

CAPÍTULO 4

DICROÍSMO CIRCULAR DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Lucrecia María Curto, Gabriela Elena Gómez y José María Delfino

4.1. La Naturaleza de la Luz Polarizada

La luz presenta una naturaleza dual de onda-partícula. Como onda electromagnética se la describe por la variación sinusoidal en el tiempo y a lo largo de la dirección de propagación de un campo eléctrico (E). Asociada a ésta, se describe la variación del campo magnético (B) en un plano perpendicular. Esta onda puede ser descripta por su amplitud (módulo máximo que alcanza el vector eléctrico) y por su frecuencia ν (número de oscilaciones del campo por unidad de tiempo). El período de una onda es el tiempo mínimo necesario para que el campo y su derivada alcancen los mismos valores en un punto fijo en el espacio (es la inversa de la frecuencia, $1/\nu$). La longitud de onda λ es la distancia lineal entre puntos equivalentes de ondas sucesivas, y equivale al producto entre c y el período, siendo c la velocidad de propagación de la luz en el vacío. Dada la constancia de c , el período y la longitud de onda quedan determinados para una onda de una dada frecuencia ν . Para todo el tratamiento que sigue, basta considerar solamente la evolución del vector eléctrico E .

En la luz natural (no polarizada), el vector E oscila en todos los planos posibles que incluyen la dirección de propagación de la onda (Figura 4.1). Por el contrario, si se selecciona un único plano de oscilación, obtendremos luz linealmente (o planarmente) polarizada (LLP). Intuitivamente, se puede concebir otra clase de luz polarizada en la que el vector E rota a lo largo de la dirección de propagación. Esta última luz se denomina circularmente polarizada (LCP) y existirán dos formas opuestas no superponibles de acuerdo con su

sentido de giro: LCP derecha e izquierda (se indicarán estas dos clases de luz por los subíndices R y L, de sus iniciales en inglés). Nótese que -a diferencia de la LLP- un polarizador lineal interpuesto frente a la onda no podrá distinguir entre luz no polarizada y LCP.

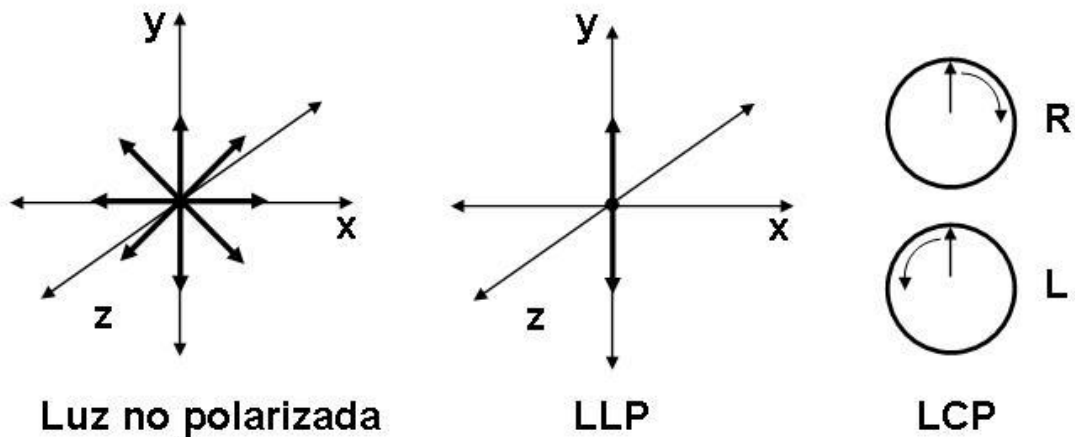


Figura 4.1. Naturaleza de la luz polarizada. Adaptada de Hammes, 2005.

En un experimento clásico de polarimetría, se utiliza LLP monocromática y se mide la desviación angular del plano de oscilación (α) luego de la interacción de la luz con una muestra de una sustancia asimétrica (ver, por ejemplo, Figura 4.2 en Hammes, 2005). Esta magnitud guarda una relación lineal con la concentración de tal sustancia (c) y con el paso de luz (l): $\alpha = [\alpha]_{\lambda T} cl$. La constante $[\alpha]_{\lambda T}$ es propia de tal sustancia para luz de la longitud de onda λ utilizada y a la temperatura T de la medición.

4.2. La Relación entre la Luz Plana y Circularmente Polarizada

Para entender intuitivamente la relación entre LLP y LCP analizaremos las dos afirmaciones siguientes. Para ello, nos valdremos de dos modos de representación (oblicuo o en perspectiva y frontal, Figura 4.2).

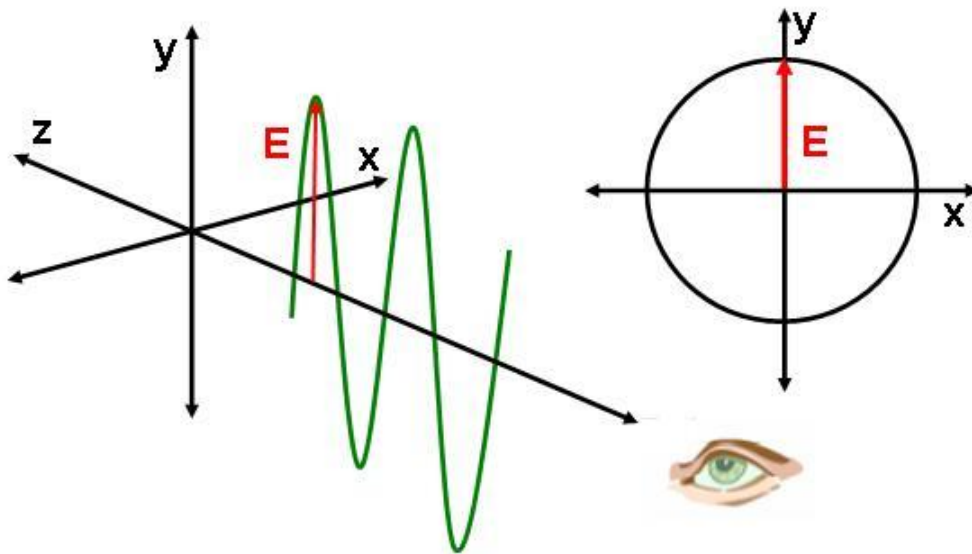


Figura 4.2. Representación en perspectiva (izquierda) y frontal (derecha) de un haz de luz linealmente polarizado.

1. Un haz de luz linealmente polarizado (LLP) resulta de la suma de dos haces circularmente polarizados (LCP) de signo opuesto (R y L) oscilando en fase (esto es, inicialmente ambos vectores coinciden en su posición). Este enunciado puede comprenderse fácilmente utilizando el modo de representación frontal si se considera que en un instante arbitrario, el vector E_R habrá avanzado un ángulo ϕ y el vector E_L , un ángulo $-\phi$. Luego de sumar ambos vectores por la regla del paralelogramo resultará LLP, y se verificará que el vector resultante siempre oscilará en el plano vertical yz . ¿Cuál sería el resultado en cambio, si dichos haces no estuvieran en fase? En este caso, el desfase inicial $\Delta\phi$ causará que en el mismo instante arbitrario uno de los vectores, por ejemplo E_R , se encuentre en la posición angular $\phi + \Delta\phi$, mientras que el otro, en $-\phi$. De este modo, la suma resultará también en LLP, pero puede demostrarse a partir de consideraciones geométricas que el plano de oscilación se habrá inclinado respecto del plano vertical un ángulo $\alpha = \Delta\phi/2$. Veremos más adelante que tal desfase es precisamente lo que ocurre a causa de la interacción de la LLP con la materia asimétrica.

2. La luz circularmente polarizada (LCP) resulta de la suma de dos haces de LLP perpendiculares entre sí y desfasados un cuarto de onda $+\frac{1}{4} \lambda$ ($= +\pi/2$). Este enunciado puede comprenderse si se emplea el modo de representación

oblicuo. Se dibujan sendos haces de LLP en los planos xz e yz , tal que se encuentren desfasados $+\frac{1}{4}\lambda$ en el origen. Así, el módulo de E de un haz de LLP alcanzará el valor de la amplitud en el punto en que el otro se anule. Como tal, será sencillo representar la suma de ambos vectores en esos puntos, luego de lo cual resultará obvio que el vector resultante describa el movimiento circular característico de la LCP. ¿Qué pasaría si el desfasaje fuese $-\frac{1}{4}\lambda$ ($= -\pi/2$)? Nótese aquí que dependiendo de cual haya sido el signo del desfasaje inicial ($\pm\frac{1}{4}\lambda$) obtendremos LCP de sentido derecho (R) o izquierdo (L). Así, el vector E de la luz resultante procederá hacia el observador rotando como una hélice en sentido horario (R) o antihorario (L). En cualquier caso, al cabo de avanzar una distancia igual a λ , el vector E adopta nuevamente la posición inicial. Por último, ¿cómo sería el haz resultante si ambos haces estuviesen en fase o desfasados media onda $1/2\lambda$ ($= \pi$)? En estos casos, ambas componentes de LLP alcanzarán valores máximos y nodos en los mismos puntos, de modo que la onda resultante será plana y oscilará en los planos sz o tz , donde s o t representan rectas contenidas en el plano xy que pasan por el origen a $+45^\circ$ o -45° respecto del eje y .

Como conclusión general de ambos ejercicios surge que *la LLP puede entenderse a partir de la suma de componentes de LCP, y viceversa*. Este punto resulta de particular importancia para comprender la función de la *celda de Pockels*, componente fundamental de un espectropolarímetro (ver Figura 4.6). Se encuentran animaciones didácticas de estos y otros ejercicios en el sitio www.enzim.hu/~szia/cddemo/ (consultado el 6 de agosto de 2013) del físico húngaro András Szilágyi.

4.3. La Interacción de la Luz Polarizada con la Materia

Al interaccionar con la materia, la luz puede dar origen a los fenómenos de dispersión, absorción, difracción, reflexión o polarización. Consideremos en primer lugar el caso de un haz incidente de LLP (en el plano arbitrario yz) sobre un *material asimétrico*. Aquí, cada uno de los componentes de LCP podría

sufrir *un diferente cambio de velocidad* en ese medio a consecuencia de la interacción. La medida física de tal cambio de velocidad está dada por el índice de refracción n (definido como el cociente de la velocidad de la luz en el vacío c y aquella en el medio c' : c/c' , donde $c' < c$). Así, se podrán definir índices para cada haz de LCP, que se denominarán n_L y n_R , y se cumplirá que $n_L \neq n_R$. ¿Cuál será el resultado observable de cumplirse tal condición? Naturalmente surge que el desfasaje $\Delta\phi$ -que describe el cambio de posición angular del vector- es consecuencia de tal cambio de velocidad, de modo que la luz resultante seguirá siendo LLP, pero su plano de oscilación se habrá inclinado un cierto ángulo $\alpha (= \Delta\phi/2)$ respecto del plano yz. Este ángulo α es aquél que se mide en un experimento de polarimetría (ver antes). Nótese que -por el contrario- el módulo del vector E no se altera, esto es, *no existe cambio en la intensidad* del haz al cabo de atravesar la muestra. En otras palabras, *no se experimenta absorción* del haz de luz. En forma general, la medida del ángulo α (o mejor dicho, la magnitud normalizada $[\alpha]_T$) a cada longitud de onda λ se denomina espectro de dispersión óptica rotatoria (ORD: Optical Rotatory Dispersion).

Consideremos ahora una situación diferente, en la que el sistema asimétrico sea capaz de *absorber diferencialmente cada componente de LCP*. Esto puede enunciarse como sigue.

3. *Un haz de luz linealmente polarizado (LLP) en que uno de los componentes de LCP (R o L) es absorbido diferencialmente por la muestra resultará en un haz de luz elípticamente polarizado.* Por razones de simplicidad, supongamos provisoriamente aquí que sólo ocurre absorción diferencial y no cambio de velocidad (aunque en realidad ambos fenómenos puedan darse simultáneamente, ver más adelante). Esta situación puede formalizarse con la condición $\varepsilon_R \neq \varepsilon_L$, donde ε_R y ε_L son los coeficientes de extinción para cada componente de LCP. ¿Cuál será la consecuencia sobre el módulo del vector E de tal fenómeno de absorción diferencial? Puede deducirse que si se cumple tal condición, entonces a partir de la ley de Lambert y Beer $A = \varepsilon cl$, la definición de Absorbancia $A = -\log(I/I_0)$ y la relación de la intensidad de luz I con la

amplitud de la onda $I \propto |E|^2$, surge que se *modificará diferencialmente la magnitud del módulo del vector eléctrico E*. Sumando nuevamente ambas componentes de LCP resulta *luz elípticamente polarizada* (LEP) (Figura 4.3). Aquí, el vector eléctrico evoluciona en el tiempo (o en el espacio) variando su módulo y posición tal que se describa una elipse.

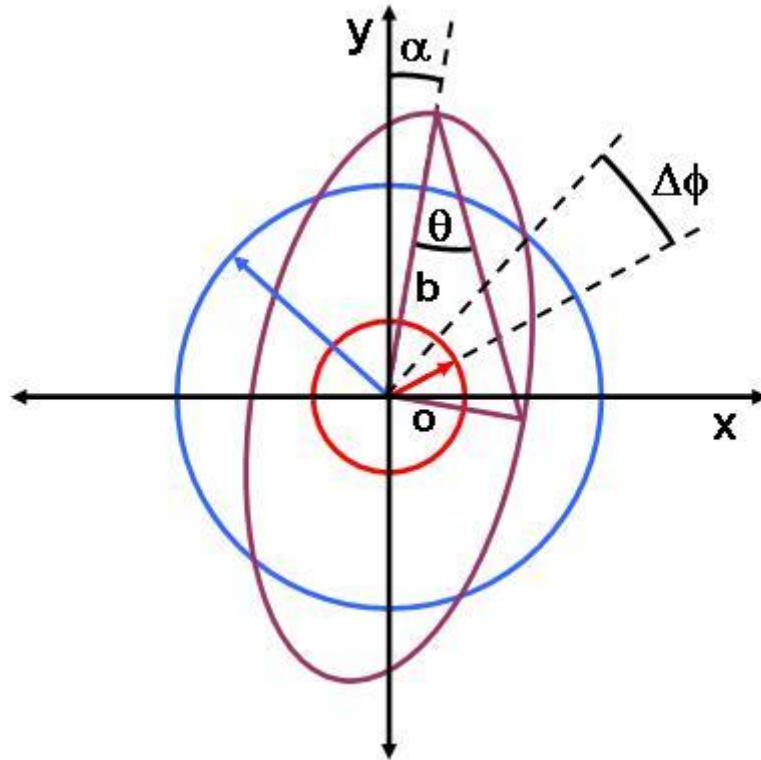


Figura 4.3. Representación frontal de luz elípticamente polarizada.

¿Cuál será la orientación del eje mayor de la elipse? Se advierte que el eje mayor de la elipse está incluido en el plano-*yz* de la LLP incidente. ¿Cuál sería el resultado si además ocurriese desfase entre los componentes de LCP (tal como está representado en la Figura 4.3)? Baste para ello cambiar la orientación angular de uno de los vectores componentes de modo que la resultante será una elipse cuyo eje mayor se encontrará inclinado respecto de la vertical. Esta última es la situación más general que resultará de la interacción de la LLP con la muestra de material asimétrico. Nuevamente, este fenómeno se describe mediante animaciones en el sitio www.enzim.hu/~szia/cddemo/ (consultado el 6 de agosto de 2013).

El fenómeno de *absorción diferencial* de LCP se define como *dicroísmo circular* (CD por *Circular Dichroism*). La magnitud del fenómeno puede cuantificarse de dos modos equivalentes. Uno es a partir de la medida del ángulo theta (θ) llamado *elipticidad*, representado como el ángulo (habitualmente medido en miligrados) definido entre el cateto mayor (semieje mayor b) y la hipotenusa del triángulo rectángulo interior a la elipse (por definición: $\theta = \arctg(o/b)$, donde o es la medida del cateto o semieje menor). Alternativamente, la medida de CD puede definirse como la magnitud $\Delta\varepsilon (= \varepsilon_R - \varepsilon_L)$ denominado *coeficiente de extinción diferencial*, derivado precisamente de la versión diferencial de la ley de Lambert y Beer: $\Delta A = \Delta\varepsilon cl$, donde $\Delta A = A_R - A_L$ y -como antes- la concentración de la sustancia es c y el paso de luz es l . Esta ley encuentra su correlato en la siguiente expresión: $\theta = [\theta]cl$, de uso generalizado en el ambiente bioquímico (ver más adelante). Valga destacar que puede considerarse la LCP como la forma más general de luz polarizada, pues en los extremos incluye como casos especiales la LCP (si $\theta = 45^\circ$, de modo que $o = b$) y la LLP (si $\theta = 0^\circ$, esto es, $o = 0$).

La medida del ángulo θ (o mejor dicho, la magnitud normalizada $[\theta]_T$) a cada longitud de onda λ se denomina espectro de dicroísmo circular (CD). A partir de consideraciones geométricas que incluyen las definiciones de elipticidad θ y Absorbancia A , y la relación $I \propto |E|^2$ ya vista entre la intensidad de luz y la amplitud de la onda, puede demostrarse que se cumple la relación $[\theta] = 3300\Delta\varepsilon$ a valores bajos de ángulo θ , donde resulta válida la aproximación de Taylor (Campbell, 1984). Las unidades de $\Delta\varepsilon$ y $[\theta]$ son $\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ y $^\circ\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, respectivamente. Más adelante trataremos con mayor detalle estas últimas unidades para el caso de péptidos y proteínas.

Desde un punto de vista conceptual es importante anticipar que -a pesar de que no resulte obvio a partir de una representación geométrica como la de la Figura 4.3 - existe sin embargo una relación biunívoca entre los espectros de ORD y de CD, esto es, entre las magnitudes angulares α (que mide la inclinación del eje mayor de la elipse) y θ (que mide la forma de la elipse). Tal

como se verá más adelante, ambos son *manifestaciones diferentes de un mismo fenómeno físico*, que es el de *la interacción de la luz polarizada con la materia asimétrica* (habitualmente constituida por *moléculas quirales*). En ORD, esta interacción se evalúa (de modo *dispersivo*) a partir del *cambio de velocidad* (índice de refracción) de los haces de LCP, mientras que en CD, la detección (en modo de *absorción*) consiste en evaluar el *cambio de amplitud* (coeficiente de extinción) de estos haces.

4.4. Las Condiciones Físicas para que Ocurra el Fenómeno de CD

Se puede definir un momento dipolar para cada transición electrónica. El dipolo que caracteriza la transición absorberá radiación oscilando en simpatía con la radiación aplicada. Esta oscilación presentará una cierta dirección asociada con ella, de modo que sólo aquellos componentes de la radiación que se encuentren *en la misma dirección del momento dipolar* causarán la transición. Efectivamente, la probabilidad de que ocurra este fenómeno será proporcional al coseno cuadrado del ángulo entre la dirección de la onda aplicada y la dirección del momento de la transición (Campbell, 1984).

Para que pueda observarse el fenómeno de CD, es preciso que se cumplan necesariamente dos condiciones: la molécula en cuestión (i) debe *absorber luz*, de modo que se define un *momento eléctrico μ* asociado a la transición electrónica y (ii) debe *ser asimétrica*, de modo que exista además un *momento magnético m* asociado a la transición. Esto último implica que se verifique en la transición *un desplazamiento neto circular de cargas* (Figura 4.4). De este modo podría visualizarse *una transición ópticamente activa* como un movimiento de cargas conforme a *un camino helicoidal*, resultante de un desplazamiento lineal (traslación) compuesto con un movimiento circular neto (rotación) de cargas entre los orbitales fundamental y excitado. Dado que toda hélice presenta un sentido único de giro (derecho o izquierdo), aquí reside la base que permite detectar transiciones ópticamente activas (Campbell, 1984).

A nivel molecular, el fenómeno podría representarse visualmente a partir de la asimetría de forma del orbital excitado respecto del orbital fundamental.

Así entonces, no toda transición electrónica será ópticamente activa, pues si la molécula no presentare asimetría, el momento magnético será nulo ($m=0$). En otras palabras, que una molécula absorba energía electromagnética no implica necesariamente que presente CD. Contrariamente, aunque la molécula sea asimétrica, si ésta no absorbiere luz, el momento eléctrico será nulo ($\mu=0$) y por esta obvia razón, tampoco presentará CD. En términos formales, el *producto escalar* de ambos momentos debe resultar en un valor distinto de cero (Cantor, 1980). Un tratamiento más detallado de los aspectos teóricos se encuentra en Rodger & Nordén (Rodger, 1997).

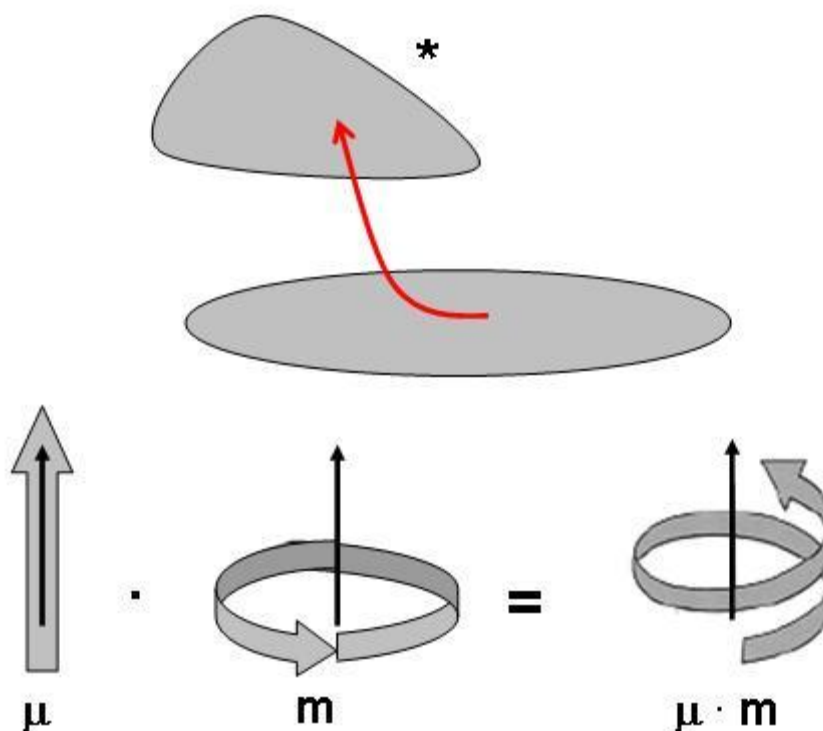


Figura 4.4. Condiciones necesarias para que se pueda observar el fenómeno de CD. Adaptada de Cantor & Schimmel, 1980.

En la práctica, ¿en qué caso se darán las condiciones para que ocurra CD? Cada vez que la molécula cumpla con la presencia de cromóforos quirales (aquellos que no puede superponerse con su imagen especular) en su estructura. Nótese, sin embargo, que esta asimetría puede provenir (i) de la propia estructura del cromóforo, o (ii) de su cercanía a un centro quiral, ya sea

por unión covalente, o (iii) por ubicación del cromóforo en un ambiente asimétrico, aunque pueda tratarse aún de una unión no covalente. En estas consideraciones reside el valor y la utilidad de la técnica de CD en química orgánica y bioquímica. Trataremos más adelante con ejemplos emblemáticos en el campo de la ciencia de péptidos y proteínas que ilustran estos conceptos.

4.5. El Efecto Cotton, Según se Manifiesta por ORD o CD

El efecto Cotton es la manifestación del fenómeno de interacción de la luz polarizada con una molécula quiral. Ya vimos que este fenómeno puede ser medido por ORD o por CD en un rango de longitudes de onda alrededor de la banda de absorción de la sustancia.

Debe destacarse que existe una relación matemática derivada de consideraciones cuánticas que relaciona ambas medidas. Esta conversión de un espectro de ORD en uno de CD y viceversa se formaliza en las transformadas de Kronig-Kramers:

$$[\alpha(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{[\theta(\lambda')]\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2}{\pi\lambda} \int_0^{\infty} \frac{[\alpha(\lambda')]\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad \text{Ec. 4.2}$$

De la primera ecuación surge que pueda conocerse un valor de ángulo de rotación α a una dada λ , si se integra convenientemente según la primera transformada el espectro de CD, esto es, los valores de θ en todo el rango de longitudes de onda λ . Inversamente, de la segunda relación surge que pueda calcularse el valor particular de elipticidad θ a una dada λ , si se integra según la segunda transformada el espectro correspondiente de ORD, esto es, los valores de α en todo el rango de longitudes de onda λ . De esta precisa relación surge que la información derivada de cada una de estas técnicas sea redundante, de modo que baste medir uno de los espectros para así conocer al

otro por cálculo. Gráficamente, para una transición dada estas relaciones se ilustran en la Figura 4.5.

Ante todo debe destacarse que compuestos enantioméricos presentarán espectros (ORD y CD) que serán imágenes especulares uno del otro. En cuanto a su forma, adviértase que el espectro de ORD se extiende a lo largo de un rango mayor de λ y presenta dos “alas” antisimétricas (de signo opuesto) que se unen en un punto central (λ_0) donde se anula el valor de α . Contrariamente, el espectro de CD para una dada transición presenta un único signo (positivo o negativo) y alcanza un valor máximo (o mínimo) a λ_0 . A ambos lados, el espectro de CD se extingue en un rango estrecho de λ . A $\lambda = \lambda_0$, el valor de elipticidad θ alcanza su valor absoluto máximo, esto es, la luz elíptica resultante presentará la máxima magnitud posible del semieje menor a , manteniendo alineado su semieje mayor b con el plano de la LLP incidente. Por otro lado, nótese que a $\lambda > \lambda_2$ y $\lambda < \lambda_1$ no existirá CD, esto es, la luz transmitida será plana, pero ese plano estará desviado hacia uno u otro lado respecto del plano de propagación yz de la LLP incidente, tal como muestra el espectro de ORD. Esta característica permite que se puedan efectuar mediciones de sustancias quirales (por ejemplo carbohidratos) por polarimetría a longitudes de onda más altas, esto es, alejadas de la zona donde ocurre el efecto Cotton. Así es posible lograr medidas confiables por polarimetría aún en regiones situadas por fuera del rango de absorción del compuesto, donde por ende no podrán observarse bandas de CD.

Hoy en día, CD se usa más frecuentemente que ORD debido a la disponibilidad de equipamiento superior y más sofisticado para su determinación (por la naturaleza alternada del modo de detección de la señal, ver más abajo), así como también por las características propias de las señales: se observan bandas más agudas y de un solo signo en el caso de CD. Esta característica redundante en un menor “spread”, lográndose de este modo un aumento de la resolución de los espectros y facilitándose así la tarea de asignación de bandas.

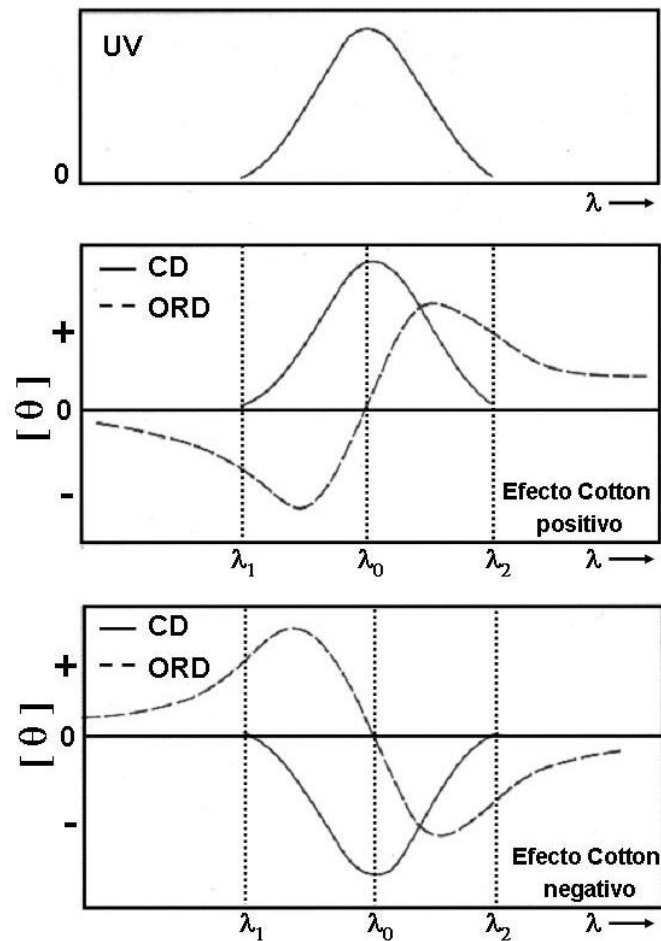


Figura 4.5. Efecto Cotton. Adaptada de Cantor & Schimmel, 1980.

4.6. La Instrumentación y la Práctica para la Medición de CD

El instrumento destinado a la medición de CD se denomina espectropolarímetro. Algunos fabricantes reconocidos de esta clase de instrumentos son Jasco (Japón), AVIV (Estados Unidos) y Applied Photophysics (Reino Unido).

El procedimiento descrito a continuación es el método de modulación, más comúnmente utilizado en aparatos comerciales, aunque existen otros como el de sustracción directa y el elipsométrico (Johnson, 1996).

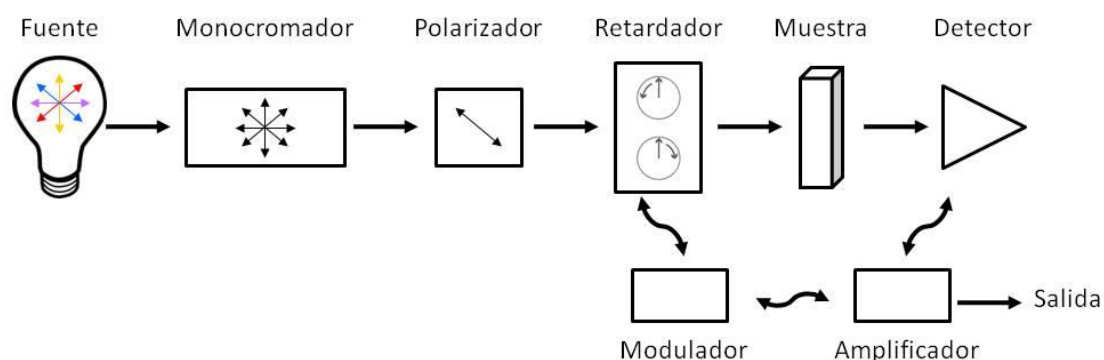


Figura 4.6. Componentes de un espectropolarímetro.

En el diagrama en bloques del instrumento (Figura 4.6) se representa en primer lugar la *fente de luz*, generalmente una lámpara de Xe, que emite luz intensa en un rango amplio 200-900 nm (opcionalmente extendido a la zona infrarroja cercana). Desarrollos más recientes hacen uso de la muy intensa radiación disponible en los sincrotrones para medidas de CD (Wallace, 2009), posibilidad que permite lograr medidas confiables en el rango ultravioleta denominado VUV (*vacuum UV*, $\lambda < 200nm$). Luego, se selecciona luz de cada longitud de onda por pasaje a través de un *monocromador* (prisma o red de difracción). A continuación, la luz atraviesa un *polarizador lineal* (que entrega LLP), antes de incidir sobre el *retardador oscilante de $\frac{1}{4} \lambda$* (modulador fotoelástico o celda de Pockels). Éste es un dispositivo electro-óptico que produce birrefringencia como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico oscilante generado por el *modulador*. Más precisamente, el campo eléctrico aplicado es de naturaleza alternante (CA) a una frecuencia aprox. 50 kHz de modo que -en función del signo del voltaje aplicado- un material piezoeléctrico producirá una vibración mecánica sobre el elemento óptico (usualmente cuarzo) que cambiará alternadamente su índice de refracción. La magnitud del voltaje CA determina la longitud de onda para la cual el dispositivo opera como retardador de $\frac{1}{4} \lambda$ (Johnson, 1996). Recuérdese en este punto la afirmación 2 discutida anteriormente que establece el modo por el cual la LLP se convierte en LCP. Así entonces, la luz que emerge de este dispositivo resulta en LCP de sentido izquierdo o derecho (dependiendo del voltaje aplicado a la celda de Pockels)

que incide sobre la *muestra*, pudiendo ser absorbidas de manera diferencial. Un *fotodetector* eficiente y muy sensible (tubo fotomultiplicador PMT) registra como una señal eléctrica la luz que le llega en función del tiempo. Esta señal incluirá un componente de CA (usualmente muy pequeño en magnitud) que será procesado por el *amplificador (lock-in amplifier)*. Para reducir el ruido, el amplificador utilizará la misma frecuencia que la modulación aplicada al retardador para procesar la señal proveniente del PMT. Así la magnitud de la señal CA será función de la diferencia entre las intensidades transmitidas de los haces derecho e izquierdo ($\propto I_R - I_L$) y la fase será sensible al signo de la señal de CD (positivo o negativo). Finalmente, la salida será la medida de la elipticidad θ (en miligrados, o su equivalente ΔA).

Si luego del pasaje a través de la muestra, cada componente de LCP no es absorbido o es absorbido en la misma medida, la combinación resultante regenerará LLP en el plano original. En cambio, si uno de los componentes de LCP se absorbe en mayor medida que el otro, la radiación resultante será elípticamente polarizada (LEP). Sin embargo, adviértase que la naturaleza de la detección en CD es muy diferente de la de un polarímetro (ORD) y que el método de modulación no evalúa directamente la naturaleza elíptica de la luz transmitida.

En general, los valores de θ medidos en la práctica son muy pequeños. En este sentido, en la mayoría de los trabajos biológicos es usual observar valores que alcanzan sólo ~ 10 miligrados. Utilizando la relación $\Delta A = \theta/33$ (similar a la vista antes), una simple cuenta nos revela que la *diferencia de Absorbancia de cada haz* está en el orden de 0.0003, una medición imposible para cualquier espectrofotómetro estándar. De aquí surge inmediatamente la necesidad de (i) amplificar la señal, acción que conduce inevitablemente a aumentar el ruido, y (ii) contar con procedimientos de detección de naturaleza alternante como el descrito más arriba. Además, para aumentar la relación señal/ruido (S/N) se recurre al promediado temporal en la colecta de datos por elección de una adecuada combinación entre la *constante de tiempo* de respuesta del equipo y la *velocidad de barrido*, dos parámetros de medición inversamente relacionados. Esto es, si se decide aumentar la primera para lograr mayor

relación S/N, se deberá obligatoriamente reducir (hacer más lenta) la segunda. Por otro lado, usualmente se promedian barridos y se aplican *a posteriori* métodos de suavizado digital (por ejemplo, filtros de Savitzky-Golay o de Fourier). Resulta ahora claro que se deba prestar atención especial a las condiciones experimentales de colecta de datos y al post-procesamiento de los mismos tal que se asegure la validez de las mediciones.

Por otro lado, es crucial que el espectropolarímetro sea calibrado regularmente. Particularmente, esto es definitorio para evaluar si ha ocurrido daño a la óptica, hecho que se traduce en errores en la intensidad y posición de los picos. Para este fin se utiliza habitualmente una solución acuosa de ácido (+)-10-canforsulfónico (CSA) o su sal de amonio por ser menos higroscópica (Takakuwa, 1985). Este compuesto permite una calibración en dos puntos ubicados en zonas críticas para la medición habitual con péptidos o proteínas. Específicamente, la sal de amonio de CSA muestra una banda positiva a 290,5 nm ($[\theta]_{290,5} = +7910 \text{ }^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$) y una banda negativa a 192 nm ($[\theta]_{192}/[\theta]_{290,5} = -2.03$).

Tal como se indicara en la sección anterior, dado que CD es una medida de una diferencia de absorción de luz, sólo se puede observar el fenómeno en la zona donde ocurren la(s) banda(s) de absorción. En cambio ORD, por tratarse de un fenómeno relacionado con el índice de refracción, como tal puede ser mensurable a longitudes de onda alejadas del máximo de absorción (Bloemendal, 1995). Esto puede resultar ventajoso en casos (por ejemplo, si el compuesto absorbe luz en zonas de difícil medida), pero no en general, pues obliga a evaluar la suma pesada del efecto de *todas las bandas de CD* para lograr una correcta interpretación. Además, tal como se vio antes, la detección por CD es técnicamente superior -y por ende, más sensible- que la de ORD. Así las cosas, ORD se usa sólo ya en raras ocasiones para el estudio de la estructura proteica. Antiguamente, el espectropolarímetro (por ejemplo, el modelo J-20 de Jasco) permitía la medida independiente -en canales ópticos separados- de los espectros de ORD o de CD. Hoy día, un espectropolarímetro moderno (por ejemplo, el modelo J-810 de Jasco) mide sólo CD y -si fuere

necesario- el *software* calcula el espectro de ORD mediante la transformación de Kronig-Kramers (ver sección anterior).

Desde el punto de vista operativo es muy importante asegurar un flujo alto y continuo de gas nitrógeno a través de la óptica del aparato y aún en la cámara de medición (especialmente para medidas por debajo de 200 nm). De otro modo, la generación de ozono a partir del oxígeno del aire puede dañar irreversiblemente los espejos del instrumento. Por otro lado, debe procurarse transparencia para todo aquel componente en la muestra que no sea la molécula a medir, esto es, los *buffers* y aditivos no deben absorber luz en el rango de medida (boratos o fosfatos son de elección, Tris es tolerable), o si lo hacen, deben mantenerse a la menor concentración posible (DTT o β -mercaptoetanol <1 mM, EDTA <0,1 mM). De este modo, la Absorbancia total de la muestra es un parámetro crítico a tener en cuenta para la calidad de los datos. Sólo se debe coleccionar el espectro en el rango de λ donde el detector (PMT) sea capaz de medir confiablemente la señal, eliminando toda región (típicamente hacia las menores λ) en que el voltaje aplicado al PMT supere el valor máximo permitido por causa de la excesiva absorción de la muestra. Esto significa que un número insuficiente de fotones lleguen al PMT, de modo que se comprometa la exactitud de la señal de CD medida.

Resulta fundamentalmente crítico determinar con precisión la concentración de la molécula de interés en la muestra. De otro modo, toda comparación entre muestras será inútil. En el caso de proteínas, deben extremarse los cuidados para lograr una medida confiable de la concentración a partir de la Absorbancia verdadera, libre de la influencia de material disperso que interfiera significativamente en la medida. Dada la conocida tendencia de muchos péptidos y proteínas a agregarse, causando que una solución verdadera se convierta en una suspensión coloidal que disperse luz, ésta es quizás una de las principales causas de error en las mediciones. No obstante lo anterior, si se logra saber con exactitud la concentración de la molécula, es posible efectuar medidas de CD aún en muestras que dispersen significativamente la luz, por ejemplo proteínas de membrana incluidas en micelas o liposomas. En este sentido, resulta aceptable la presencia de detergentes como MOPS, Lubrol,

SDS u otros. La relación S/N alcanza un valor óptimo en el rango de Absorbancia 0,6-1,2, pero para la muestra de interés resulta a menudo suficiente un valor de 0,3. Finalmente, para evaluar cualquier deriva (*drift*) instrumental es buena práctica intercalar blancos de solvente y repetir muestras de referencia entre las muestras incógnita.

4.7. El Valor de CD para Investigar la Conformación de Péptidos y Proteínas

La técnica de CD ha sido ampliamente utilizada para investigar aspectos de la conformación de péptidos y proteínas (Fasman, 1996). La preparación de la muestra y la medida misma no es mucho más compleja que la de una determinación espectrofotométrica convencional. El material utilizado no se transforma ni se destruye, de modo que es posible recuperarlo intacto al cabo de la medición. Habitualmente la medida de CD puede realizarse en condiciones “más fisiológicas” que aquellas utilizadas en cristalografía o NMR. Tal como se enfatizara antes, es preciso lograr una medida exacta de la concentración de la muestra proteica a partir de un valor confiable del coeficiente de extinción, o bien, en su defecto, a partir de métodos de referencia, tal como es el análisis de aminoácidos cuantitativo.

Fundamentalmente, CD se utiliza para (i) estimar el contenido global de estructura secundaria, (ii) detectar cambios conformacionales, y (iii) medir interacciones de ligandos (pequeñas moléculas o aún macromoléculas) o fases organizadas (por ejemplo, micelas o bicapas lipídicas) con los polipéptidos. Debe aclararse aquí que también CD ha sido muy empleado para evaluar la conformación y medir fenómenos de interacción en ácidos nucleicos y otras biomoléculas (ver ejemplos en Campbell, 1984; Fasman, 1996; Hammes, 2005), pero la discusión que sigue se limitará exclusivamente al caso de los péptidos y las proteínas.

Para proteínas se ha investigado extensamente la transición $N \leftrightarrow U$ entre el estado nativo (N) y el desplegado (U), incluyendo -en muchos casos- estados

intermediarios. La importancia fundamental de estudiar esta reacción radica en el hecho de que, en general, sólo el estado N está asociado a la función. Aquí reside la gran utilidad de CD para controlar el estado nativo de las proteínas, mediante un análisis simple y confiable que informa sobre el estado conformacional de un producto proteico para uso biomédico o industrial. Por otro lado, la funcionalidad de una proteína se manifiesta generalmente en su capacidad para unir ligandos específicos. Aquí nuevamente CD resulta de gran provecho, pues se puede evaluar cuantitativamente la unión: $N + L \leftrightarrow NL$. Ejemplos de esto último son la unión de sustratos y análogos a las enzimas, o la unión de agonistas, antagonistas y drogas a receptores, canales y bombas. Ante todo, para la medida de CD resulta importante distinguir dos regiones espectrales. La zona del *ultravioleta lejano*, que llamaremos operativamente UV_L (aprox. 180-250 nm), contenida en las regiones FUV (*far UV*) y MUV (*middle UV*). Para esta zona habitualmente se utilizan cubas de 1 mm de paso y aún menor (0,5 o 0,1 y hasta 0,05 o 0,01 mm) si fuere preciso extender la medida a la zona UV de muy bajas longitudes de onda (VUV o *vacuum UV*). La zona del *ultravioleta cercano*, que llamaremos UV_C (aprox. 250-340 nm), contenida en las regiones NUV (*near UV*) y MUV, y que no deberá confundirse con la región denominada UVC. Aquí típicamente se usan cubas de 1 cm de paso óptico, y mayores (de hasta 5 y 10 cm) en caso de ser necesario detectar señales muy débiles. Dado que el contenido de información en un espectro crece significativamente a menores longitudes de onda, si fuere posible, debe procurarse coleccionar datos hasta regiones cercanas o aún menores a 190 nm. En equipos modernos de laboratorio puede alcanzarse el límite de 184 nm, y actualmente se logran mediciones a λ aún menores si se utiliza radiación sincrotrón (Wallace, 2009).

Tal como se señalara anteriormente, para que un compuesto presente señal dicroica éste debe ser (o contener) un cromóforo quiral, o bien, si no fuere así, por interacción con grupos vecinos el cromóforo aquiral deberá adoptar una disposición o ubicarse en un ambiente químico que induzca asimetría. Sobre la base de que las proteínas son polímeros de L-aminoácidos que contienen cromóforos (amidas del enlace peptídico, grupos aromáticos y puentes

disulfuro) (Figura 4.7), naturalmente se originarán estructuras asimétricas que darán origen a señales dicroicas. De este modo, del análisis del espectro de CD en la región UV podrá obtenerse rica información estructural sobre la conformación de la molécula proteica.

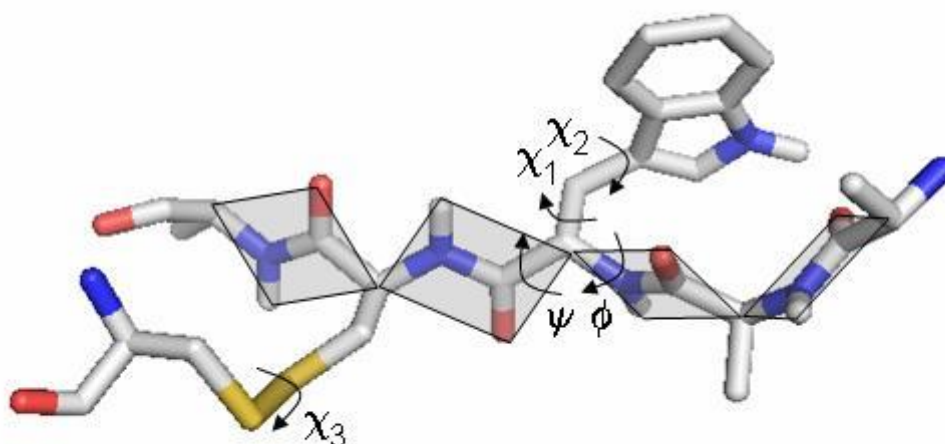


Figura 4.7. Detalle de las posibles conformaciones de los enlaces peptídicos.

4.8. La Región UV Lejana y la Estructura Secundaria

El espectro de CD en la región UV_L informa sobre el *contenido global de estructura secundaria*. El principal cromóforo que contribuye señal en esta región es el enlace peptídico. Este grupo funcional presenta dos transiciones: $n\pi^*$, débil, ancha y centrada en aproximadamente 210 nm y otra $\pi\pi^*$, que es intensa, aguda y está centrada en aproximadamente 190 nm. La interacción entre los planos representados por los enlaces peptídicos dependerá de su disposición relativa, que será diferente (y quiral) de acuerdo con el tipo de estructura secundaria que adopte la cadena, por ejemplo el sentido derecho de la hélice α o la casi completa inversión de los planos en una hebra β . Este hecho da origen a espectros diferentes de CD (Figura 4.8). Aquí se muestran las diferencias entre los dos tipos más frecuentes de estructura secundaria (α y

β), y entre éstos y el de una cadena desordenada (*r. random coil* u ovillo al azar).

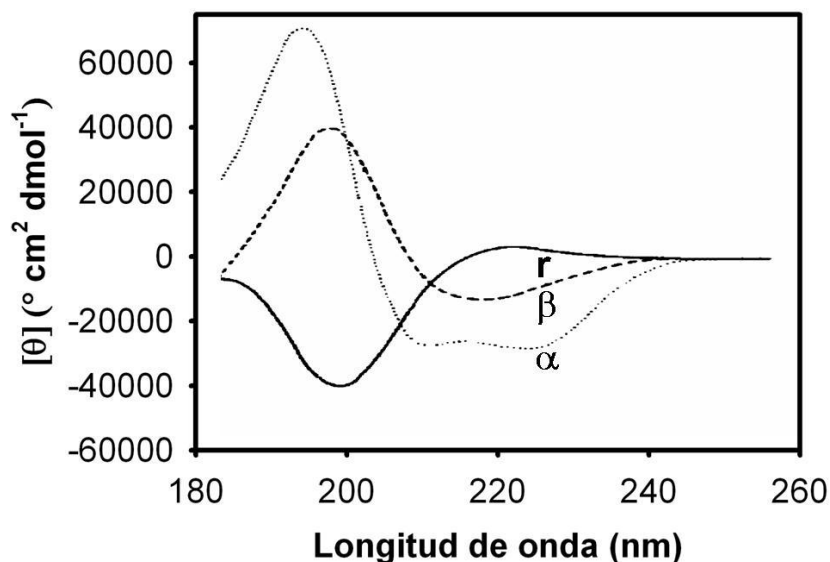


Figura 4.8. Espectros típicos para las estructuras secundarias α y β . También se muestra una cadena desordenada. Adaptada de Brahms & Brahms, 1980.

En forma característica, la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm y de un máximo a ~190 nm da cuenta de la existencia de estructura α helicoidal. En cambio, un único mínimo a ~215 nm y un máximo cercano a ~195 nm dan indicio de contenido preponderante de hoja β . En este caso, la diversidad de estructuras β -paralela, antiparalela y mixta, que definen superficies de variada curvatura- da origen a espectros que difieren considerablemente. Muy distinto a los anteriores es el caso de la estructura desordenada, que presenta una banda débilmente positiva por encima de 210 nm y es fuertemente negativa a λ menores.

Como ejemplos de lo antedicho, en la Figura 4.9 se muestran los espectros de CD en la zona UV_L de la hormona de crecimiento humana (hGH), una proteína *todo α* de la clase *manejo de cuatro hélices* (*four helix bundle*, panel A); la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP), un dominio predominantemente β (panel B); y un péptido desestructurado en solución acuosa derivado de la lisozima humana (panel C) (Iannucci, 2013).

Si bien en dicha figura resulta fácil advertir por simple inspección visual la contribución al espectro experimental de los distintos tipos de estructura secundaria mencionados, en casos en que la estructura comprenda distintos motivos (por ejemplo, proteínas de la clase α/β ó $\alpha+\beta$) puede resultar más difícil la asignación inequívoca del contenido de cada tipo de estructura secundaria. Por otro lado, nótese que por ser CD una medida *global y poblacional*, no es posible asignar estructura secundaria a regiones específicas de la molécula. Para facilitar la comparación entre espectros de proteínas o péptidos de diferente peso molecular (*MW*), se utiliza la magnitud *MRW* (*mean residue weight*): $MRW = MW/(\#res - 1)$, para expresar la masa de la muestra, donde el denominador representa el número de enlaces peptídicos de la cadena. Finalmente, se han adoptado por razones históricas las siguientes unidades de elipticidad $[\theta]$: $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$, donde la concentración proteica se expresa en dmoles de residuo de aminoácido promedio por cm^3 .

4.9. Estimación del Contenido de Estructura Secundaria

Para este propósito se han desarrollado numerosos métodos empíricos de deconvolución. La premisa básica consiste en que -así como puede definirse una estructura proteica en términos de los componentes de estructura secundaria que la constituyen- también puede pensarse en un espectro de CD como la resultante de la combinación lineal (se supone aditividad) de las contribuciones (independientes) de cada uno de los tipos de estructura secundaria presentes. Así, para cada λ vale la expresión:

$$[\theta(\lambda)]_{MRW} = \sum_{k=1}^N f_k [\theta(\lambda)]_k \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde $[\theta(\lambda)]_{MRW}$ es la elipticidad θ media por residuo de aminoácido, $[\theta(\lambda)]_k$ es el espectro de base para cada tipo k de estructura secundaria (por ejemplo, α , β , t : *turn*, o : “otra”, que incluye el ovillo al azar) y f_k es la *fracción o proporción*

de residuos en la proteína que adoptan el tipo k de estructura secundaria. Para el cálculo, se imponen además las restricciones $\sum_{k=1}^N f_k = 1$ y $f_k \geq 0$. En la aproximación más simple, se trata entonces de ajustar las expresiones anteriores al espectro experimentalmente observado mediante regresión no-lineal. Como resultado se obtendrán las fracciones f_k de estructura secundaria (Venyaminov, 1996; Greenfield, 2006c). Entre los métodos utilizados para este fin se cuentan PG (Provencher/Glückner), HJ (Hennessey/Johnson), SSE, CONTIN, BELOK, VARSLC 1, SC (*self-consistent*), LINCOMB/CCA (*convex constraint analysis*), BPNN (que usa redes neuronales), SOM-BPN y PROT CD. Un sitio de referencia es DICHROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, consultado el 6 de agosto de 2013), lugar en que pueden ingresarse datos espectrales para su tratamiento. También se ha establecido el banco de datos espectrales PCDDB (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php>, consultado el 6 de agosto de 2013). Un punto crucial aquí consiste en cómo establecer los espectros característicos para cada tipo de estructura secundaria. A grandes rasgos, para este propósito se han utilizado dos clases de métodos: (i) aquellos basados en espectros de referencia obtenidos a partir de polipéptidos modelo, y (ii) otros basados en proteínas de estructura conocida. Los primeros (Greenfield & Fasman, citado por Venyaminov, 1996) utilizan polímeros tales como poli-Lys o poli-Glu, que experimentan transiciones hélice-ovillo (*helix-coil*) dependientes del pH. El problema aquí es la incertidumbre en la elección de aquellos polipéptidos que sirvan como modelo y la conocida dependencia con el largo de las hélices, hebras u ovillos, que habitualmente son más cortas en las proteínas.

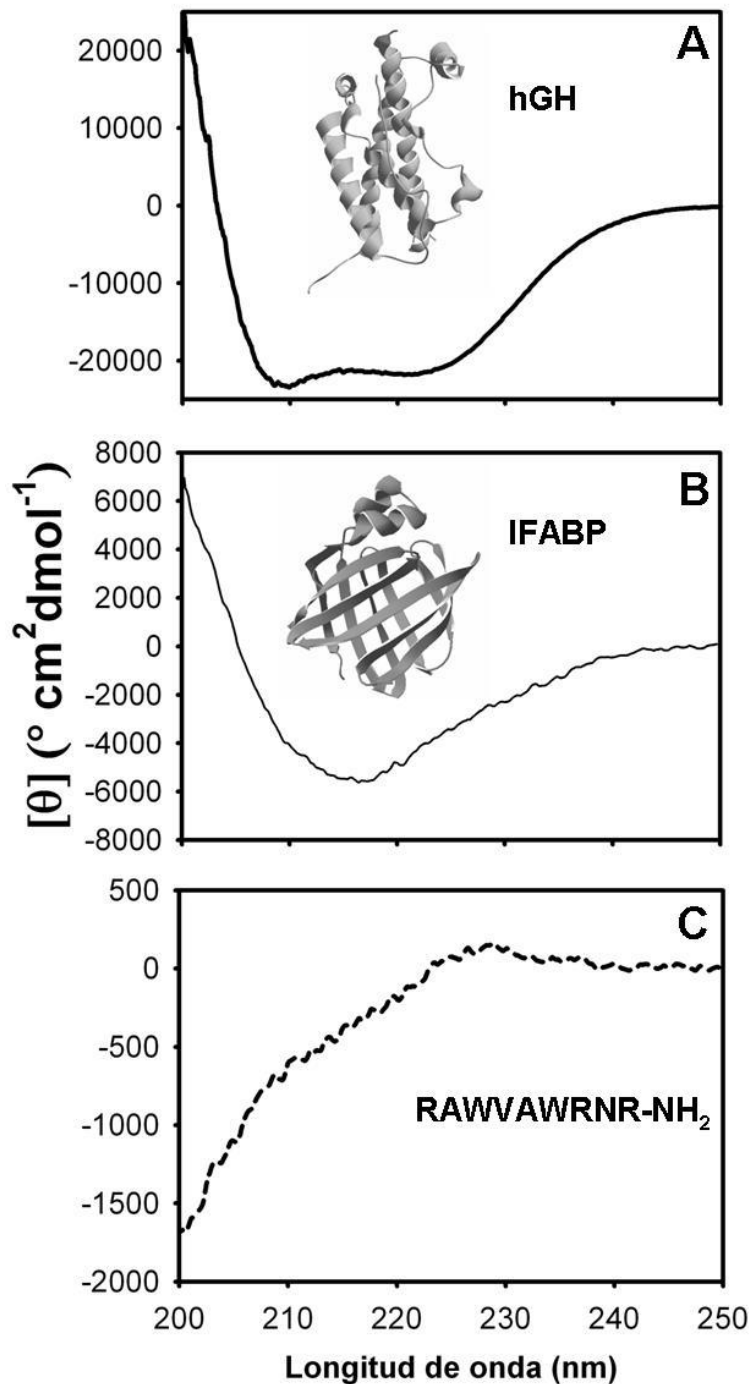


Figura 4.9. Espectros en el UV_L de: A) hormona de crecimiento humana (hGH); B) la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP) y C) un péptido desestructurado en solución acuosa derivado de la lisozima humana.

Los métodos de la segunda clase (Saxena & Wetlaufer; Chen y col., citados por Venyaminov, 1996) utilizan espectros de proteínas cuya estructura tridimensional sea bien conocida (estructuras depositadas en el banco pdb:

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, consultado el 06 de agosto de 2013) para definir el conjunto de base (*basis set*) de espectros correspondientes a hélice α , hoja β y el “resto”. Con esta estrategia se sortea el problema mencionado antes de la dependencia con el largo, pues el análisis está sustentado sobre proteínas reales. No obstante, existen problemas derivados del reducido tamaño del conjunto de proteínas utilizadas como referencia, la falta de distinción entre hélice α y otras hélices (por ejemplo, 3_{10}) y -más importante aún- la hoja β resulta un promedio estadístico entre contribuciones de hoja paralela y antiparalela de variada distorsión, y constituidas por un número variable de hebras de distinto largo. Así, existen factores estructurales propios de las moléculas peptídicas y proteicas que contribuyen a disminuir la exactitud del resultado. De este modo, la confiabilidad de los métodos de deconvolución es mayor si se trata de proteínas ricas en estructura α que si predomina la estructura β . En general, la confianza en la asignación cuantitativa de los distintos tipos de estructura secundaria dista de ser uniforme (conforme al orden $\alpha > r \gg \beta \gg t$) y el contenido de información del espectro depende fuertemente de cuán lejos en la región UV_L haya podido lograrse la colección de datos (idealmente hasta 184 nm). Las estimaciones del contenido de estructura secundaria son sólo aproximadas, prueba de ello es que la aplicación de varios métodos sobre el mismo espectro experimental puede conducir a resultados significativamente diferentes. Además, aunque la absorción en la zona UV_L está ciertamente dominada por el enlace peptídico, se ha demostrado que aportan contribuciones significativas y variables los puentes disulfuro (en el rango 240-290 nm) y las cadenas laterales aromáticas, fundamentalmente de los residuos de Trp y Tyr ubicados en ambientes estructurados (Chakrabarty, 1993). A menudo, los métodos adolecen del problema de ignorar estas contribuciones. Particularmente, por su utilización generalizada como parámetro de estructura, debe ejercerse especial precaución cada vez que se evalúen las contribuciones a $[\theta]_{222}$ (ver luego).

4.10. La Región UV Cercana y la Estructura Terciaria

El espectro de CD en la región UV_c es único y característico de cada proteína (huella digital o *fingerprint*) y refleja mayoritariamente las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas (y puentes disulfuro) ubicadas en ambientes estructurados. Así, las características espectrales aquí reflejarán aspectos de la *estructura terciaria* de la proteína. Esta última característica es sumamente útil para la comparación de la estructura terciaria entre proteínas relacionadas, por ejemplo entre una variante *wild type* y mutantes puntuales, o entre muestras de la misma proteína obtenidas de la fuente natural o en forma recombinante. La Figura 4.10 ilustra espectros de proteínas (hGH e IFABP) en esta región. El péptido desestructurado (ver Figura 4.9, panel C) no presenta señal alguna en esta zona espectral.

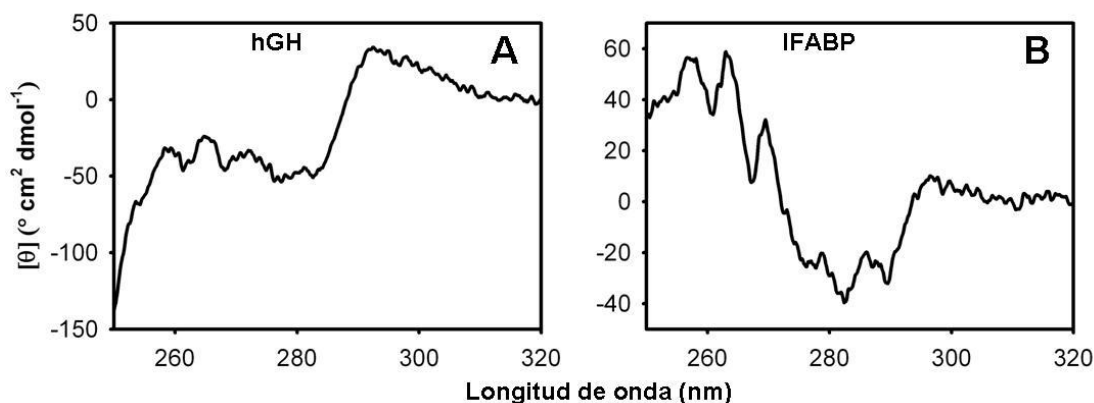


Figura 4.10. Espectros de proteínas en el UV_c: A) hGH y B) IFABP

Las cadenas laterales de los residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe, His) incluyen cromóforos planos (ópticamente inactivos *per se*), que son causantes de bandas de CD en el rango 250-290 nm por su ubicación en el ambiente químico asimétrico dado por la estructura terciaria compacta, característica del estado nativo de la proteína (Woody, 1996). Sumado a estas contribuciones se encuentra el residuo de cistina (el dímero de cisteína) que aporta bandas débiles centradas a ~280 nm cuyo signo depende de la quiralidad del puente disulfuro (la torsión χ_3 está generalmente restringida a ángulos de aproximadamente +90° o -90°) (Srinivasan, 1990). Varios factores influyen

sobre la intensidad de las bandas asignadas a los residuos aromáticos: (i) la rigidez de la proteína, siendo menor la intensidad cuanto mayor es la movilidad; (ii) las interacciones entre los grupos aromáticos, que se torna muy importante a distancias menores que 1 nm; y (iii) el número de grupos aromáticos. Téngase en cuenta que aún proteínas con un número elevado de aminoácidos aromáticos pueden presentar baja señal por efecto de cancelación entre señales positivas y negativas.

Adicionalmente, componentes no proteicos, esto es, grupos prostéticos o cofactores (por ejemplo, hemo, flavinas, etc.), o quelatos de metales de transición (por ejemplo, Cu o Co) en metaloproteínas pueden dar lugar a señales de CD características. Estas pueden proveer información valiosa acerca del entorno proteico asimétrico de estos cromóforos. Como ejemplos, proteínas coloreadas -tales como mioglobina o bacteriorrodopsina- también absorben luz visible -y por quiralidad propia o del ambiente químico- pueden originar señales de CD en esta región espectral.

4.11. Cambios Conformacionales en Proteínas

Entre las técnicas experimentales más utilizadas en biofísica para evaluar la reacción de plegado $N \leftrightarrow U$ -esto es, el equilibrio entre el estado nativo N y la colección (*ensemble*) de formas desplegadas U - la medida del cambio en el espectro de CD ocupa un lugar central por su extrema sensibilidad al cambio conformacional. Cada una de las técnicas (por ejemplo, CD, fluorescencia, exclusión molecular por tamaño, etc.) provee una señal característica (Y) que contiene información sobre la *naturaleza* y la *abundancia relativa* de las especies involucradas en la reacción. A través de la medida de Y en cada muestra donde el equilibrio $N \leftrightarrow U$ se haya perturbado -ya sea por la presencia de agentes caotrópicos como la urea o el cloruro de guanidinio, o por la variación de la temperatura o la presión hidrostática (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b) - se puede inferir la presencia y cuantificar las especies en equilibrio. En el caso más simple de un equilibrio en dos estados (*two state*)

perturbado por un agente químico D , esto es, donde sólo coexistan las especies N y U , la señal Y podrá expresarse como $Y = f_N Y_N + f_U Y_U$ y de aquí inferirse la fracción desplegada $f_U (= 1 - f_N)$ de proteína como la relación $f_U = (Y - Y_N)/(Y_U - Y_N)$. Con los datos obtenidos es posible hallar el valor de las constantes termodinámicas de la reacción ($K_{eq} = f_U/f_N$, $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$ y $\Delta G^0 = \Delta G_{H_2O}^0 + m[D]$) y además el parámetro m que refleja la cooperatividad de la transición. En experimentos en función de la temperatura, se pueden derivar además las magnitudes ΔH^0 y ΔS^0 . Más allá de su valor propio, estos parámetros termodinámicos permiten definir la *estabilidad relativa* de la conformación proteica, una propiedad de fundamental importancia práctica en biotecnología a la hora de evaluar un producto proteico.

Medir la evolución de los espectros de CD en las regiones UV_L y UV_C en función de la perturbación física o química impuesta permite distinguir la existencia de especies intermediarias en el equilibrio. Recuérdese aquí que la señal de CD en la región UV_L (por ejemplo, $[\theta]_{220}$) informará sobre cambios en la estructura secundaria, mientras que la señal en la región UV_C ($[\theta]_{270}$) lo hará sobre cambios en la estructura terciaria. Habitualmente, y con el fin de explorar este equilibrio desde otra perspectiva, las mismas muestras pueden ser analizadas también por sus propiedades de fluorescencia intrínseca (por ejemplo, por la intensidad y/o máximo de emisión).

La Figura 4.11 ilustra el caso de dos proteínas muy relacionadas por su conformación (aunque disímiles en secuencia) -lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) y α -lactalbúmina bovina (α -LA)- que exhiben mecanismos de plegado muy diferentes (Uversky, 1993).

Mientras que la primera muestra una típica transición simple en dos estados, caracterizada por *la coincidencia de las señales en las zonas UV_L y UV_C , la disociación entre estas señales* en el caso de la segunda evidencia la presencia de especies intermediarias en el equilibrio. Un típico caso de especie intermediaria es el así llamado glóbulo fundido (*molten globule, MG*), una forma emparentada con el estado nativo N , pero levemente expandida, que muestra movimiento interno incrementado de las cadenas laterales de los aminoácidos

hidrofóbicos del *core* proteico. Como tal, en este estado *MG* persiste la señal de CD en la región UV_L , pero se pierde la señal en la región UV_C .

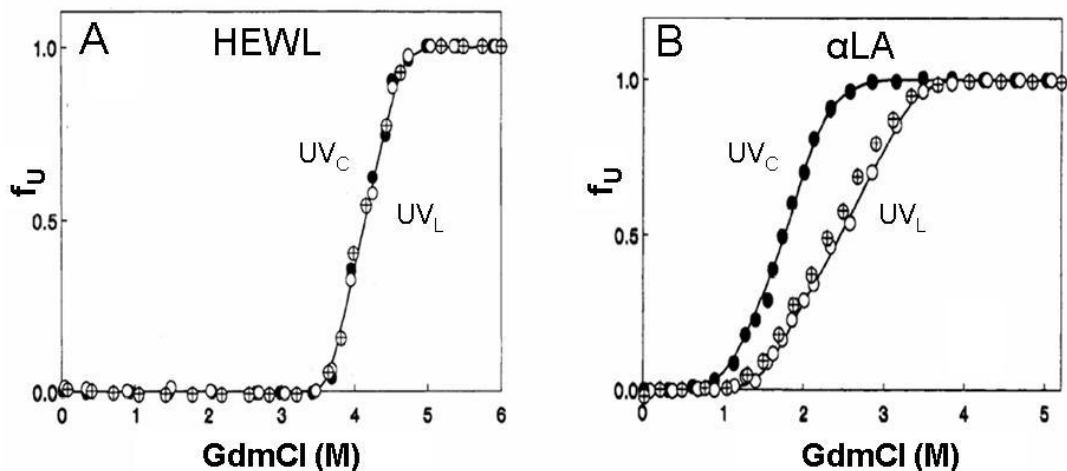


Figura 4.11. *Transiciones en el equilibrio para dos proteínas: A) HEWL y B) α LA*

Un tratamiento general y detallado de los datos espectrales para extraer valores de los parámetros termodinámicos está fuera del foco de este capítulo. Para aquellos interesados, se recomienda la lectura de las referencias de Schmid (Schmid, 1989), Pace & Shaw (Pace, 2000) y Greenfield (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b).

Finalmente, valga señalar que también es posible efectuar otro tipo de experimentos en que se perturba el sistema y se mide la *evolución temporal* (*cinética*) de la señal. Para estos últimos, se monta sobre el espectropolarímetro un aparato para *mezclado rápido de flujo interrumpido* (*stopped flow*), que permite preparar muestras y tomar mediciones en el orden de milisegundos (Greenfield, 2006d). Así, se ha estudiado la cinética del plegado de citocromo c, HEWL y α -LA, por mencionar sólo algunos ejemplos pioneros (Kuwajima, 1996).

4.12. Interacción de Proteínas con Ligandos

La exquisita sensibilidad de la señal de CD al ambiente químico puede utilizarse con provecho para la medición de fenómenos de interacción de ligandos con proteínas. En la unión de una proteína P con un ligando L para rendir un complejo PL : $P + L \leftrightarrow PL$, gobernada por la constante de unión $K_{asoc} = [PL]/[P][L]$, es posible en muchos casos evaluar cuantitativamente la forma unida del ligando (PL) en la mezcla en equilibrio, cuando se trate de un ligando cromóforo aquiral, dado que sólo aparecerá señal dicroica inducida si éste se ubica en el ambiente asimétrico provisto por la cavidad de unión en la proteína. Complementariamente, mediante una simple medida espectrofotométrica sobre la misma muestra podrá evaluarse la *concentración total* del ligando ($[L]_{total} = [L] + [PL]$). De este modo, surge inmediatamente que será posible estimar la afinidad K_{asoc} mediante medidas a cada $[L]_{total}$ y $[P]_{total}$ ($= [P] + [PL]$) ensayadas, *sin necesidad de separar la fracción de ligando unida de la libre*.

Sirvan los ejemplos siguientes para ilustrar los conceptos anteriores.

Ejemplo 1: La unión de la sonda anilino naftalén sulfonato (ANS) a IFABP induce una banda positiva centrada a 335 nm, que se incrementa con la concentración del ligando (Figura 4.12) (Arighi, 2003). Nótese que hay otros cambios de forma e intensidad en bandas ubicadas en el rango 250-300 nm, pero éstas probablemente representan la contribución mixta de transiciones aromáticas de la proteína y bandas inducidas por la sonda. El inserto muestra la evolución de la elipticidad a 335 nm en función de la concentración total del ligando presente, en una zona donde sólo absorbe este último. Así se determinó una constante de unión de $12,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$, que coincide con aquella estimada por fluorescencia.

Ejemplo 2: A menudo sucede que el fenómeno de unión conlleva una alteración en la conformación de la proteína. Esta situación puede también utilizarse con provecho para medir la afinidad por el ligando. Consideremos el caso de la unión de Ca^{2+} a calmodulina (Figura 4.13) (Gómez y col., resultados no publicados).

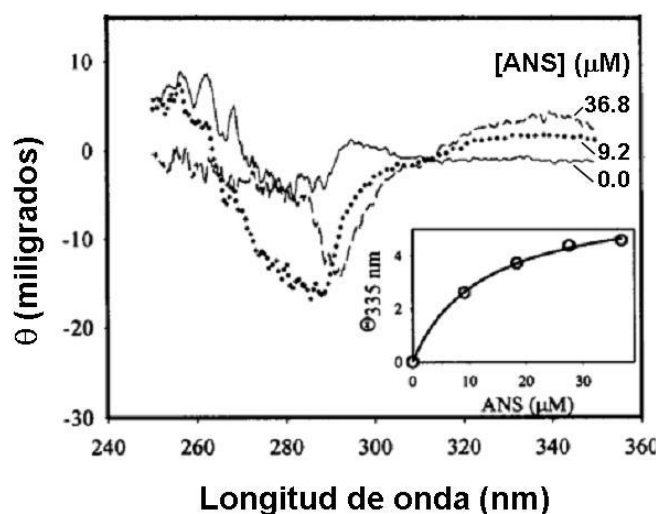


Figura 4.12. Inducción de bandas en el UV_C por unión de ligandos a IFABP

El ión calcio es un ligando “invisible” al CD, pues no presenta absorción UV. Sin embargo, a través de su efecto pronunciado sobre la proteína -en particular sobre los cromóforos aromáticos de Tyr (bandas a 279 y 286 nm) y Phe (bandas a 261 y 268 nm)- es posible evaluar la variación de la señal dicroica de la proteína en el rango UV_C. Los cambios espectrales atribuibles a Tyr y Phe ocurren en forma paralela, reflejando la presencia de estos residuos en cada uno de los sitios ubicados en el dominio C-terminal que unen Ca²⁺ con alta afinidad. Estos cambios se estabilizan una vez que el ión alcanza a saturar estos sitios (Crouch & Klee, citado por Woody, 1996). Notablemente, el efecto de agregar Cd²⁺ en lugar de Ca²⁺ mimetiza estos efectos, implicando así un cambio conformacional idéntico en la proteína (resultados no mostrados).

Ejemplo 3: El fenómeno de unión del ligando oleato con IFABP y una forma abreviada de esta proteína, Δ98Δ (Curto, 2009) se ilustra en la Figura 4.14. Pueden encontrarse semejanzas con el ejemplo anterior en tanto oleato no absorbe luz en el rango medible. Aquí se muestra el efecto moderadamente estabilizante sobre la proteína de la adición del ligando, medida por la evolución de la señal dicroica a 216 nm en función de la concentración del caótropro cloruro de guanidinio (GdmCl). Una vez transformados los datos espectrales en la fracción nativa f_N (ver antes), se evidencia que: (i) la forma Δ98Δ se despliega cooperativamente, (ii) es menos estable que IFABP, pero

(iii) resulta estabilizada en mayor medida por el ligando ácido graso. En $\Delta 98\Delta$, el evento de unión resultaría crítico para estabilizar contactos de cadenas laterales que conducen al reajuste de la estructura terciaria.

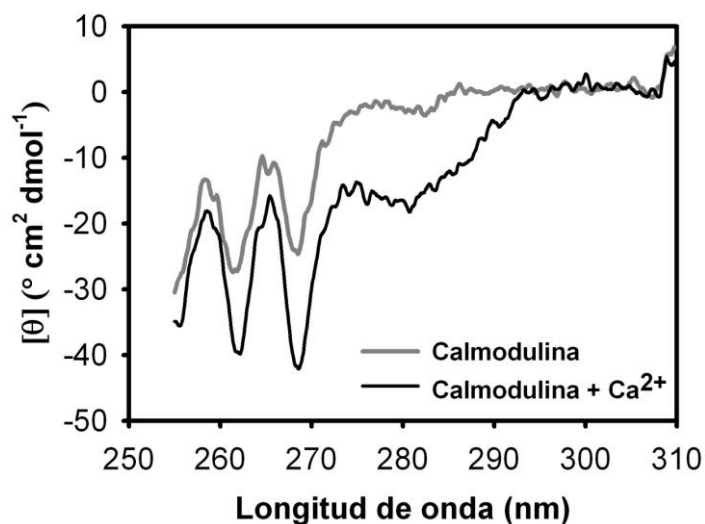


Figura 4.13. Inducción de bandas en el UV_C por unión de calcio a Calmodulina

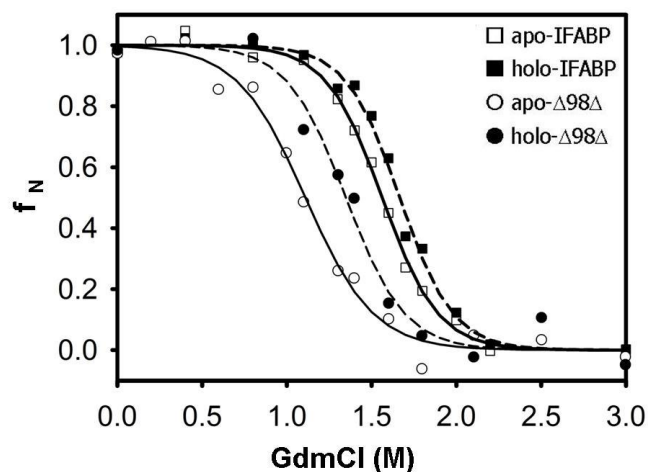


Figura 4.14. Efecto de la unión del ligando ácido oleico sobre la estabilidad de IFABP y $\Delta 98\Delta$

Ejemplo 4: La consolidación de la estructura terciaria de una proteína puede ocurrir a partir del evento de reconocimiento mutuo entre fragmentos de la misma. Éste es el caso del péptido 94-108 de la tiorredoxina de *E. coli* (TRX), que al enfrentarse al fragmento mayor 1-93 es capaz de constituir un complejo no covalente semejante al estado nativo intacto de la proteína, recuperándose

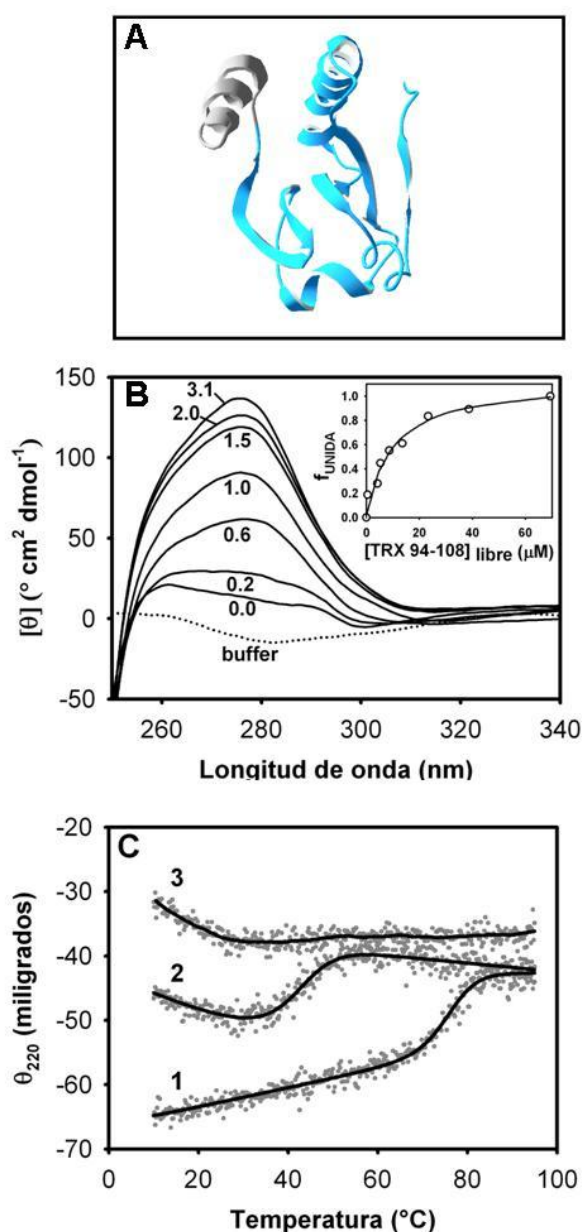


Figura 4.15. (A) Estructura cristalográfica de TRX de *E. coli* (código pdb: 2TRX), donde se muestra el fragmento TRX1-93 en azul y el péptido TRX94-108 en gris. (B) Unión del péptido TRX94-108 al fragmento TRX1-93 seguido por CD en la región UV_C . Los números (0.0 al 3.1) indican la relación molar péptido:fragmento. El inserto muestra la fracción unida (extraída de la evolución de la señal dicróica a 280 nm) en función de la concentración de péptido libre. (C) Desnaturalización térmica seguida por CD en la región UV_L del fragmento TRX1-93 (3), del complejo TRX1-93/TRX94-108 (2), o de TRX de largo completo (1).

inclusive en parte la actividad enzimática (Santos, 2007). Notablemente, en forma aislada el péptido TRX94-108 no presenta estructura, pero se ordena, tal como es el caso en la estructura intacta. Por otro lado, el fragmento TRX1-93 no alcanza a compactarse por sí mismo y da lugar a una estructura del tipo glóbulo fundido (MG). Este caso representa un evento molecular de selección

estructural recíproca, donde ambos componentes ganan orden. La evolución de la señal de CD en la región UV_c a medida que se titula el fragmento TRX1-93 con el péptido TRX94-108 se muestra en la Figura 4.15A.

Al máximo exceso molar ensayado, se advierte la recuperación mayoritaria del espectro nativo. Del gráfico en el inserto puede derivarse la afinidad de esta interacción ($K_D = 1/K_{asoc} \sim 12 \mu\text{M}$). Por otro lado, la estabilidad termodinámica del complejo se evaluó a partir de la transición térmica seguida por la medida de θ_{220} , que estima el contenido de estructura secundaria de la proteína. A diferencia del fragmento TRX1-93, el complejo recupera una transición cooperativa, aunque ésta esté centrada a una temperatura mucho menor (40 °C) que la que experimenta la proteína intacta (76 °C) (Figura 4.15B).

4.13. Efecto de Anfifilos y Co-Solventes sobre Péptidos

Desestructurados

Ejemplo 5: El mismo péptido anfipático TRX94-108 del ejemplo anterior experimenta inducción de estructura α helicoidal -a partir de una forma desestructurada en solución acuosa- por interacción con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) (Figura 4.16A) (Román, 2010). Este efecto demuestra que la naturaleza hidrofóbica de la unión restringe el espacio conformacional accesible al péptido, favoreciendo aquella estructura secundaria (α -hélice en este caso) que optimice la interacción. Este experimento demuestra que no siempre es necesaria la presencia de un núcleo (*core*) proteico preformado para que un elemento de estructura secundaria como el representado por este péptido adquiera su forma final plegada.

Ejemplo 6: Otro ejemplo de inducción de estructura secundaria está dado por el péptido anti-estafilocócico KW (RKWVWRNR-NH₂), originalmente derivado del fragmento 107-115 de la lisozima humana y normalmente desordenado en solución acuosa (Figura 4.16B) (Iannucci, 2013). Tanto por efecto del co-solvente trifluoroetanol (TFE) como por exposición a una fase micelar constituida por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), se advierte que KW se

ordena, a juzgar por la reducción de la magnitud de la banda negativa a ~ 200 nm y la tendencia a exacerbar la banda negativa a 222 nm. Estos resultados subrayan el papel de la estructura secundaria y la distribución de residuos polares y no polares para la efectiva interacción del péptido con la membrana plasmática de la bacteria, un paso crítico para desencadenar su acción letal.

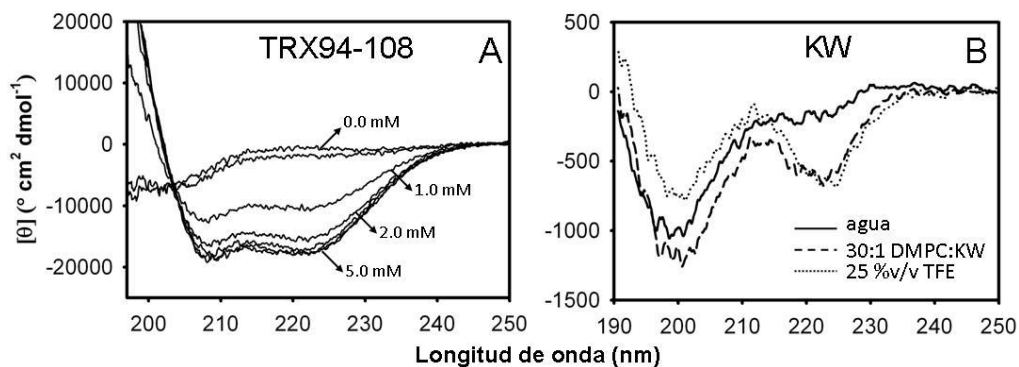


Figura 4.16. Inducción de estructura secundaria por distintos agentes sobre A) TRX94-108 y B) KW.

Ejemplo 7 Cuando IFABP y formas abreviadas de la misma ($\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$) son desafiadas con el co-solvente TFE (25 % v/v) se dispara un proceso de agregación de tipo amiloide (Curto, 2012). Este proceso implicaría un reordenamiento estructural hacia una forma polimérica del tipo *cross- β* . Sugestivamente, a concentraciones menores del co-solvente (2,5-10 % v/v) -situación en que las proteínas permanecen solubles- la proteína intacta y las formas abreviadas coalescen en una estructura común de carácter predominantemente β (Figura 4.17), que comparte una estabilidad similar frente al caótrofo químico GdmCl (Curto, 2013).

Esta evolución es más marcada para el caso de las formas abreviadas, en concordancia con la mayor plasticidad estructural característica de estas formas respecto de la proteína madre (IFABP). Estas observaciones iluminan aspectos del mecanismo que conduce a la agregación, posiblemente señalando eventos tempranos de este proceso.

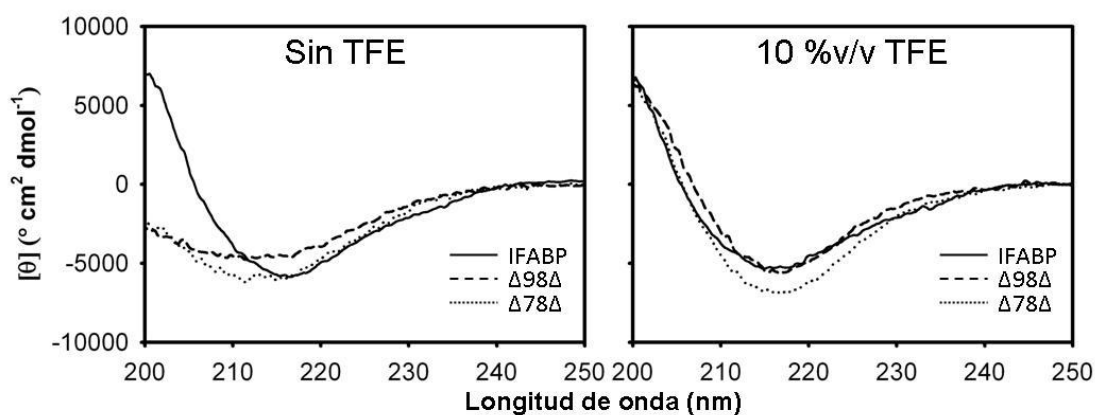


Figura 4.17. Inducción de estructura secundaria por el agregado de TFE sobre IFABP, $\Delta 98\Delta$ y $\Delta 78\Delta$.

Bibliografía

Arighi CN, Rossi JPFC, Delfino JM. Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry* 42: 7539-7551, 2003.

Bloemendal M, Johnson Jr. WC. Structural information on proteins from circular dichroism spectroscopy: possibilities and limitations. En Herron JN, Jiskoot W, Crommelin DJA (Eds.), *Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins* (pp. 65-100). Plenum Press, New York (NY), 1995.

Brahms S, Brahms J. Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism. *J Mol Biol* 138: 149-178, 1980.

Campbell ID, Dwek RA. *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park (CA), 1984.

Cantor CR, Schimmel PR. (Eds.), *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. Freeman, New York, 1980.

Chakrabartty A, Kortemme T, Padmanabhan S, Baldwin RL. Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry* 32: 5560–5565, 1993.

Curto LM, Caramelo JJ, Franchini GR, Delfino JM. $\Delta 98\Delta$, a minimalist model of antiparallel β -sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci* 18: 735-746, 2009.

Curto LM, Angelani CR, Caramelo JJ, Delfino JM. Truncation of a β -barrel scaffold dissociates intrinsic stability from its propensity to aggregation. *Biophysical Journal* 103: 1929-1939, 2012.

Curto LM, Angelani CR, Cabanas IS, Caramelo JJ, Delfino JM. On how stable β -barrels become propense to filamentous growth. En Mechanobiology of Proteins and Cells Meeting. Salisbury Cove, Maine, 2013.

Fasman GD. (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. Plenum Publishing Corp, New York, 1996.

Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1: 2527-2535, 2006a.

Greenfield NJ. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nat Protoc* 1: 2733-2741, 2006b.

Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1: 2876-2890, 2006c.

Greenfield NJ. Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nat Protoc* 1: 2891-2899, 2006d.

Hammes GG. Spectroscopy for the Biological Sciences. Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 2005.

Iannucci N, Curto L, Albericio F, Cascone O, Delfino JM. Structural glance into a novel designed anti-staphylococcal peptide. *Pept Sci*, 2013 (en prensa).

Johnson Jr. WC. Circular dichroism instrumentation. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 635-652). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Kuwajima K, Hiraoka Y, Ikeguchi M, Sugai S. Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 24: 874-881, 1985.

Kuwajima K. Stopped-flow circular dichroism. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 159-182). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Pace CN, Shaw KL. Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins (suppl 4)*:1-7, 2000.

Rodger A, Nordén B. Circular Dichroism and Linear Dichroism. Oxford University Press, Bath, 1997.

Roman EA, Rosi P, González Lebrero MC, Wuilloud R, González Flecha FL, Delfino JM, Santos J. Gain of local structure in an amphipathic peptide does not require a specific tertiary framework. *Proteins* 78: 2757-2768, 2010.

Santos J, Marino-Buslje C, Kleinman C, Ermácora MR, Delfino JM. Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: interaction between *E. coli* thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry* 46: 5148-5159, 2007.

Schmid FX. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. En Creighton TE (Ed.), Protein Structure: a practical approach (pp. 251-285). IRL Press, New York (NY), 1989.

Srinivasan N, Sowdhamini R, Ramakrishnan C, Balaram P. Conformations of disulfide bridges in proteins. *Int J Peptide Protein Res* 36: 147-155, 1990.

Takakuwa T, Konno T, Meguro H. A New Standard Substance for Calibration of Circular Dichroism: Ammonium d-10-Camphorsulfonate. *Analytical Sciences* 1: 215-218, 1985.

Uversky VN. Use of Fast Protein Size-Exclusion Liquid Chromatography To Study the Unfolding of Proteins Which Denature through the Molten Globule. *Biochemistry* 32: 13288-13298, 1993.

Venyaminov SYu, Yang JT. Determination of protein secondary structure. En Fasman GD (Ed.); Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 69-107). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.

Wallace BA, Janes RW. (Eds.), Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy. IOS Press, Amsterdam, 2009.

Woody RW, Dunker AK. Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins. En Fasman GD (Ed.), Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (pp. 109-157). Plenum Publishing Corp., New York (NY), 1996.