

Hansen, C. (2000) Numerical aspects of deconvolution. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 71 pages

Hansen, C (2001) Regularization tools: A Matlab package for analysis and solution of discrete ill-posed problems. <http://www.imm.dtu.dk/~pch>. 109 pages

Lawson, C. L., and Hanson, R. J. (1974) Solving least squares problems. Prentice-Hall. Chap. 23

- Le Besnerais, G., Bercher, J.-F., and Demoment, G. (1994) A new look at the entropy for solving linear inverse problems. Scientific Literature Digital Library. <http://citeseer.nj.nec.com>
- Livesey, A. K., Licinio, P., and Delaye, M. (1986) Maximum entropy analysis of quasielastic light scattering from colloidal dispersions. *J. Chem. Phys.* 84, 5102-5106
- McWhirter J.R., and Pike E.R. (1978). On the numerical inversion of the Laplace transform and similar Fredholm integral equations of the first kind. *Journal of Physics A* 11, 1729-1745
- Meier, J. E., and Marshall, A. G. (1991) Pure absorption-mode spectra from Bayesian maximum entropy analysis of ion cyclotron resonance time-domain signals. *Anal. Chem.* 63, 551-560
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992) Numerical recipes in C: The art of scientific computing, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge-New York-Melbourne. Chap. 18
- Provencher, S. W. (1982). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications* 27, 213-227
- Skilling, J., and Gull, S. F. (1985) Algorithms and applications. *In* Maximum-entropy and Bayesian methods in inverse problems. D. Reidel Publishing Company. 83-132
- Steinbach, P. J., Frauenfelder, K. C., Johnson, J. B., Lamb, D. C., Nienhaus, G. U., Sauke, T. B., and Young, R. D. (1992) Determination of rate distributions from kinetic experiments. *Biophys. J.* 61, 235-245

2. Modelación de datos y estimación de parámetros

2.1. Introducción

Es habitual realizar experimentos en los que se obtienen un gran número de datos. Ajustando los datos a un modelo con parámetros variables, podemos reducir los resultados en unos pocos números. El modelo ajustado sigue los datos experimentales y puede utilizarse, por ejemplo, para suavizar o como función de interpolación para obtener datos no medios.

Cuando el modelo utilizado es derivado de cierta teoría que se supone ha de regir el experimento, el ajuste de curvas se convierte en un método para estimar parámetros del sistema estudiado. Primero tendremos que crear un modelo con parámetros ajustables capaz de captar la respuesta del sistema a nuestro experimento. Éste modelo no tendrá que ser arbitrario, sino que tendrá que derivarse de la teoría subyacente. Posteriormente tendremos que determinar qué valores de los parámetros ajustables del modelo generan una correspondencia máxima con los datos experimentales, de acuerdo con algún criterio. Esta correspondencia no podrá ser (ni tendrá que ser) perfecta, pues los datos experimentales contienen errores. A partir de la calidad del ajuste y cierto conocimiento estadístico de los errores de los datos, podemos determinar si un modelo no es capaz de describir los datos. Esto nos permitirá cierta capacidad de discriminación cuando varios modelos son teóricamente posibles. Finalmente, la estimación de los parámetros del sistema no está completa sin el error en la estimación de los parámetros. De esta manera, los valores obtenidos en el ajuste se pueden valorar en su justa medida.

En los siguientes puntos describiremos estos procesos, excepto el de la obtención del modelo. El primer punto que trataremos es la medición de la correspondencia entre los datos y el modelo.

2.2. Mínimos cuadrados como estimación más probable de los parámetros

Consideremos la existencia de unos datos experimentales obtenidos en función de una variable x , que expresaremos como $y(x)$, los cuales contienen ruido de normal de desviación estándar $\sigma_y(x)$, cuyo valor varía con x . Por otro lado, el modelo que queremos ajustar depende de los parámetros $a_1 \dots a_M$, y viene dado por $f\{x; a_1 \dots a_M\}$. A partir de $y(x)$, $\sigma_y(x)$ y $f\{x\}$ queremos obtener los valores de $a_1 \dots a_M$ más probables. Para ello, tenemos que ser capaces de medir la probabilidad de los parámetros dado los datos experimentales y posteriormente buscar su máximo. Esta probabilidad no es directamente obtenible, aunque mediante se puede separar en probabilidades obtenibles (ver punto 1.3):

$$\Pr(a_1 \dots a_M | y(x), \sigma_y(x), f(x)) \propto \Pr(y(x) | a_1 \dots a_M, \sigma_y, f(x)) \times \Pr(a_1 \dots a_M) \quad (2.1)$$

Si cualquier valor de los parámetros es igualmente probable, $\Pr(a_1 \dots a_M)$ es una constante, y la probabilidad de los parámetros está directamente relacionada con la probabilidad de los datos dado los parámetros. Cuando $y(x)$ contiene errores normales ésta probabilidad viene dada por:

$$\Pr(y(x)|a_1\dots a_M, \sigma_y(x), f(x)) = \frac{1}{\prod_{i=1}^N \sigma\{x_i\}\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \left(\frac{y\{x_i\} - f\{x_i; a_1\dots a_M\}}{\sigma_y\{x_i\}}\right)^2\right) \quad (2.2)$$

donde N es igual al número de datos experimentales que contiene $y(x)$. Maximizar la probabilidad de la ecuación 2.2 es equivalente a minimizar la función χ^2 (chi cuadrada) respecto a los parámetros a . Ésta viene dada por:

$$\chi^2 \equiv \sum_{i=1}^N \left(\frac{y\{x_i\} - f\{x_i; a_1\dots a_M\}}{\sigma_y\{x_i\}}\right)^2 \quad (2.3)$$

La minimización de la χ^2 lleva a una solución de mínimos cuadrados sopesados. Si la desviación estándar del ruido en $y(x)$, $\sigma_y(x)$, es independiente de x , su valor puede sacarse del sumatorio de la ecuación 2.3 y su valor no afecta a la localización del mínimo. En este caso, los parámetros más probables pueden obtenerse a partir de los valores de a que minimizan:

$$\sum_{i=1}^N (y\{x_i\} - f\{x_i; a_1\dots a_M\})^2 \quad (2.4)$$

es decir, la solución por mínimos cuadrados. Por lo tanto, si los errores en los datos siguen una distribución normal, la minimización de la χ^2 nos da los parámetros más probables, y si los errores en $y(x)$ tienen una desviación estándar constante, los parámetros más probables pueden obtenerse también por mínimos cuadrados.

Existen diferentes algoritmos para encontrar el mínimo de las ecuaciones 2.3 y 2.4 respecto a $a_1\dots a_M$.

2.3. La calidad del ajuste

Si los datos experimentales son ajustados con un modelo teórico correcto, el valor de χ^2 en el mínimo tendrá que estar cercano a N . Cuando los parámetros del modelo son lineales, el valor de χ^2 en el mínimo sigue una distribución chi-cuadrada con $N - M$ grados de libertad. A medida que $N - M$ aumenta, la distribución se acerca a una distribución normal, con media $N - M$ y desviación estándar $\sqrt{2 \times (N - M)}$. Podemos determinar, de esta manera, la probabilidad que la χ^2 sea mayor de cierto valor.

Tomemos, por ejemplo, el valor de χ^2 que hemos obtenido en un ajuste. Queremos saber la probabilidad que, siendo el modelo correcto, este valor se dé al azar. Si esta probabilidad es pequeña, digamos que menor 1% (corresponde a $\chi^2 > (N - M) + 3\sqrt{2 \times (N - M)}$), hemos de considerar dos posibles causas: a) El modelo es incorrecto o al menos incompleto, de manera que no es capaz de ajustar ciertas características de los datos, lo cual lleva a un excesivo valor de χ^2 . b) El modelo puede ser correcto, y simplemente hemos infraestimado la desviación estándar del ruido. Si por otra parte, la probabilidad de la χ^2 en el mínimo es significativa, puede deberse a dos razones: a) El modelo describe los datos experimentales dentro de los niveles de ruido, y por lo tanto el modelo es plausible aunque no necesariamente correcto, pues otros modelos podrán cumplir también este criterio. B) Hemos

sobrestimado la desviación estándar del ruido, de manera que es posible que el modelo sea en realidad rechazable. Por lo tanto el valor de la χ^2 en el mínimo aporta cierta información sobre la plausibilidad de un modelo. Esta información está condicionada a una estimación suficientemente buena de la desviación estándar del ruido en los datos experimentales.

Existen otros métodos para determinar si el modelo describe los datos experimentales dentro de los niveles de ruido, los cuales no requieren conocer la desviación estándar del ruido experimental. Suelen basarse en el análisis del residual del ajuste (datos menos ajuste). Si el ajuste es bueno el residual será aleatorio, sin ningún patrón, por el contrario si el ajuste no es bueno el residual mostrará estructura. Este es el método que, en su versión subjetiva, utilizamos la mayoría para determinar la calidad de un ajuste.

En muchos casos no conocemos la desviación estándar de los errores en los datos y la queremos determinar. Ésta, puede estimarse a partir de un experimento en el que no haya respuesta del sistema, pero sí de todas las fuentes de error. Cuando esto no es posible, ésta puede estimarse a partir de un ajuste, suponiendo que el modelo se ajusta bien y que en el intervalo ajustado la desviación estándar del ruido es constante (no depende de x), como:

$$\sigma_y^2 = \frac{1}{N - M} \sum_{i=1}^N (y\{x_i\} - f\{x_i; a_1 \dots a_M\})^2 \quad (2.5)$$

La manera más habitual de llevar esto a cabo, es ajustar diversos tramos de los datos a rectas o un polinomio de grado dos. Los tramos han de ser suficientemente cortos para que el ajuste sea bueno, aunque no demasiado cortos.

2.4. Estimación de los errores e intervalos de confianza en los parámetros

2.4.1. Introducción

Consideremos unos datos $y(x)$ libres de errores, los cuales al ser ajustados a un modelo generan un vector solución $\mathbf{a} = a_1 \dots a_M$ (los parámetros ajustados). Si los datos contienen errores, estos vendrán dados por $y(x)' = y(x) + \delta y(x)$, donde $\delta y(x)$ representa el ruido o error. La presencia de este ruido hará que el vector solución sea $\mathbf{a}' = \mathbf{a} + \delta \mathbf{a}$. Por lo tanto los valores de los parámetros son perturbados por la presencia de ruido en los datos. Dos cuestiones nos interesarán: a) Determinar la relación entre la perturbación de los datos, $\delta y(x)$, y la perturbación de los parámetros, $\delta \mathbf{a}$; y b) A partir de \mathbf{a}' , determinar un intervalo dónde se encuentre \mathbf{a} .

a) A partir de $y(x)$ y un conocimiento estadístico de sus errores, $\delta y(x)$, (por ejemplo su desviación estándar σ_y) queremos obtener un conocimiento estadístico de $\delta \mathbf{a}$ (por ejemplo su desviación estándar $\sigma_a = \sigma_1 \dots \sigma_M$) o de la precisión de los parámetros (generalmente definida como $\mathbf{p} = a_1/\sigma_1 \dots a_M/\sigma_M$). Este caso tiene un interés teórico, pues nos permite determinar la precisión teórica a la que se pueden obtener ciertos parámetros en un ajuste.

b) En la vida real nunca tenemos acceso a datos libres de ruido, sino a cierta realización de dichos datos, dada por $y(x)$, la cual nos lleva a una solución \mathbf{a}' . A partir de $y(x)$ y un conocimiento estadístico de $\delta y(x)$ (generalmente σ_y), deseamos obtener un conocimiento estadístico de $\delta \mathbf{a}$. La manera de obtenerlo es considerar que los parámetros \mathbf{a}' son sensibles al ruido en $f\{x; a_1' \dots a_M'\}$ de manera semejante que \mathbf{a} es sensible a errores en $y(x)$. Suponemos, pues, que la distribución de $\delta \mathbf{a}$ es semejante a $\delta \mathbf{a}'$. El problema se reduce así al problema (a), donde $f\{x; a_1' \dots a_M'\}$ hará las veces de datos libres de ruido. Por ejemplo, para el caso que $\delta \mathbf{a}'$ sigue una distribución normal podremos declarar que la probabilidad que \mathbf{a} se encuentre en el intervalo $\mathbf{a}' \pm \boldsymbol{\sigma}_a$ será del 96%. Es decir, de esta manera podemos definir un intervalo de confianza donde se hallan los parámetros no perturbados por el ruido.

El problema se reduce a obtener $\boldsymbol{\sigma}_a$ (cuando analizamos datos sin ruido) o $\boldsymbol{\sigma}_a'$ (cuando analizamos datos con ruido).

2.4.2. Errores estándares asintóticos

La forma más común, simple y rápida de obtener la desviación estándar de los errores en los parámetros ajustados nos la da los errores estándares asintóticos. Cuando todos los datos experimentales son independientes y muestran errores de desviación estándar σ_y constantes con x , los errores estándares asintóticos de los parámetros, $\boldsymbol{\sigma}_a$, se obtiene a partir de σ_y y los elementos diagonales de la inversa de la matriz Hessiana (\mathbf{H}^{-1}) obtenida en el mínimo de χ^2 :

$$\boldsymbol{\sigma}_a = \sigma_y \sqrt{\text{diagonal}\{\mathbf{H}^{-1}\}} \quad (2.6)$$

donde la matriz Hessiana es una matriz cuadrada de tamaño M , con elementos:

$$\mathbf{H}_{k,l} = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f\{x; a_1 \dots a_M\}}{\partial a_k} \times \frac{\partial f\{x; a_1 \dots a_M\}}{\partial a_l} \right] \quad (2.7)$$

donde N es el número de datos. La matriz Hessiana se utiliza en la mayor parte de métodos para obtener el mínimo de χ^2 y de la solución por mínimos cuadrados cuando el modelo no es lineal en los parámetros, y en este caso, su obtención no requiere ningún calculo extra. A la matriz $\sigma_y^2 \times \mathbf{H}^{-1}$ se le conoce como la matriz de la varianza-covarianza, y los errores estándares asintóticos son la raíz cuadrada de los elementos de su diagonal. Conviene definir también la matriz de correlación cruzada, cuyos elementos vienen dados por:

$$\mathbf{C}_{k,l} = \frac{(\mathbf{H}^{-1})_{k,l}}{\sqrt{(\mathbf{H}^{-1})_{k,k} (\mathbf{H}^{-1})_{l,l}}} \quad (2.8)$$

Un elemento de \mathbf{C} es cero si dos parámetros son ortogonales, lo cual quiere decir que la variación de la χ^2 al variar uno de los parámetros no puede compensarse por la variación del otro parámetro. Si un elemento fuera de la diagonal de \mathbf{C} es 1, implica que dos parámetros están totalmente correlacionados (si es -1 están totalmente anticorrelacionados) y la variación de la χ^2 al variar uno de los parámetros puede

compensarse totalmente por la variación del otro. En este caso, los datos no permiten determinar los parámetros, pues el mínimo de la χ^2 no es único. Generalmente nos hallaremos entre ambos extremos, a medida que los elementos de fuera de la diagonal se acercan a 1 más difícil será obtener el mínimo de χ^2 y peor definida la solución.

Los errores asintóticos estiman cómo el ruido en $f\{x; a_1 \dots a_M\}$ afectará la solución en \mathbf{a} . Esta estimación será estrictamente correcta cuando el modelo es lineal en sus parámetros y estos no muestran correlación (los elementos no diagonales de \mathbf{C} son casi nulos). Fuera de estas condiciones (el cual es el caso habitual) la estimación de σ_a tendrá que considerarse aproximada (aunque puede ser muy aproximada). Además, las ecuaciones 2.6-7, utilizadas para obtener los errores asintóticos, asumen que los N valores de los datos son medidas independientes. Por ejemplo, si los datos son interpolados hasta obtener $2N$ valores, los errores asintóticos calculados se reducirán en $\sqrt{2}$. Para corregir este hecho, cuando no todos los datos son independientes, los errores asintóticos se obtendrán como:

$$\sigma_a = \sigma_y \sqrt{\frac{N}{N_I} \times \text{diagonal}\{\mathbf{H}^{-1}\}} \quad (2.9)$$

siendo N_I el número total de datos independientes (no interpolados).

2.4.3. Estimación de los errores por el método de Monte Carlo

Los errores asintóticos tienen ciertas limitaciones, pues sólo pueden demostrarse correctos cuando el modelo ajustado es lineal en sus parámetros y estos no muestran correlaciones. Fuera de estas situaciones sus valores pueden ser mostrar diferentes grados de corrección. Además, los errores asintóticos asumen que los errores en los parámetros siguen una distribución normal. Esto puede no ser así, y la distribución de los errores puede tener otra forma e incluso ser asimétrica. Se han desarrollado otros métodos para ir superando todas estas limitaciones. Estos métodos resultan más complejos a la vez que reducen sus asunciones y limitaciones, hasta que llegamos al más completo de todos, que curiosamente es el más simple conceptualmente: el método de Monte Carlo.

El método de Monte Carlo se basa en simular, a partir de $y(x)$ y un conocimiento estadístico de $\delta y(x)$, toda una batería de datos ruidosos, $y(x)'$. El ajuste de estos datos nos proporcionará una batería de parámetros perturbados \mathbf{a}' . De esta manera, simulamos numerosos posibles experimentos y podremos determinar perfectamente la distribución de $\delta \mathbf{a}$. La limitación de este método consiste en poder generar fielmente el ruido de los datos. También puede resultar una limitación, el hecho que la obtención de los errores de los parámetros por este método requiera mucho tiempo, en comparación con el tiempo requerido para obtener la solución o los errores asintóticos. Este problema tiene cada vez menos peso por la creciente velocidad de los ordenadores.

2.5. Ajuste de una banda

Es habitual la necesidad de un análisis cuantitativo de espectros compuestos por bandas. Para ello necesitamos obtener una estimación de sus parámetros (posición, anchura y área) así como el error de dicha estimación. La herramienta necesaria es el ajuste de un modelo al espectro. Estudiaremos el caso más sencillo, aquel que el espectro se compone de una sola banda.

Consideremos un espectro que contiene una banda con posición v_0 , anchura γ y área A . Este espectro contiene ruido normal de desviación estándar σ_y , y todos sus valores han sido medidos de manera independiente. Mediante un ajuste utilizado un modelo dado por $f\{v; v_0, \gamma, A\}$ obtenemos una estimación de los parámetros de la banda (que raramente coincidirán exactamente con los reales). Si midiéramos de nuevo el espectro, el ajuste nos daría unos parámetros algo diferentes. Desde el punto de vista práctico nos interesa conocer la magnitud del error que cometemos en la estimación de los parámetros de esta banda. Desde el punto de vista teórico, deseamos ser capaces de predecir $\sigma(v_0)$, $\sigma(\gamma)$ y $\sigma(A)$, o la precisión en los parámetros $P(v_0) = \gamma/\sigma(v_0)$, $P(\gamma) = \gamma/\sigma(\gamma)$ y $P(A) = A/\sigma(A)$, antes incluso de la realización de ningún experimento. Esto nos permite entender los factores que afectan a la precisión de los parámetros y puede dar información sobre los errores que se cometerán, y si estos son asumibles. Para ello consideramos los errores asintóticos (ecuación 2.6-7) y los reexpresaremos en forma integral, para así obtener expresiones, que llamaremos teóricas, de los errores asintóticos.

Consideremos los datos libres de ruido, el ajuste del cual nos dará los parámetros correctos, dados por \mathbf{a} que correspondientes al modelo $f\{v; \mathbf{a}\}$. Los elementos de la matriz Hessiana vendrán determinados por:

$$\mathbf{H}_{k,l} = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f(v)}{\partial a_k} \frac{\partial f(v)}{\partial a_l} \right] \cong d \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial a_k} \frac{\partial f(v)}{\partial a_l} dv = d \times \mathbf{G}_{k,l} \quad (2.10)$$

donde d es la densidad de valores independientes que contienen los datos experimentales. Por lo tanto, para obtener los errores hemos de invertir la matriz \mathbf{G} :

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} \frac{\partial f(v)}{\partial A} dv \\ \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} \frac{\partial f(v)}{\partial A} dv \\ \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial A} \frac{\partial f(v)}{\partial v_0} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial A} \frac{\partial f(v)}{\partial \gamma} dv & \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial f(v)}{\partial A} \frac{\partial f(v)}{\partial A} dv \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

El error estándar de un parámetro a_i será:

$$\sigma(a_i) = \sigma_y \sqrt{(\mathbf{H}^{-1})_{ii}} = \frac{\sigma_y \sqrt{(\mathbf{G}^{-1})_{ii}}}{\sqrt{d}} = \frac{C(a_i) \times \sigma_y}{\sqrt{d}} \quad (2.12)$$

donde $C(a_i)$ es una constante que depende de $(\mathbf{G}^{-1})_{ii}$, y por lo tanto del parámetro a_i y del modelo $f(v)$. La expresión 2.12 tiene la ventaja respecto a las ecuaciones 2.6-7 que, ahora, el error de un parámetro está directamente relacionada con valores fácilmente obtenibles de un espectro.

La precisión para la posición será:

$$P(v_0) = \frac{\gamma\sqrt{d}}{C(v_0)\times\sigma_y} = \frac{\gamma\times(S/R)\times\sqrt{K}}{C(v_0)\times I\times\sqrt{\gamma}} = c(v_0)\times(S/R)\times\sqrt{K} \quad (2.13)$$

donde I es la intensidad máxima de la banda, (S/R) es la relación entre la intensidad máxima de la banda y la desviación estándar del ruido, y K es el número de datos independiente por anchura de banda. El mismo procedimiento puede realizarse para determinar el resto de las precisiones.

$$P(\gamma) = \frac{\gamma\sqrt{d}}{C(\gamma)\times\sigma} = \frac{\gamma\times(S/R)\times\sqrt{K}}{C(\gamma)\times I\times\sqrt{\gamma}} = c(\gamma)\times(S/R)\times\sqrt{K} \quad (2.14)$$

$$P(A) = \frac{A\sqrt{d}}{C(A)\times\sigma} = \frac{A\times(S/R)\times\sqrt{K}}{C(A)\times I\times\sqrt{\gamma}} = c(A)\times(S/R)\times\sqrt{K}$$

Las ecuaciones 2.13-14 tienen la ventaja, respecto a la ecuación 2.12, que las constantes $c(a_i)$ son adimensionales.

Para una banda Lorentziana es posible invertir analíticamente la matriz \mathbf{G} , con lo que obtenemos:

$$C(v_0) = \frac{\gamma}{A} \sqrt{\frac{\pi|\gamma|}{2}} \quad C(\gamma) = \frac{2\gamma}{A} \sqrt{\pi|\gamma|} \quad C(A) = \sqrt{2\pi|\gamma|} \quad (2.15)$$

y,

$$c(v_0) = \frac{\sqrt{2\pi}}{2} \quad c(\gamma) = \frac{\sqrt{\pi}}{4} \quad c(A) = \frac{\sqrt{2\pi}}{4} \quad (2.16)$$

Por lo tanto para el ajuste de un espectro compuesto por una banda Lorentziana podemos determinar la precisión con la que podrán obtenerse sus parámetros antes de realizar el ajuste, y sólo basándonos en la relación S/R del espectro y en el número de puntos por anchura. Sin embargo, hemos de recordar que las ecuaciones 2.12-14 derivan de los errores asintóticos, y por lo tanto mostrarán las mismas limitaciones que éstos.

Para otras bandas que no sean bandas Lorentzianas, no existe una inversa analítica de la ecuación 2.11. Aún así, las constantes $C(a_i)$ y $c(a_i)$ pueden obtenerse numéricamente.

Bibliografía

- Johnson M., and Frasier S. (1985). Nonlinear least-Squares analysis. *Methods Enzymol.* 117, 301-341
- Johnson, M. L., and Faunt, L. M. (1992) Parameters estimation by least-squares methods. *Methods Enzymol.* 117, 1-37
- Johnson, M. L. (1992) Why, when, and how biochemist should use least-squares. *Anal. Biochem.* 206, 215-225
- Johnson, M.L. (2000) Parameter correlations while curve fitting. *Methods Enzymol.* 321, 424-446
- Lee, H.-N., and Marshall, A. G. (2000) Theoretical maximal precision for mass-to-charge ratio, amplitude, and width measurements in ion-counting mass analyzers. *Anal. Chem.* 72, 2256-2260

Liang, Z., and Marshall A. G. (1990) Time-domain (interferogram) and frequency-domain (absorption-mode and magnitude-mode) noise and precision in Fourier transform spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 44, 766-775

Marshall, A. G., and Verdun, F. R. (1990) Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry: A user's handbook. Elsevier. Chap.5

Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992) Numerical recipes in C: The art of scientific computing. 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge-New York-Melbourne. Chap.15

Straume, M., and Johnson, M.L. (1992) Monte Carlo method for determining complete confidence probability distributions of estimated model parameters. *Methods Enzymol.* 210, 119-129.

Straume, M., and Johnson, M. L. (1992) Analysis of residuals: Criteria for determining goodness-of-fit. *Methods Enzymol.* 117, 87-105

Williams, D. J., and Hall, K. B. (2000) Monte Carlo applications to thermal and chemical denaturation experiments of nucleic acids and proteins. *Methods Enzymol.* 321, 330-352

3. Expresiones de filtros y funciones de apodización

Una vez definida una función de apodización o un filtro, $D(x)$, la forma de la banda que generan, $D(v)$, se puede obtener como:

$$D(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} D(x) \cos(2\pi xv) dx \quad (3.1)$$

A continuación damos una serie de expresiones para $D(x)$ y sus $D(v)$ correspondientes.

3.1. Caja

$$D(x)_{caja} = \begin{cases} 1 & |x| \leq l \\ 0 & |x| > l \end{cases} \quad (3.2)$$

$$D(v) = \frac{\text{sen}(2\pi lv)}{\pi v} = 2l \text{senc}(2\pi lv)$$

3.2. Norton-Beer mediana

$$D(x) = \left(0,152 - 0,136 \left(1 - \left(\frac{x}{l} \right)^2 \right) + 0,984 \left(1 - \left(\frac{x}{l} \right)^2 \right)^2 \right) \times D(x)_{caja} \quad (3.3)$$

$$D(v) = \frac{(17\pi^2 l^4 - 369) \cos(2\pi l^2 v)}{125\pi^4 l^7} + \frac{(38\pi^4 l^8 - 509\pi^2 l^4 + 369) \text{sen}(2\pi l^2 v)}{250\pi^5 l^9}$$

3.3. Triángulo

$$D(x) = \left(1 - \frac{|x|}{l} \right) \times D(x)_{caja} \quad (3.4)$$

$$D(v) = \frac{1 - \cos(2\pi vl)}{(2\pi^2 v l^2)} = l \text{senc}^2(\pi vl)$$

3.4. Hamming

$$D(x) = (0,54 + 0,46 \cos(\pi x / l)) \times D(x)_{caja} \quad (3.5)$$

$$D(v) = \frac{(16l^2 v^2 - 27) \text{sen}(2\pi lv)}{50\pi v (2lv + 1)(2lv - 1)}$$

3.5. Norton-Beer fuerte

$$D(x) = \left(0,045 + 0,555 \left(1 - \left(\frac{x}{l} \right)^2 \right)^2 + 0,400 \left(1 - \left(\frac{x}{l} \right)^2 \right)^3 \right) \times D(x)_{caja} \quad (3.6)$$

$$D(v) = \frac{3(49\pi^2 l^4 - 600) \cos(2\pi l^2)}{200\pi^6 l^{11}} + \frac{3(6\pi^6 l^{12} - 148\pi^4 l^8 - 849\pi^2 l^4 + 600) \text{sen}(2\pi l^2)}{400\pi^7 l^{13}}$$

3.6. Bessel

$$D(x) = \left(1 - \left(\frac{x}{l} \right)^2 \right)^2 \times D(x)_{caja} \quad (3.7)$$

$$D(v) = \frac{(4\pi^2 l^2 v^2 - 3) \text{sen}(2\pi l v) - 6\pi l v \cos(2\pi l v)}{2\pi^5 l^4 v^5}$$

3.7. Gausiano

$$D(x) = \exp\left(-\frac{\pi^2}{\ln 2} \left(\frac{x}{2l} \right)^2 \right) \quad (3.8)$$

$$D(v) = \frac{2l\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}} \exp(-\ln 2(2vl)^2)$$

3.8 Gausiano truncado

$$D(x) = \exp\left(-\frac{\pi^2}{\ln 2} \left(\frac{x}{2l} \right)^2 \right) \times D(x)_{caja} \quad (3.9)$$

$$D(v) = \frac{2l\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}} \exp(-\ln 2(2vl)^2) \otimes 2l \text{senc}(2\pi l v)$$

3.9. Senc cuadrado

$$D(x) = \left(\frac{\text{sen}(\pi x / l)}{\pi x / l} \right)^2 = \text{senc}^2(\pi x / l) \times D(x)_{caja} \quad (3.10)$$

$D(v)$ no tiene expresión analítica.

3.10. Blackman-Harris (tres términos)

$$D(x) = (0,42 + 0,497 \cos(\pi x / l) + 0,079 \cos(2\pi x / l)) \times D(x)_{caja} \quad (3.11)$$

$$D(v) = \frac{(24l^4 v^4 - 211l^2 v^2 + 424)}{1000\pi v(2lv+1)(2lv-1)(lv+1)(1-lv)} \text{sen}(2\pi l v)$$

3.11. Blackman-Harris-Lórenz

$$D(x) = (0,411 + 0,5 \cos(\pi x / l) + 0,089 \cos(2\pi x / l)) \times D(x)_{caja}$$

$$D(v) = \frac{3(48l^2v^2 - 137)}{1000\pi v(2lv + 1)(2lv - 1)(lv + 1)(1 - lv)} \text{sen}(2\pi lv) \quad (3.12)$$

3.12. Norton-Beer-Lórenz

$$D(x) = \left(1 - \left(\frac{x}{l}\right)^2\right)^3 \times D(x)_{caja}$$

$$D(v) = \frac{9(5 - 8\pi^2 l^2 v^2) \text{sen}(2\pi lv)}{4\pi^7 l^6 v^7} + \frac{3(4\pi^2 l^2 v^2 - 15) \cos(2\pi lv)}{2\pi^6 l^5 v^6} \quad (3.13)$$

Bibliografía

- Griffiths, P. R., and de Haseth, J. A. (1986) Fourier transform infrared spectroscopy. John Wiley & Sons. Chap. 1
- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Cameron D. G., and Mantsch H. H. (1981) Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl. Opt.* 20, 1866-1879
- Marshall, A. G., and Verdun, F. R. (1990) Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry: A user's handbook. Elsevier. Chap. 2

4. Manipulación del ruido, de la intensidad y de la relación señal/ruido de un espectro en el espacio de Fourier

4.1. Manipulación del ruido

De acuerdo con el teorema de Parseval, el ruido entre dos dominios relacionados por la transformada de Fourier, por ejemplo entre un espectro y un interferograma, cumple que:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \varepsilon_v^2 dv = \int_{-\infty}^{+\infty} \varepsilon_x^2 dx \quad (4.1)$$

donde ε_v es el ruido en el espectro y ε_x es el ruido en el interferograma. Así mismo, teniendo en cuenta que el valor expectación de ε es σ (la desviación estándar del ruido), tendremos que:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \sigma_v^2 dv = \int_{-\infty}^{+\infty} \sigma_x^2 dx \quad (4.2)$$

donde σ_v es la desviación estándar del ruido en el espectro, y σ_x en el interferograma. Si el espectro está truncado, de tal manera que va de v_i a $v_i + \Delta$, y está obtenido a una resolución de $1/x_f$, tendremos que:

$$\int_{v_i}^{v_i+\Delta} \sigma_v^2 dv = \int_{-x_f}^{+x_f} \sigma_x^2 dx \quad (4.3)$$

Además, si el ruido es blanco, σ_v y σ_x no dependen ni de v ni de x , y la ecuación 4.3 se puede simplificar:

$$\int_{v_i}^{v_i+\Delta} \sigma_v^2 dv = \sigma_v^2 \int_{v_i}^{v_i+\Delta} dv = \sigma_v^2 \times \Delta = \int_{-x_f}^{+x_f} \sigma_x^2 dx = \sigma_x^2 \int_{-x_f}^{+x_f} dx = \sigma_x^2 \times 2x_f \quad (4.4)$$

y por lo tanto:

$$\sigma_v = \sqrt{\frac{1}{\Delta} \int_{-x_f}^{+x_f} \sigma_x^2 dx} = \sigma_x \times \sqrt{\frac{2x_f}{\Delta}} \quad (4.5)$$

Ahora pensemos que el interferograma ha sido apodizado, mediante la función $R(x, x_f)$. El valor de σ_x ya no será constante con x , sino que dependerá de x de acuerdo con la expresión de la función de apodización. El ruido en el espectro será ahora:

$$\sigma_v = \sqrt{\frac{1}{\Delta} \int_{-x_f}^{+x_f} \sigma_x^2 dx} = \sqrt{\frac{1}{\Delta} \int_{-x_f}^{+x_f} \sigma_{x0}^2 R(x, x_f)^2 dx} = \sigma_{x0} \sqrt{\frac{2x_f}{\Delta}} \sqrt{\int_{-x_f}^{+x_f} R(x, x_f)^2 dx} \quad (4.6)$$

donde σ_{x0} es la desviación estándar del ruido en el interferograma para x igual a 0.

Por ejemplo, si tenemos dos apodizaciones diferentes, $R_1(x, x_f)$ y $R_2(x, x_f)$, y queremos saber cual suprime mejor el ruido del espectro, la relación entre el ruido en el espectro para las dos apodizaciones será:

$$\frac{\sigma_{2v}}{\sigma_{1v}} = \frac{\sqrt{\int_0^{+x_f} R_2(x, x_f)^2 dx}}{\sqrt{\int_0^{+x_f} R_1(x, x_f)^2 dx}} \quad (4.7)$$

De manera semejante, la variación de ruido al desconvular para una banda, $B(v)$, utilizando un filtro $D(x, l)$, será:

$$\frac{\sigma_v'}{\sigma_v} = \frac{\sqrt{\int_0^{+l} (D(x, l)R(x, x_f) / B(x))^2 dx}}{\sqrt{\int_0^{+x_f} R(x, x_f)^2 dx}} \quad (4.8)$$

4.2. Manipulación de la intensidad

Para un espectro, $E(v)$, formado por una sola banda de forma $B(v)$ y de área A , la altura de la banda es igual a la integral de $E(x)$:

$$E(v)_{\max} = \int_{-\infty}^{+\infty} E(x) dx = A \int_{-\infty}^{+\infty} B(x) dx \quad (4.9)$$

Si consideramos que el espectro se ha obtenido a una resolución nominal $1/x_f$ y utilizando una apodización $R(x, x_f)$, el máximo del espectro será:

$$E(v)_{\max} = A \int_{-x_f}^{+x_f} B(x) R(x, x_f) dx \quad (4.10)$$

La intensidad del máximo del espectro autodesconvulado, utilizando un filtro $D(x, l)$, será:

$$E'(v)_{\max} = A \int_{-l}^{+l} D(x, l) R(x, x_f) dx \quad (4.11)$$

Por lo tanto, la variación de la intensidad del máximo del espectro al desconvular será:

$$\frac{E'(v)_{\max}}{E(v)_{\max}} = \frac{\int_0^{+l} D(x, l) R(x, x_f) dx}{\int_0^{+x_f} B(x) R(x, x_f) dx} \quad (4.12)$$

De manera semejante se podrá determinar el aumento del máximo en otras condiciones.

4.3. Determinación de la relación señal / ruido al autodesconvular

Para un espectro formado de una banda de área A y de forma $B(v)$, la relación señal/ruido del espectro viene dada por:

$$S/R = \frac{E(v)_{\max}}{\sigma_v} = \frac{A \int_0^{+x_f} B(x)R(x, x_f) dx}{\sigma_{x0} \sqrt{\frac{2x_f}{\Delta}} \sqrt{\int_0^{+x_f} R(x, x_f)^2 dx}} \quad (4.13)$$

Tras autodesconvular, la relación señal/ruido será:

$$S/R' = \frac{E'(v)_{\max}}{\sigma_{v'}} = \frac{A \int_0^{+l} D(x, l)R(x, x_f) dx}{\sigma_{x0} \sqrt{\frac{2x_f}{\Delta}} \sqrt{\int_0^{+l} (D(x, l)R(x, x_f)/B(x))^2 dx}} \quad (4.14)$$

y por lo tanto, la degradación de la relación señal/ruido al autodesconvular, $F_{S/R}$, se podrá determinar como:

$$F_{S/R} = \frac{S/R'}{S/R} = \frac{\int_0^{+l} D(x, l)R(x, x_f) dx \sqrt{\int_0^{+x_f} R(x, x_f)^2 dx}}{\int_0^{+x_f} B(x)R(x, x_f) dx \sqrt{\int_0^{+l} (D(x, l)R(x, x_f)/B(x))^2 dx}} \quad (4.15)$$

Bibliografía

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Cameron, D. G., and Mantsch, H. H. (1981) Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl. Opt.* 20, 1866-1879

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1982) Smoothing of spectral data in the Fourier domain. *Appl. Opt.* 21, 1866-1872

Marshall, A. G., and Verdun, F. R. (1990) Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry: A user's handbook. Elsevier. Chap. 5

5. Modelos autorregresivos y predicción lineal

5.1 Introducción

Cuando unos datos $x(t)=x_1, x_2, \dots, x_j$ siguen un modelo autorregresivo, sus valores a diferentes valores de t se pueden obtener como combinación lineal (o más exactamente como convolución) de sus valores obtenidos a otros valores de t . En especial nos interesa el caso en que podemos predecir un valor x_j utilizando M valores anteriores de $x(t)$:

$$x_j = h_1 x_{j-1} + h_2 x_{j-2} + \dots + h_M x_{j-M} = \sum_{k=1}^M h_k x_{j-k} \quad (5.1)$$

aunque también nos puede interesar predecir a partir de M valores posteriores de $x(t)$:

$$x_j = h_1' x_{j+1} + h_2' x_{j+2} + \dots + h_M' x_{j+M} = \sum_{k=1}^M h_k' x_{j+k} \quad (5.2)$$

Los pesos de la combinación lineal recaen en h , conocida como función de respuesta a un impulso o filtro autorregresivo. Cuando la misma h sirve para predecir todos los valores de $x(t)$, estamos en el caso estacionario.

Los datos provenientes de un proceso armónico siguen un modelo autorregresivo estacionario, y sus valores no medidos puede predecirse si se dan dos condiciones: conocemos h y el número de procesos armónicos es menor que M , la longitud del segmento utilizado en la predicción. Recordamos que un proceso armónico es aquel que cumple la ecuación diferencial 2.2 de la introducción, y por lo tanto la señal consiste de exponenciales complejas (o sinusoides o cosenoides) con una amplitud constante o exponencial. Cuando existe algún tipo de decaimiento de la señal que no sea exponencial, la señal no se genera por un proceso armónico (aunque se puede describir como la suma de diversos procesos armónicos) y por lo tanto no será un modelo autorregresivo estacionario. En cualquier caso, la predicción no podrá ser correcta, pues estrictamente no existe h , y si utilizamos la h del proceso armónico que describe los datos, la predicción será errónea.

Estrictamente, la predicción lineal funciona en todos los sentidos y en cualquier dominio de t sólo cuando la señal consta de sinusoides de amplitud constante. Cuando la amplitud decae exponencialmente, la predicción funciona perfectamente hacia delante y hacia atrás en el dominio positivo y negativo de t , pero no cuando t cambia de signo. Por lo tanto la predicción lineal funcionará en un dominio si todo decaimiento no exponencial es eliminado matemáticamente (ya sabemos como), y a través de un cambio de dominio si todo el decaimiento es eliminado. En los Resultados Teóricos hemos visto como este hecho puede utilizarse para determinar la forma y anchura de las bandas de un espectro.

5.2. Obtención de la función de respuesta al impulso

Una correcta predicción necesita de dos elementos y una condición. La condición es que el sistema sea autorregresivo. Los elementos son la función de respuesta al impulso (primer elemento), que al aplicarla sobre un segmento suficientemente largo de datos conocidos (el segundo elemento) nos genera la predicción de datos no conocidos. Los datos conocidos pueden obtenerse experimentalmente, con la única limitación que contendrán errores, como es propio de cualquier medición.

La obtención de la función de respuesta a un impulso es un proceso complejo y delicado. Si ésta contiene errores, la predicción se verá muy afectada, más que por la presencia de errores en los datos. Además, la función de respuesta a un impulso no puede ser obtenida experimentalmente, y se ha de suponer una forma analítica o se ha de inferir a partir de datos medibles.

La forma analítica de la función de respuesta al impulso, cuando los datos son exponenciales complejas de amplitud constante, puede construirse como describen Kauppinen y Saarinen (1994). Tiene la limitación que presupone que conocemos el número y frecuencia de las sinusoides que componen la señal, y que estas no decaen en amplitud, lo cual no es nada habitual. La ventaja es que la función de respuesta obtenida no contiene errores, y como consecuencia la predicción puede alargarse tanto como se desee. Como hemos visto en la Introducción, esto puede aplicarse para extender un interferograma y por lo tanto se pueden conseguir espectros a una resolución ilimitada. Este aumento de la resolución se producirá, además, sin aumentar el ruido del espectro y sin introducir ningún tipo de distorsión.

La otra manera de obtener la función de respuesta a un impulso es por inferencia, buscando ciertas condiciones que tenga que cumplir. Imaginemos que conocemos al menos $2 \times M$ valores de unos datos que siguen un modelo autorregresivo. Con los primeros M valores podemos predecir los restantes valores conocidos (si conocemos h). De la misma manera podemos preguntarnos si sería posible conocer h a partir de los valores que se han de predecir. Consideremos una función $E(x)$, la cual sigue un modelo autorregresivo. Conocemos $2 \times M + F$ valores de esta función (que en general serán números complejos), los cuales indexamos de E_0 a E_{2M+F-1} . Cualquier \mathbf{h} que sea un posible candidato ha de cumplir:

$$\begin{pmatrix} E_{M+F-1} & E_{M+F} & \cdots & E_{2M+F-2} \\ E_{M+F-2} & E_{M+F-1} & \cdots & E_{2M+F-3} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ E_0 & E_1 & \cdots & E_{M-1} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} h_M \\ h_{M-1} \\ \vdots \\ h_1 \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} E_{2M+F-1} \\ E_{2M+F-2} \\ \vdots \\ E_M \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

En este sistema hay F más ecuaciones que incógnitas. De manera semejante, con los últimos M valores de la señal se puede predecir los restantes valores conocidos utilizando \mathbf{h}' :

$$\begin{pmatrix} E_M & E_{M-1} & \cdots & E_1 \\ E_{M+1} & E_M & \cdots & E_2 \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ E_{2M+F-1} & E_{2M+F-2} & \cdots & E_{M+F} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} h'_M \\ h'_{M-1} \\ \vdots \\ h'_1 \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} E_0 \\ E_1 \\ \vdots \\ E_{M+F-1} \end{pmatrix} \quad (5.4)$$

Ambas condiciones se pueden reunir en el siguiente sistema teniendo en cuenta que para un modelo armónico $\mathbf{h}' = \mathbf{h}^*$ (el asterisco representa el complejo conjugado):

$$\begin{pmatrix} E_{M+F-1} & E_{M+F} & \cdots & E_{2M+F-2} \\ E_{M+F-2} & E_{M+F-1} & \cdots & E_{2M+F-3} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ E_0 & E_1 & \cdots & E_{M-1} \\ \hline E_M^* & E_{M-1}^* & \cdots & E_1^* \\ E_{M+1}^* & E_M^* & \cdots & E_2^* \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ E_{2M+F-1}^* & E_{2M+F-2}^* & \cdots & E_{M+F}^* \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} h_M \\ h_{M-1} \\ \vdots \\ h_1 \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} E_{2M+F-1} \\ E_{2M+F-2} \\ \vdots \\ E_M \\ E_0^* \\ E_1^* \\ \vdots \\ E_{M+F-1}^* \end{pmatrix} \quad (5.5)$$

Abreviaremos estos tres sistemas lineales como $\mathbf{A} \times \mathbf{h} \approx \mathbf{a}$, y nos sirven como condiciones que ha de cumplir h . A pesar que estos sistemas estarán generalmente sobredeterminados, la matriz \mathbf{A} puede estar mal condicionada y por lo tanto estas ecuaciones no definen \mathbf{h} de manera inequívoca y libre de error. Una manera de obtener una solución \mathbf{h} estable, es mediante una solución de mínimos cuadrados mínima norma (solución regularizada de orden cero, ver Apéndice 1.2). Esta solución no será igual a la solución verdadera, es decir, la función de respuesta obtenida y la teórica diferirán. Esto tendrá consecuencias prácticas, pues la predicción se realizará con errores y estos se irán acumulando y ampliando a largo de la predicción, que tendrán que ser por ello de duración limitada.

Existen otras maneras de obtener una estimación de h , que se basan en un sistema de ecuaciones semejantes a las ecuaciones 5.3-5, pero no con los datos directos, sino con su correlación. Estas ecuaciones se llaman de Yule-Walker y pueden resolverse directamente o con el método Burg. A pesar de ciertas disputas, parece que las funciones de respuesta al impulso obtenidos por estos métodos pueden a veces introducir grandes distorsiones en las predicciones.

Una vez obtenida la función de respuesta al impulso, ésta puede utilizarse para extrapolar el interferograma, o directamente para obtener una estimación del espectro de poder como:

$$|E(\nu)|^2 = \frac{\sigma_v^2}{|1 - \mathfrak{F}\{h\}|^2} \quad (5.6)$$

donde \mathfrak{F} representa la transformada de Fourier.

Los espectros de poder obtenidos de esta manera se les conoce como espectros de poder obtenidos por el método de máxima entropía de Burg. Hay que decir que este método no mantiene relación con las inferencias, reconstrucciones o inversiones que utilizan expresiones de la entropía.

Existe una polémica importante sobre a si la función de respuesta al impulso ha de utilizarse para extrapolar el interferograma o para obtener la estimación del espectro de poder. Nosotros en este trabajo siempre hemos utilizado la función de respuesta al impulso para extrapolar el interferograma.

Referencias y Bibliografía

- Hoch, J. (1989) Modern spectrum analysis in nuclear magnetic resonance: Alternatives to the Fourier transform. *Methods Enzymol.* 176, 216-241
- Kauppinen, J. K., and Saario, E. K. (1993) What is wrong with MEM? *Appl. Spectrosc.* 47, 1123-1127
- Kauppinen, J. K., and Saarinen, P. E. (1994) True linear prediction by use of a theoretical impulse response. *J. Opt. Soc. Am. B* 11, 1631-1638
- Kauppinen, J. K., Saarinen, P. E., and Hollberg, M. R. (1994) Linear prediction in spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 324, 61-74
- Kawata, S., Minami, K., and Minami, S. (1983) Superresolution of Fourier transform spectroscopy data by the maximum entropy method. *Appl. Opt.* 22, 3593-3598
- Leclerc, G., and Pireaux, J. J. (1994) What is wrong with “What is wrong with MEM?”. *Appl. Spectrosc.* 48, 973-976
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. (1992) Numerical recipes in C: The art of scientific computing. 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge-New York-Melbourne. Chap. 13
- Saarinen, P. E. (1997) Spectral line narrowing by the use of the theoretical impulse response. *Appl. Spectrosc.* 51, 188-200
- Sievänen, O.-P. (1997) Estimating optimum filter length in linear prediction. *Appl. Spectrosc.* 51, 718-720
- Stern, A. S., Li, K.-B., and Hoch, J. C. (2002) Modern spectrum analysis in multidimensional NMR spectroscopy: Comparison of linear-prediction extrapolation and maximum-entropy reconstruction. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 1982-1993