

e intermoleculares son mínimas (la intensidad de fluorescencia es alta, se minimizan las vías de desexcitación no radiativas por colisiones) y la emisión se produce desde un entorno relativamente apolar (335 nm). En cambio, en el estado, parcialmente, plegado las colisiones aumentan porque la cadena polipeptídica es mucho más flexible. Se puede ver que a pesar de esto, la emisión sigue siendo desde un entorno relativamente apolar (338 nm, no hay efecto por solvente). Cuando se observa el espectro del estado desplegado de esta proteína se detecta un corrimiento hacia longitudes de onda mayores 354 nm, que coincide con la longitud de onda de emisión del triptofano disuelto en agua (relajación por solvente). La intensidad es también baja, ahora también están presentes las colisiones con moléculas de solvente que desexcitan a una elevada proporción del fluoróforo por vías no radiativas.

En la cadena polipeptídica existen algunos grupos químicos que pueden contribuir a la desexcitación por vías no radiativas. Entre ellos las histidinas y los puentes disulfuro son los más comunes.

En la **Figura 4-25** se muestra el proceso de desplegado en función de la concentración de desnaturalizante para dos proteínas: la BSA (albúmina bovina sérica) y la lisozima de clara de huevo.

En el caso de la BSA podemos ver que, a medida que se incrementa la concentración de desnaturalizante (GuHCl), la intensidad de fluorescencia disminuye por colisiones

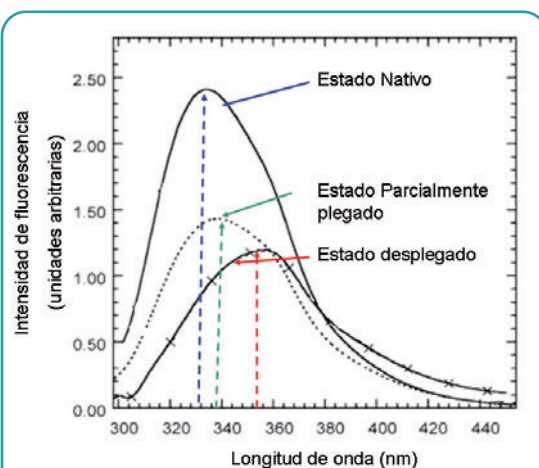


Figura 4-24. Espectros de fluorescencia de tres estados conformacionales de la proteína  $\beta$ -lactamasas.

*En línea llena, el estado nativo; en línea punteada, un espectro correspondiente a una conformación parcialmente plegada y, en línea llena con cruces, el espectro correspondiente a la  $\beta$ -lactamasas desplegada. Se observan cambios en la intensidad del máximo de fluorescencia y en la longitud de onda relacionada al máximo consecuencia de cambios en el entorno químico de los residuos. ( ver Figura 4-24. )*

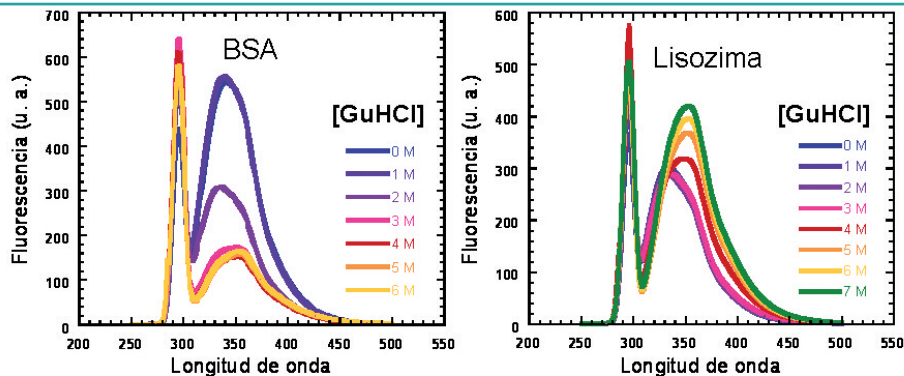


Figura 4-25. El proceso de desplegado en el equilibrio seguido por fluorescencia.

internas a bajas concentraciones de desnaturalizante y, luego, a mayores concentraciones de desnaturalizantes por colisiones con moléculas de agua.

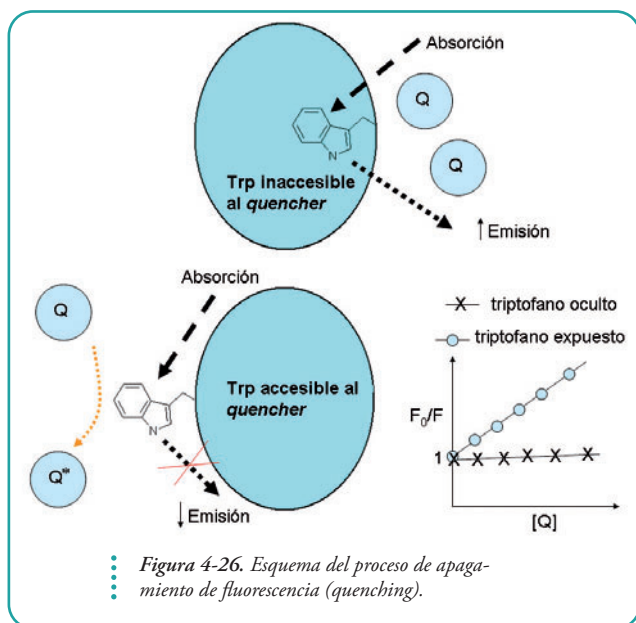
Por el contrario, en el caso de la lisozima la intensidad de fluorescencia aumenta a medida que se incrementa la concentración de GuHCl y que aumenta la concentración de proteína en estado desplegado. Esto se debe a la presencia de puentes disulfuro presentes en esta macromolécula. En el estado desplegado se incrementa la probabilidad de desexcitación con emisión de luz porque los residuos de triptofano están alejados de los puentes disulfuro.

*Desnaturalización química de la proteína BSA y de la lisozima de clara de huevo de gallina, a la izquierda y a la derecha, respectivamente. Se excitó a 295 nm con un ancho de banda de 8,0 nm. El pico ubicado a 295 nm es producido por la existencia de dispersión luminosa debido a la presencia de partículas en la solución. (ver Figura 4-25)*

## Apagado y apagadores de la Fluorescencia

El retorno no radiativo al estado basal **por contacto con una segunda molécula** puede también ser explotado en el análisis conformacional de las proteínas. Este proceso es conocido con el nombre de *quenching* o apagado y, a estas moléculas, se las conoce como *quenchers* o apagadores.

En este tipo de experimentos se mide el espectro de fluorescencia con cantidades crecientes de apagador y se calcula  $F_0/F$ , donde  $F_0$  es fluorescencia en ausencia de apagador y  $F$  es la



*Arriba un triptofano oculto no interacciona con las moléculas apagadoras (quenchers). Abajo, un triptofano expuesto puede deexcitarse por vías no radiativas ante la presencia en la solución de moléculas apagadoras de la fluorescencia. En el gráfico de la derecha se muestra este efecto: la reducción de la fluorescencia (y el aumento del cociente  $F_0/F$ , donde  $F_0$  es la fluorescencia en ausencia de apagador) en función de la concentración de apagador (quencher). (ver Figura 4-26)*

fluorescencia en presencia (ver gráfico en la Figura 4-26). A medida que agreguemos apagador, la fluorescencia será menor y el cociente  $F_0/F$  resultará en un valor mayor esto siempre y cuando el apagador tenga acceso al fluoróforo (curva que corresponde a triptofano ex-

puesto). Si no tuviera acceso al fluoróforo la pendiente de la recta debería ser cero (la intensidad de fluorescencia no debería variar por el agregado del apagador).

Estos gráficos se conocen como gráficos de Stern-Volmer y las rectas pueden representarse mediante la ecuación

Donde  $k_Q$  depende del tipo de fluoróforo y apagador, de la accesibilidad del fluoróforo. Además cuando el apagado depende de la difusión del apagador hacia el fluoróforo el proceso

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_Q \cdot [Q]$$

es dependiente de la viscosidad del solvente y de la temperatura.

Tres moléculas apagadoras de la fluorescencia de triptofano muy comúnmente usadas son el ión yoduro, la acrilamida y el gas oxígeno ( $O_2$ ).

El hecho de que el  $O_2$  penetre en el interior de las proteínas e incluso logre apagar a la fluorescencia de los triptofanos más ocultos **sirvió para demostrar que las proteínas son bastante más flexibles con respecto a lo que se creía en función de los datos cristalográficos. Estos experimentos fueron algunos de los tantos experimentos geniales realizados por el científico de origen argentino Gregorio Weber (Figura 4-27) quien desarrolló una gigantesca batería de teoría y experimentos permitiendo comprender muchos de los procesos de fluorescencia en el campo del estudio de las proteínas.**



Figura 4-27.  
El Dr. Gregorio Weber.

## Fluoróforos extrínsecos

Es muy importante destacar que existen innumerables moléculas fluorescentes muy útiles para el estudio de la estructura proteica. A estos fluoróforos, que no forman parte de la cadena polipeptídica (fluoróforos intrínsecos de la proteína), se los conoce con el nombre general de fluoróforos extrínsecos.

Este reactivo es capaz de unirse a las superficies hidrofóbicas accesibles presentes, típicamente, en los estados parcialmente plegados. Lo que resulta muy útil, en el caso de ANS, es que el rendimiento cuántico del ANS en solución es muy bajo pero, cuando se une a las superficies apolares proteicas, aumenta considerablemente (aumenta la intensidad de fluorescencia); además la excitación se realiza 350 nm, y a esta longitud de onda las proteínas no absorben, por lo que se lo puede excitar selectivamente.

Este comportamiento permite determinar en la presencia de estos estados conformacionales en solución. Por otro lado el ANS libre (en solvente acuoso) emite a longitudes de onda cercanas a los 495-500 nm mientras que el ANS unido emite a 480nm. La gran diferencia en las longitudes de onda de emisión ocurre porque el ANS que se ha unido a la superficie proteica se encuentra en entornos apolares; en cambio, en el caso del ANS libre existe relajación por solvente del estado excitado corriendo la longitud de onda hacia longitudes mayores, menos energéticas.

*Un ejemplo es el 1,8-anilino naftaleno sulfonato (ANS, ver Figura 4-28).*

## Transferencia de energía por resonancia

Existe un proceso que es, particularmente, útil en el análisis de la conformación proteica y en el estudio del plegado de las proteínas. Es la transferencia de energía por resonancia. Este proceso involucra, por lo menos, a dos grupos químicos, uno llamado donador y otro que recibe el nombre de aceptor. Ambos pueden ser fluoróforos. El proceso consiste en la transferencia de la energía absorbida por parte del donador (y desexcitación del donador) al grupo aceptor sin emisión de luz. Si el grupo aceptor es un fluoróforo este puede, a su vez, desexcitarse emitiendo luz. (Figura 4-29).

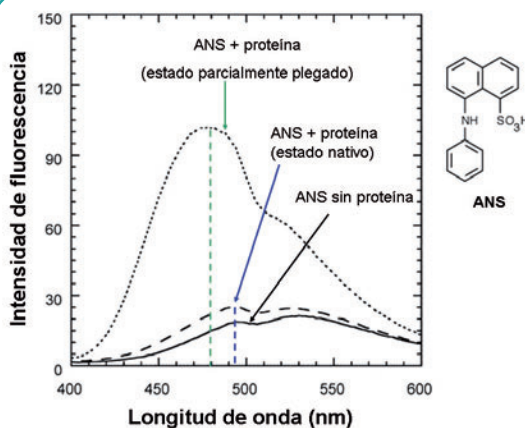


Figura 4-28. La unión de ANS, un fluoróforo extrínseco como diagnóstico de la existencia de superficies hidrofóbicas en estados parcialmente plegados. Se observan diferencias tanto en la intensidad como en el valor de longitud de onda del máximo de emisión dependiendo del entorno químico (polar o apolar).

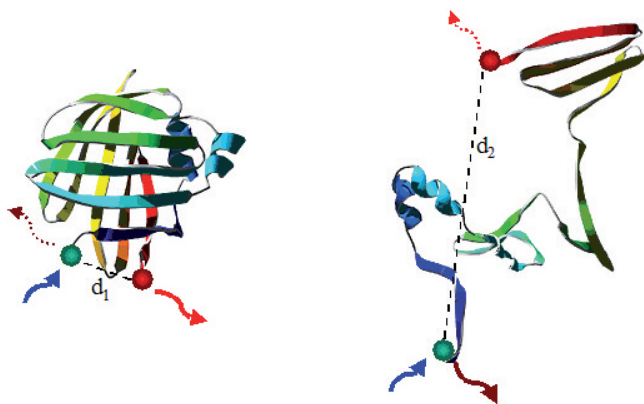


Figura 4-29. Transferencia de energía por resonancia para un caso hipotético basado en la proteína de unión a ácidos grasos IFABP.

fluoróforo aceptor al otro extremo (círculo rojo). Cuando la proteína está correctamente plegada ambos extremos se encuentran ubicados a una distancia  $d_1$  que es óptima para la transferencia de energía por resonancia; al excitar al donador, este transfiere la energía (se desexcita) al grupo aceptor (quien se excita y luego se desexcita emitiendo luz) entonces la emisión de fluorescencia del grupo donador es mínima. Sin embargo,

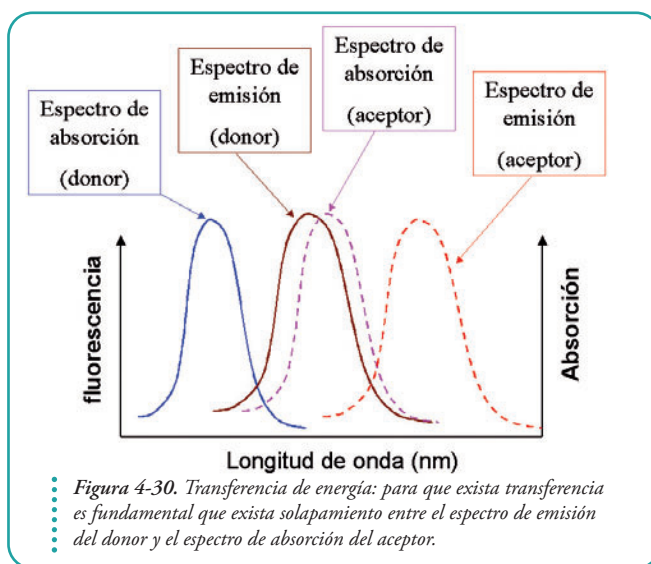
En el estado nativo (izquierda), los fluoróforos ubicados en los extremos N y C- terminales quedan a una distancia óptima para la transferencia de energía, en cambio en el estado desplegado, en promedio, esta distancia es mucho mayor, impidiendo una transferencia eficiente. (ver Figura 4-29)

En la figura 4-29 se muestra, como ejemplo, un experimento hipotético en el que se han unido el fluoróforo donador a un extremo de la proteína (círculo verde) y el

cuando la proteína se despliega los extremos quedan ubicados en promedio a una distancia  $d_2$ , mucho mayor). En este caso la transferencia de energía entre ambos fluoróforos será despreciable y la emisión por parte del grupo donador será máxima.

En rigor la distancia no es el único parámetro que determina la eficiencia de este proceso.

Además de la distancia entre donador y aceptor también juega un rol importante la orientación relativa entre ambos grupos y el tiempo que el grupo donador permanece en estado excitado antes de emitir un fotón. Por otro lado, es fundamental que exista solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor (ver **Figura 4-30**).

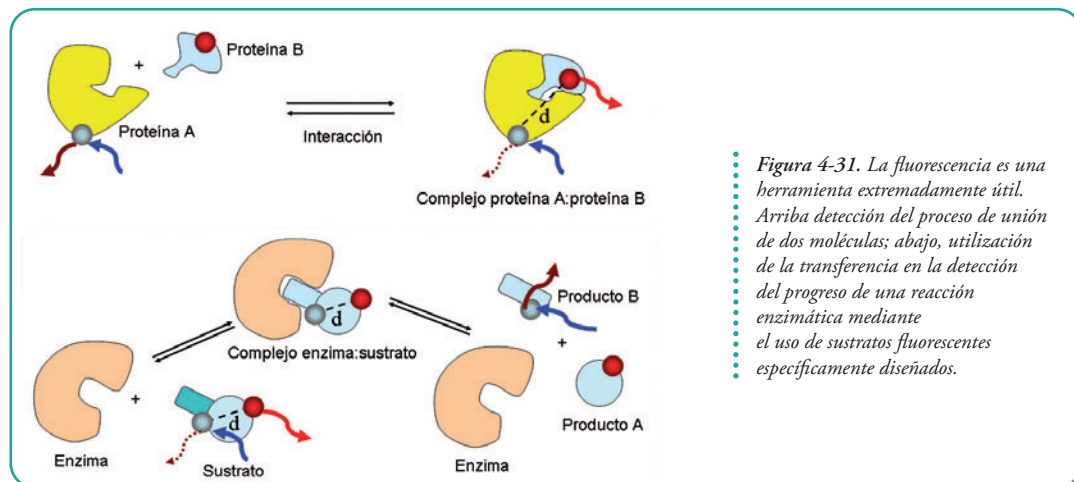


La transferencia se puede medir observando la disminución de la fluorescencia del donador o el aumento de la emisión de aceptor pero, generalmente, se usa la primera forma.

La transferencia de energía por resonancia también es muy útil para detectar procesos en los que interviene la unión (por interacción) y el reconocimiento de dos moléculas.

Existen además diversos sustratos fluorescentes de enzimas en los que se detecta la ruptura de la molécula y la formación de los productos por transferencia

de energía por resonancia (**Figura 4-31**). Estos son, simplemente, dos ejemplos de las decenas de aplicaciones que existen en la actualidad.





## Dicroísmo circular

Dicroísmo circular es la absorción diferencial por parte de una molécula asimétrica (en nuestro caso, de algunos grupos químicos de la cadena polipeptídica) de dos haces de luz circularmente polarizados de sentido opuesto (izquierdo y derecho). La asimetría de los cromóforos en proteínas (amidas, grupos aromáticos y puentes S-S) se induce por la interacción con grupos vecinos (el entorno químico).

Así, para comprender qué es dicroísmo circular hay que comprender algunas de las propiedades de la luz. Por ejemplo, alguna forma sencilla de representación de un haz de luz (**Figura 4-32**), qué es luz polarizada y qué es luz circularmente polarizada.

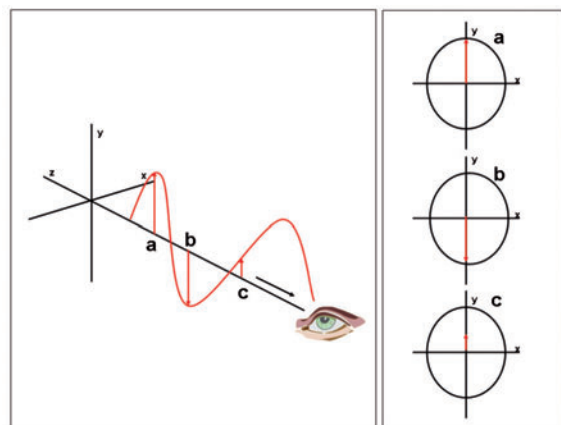


Figura 4-32. Dos sistemas de representación de un haz de luz.

Recordemos que podemos representar a la luz en función de su comportamiento ondulatorio. En el esquema de la izquierda un observador imaginario puede ver cómo avanza un haz en el espacio a través de la coordenada Z, mientras que si el observador imaginario se ubicara en el sitio indicado con la figura del ojo, siempre de frente al haz (luz linealmente o plano polarizada, ver más adelante), vería en este caso cómo cambia la amplitud del haz en función del tiempo. Esto está indicado por las flechas rojas en el panel de la derecha, por ejemplo, a tiempo  $t=a$  la amplitud es máxima, a tiempo  $t=b$  también es máxima en módulo pero su signo es opuesto, a tiempo  $t=c$  la amplitud toma un valor intermedio. (ver Figura 4-32)

La luz blanca (la que emite una lamparita común y corriente es luz no polarizada: la fuente emite haces de luz en todas las direcciones (x, y, z) y sentidos. Sin embargo, existen elementos ópticos que permiten polarizar la luz, seleccionar los haces que vibran, por ejemplo en un plano, como en el caso de la **Figura 4-32**, en el que el haz vibra en el plano Z, Y.

Antes de atravesar la muestra ( $t=a$ )

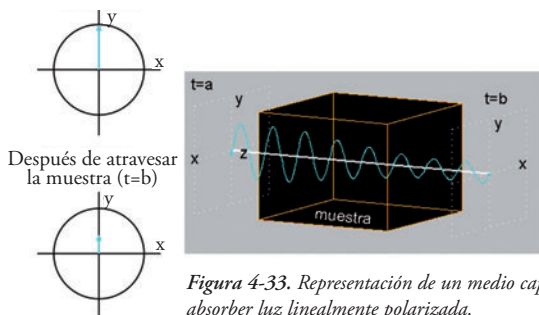


Figura 4-33. Representación de un medio capaz de absorber luz linealmente polarizada.

Si el haz de luz polarizada atravesara un medio (una muestra) que absorbe luz el observador imaginario ahora vería algo parecido a lo que se muestra en la **Figura 4-33**: la amplitud máxima del haz se va atenuando en función de su paso por la muestra.

Por otro lado, podemos pensar qué pasaría si sumáramos dos

haces de luz (en la Figura 4-34 se lo representa). El haz en rojo y el haz verde están en fase (desfasados en  $0^\circ$ ), esto quiere decir que llegan a su máximo de amplitud simultáneamente. El haz representado en rojo está polarizado en el plano  $z, x$ ; mientras que el haz representado en verde está polarizado en el plano  $z, y$ ; es decir que ambos haces están polarizados en planos uno a  $90^\circ$  del otro. La resultante de la suma de ambos haces **también es luz polarizada en el plano** y se representa con trazo celeste. En los tiempos  $t=2$  y  $t=4$  la amplitud del haz es cero, mientras que en los tiempos  $t=1$  y  $t=3$  el módulo de la amplitud es máximo.

*La amplitud máxima del haz se va atenuando en función de su paso por la muestra. (ver Figura 4-33)*

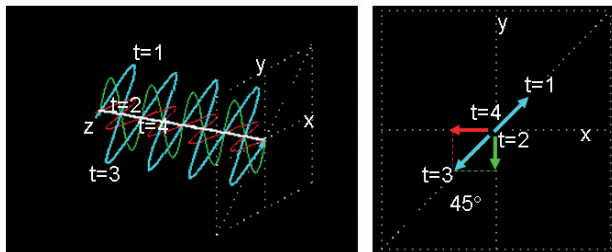


Figura 4-34. Suma de dos haces en fase de luz linealmente polarizada en planos perpendiculares (haces en color verde y rojo). El haz resultante se muestra en celeste; en este caso también es linealmente polarizado.

Sin embargo, si sumamos ahora dos haces de luz linealmente polarizada (como en el caso anterior, polarizados en planos a  $90^\circ$  pero, **en este caso los haces están desfasados  $90^\circ$** , esto quiere decir que cuando un haz llega a un máximo de amplitud (haz verde en plano  $z, y$ ) el segundo haz tiene amplitud 0, cuando el primero tenga amplitud 0, el segundo tendrá amplitud máxima; el haz

resultante ya no estará polarizado en el plano sino que se propagará helicoidalmente, describiendo una hélice y, si el observador lo viera avanzar desde el frente vería que su amplitud no varía y que el haz resultante describe un circunferencia en función del tiempo ( $t$ ) (ver Figura 4-35, panel de la derecha), ¡por esto se la llama luz circularmente polarizada!

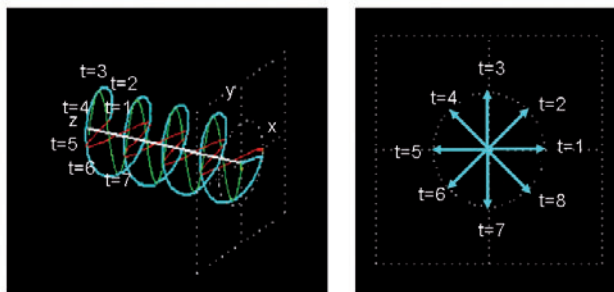
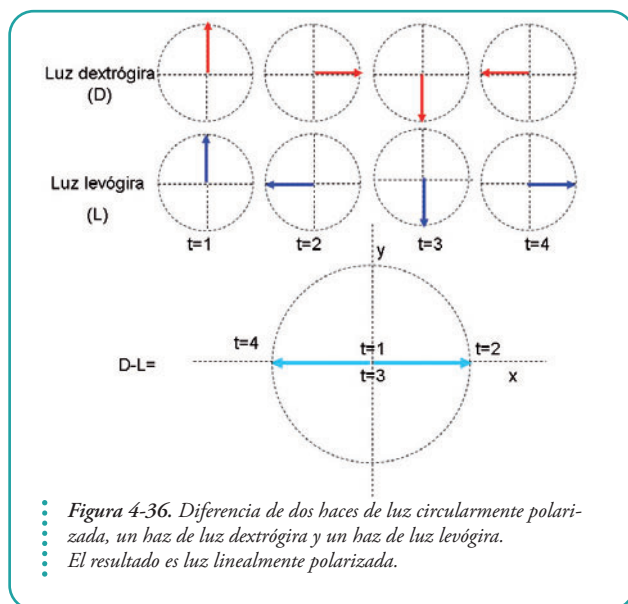


Figura 4-35. Suma de dos haces de luz linealmente polarizada, ambos polarizados en planos perpendiculares (a  $90^\circ$ , uno con respecto al otro). En este caso, además los haces están desfasados en  $90^\circ$ . Los tiempos  $t=1, t=2, t=3$ , etc. de ambas figuras se corresponden. El resultado es luz circularmente polarizada; en el espacio el haz se propaga helicoidalmente (izquierda). Dado que la suma a todo tiempo produce un vector de igual módulo un observador ubicado delante del haz podría ver cómo este describe un círculo.

Si la flecha celeste (el vector amplitud resultante) se mueve como las agujas del reloj, se dice que la luz es circularmente polarizada dextrógira (gira hacia la derecha), en cambio si gira hacia la izquierda (tomando como punto de referencia las 12 h en el reloj)

será luz levógira. Así pudimos fabricar luz circularmente polarizada a partir de dos haces linealmente polarizados.

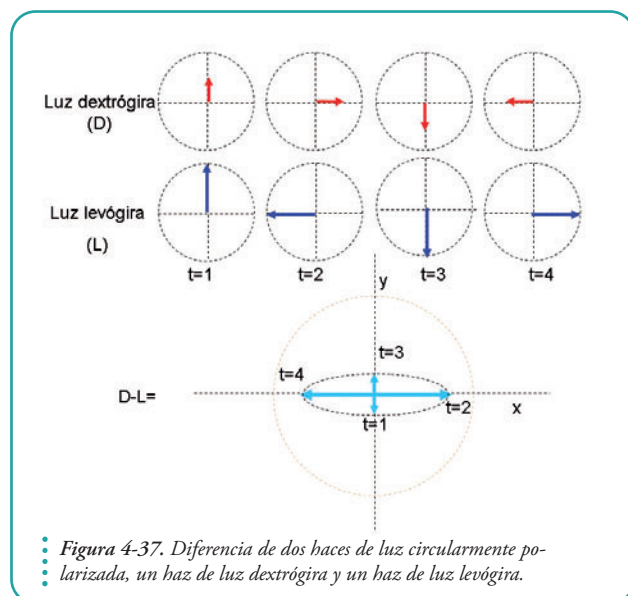
Por último podemos pensar qué es lo que pasaría si restáramos dos haces de luz, pero ahora en ambos casos los haces son de luz circularmente polarizada (Figura 4-36).



En la Figura 4-37 se muestra lo que ocurre: si hacemos la resta para cada tiempo (esto es restar la flecha roja a la azul a cada tiempo ( $t=1$ ,  $t=2$ ,  $t=3$  y  $t=4$ , por ejemplo) recordando el signo (+, -) de cada cuadrante, Figura 4-38). Efectivamente, fabricamos luz linealmente polarizada, que vibra en el plano (x, z) y se propaga a través del eje z.

¿Qué pasaría si ambos haces atravesaran una muestra que absorbe diferencialmente luz circularmente polarizada?

Por ejemplo, la muestra absorbe únicamente luz circularmente polarizada dextrógira (no absorbe luz levógira).



En esta instancia, el observador imaginario ya no vería ni luz linealmente polarizada, ni tampoco circular. ¡Vería luz elípticamente polarizada! (el dibujo que describe el haz mirado de frente es una elipse, ver Figura 4-37), esto ocurre porque los haces no se cancelan completamente en la coordenada espacial y en nuestro ejemplo. Ya que como hubo absorción y, ahora, las amplitudes de ambos haces ya no son idénticas.

En general en muestras de proteínas la diferencia de absorción entre ambos haces es pequeña, por este motivo el radio menor de la elipse suele ser muy pequeño con respecto al mayor.



Uno de los problemas experimentales radica en detectar esta diferencia de absorción, es decir, detectar una diferencia en los coeficientes de absorción dextrógiro  $\varepsilon_D$  y levógiro  $\varepsilon_L$ . Se puede ver que el radio mayor de la elipse es proporcional a  $\varepsilon_L + \varepsilon_D$  y que el radio menor será proporcional a  $\varepsilon_L - \varepsilon_D$ .

Podemos plantear dos ecuaciones de absorbancia, una para luz levógira y otra para luz dextrógira:

$$A_L = \log \left( \frac{I_{0L}}{I_{1L}} \right) \quad A_L = \varepsilon_L \times C \times l \quad A_D = \log \left( \frac{I_{0D}}{I_{1D}} \right)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad en ausencia de muestra (ausencia de absorción) e  $I_1$  es la intensidad resultante luego de que el haz de luz atraviesa la muestra. Los subíndices L y D indican levógiro y dextrógiro, respectivamente.

Ahora podemos plantear la diferencia de absorbancias (usando Ley diferencial de Lambert-Beer)

$$A_L - A_D = \Delta A = \varepsilon_L \times C \times l - \varepsilon_D \times C \times l$$

Y en definitiva

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_D) \times C \times l$$

Los equipos que permiten hacer estas mediciones (diferencias de absorción de luz circularmente polarizada dextrógira y levógira se llaman espectropolarímetros. Estos equipos son muy costosos y, electrónicamente, muy complejos; pero como veremos son extremadamente útiles. La relación entre los coeficientes de absorción puede extraerse a partir de la relación entre los radios de la elipse mediante propiedades trigonométricas:

$$\operatorname{tg}(\theta) = \frac{\varepsilon_L - \varepsilon_D}{\varepsilon_L + \varepsilon_D}$$

Así una de las formas de medir absorción diferencial de luz circularmente polarizada (dextrógira y levógira) es medir el ángulo  $\theta$ , en general el ángulo estará dado en miligrados. Éstas, que son las unidades crudas podrán relativizarse a la concentración de proteína, o enlaces peptídicos presentes en la muestra, también habrá que tener en cuenta el paso óptico (típicamente 0,1 ó 1 cm) de la cubeta que se utilizó. Se suelen usar las unidades de elipticidad molar  $[\theta]$ . En este caso se considera la concentración en deci moles ( $1 \text{ dmol} = 0.1 \text{ mol}$ ) de enlaces peptídicos por litro ( $1000 \text{ cm}^3$ ).

Puede tenerse en cuenta el ejemplo numérico para más claridad

Una muestra que arroja una medición de 3 mili grados (0.003 grados) usando una cubeta de paso óptico de 1 cm y una concentración de proteína de  $10 \mu\text{M}$  ( $0.00001 \text{ M}$ ). Si la proteína tiene una longitud de 101 re-

*En este caso los haces han atravesado una muestra que absorbe, diferencialmente, luz circularmente polarizada en el sentido dextrógiro. El resultado es luz elípticamente polarizada. (ver Figura 4-37)*

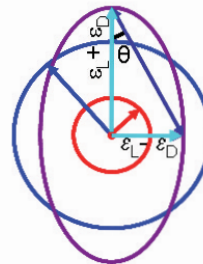


Figura 4-38. Relación entre los coeficientes de absorción puede extraerse a partir de la relación entre los radios de la elipse mediante propiedades trigonométricas.

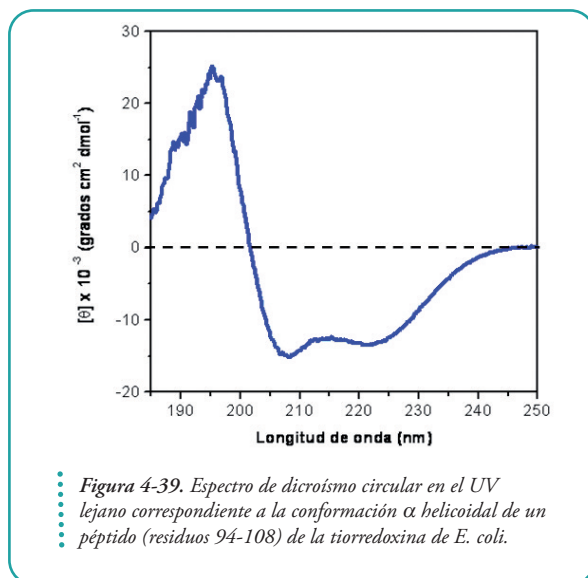
siduos de aminoácidos entonces tiene 100 enlaces peptídicos y la concentración de enlaces peptídicos va a ser 100 veces mayor que la de proteína (1 molécula tiene 100 enlaces peptídicos). Así la concentración de enlaces es  $0.00001 \times 100 \text{ M} = 0.001 \text{ M}$  o 0.01dM (decimolar)

$$[\theta] = \frac{0,003 \text{ grados}}{\frac{0,01 \text{ dmoldes}}{1000 \text{ cm}^3} \times 1 \text{ cm}} \quad [\theta] = 300 \frac{\text{grados}}{\text{dmoles}} \times \text{cm}^2$$

Volviendo ahora a nuestro punto, **las proteínas**, el dicroísmo circular (CD) en la zona UV lejano (180-250 nm), en la que absorbe el enlace peptídico, refleja el contenido de estructura secundaria y el CD en la zona UV cercana (250-340 nm), donde absorben las cadenas laterales de W, Y, F, H y los puentes disulfuro, revela características de la estructura terciaria a través de la detección de las asimetrías del entorno de esos residuos.

Los usos más comunes del dicroísmo circular en proteínas son: estimar el contenido de estructura secundaria, estimar el contenido de estructura terciaria, medir procesos de interacción de proteínas con otras moléculas (por ejemplo fármacos) y evaluar cambios conformacionales, y la estabilidad de la conformación a través de procesos de desnaturalización química o por temperatura.

Desde un punto de vista práctico vale la pena aprender a examinar espectros de dicroísmo circular porque, como podemos imaginar, son muy informativos.



Para comenzar, en los espectros en la región del UV lejano (el enlace peptídico) podremos identificar bandas de absorción diferencial correspondientes a estructura  $\alpha$  helicoidal: típicamente una banda positiva a 190-195 nm, y dos negativas una a 208 nm, y otra a 222 nm (ver **Figura 4-39**).

Las bandas de absorción diferencial correspondientes a estructura  $\beta$  están ubicadas a 195 nm (positiva) y a 215 nm (negativa) (ver **Figura 4-40**);

También es importante notar que el espectro de péptidos (y proteínas) desorganizados es, claramente, diferente a los anteriores. En la **Figura 4-41** se muestra un ejemplo: el péptido TRX94-108 de la

tiorredoxina de *E. coli* (residuos 94-108) pero en su conformación desestructurada. Es importante notar que a 220 nm la banda negativa típica de elementos helicoidales ha desaparecido y a 190-200 nm tenemos una fuerte banda negativa.

Las diferencias observadas entre en los espectros permitirán estimar y, en el mejor de los casos, calcular el contenido de estructura secundaria. Así podremos *deconvolucionar* (descomponer el espectro en una suma de bandas de absorción) un espectro de una proteína con es-

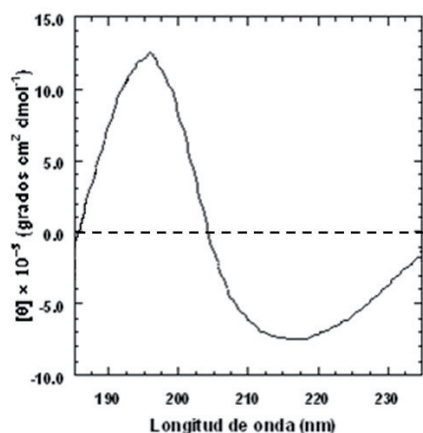


Figura 4-40. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano correspondiente a una proteína con estructura secundaria mayoritariamente  $\beta$  (IFABP, proteína de unión a ácidos grasos de intestino de rata)

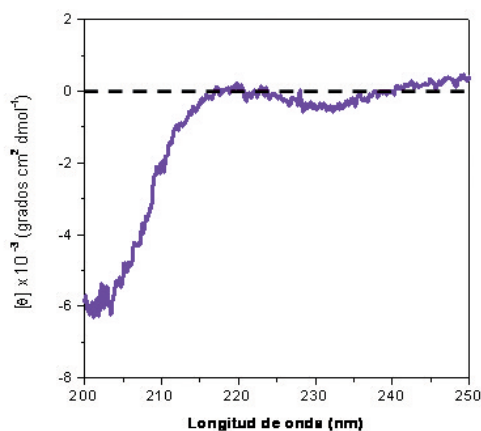


Figura 4-41. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano correspondiente a un péptido desorganizado. Notar que a 220 nm la banda negativa típica de elementos helicoidales ha desaparecido y a 190-200 nm existe una fuerte banda negativa.

estructura compleja (por ejemplo  $\alpha+\beta$ ) y estimar el porcentaje de estructura secundaria  $\alpha$  y  $\beta$  y de regiones desorganizadas. Estas cuentas se hacen teniendo como base un conjunto de espectros de CD de proteínas con estructura secundaria conocida.

Para poder hacer esto, requerimos, entre otras cosas, conocer exactamente la concentración de proteína en la muestra medida al momento de la determinación, por ejemplo, por espectrofotometría UV (con un coeficiente de extinción confiable) porque tendremos que referir la absorción de luz circularmente polarizada (elipticidad) al contenido de enlaces peptídicos de la muestra.

Por último, el proceso de *deconvolución* de espectros no siempre es sencillo y las cuentas muchas veces se complican. Particularmente, es difícil la asignación de estructura  $\beta$  y vale la pena remarcar que algunas proteínas tienen espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano extremadamente atípicos.

La técnica de dicroísmo circular también permite estudiar el contenido de estructura terciaria. Los residuos aromáticos en las proteínas nativas se encuentran en ambientes asimétricos, propios de la estructura terciaria de las macromoléculas. Como se comentó con anterioridad, las bandas de absorción correspondientes a los residuos aromáticos se observan en el UV cercano (Figura 4-42).

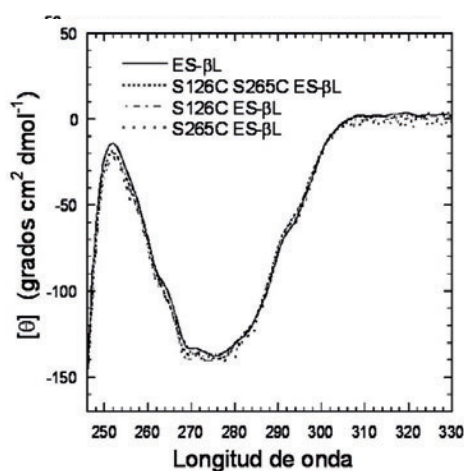


Figura 4-42. Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano (240-340nm) de la  $\beta$ -lactamasa salvaje (ES- $\beta$ L) y de tres variantes S126C (—•—), S265C (---), en estos dos casos se ha reemplazado un residuo de serina por uno de cisteína) y S126C S265C (---), un doble reemplazo de serinas por cisteínas.

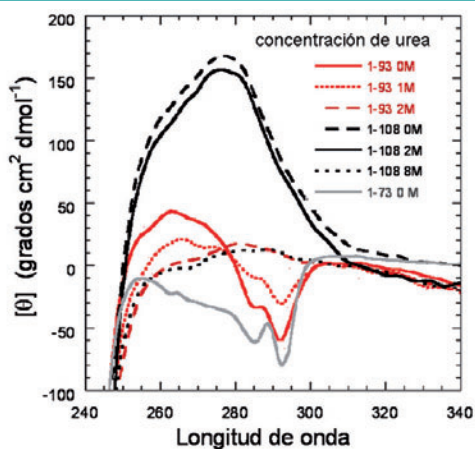


Figura 4-43. Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano (240-340 nm) de variantes de tioredoxina. En trazo color negro, la variante salvaje (longitud: 108 residuos), en ausencia (—) o en presencia de urea (8.0 M, (—) y 2.0 M (- - -)). Una variante corta (trazo rojo) TRX1-93 que comprende del residuo 1 al 93 en ausencia (—) o en presencia de urea 1.0 M (- - -) o 2.0 M (—). Por último la variante TRX1-73, una variante aún más corta, de 73 residuos en trazo gris.

Además puede verse la perturbación de los espectros en presencia de urea a causa de la desnaturalización y de la pérdida de estructura terciaria. En este caso no podemos decir que los entornos de los residuos aromáticos son similares para las tres variantes.

Por último, en la Figura 4-44 se muestra

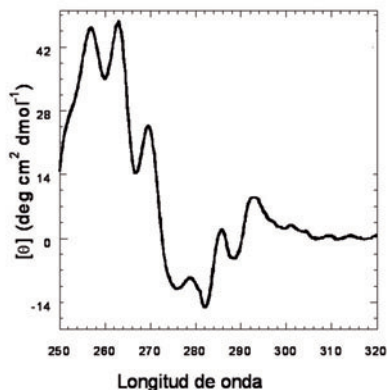


Figura 4-44. Espectro de dicroísmo circular en el UV cercano de la variante salvaje de IFABP (la proteína intestinal de unión a ácidos grasos de rata).

Lo realmente interesante es que el espectro de CD es una especie de huella dactilar del estado conformacional y en caso de que existan perturbaciones de la estructura terciaria podremos observarlas. Debemos tener presente que las bandas de absorción podrán ser positivas o negativas y que muchas veces unas (correspondientes a un residuo localizado en un entorno de la estructura) podrán cancelarse con otras correspondiente a otro residuo localizado en un ambiente distinto. Aquí se muestran tres ejemplos.

En la Figura 4-42 se pueden ver espectros de CD en el UV cercano de la proteína  $\beta$ -lactamasa de *Bacillus licheniformis* y de tres variantes mutantes dos variantes simples en las que se reemplazó un residuo de serina por uno de cisteína y una doble mutante en la que se reemplazaron dos residuos de serina por cisteínas. La superposición de los espectros muestra que el empaquetamiento terciario en el entorno de los residuos aromáticos sería semejante para las tres variantes con respecto a la proteína salvaje (sin mutaciones).

En la Figura 4-43 se muestran espectros correspondientes a tres variantes de la tioredoxina de *E. coli*: la proteína salvaje (1-108) y variantes acortadas (1-93) y (1-73)

un espectro de CD en el UV cercano de la variante salvaje de IFABP (la proteína intestinal de unión a ácidos grasos de rata). Podemos ver como se remarcen en este caso las bandas vibrónicas de los residuos de fenilalanina (entre 250 y 270 nm). Claramente este espectro es una huella digital de la presencia de estructura terciaria en la IFABP.

Finalmente vale la pena tener en cuenta algunas consideraciones referentes a aspectos instrumentales de estos equipos que utilizan fuentes de luz intensas, fotodetectores (detectores de fotones) eficientes y electrónica superior para reducir ruido. Con este objetivo (disminuir el ruido y aumentar

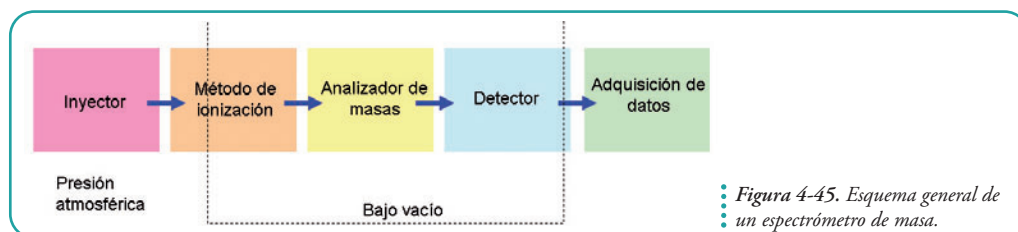
la señal) suelen tomarse algunos recaudos en la ejecución de los experimentos: por ejemplo se realizan muchos espectros que luego se promedian. Además se aumenta el tiempo de colección de datos. También suelen utilizarse celdas de 1 a 10 cm en la zona UV cercana: para poder medir señales débiles y celdas de 1, 0.5 y 0.1 mm en la zona UV lejana, para minimizar la absorción del solvente. Siempre se utiliza un flujo de gas N<sub>2</sub> continuo para evitar daño por ozono de la óptica (particularmente, de los espejos que forman parte del instrumento).

## Espectrometría de masa.

La espectrometría de masa es, sin la menor duda, una de las herramientas más valiosas. Esta herramienta permite estudiar la estructura covalente de las proteínas y comprobar su integridad con gran rapidez y facilidad. Permite determinar la masa de una macromolécula con exactitud y gran precisión. Actualmente, dependiendo del tipo de equipamiento podemos realizar determinaciones en un rango increíblemente grande de masas. Podemos detectar muy rápidamente si la macromolécula posee o no modificaciones post-traduccionales o si su estado de oxidación es el correcto; si hemos producido una proteína recombinante y mediante técnicas de ingeniería genética hemos reemplazado alguna cadena lateral por algún otro aminoácido, podremos comprobar la modificación introducida. Es una técnica muy completa que se la aprovecha por su inmensa capacidad en la identificación (desde átomos a moléculas complejas). Permite identificar y cuantificar mezclas complejas; es rápida y de gran sensibilidad (entre otras cosas proporciona información estructural e información isotópica); es una técnica de rutina en procesos industriales y en el control de calidad de productos biotecnológicos; permite estudiar desde procesos de unión de pequeñas moléculas hasta el arreglo de estructura cuaternaria de complejos proteicos gigantescos (> 800.000 Da); espectrometría de masa, no es una técnica espectroscópica porque no está basada en la interacción luz-materia.

Los espectrómetros de masa poseen cinco partes fundamentales (Figura 4-45):

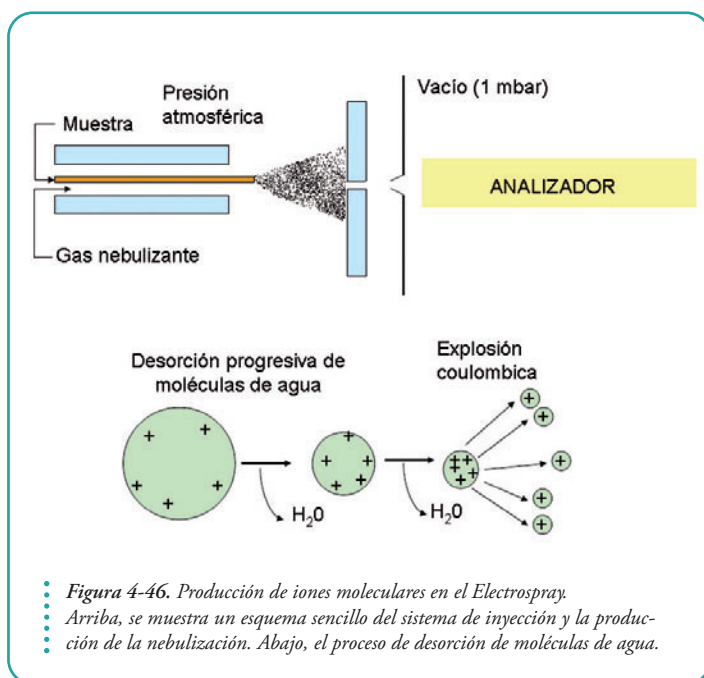
1. un sistema de inyección de la muestra;
2. un sistema de ionización pasaje de la muestra a una fase de tipo gaseoso;
3. un analizador;
4. un detector de masas y
5. un sistema de captura y tratamiento de datos



Existen dos o tres metodologías, ampliamente, aplicadas que permiten ionizar y, literalmente, *hacer volar a las proteínas* para su análisis. Sin duda una de las más impor-



tantes es ESI-MS: espectrometría de masa de ionización por *electrospray*. Esta técnica se basa en que la solución de proteína es inyectada a través de una micro aguja con propiedades especiales que permite la formación de un spray de la solución proteica (podemos pensar en una nebulización) en pequeñas gotas. Además, las moléculas son sometidas a un voltaje elevado y son conducidas mediante la aplicación de vacío. La desorción de moléculas de agua de la superficie de las gotas permite la generación de una relación tal, de cargas sobre la superficie de la gota, que su repulsión provoca explosiones coulombicas produciendo gotas más pequeñas y más pequeñas. Finalmente, para cada macromolécula cargada (ión molecular) sólo unas pocas moléculas de agua continúan adsorbidas a la superficie molecular (ver Figura 4-46).



El proceso de evaporación es típicamente suplementado con un flujo de gas nitrógeno y calor.

Una característica importante de de ESI-MS es que, como las condiciones usadas para producir las gotas cargadas positivamente son ácidas, se tienden a protonar todos los sitios básicos en las moléculas de analito. Esto generará una familia de iones, algunos más cargados y otros menos cargados. Existirán entidades moleculares (iones moleculares) más probables y otras menos probables, dependiendo de la estructura primaria de la macromolécula.

El tercer componente del

equipo, como se mencionó más arriba, es el analizador. Los analizadores de masas llevan adelante la separación de los iones generados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Existen disponibles tres o cuatro tipos de analizadores de masas distintos entre ellos el analizador cuadrupolo, la trampa de iones. En el caso del cuadrupolo y la trampa iónica se aprovecha el hecho de que frente a campos electromagnéticos, los distintos iones responderán de manera diferente. En particular, un analizador de cuadrupolo está compuesto por cuatro cilindros metálicos paralelos que forman un complejo campo electromagnético. Los iones pasarán a través del cuadrupolo (Figura 4-47) hacia el detector.

Las trayectoria de cada tipo de ión será afectada por el campo y sólo iones en los que la relación  $m/z$  tome valores determinados podrán atravesar el cuadrupolo, longitudinalmente, evitando colisionar con los cilindros. El resto de los iones chocarán con las superficies del analizador. Así, el cuadrupolo funciona como un filtro de iones. La trampa de iones también

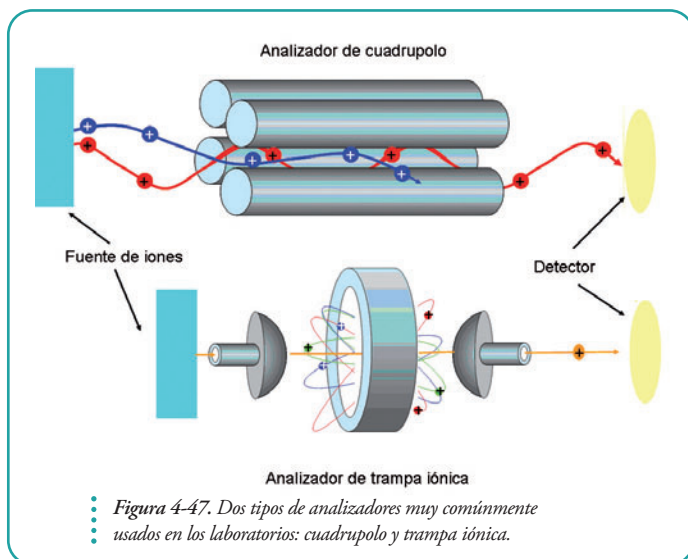


Figura 4-47. Dos tipos de analizadores muy comúnmente usados en los laboratorios: cuadrupolo y trampa iónica.

utiliza campos electromagnéticos oscilantes pero, en este caso, para atrapar iones en forma controlada. Los iones son atrapados en un pequeño volumen por medio de campos eléctricos. Para ello, se dispone de un arreglo de tres electrodos, uno circular y dos electrodos hiperbólicos. La variedad de potenciales posibles que pueden aplicarse a los electrodos permite atrapar iones dentro de un rango  $m/z$  específico: atrapar iones con un valor  $m/z$  seleccionado, atrapar iones por encima de un valor  $m/z$  determinado, o

expulsar de la trampa iones de con valor  $m/z$  específico para su posterior detección.

No nos detendremos en análisis de los distintos tipos de detectores de iones, pero sí en el análisis de los datos experimentales. Si partimos de una muestra de proteína pura, por ejemplo de lisozima, a un pH determinado, observaremos una familia de iones que corresponderán a una única especie de proteína: lisozima. Estos iones difieren entre sí tanto en su carga, porque se han aceptado un número definido de cargas positivas provenientes de los protones ( $H^+$ ) y, por otro lado, también difieren en su masa porque para cada ión molecular a la masa de la proteína deberemos sumarle la masa de los protones que ha aceptado. Por ejemplo, si una proteína de masa  $m$  y carga  $q$  acepta en su estructura 5 protones, su carga se modificará en  $q+5$  y su masa en  $m+5$  porque la masa de un protón es  $m_H=1$ .

La relación masa/carga en definitiva para unión estará dada por la ecuación:

$$\frac{m}{z} = \frac{m_p + n}{n}$$

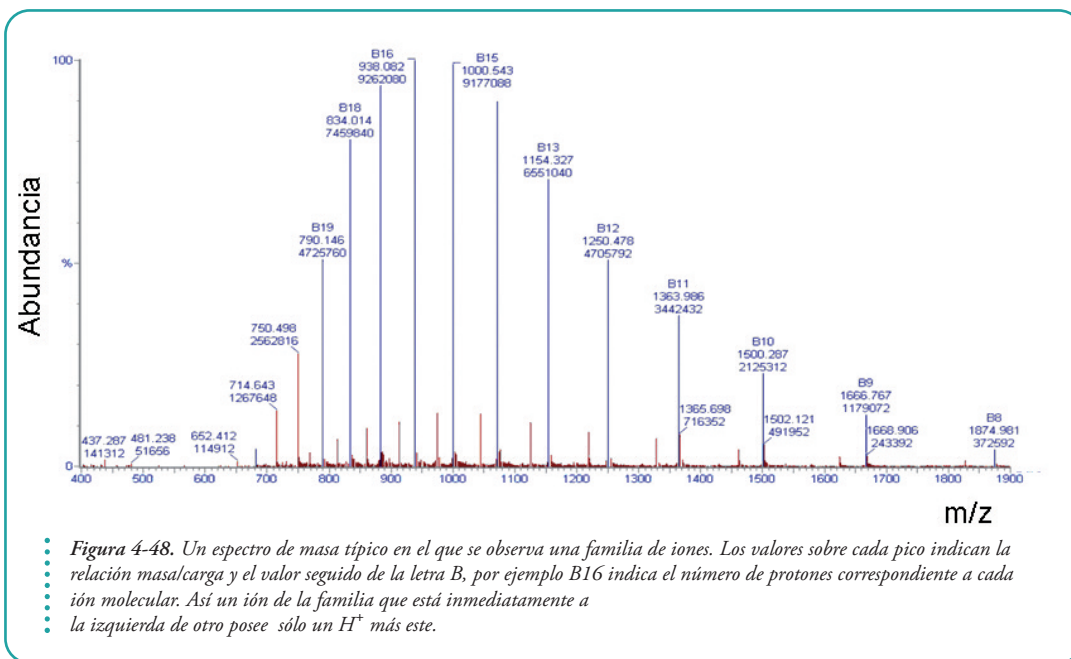
En las que  $m_p$  es la masa de la proteína,  $n$  es el número de protones que ha aceptado; si acepta un protón más entonces la ecuación se verá modificada de la siguiente manera

$$\frac{m}{z} = \frac{m_p + (n + 1)}{(n + 1)}$$

Dado que el espectrómetro de masa detecta iones en función de la relación masa/carga tendremos con dos iones un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas  $m$  y  $n$ . Sin embargo, en los espectros de masa muchas veces podremos observar muchos miembros de una familia de iones moleculares.

En la **Figura 4-48** se muestra un ejemplo. Se trata de un espectro de masa de la proteína de unión a ácidos grasos.

Es muy importante tener en cuenta que, dada la inmensa cantidad de átomos que posee una



proteína, debe tenerse en cuenta la abundancia de isótopos en la naturaleza. Por lo que **se usará en el cálculo una masa promedio** y no la masa del isótopo más abundante (monoisotópica).

Por ejemplo, la abundancia del hidrógeno cuya masa es de 1,007825 es del 99,99 % mientras que la masa del deuterio es de 2,014102 y su abundancia es del 0,015%. (ver **Tabla 4-2** y **Tabla 4-3**)

En este ejemplo la masa calculada experimentalmente es de  $14.993,78 \pm 0,87$  mientras que el valor teórico es de 14993. Queda más que claro con este ejemplo sencillo la relevancia que tiene este tipo de herramienta de extrema precisión en el estudio de proteínas.

El cálculo de la masa teórica puede hacerse usando el programa ProtParam disponible en <http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>.

Nombre	Símbolo	Masa	Abund.	Símbolo	Masa	Abund.	Símbolo	Masa	Abund.
Hidrógeno	H(1)	1.007825	99.99	H(2)	2.014102	0.015			
Carbono	C(12)	12.000000	98.90	C(13)	13.003355	1.10			
Nitrógeno	N(14)	14.003074	99.63	N(15)	15.000109	0.37			
Oxígeno	O(16)	15.994915	99.76	O(17)	16.999131	0.038	O(18)	17.999159	0.20
Azufre	S(32)	31.972072	95.02	S(33)	32.971459	0.75	S(34)	33.967868	4.21

**Tabla 4-2.** Abundancias relativas de los distintos isótopos de los elementos de interés.

RESIDUO	CODIGO	COMPOSICION	MASA MONOISOTOPICA	MASA PROMEDIO
Glicina	G	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	57.02146372	57.02146372
Alanina	A	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71.03711379	71.0779
Serina	S	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	87.03202841	87.0773
Prolina	P	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO	97.05276385	97.11518
Valina	V	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	99.06841392	99.13106
Treonina	T	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101.0476785	101.10338
Cisteína	C	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NOS	103.0091845	103.1429
Leucina	L	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.084064	113.15764
Isoleucina	I	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.084064	113.15764
Aspargina	N	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.0429274	114.10264
Acido Aspártico	D	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115.026943	115.0874
Glutamina	Q	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	128.0585775	128.12922
Lisina	K	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	128.094963	128.17228
Acido Glutámico	E	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129.0425931	129.11398
Metionina	M	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS	131.0404846	131.19606
Histidina	H	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	137.0589119	137.13928
Fenilalanina	F	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	147.0684139	147.17386
Arginina	R	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	156.101111	156.18568
Tirosina	Y	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	163.0633285	163.17326
Triptofano	W	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	186.079313	186.2099

ELEMENTO	CODIGO	MASA MONOISOTOPICA	MASA PROMEDIO
Hidrógeno	H	1.007825032	1.00794
Carbono	C	12	12.0107
Nitrógeno	N	14.00307401	14.0067
Oxígeno	O	15.99491462	15.9994
Azufre	S	31.97207069	32.065

*Tabla 4-3. Masas correspondientes a los residuos de aminoácidos. Las masas de los elementos fueron extraídas del National Institute of Standards and Technology de Estados Unidos de Norteamérica. <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/index.html>.*

## La obtención de estructuras tridimensionales por difracción de rayos X.

La determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X requiere contar con cristales de proteínas.

### ¿Qué es un cristal de proteínas?

Un conjunto gigantesco de macromoléculas proteicas (unas  $10^{15}$ , mil millones de millones de moléculas) perfectamente ordenadas con una simetría determinada. Los cristales de proteína son muy espaciales, son frágiles porque el contenido de moléculas de agua es muy grande (típicamente mayor al 50%) y los contactos intermoleculares que mantienen a las proteínas empaquetadas en el cristal no son tantos ni tan fuertes como en el caso de otro tipo de cristales.

Los cristales crecen sólo en soluciones en las que la concentración de proteína debe ser inicialmente muy elevada (entre 5 y 20 mg/mL). A estas concentraciones, las proteínas suelen tener alta tendencia a agregar, pero en algunas condiciones particulares también cristalizan: forman agregados proteicos pero extremadamente ordenados.

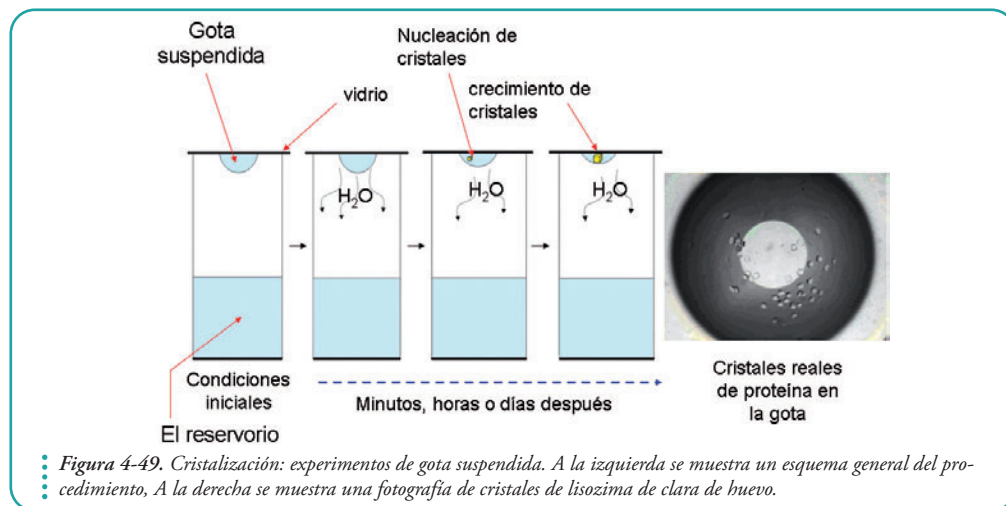
Uno de las dificultades experimentales que los cristalógrafos deben solucionar es, justamente, encontrar esas condiciones especiales de cristalización entre muchas no productivas (una aguja en un pajar). Típicamente, se hace la búsqueda de las condiciones de cristalización modificando

tipo y concentración de sales, cambios en pH.

Como en otros tipos de crecimientos cristalinicos debe formarse, primero, un núcleo de cristalización a partir del cual el cristal crecerá en todas sus dimensiones posibles. La presencia de impurezas (típicamente otras proteínas, o proteína mal plegada), partículas de polvo, etc. Frecuentemente, inhiben el crecimiento del cristal.

Existen muchas maneras de producir cristales de proteínas. Una de las formas más comunes es mediante experimentos de gota suspendida (Figura 4-49).

*Por este motivo en la actualidad, en la mayor parte de los laboratorios, en los que se hace cristalogénesis, el proceso de generación de cristales de proteína, se usan sistemas automatizados, robots específicamente diseñados para mezclar las soluciones en micro gotas.*



En este tipo de experimentos se prepara una solución de la proteína de interés, preferentemente, en agua libre de partículas e iones y se la diluye al medio con el *buffer* (por ejemplo, se agrega 1  $\mu\text{L}$  de proteína más 1  $\mu\text{L}$  de *buffer*) formando una pequeña gota que se deposita en un vidrio perfectamente limpio. Este vidrio se usa como tapa de un reservorio que tiene el mismo *buffer* que se usó para diluir la proteína (comúnmente unos 500  $\mu\text{L}$ ). Así, la concentración de los componentes del *buffer* en el reservorio será el doble que la concentración en la gota. El resultado es que por difusión de vapor, las moléculas de agua presentes en la gota difundirán hacia el reservorio, en principio, hasta que las concentraciones de la gota y del reservorio se equilibren. A medida que esto ocurre, la proteína, las sales, y el agente precipitante presente en el *buffer* de la gota, paulatinamente, comienzan a concentrarse. La velocidad de este proceso dependerá entre otras cosas de la temperatura. Por este motivo suele disponerse de cámaras de temperatura controlada (por ejemplo una 4  $^{\circ}\text{C}$  y al otra a 20  $^{\circ}\text{C}$ ).

A medida que la proteína y el agente precipitante se concentran comienzan a favorecerse las condiciones óptimas para la nucleación. Una vez que se forman los núcleos de cristalización, los cristales pueden continuar su crecimiento a expensas de la reducción de la concentración de proteína soluble en la gota.

Este tipo de dispositivos permiten probar, simultáneamente, muchas condiciones de



cristalización, sin consumir grandes cantidades de la proteína de interés, que por lo general es difícil de purificar.

Pero la obtención de cristales es, únicamente, una de las tareas de un cristalógrafo. Una vez obtenidos los cristales podrán realizarse los experimentos para obtener datos de difracción de rayos X.

### ¿Qué es la difracción de rayos X?

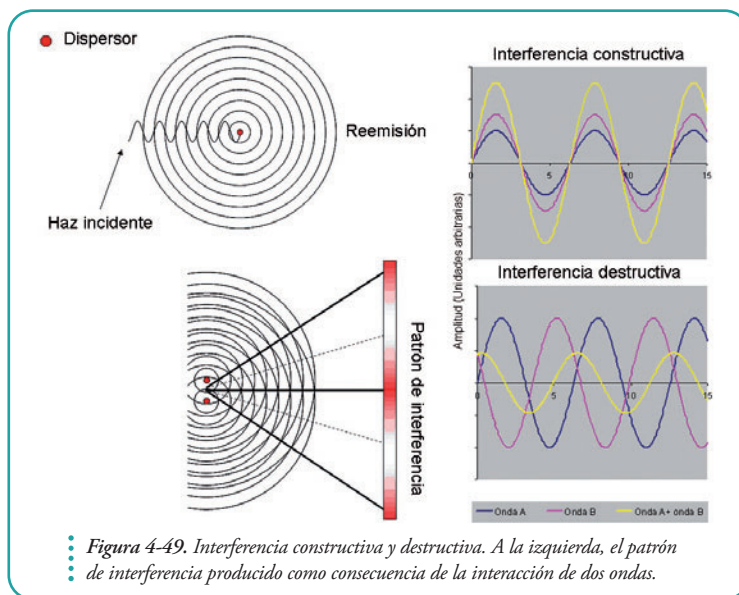
Podemos ir de a pasos pequeños y preguntarnos

### ¿Qué son los rayos X?

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas de longitudes de onda extremadamente cortas, altamente energéticas. Estas radiaciones (fotones) son emitidos cuando los electrones se aceleran. Los haces de rayos X más poderosos se producen en un tipo de fuente conocida con el nombre de luz Sincrotrón.

Los sincrotrones son sistemas de aceleración de partículas en este caso electrones. Este tipo de haces son policromáticos, de espectro continuo, y permiten seleccionar una variedad de longitudes de onda entre ellas en el rango de 0,2 y 2 Å (ver más adelante, **Figura 4-51**).

Cuando los rayos X chocan con un átomo interactúan con sus electrones. Estos reemiten la radiación electromagnética incidente, pero, ahora, en diferentes direcciones. La frecuencia de la radiación reemitida es similar a la de la radiación incidente. Los fotones reemitidos por átomos cercanos interfieren entre sí constructiva o destructivamente, sumándose o cancelándose, porque las ondas ya no se encuentran necesariamente en las fases. Este es el fenómeno conocido con el nombre de difracción. En el ejemplo de la **Figura 4-49**, se muestra la consecuencia del fenómeno de difracción para dos objetos actuando como dispersores.



Así se genera un patrón de interferencia que es, en cada punto, igual a la suma (vectorial) de las ondas dispersadas. Podemos pensar como analogía en las ondas producidas al tirar una o dos piedras en una pileta.

Como la dispersión es el resultado directo de las interacciones entre los rayos X incidentes y los electrones de los átomos dentro del cristal, si logramos estudiar las direcciones

en las que ocurre difracción luego de que los rayos X impacten sobre el cristal, examinando la interferencia constructiva y destructiva, podríamos predecir la ubicación periódica de los átomos que lo componen (específicamente podríamos construir un mapa de las densidades de electrones en la red cristalina).

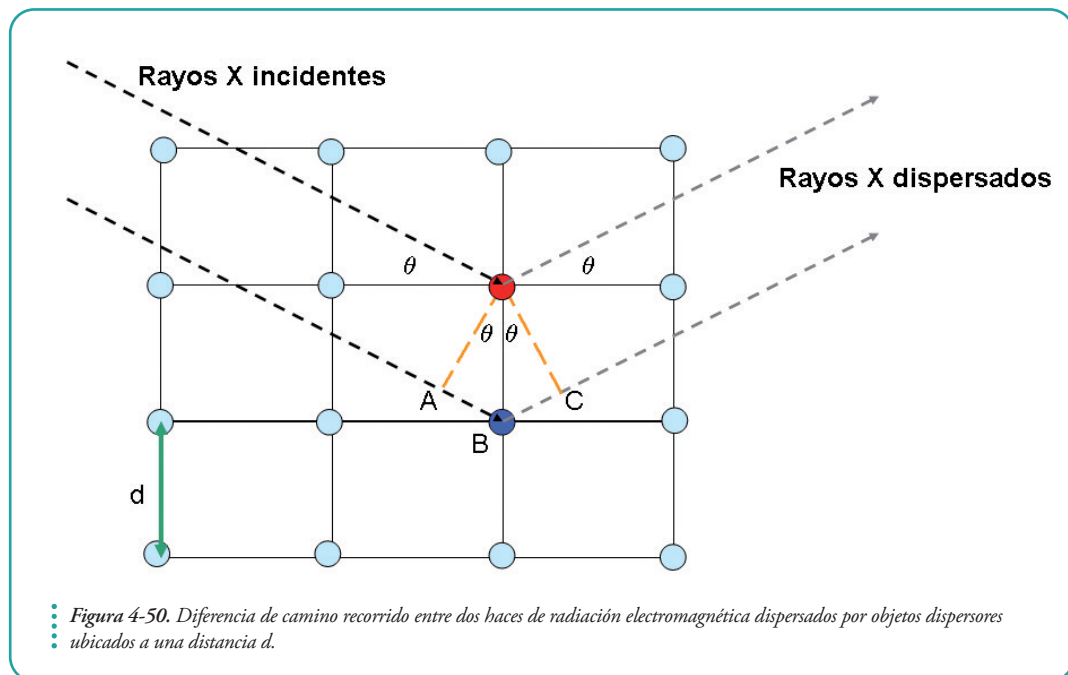
Gracias a los físicos William Henry Bragg y William Lawrence Bragg (su hijo) quienes derivaron una ley ahora conocida como Ley de Bragg podemos establecer relaciones entre los mapas de difracción y la estructura del cristal, es decir, la correspondencia entre la posición de los objetos que actúan como dispersores, y el patrón de interferencias (máximos y mínimos en intensidades). Los Bragg fueron premiados en el año 1915 con el Premio Nobel de Física por sus trabajos en la determinación de la estructura cristalina.

Efectivamente, descubrieron que los picos de intensidad en el patrón de difracción (máximos) para los rayos X dispersados podían ser seleccionados cuando el ángulo  $\theta$  de incidencia era igual al de la radiación dispersada y, simultáneamente, la diferencia de camino realizada por la radiación era un número entero de veces el valor de la longitud de onda, de tal manera que se recuperaba la fase de la onda.

Como se ve en la **Figura 4-50**

$$\frac{\text{diferencia de caminos entre haces}}{2} = AB = BC = d \times \sin\theta$$

$$\text{diferencia de caminos entre haces} = 2d \times \sin\theta$$



Por esto, la intensidad debe ser máxima cuando

$$n\lambda = 2d \times \sin\theta$$

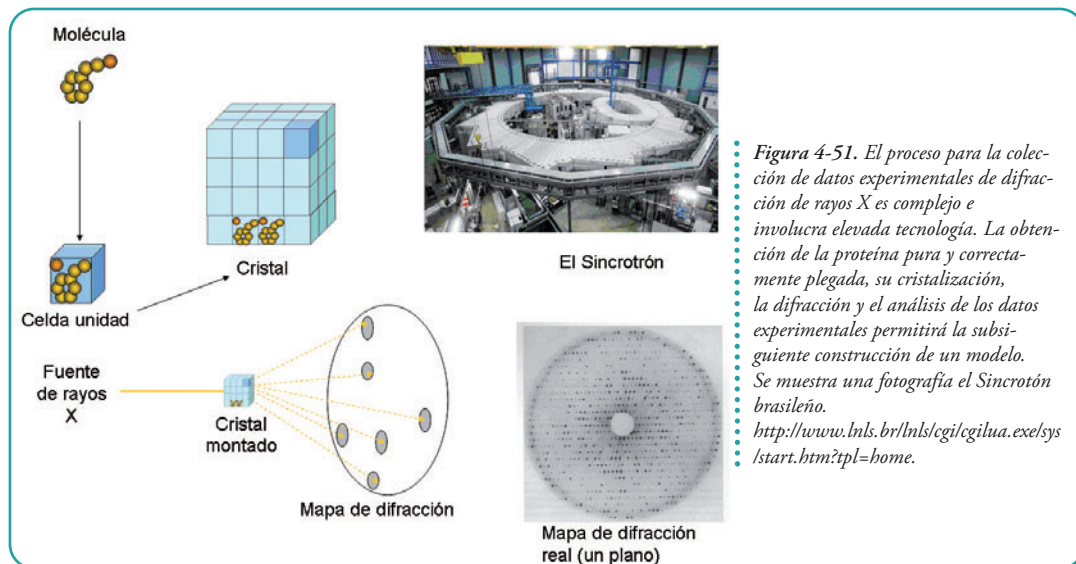
Donde  $n$  es un número entero y  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de rayos X.

En este contexto, vale la pena preguntarse cómo están organizadas las proteínas dentro de un cristal (recordemos que son unas  $10^{15}$  moléculas). Es muy importante tener en cuenta que en un cristal coexisten miles de macromoléculas, perfectamente, ordenadas y alineadas y con movilidad extremadamente restringida. El efecto del orden es el aumento de la intensidad de las señales dispersadas.

Un cristal puede dividirse en unidades mínimas (Figura 4-51). Cada unidad mínima recibe el nombre de **celda unidad** y cada una de ellas contiene toda la información necesaria para reconstruir el cristal en base, simplemente a la traslación de la celda unidad en las tres dimensiones. A su vez, la celda unidad puede tener simetría interna. En este caso se define la unidad asimétrica.

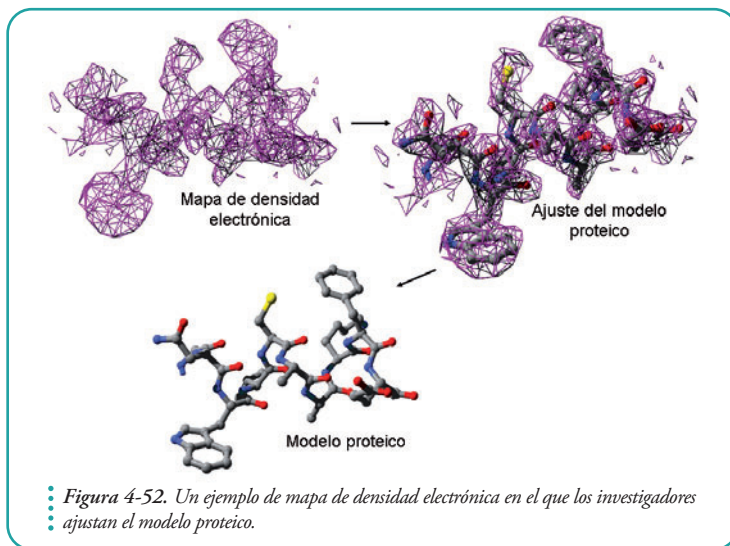
El cristal es montado de tal forma que se lo puede rotar, paulatinamente, con una increíble precisión y los datos de los distintos planos de difracción son adquiridos con cámaras especiales. Además, es importante mencionar que existen estrategias de adquisición de datos experimentales que garantizan que el investigador pueda contar con varios juegos completos de datos, es decir, de las posiciones e intensidades de los picos de difracciones del cristal necesarias, en principio, para construir un modelo experimental en el que se reconstruyen las posiciones de los átomos que dieron origen a la difracción.

*En una celda unidad pueden alojarse más de una macromolécula. No necesariamente esto indicará que las moléculas tienen estructura cuaternaria en solución. Muchas veces se trata de dímeros cristalográficos, donde las interacciones intermoleculares están favorecidas por el empaquetamiento del cristal. Éste, por ejemplo, es el caso de la tiorredoxina de E. coli, (TRX), estructura PDB: 2TRX, en la que existen dos moléculas de TRX por celda unidad y sin embargo la proteína en solución es básicamente monomérica.*



Utilizando matemática, relativamente avanzada, mediante transformaciones (transformaciones de Fourier) que relacionan densidad electrónica en el espacio con el patrón de difracción, se ubican en el cristal las densidades electrónicas que dieron origen a los picos de difracción de rayos X.

Para generar el modelo de la macromolécula el científico deberá hacer encajar (ajustar) el modelo molecular en las densidades electrónicas halladas experimentalmente por difracción (ver **Figura 4-52**). El mapa de densidad electrónica es una excelente aproximación de la posición de los átomos en de la macromolécula.



El investigador tendrá a su disposición, para hacer el ajuste del modelo a la densidad electrónica, la secuencia exacta de aminoácidos de la proteína, una biblioteca con las estructuras químicas de los veinte aminoácidos y de las geometrías moleculares más comunes, por ejemplo la de los enlaces peptídicos. El encaje o ajuste del modelo se hará básicamente modificando ángulos, longitudes de enlace y ángulos diedros (torsionales). Las

modificaciones tendrán un costo energético y deberán satisfacer simultáneamente

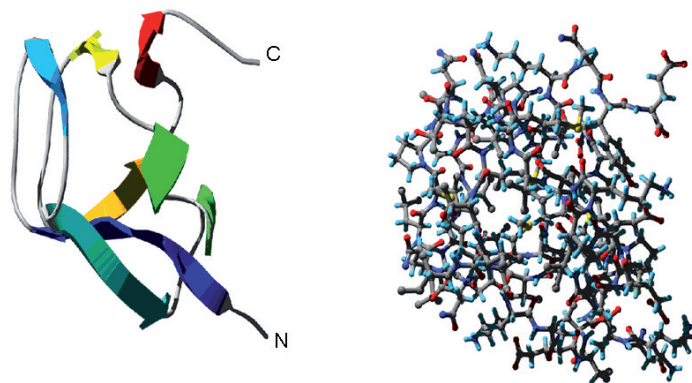
- El ajuste de la macromolécula a la densidades electrónicas
- Geometrías moleculares de menor energía

Así que, por lo general, los modelos cristalográficos se generan en función de las densidades electrónicas de los átomos de carbono (6 electrones) nitrógeno (7 electrones), oxígeno (8 electrones) y azufre (16 electrones) conocidos entre los cristalógrafos como átomos pesados.

En definitiva, un patrón de difracción proviene de una de la densidad electrónica y esta describe la estructura 3D de la macromolécula.

Cada *spot* en el patrón de difracción, a su vez, está determinado por una onda discreta de radiación electromagnética. Cada onda cuenta con una intensidad y una fase que describe su comportamiento. Al analizar el patrón de difracción vemos que lo único que podemos rescatar es una relación entre las intensidades

*Vale la pena resaltar que ciertos átomos ricos en electrones como el azufre y algunos metales como el hierro y el cobre serán muy efectivos como dispersores de rayos X, mientras que por el contrario, los átomos pobres en electrones, como los átomos de hidrógeno que comparten su único electrón en un enlace no serán buenos dispersores, al punto que, por lo general, la densidad electrónica asociada a los átomos de hidrógeno no podrá ser observada. Solo será posible en experimentos en los que la resolución es máxima, por lo general, por debajo de 1,0 Å (ver Figura 4-53).*



Proteína anticongelante de tipo III  
PDB: 1UCS

Figura 4-53. La estructura PDB: 1UCS, que corresponde a una proteína de la familia de las proteínas anti congelantes del grupo III, presentes en peces que sobreviven a temperaturas extremadamente bajas sin congelarse. Esta estructura posee una resolución increíblemente elevada de 0.65Å. A la izquierda una representación de cintas; en el panel de la derecha puede verse que la elevada resolución permite en este tipo de casos ubicar densidades electrónicas correspondientes a los átomos de hidrógeno.

de cada spot, pero en el camino hemos perdido las fases. Para reconstruir las densidades electrónicas debemos contar con ambas: con las intensidades y con las fases. El problema es encontrar la fase que corresponde a cada spot de difracción. Si bien no profundizaremos sobre este punto debe quedar claro que este es el principal problema con que se encuentran los cristalógrafos al punto que se puede ver que contar las fases adecuadas es mucho más importante que contar con las intensidades, las fases proveen la mayor parte de la estructura.

En la Figura 4-54 se muestra con un ejemplo el efecto de utilizar las fases correctas e intensidades incorrectas para reconstruir una imagen.

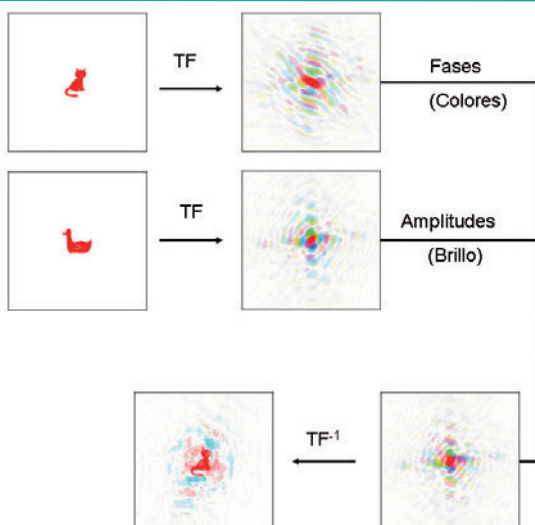


Figura 4-55. La importancia de las fases en cuanto a la información que éstas portan para la generación del modelo, en este caso una imagen. Se muestra el patrón de difracción o la transformación de Fourier (TF; que es una operación matemática equivalente) de la imagen de un pato y de la imagen de un gato. Podemos, entonces, utilizar el juego de fases exactas que dieron origen al patrón de difracción del gato y el juego de amplitudes exactas que dieron origen la difracción del pato. Si ahora hacemos la operación reversa, (creamos la imagen con intensidades de pato y fases de gato) obtenemos algo muy parecido al gato. En el patrón de difracción, los colores muestran las diferentes fases y el brillo del color indica intensidad. Reproducido por cortesía de Kevin Cowtan.



A esta metodología se la llamó **reemplazo isomórfico**, porque requiere que uno o unos pocos átomos pesados (cobre, uranio, oro, mercurio) estén específicamente ubicados en la unidad asimétrica; la presencia de estos átomos alterará el patrón de difracción modificando las intensidades de los haces dispersados pero sin afectar la estructura de la macromolécula ni su orientación en la celda unidad; sin afectar tampoco la estructura del cristal. Se deben adquirir datos de difracción del cristal nativo (sin átomos pesados) y del cristal con átomos pesados, que pueden incorporarse al mismo por difusión.

Este procedimiento permite ubicar los átomos pesados (mercurio o uranio) en la celda unidad y, como son sólo unos pocos átomos, se pueden usar estrategias que no se requieren información de las fases. Una vez que se ha determinado la ubicación de estos átomos, se pueden calcular las fases y las intensidades.

La contribución a la difracción de la proteína dependerá tanto de las fases que provienen de la proteína como de la fase de los átomos pesados; las intensidades se suman si ambos tienen la misma fase y se restan si tienen fases opuestas.

Si se conocen las fases de los átomos pesados puede, finalmente, estimarse las fases correspondientes a cada spot de difracción de la proteína.

Como de este procedimiento se obtienen 2 soluciones posibles por cada spot se realizan experimentos simultáneos con distintos metales. Así una única de estas dos soluciones será la real.

Existen otras metodologías que, en la actualidad, se utilizan más comúnmente. Muy resumidamente, las técnicas de reemplazo molecular usan modelos de estructuras homólogas de los que pueden calcularse fases esperadas: se desprenden fases iniciales que, luego, se optimizan en función de ajustes que tienen en cuenta el patrón de difracción obtenido experimentalmente. Otra metodología, ampliamente, usada es la dispersión anómala multi longitud de onda (MAD), requiere que los datos sean colectados a varias longitudes de onda, típicamente a tres longitudes, con el objetivo de evaluar efectos anómalos de absorción por parte de ciertos tipos de átomos. Estos efectos anómalos de absorción provocan diferencias de intensidades relativas para los spot de difracción de un único cristal al ser difractado con distintas longitudes de onda. Así puede calcularse la subestructura de átomos que producen MAD y, posteriormente, utilizar esas fases para calcular el resto. Una estrategia muy común para incorporar átomos que produzcan MAD y que estén ubicados selectivamente en el cristal es la incorporación de residuos de selenio metionina en lugar de metionina (se reemplaza el azufre por selenio).

Actualmente, uno de los mayores desafíos científicos consiste en estudiar estructuras de complejos multiprotéicos que van desde maquinarias de síntesis que incluyen polimerasas y ribosomas completos hasta virus. Sin duda comprender las bases de la función biológica a través del análisis estructural es parte de este gran desafío.

*Si bien, actualmente, existen varias soluciones, la primera, históricamente, que responde al problema de las fases, se implementó para cristales de hemoglobina y fue desarrollada por Max Perutz y John Kendrew en el año 1954 (quienes recibieron el premio Nobel de Química en el año 1962 por estos descubrimientos).*