



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

Simulación Numérica y Estudios
Experimentales sobre
Ultracentrifugación Analítica de
Macromoléculas

D^a. Ana Isabel Díez Peña

2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José García de la Torre, Catedrático de Universidad del Área de Química Física en el Departamento de Química Física, **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Simulación numérica y estudios experimentales sobre ultracentrifugación analítica de macromoléculas”, realizada por D^a. Ana Isabel Díez Peña, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de Noviembre de 2014

Fdo: D. José García de la Torre



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José Ginés Hernández Cifre, Profesor Titular de Universidad del Área de Química Física en el Departamento de Química Física, **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Simulación numérica y estudios experimentales sobre ultracentrifugación analítica de macromoléculas”, realizada por D^a. Ana Isabel Díez Peña, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de Noviembre de 2014

Fdo: D. José Ginés Hernández Cifre



D. Álvaro Ortega Retuerta, Investigador Contratado en la Estación Experimental del Zaidín del CSIC (Granada), **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Simulación numérica y estudios experimentales sobre ultracentrifugación analítica de macromoléculas”, realizada por D^a. Ana Isabel Díez Peña, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Granada, a 10 de Noviembre de 2014

Fdo: D. Álvaro Ortega Retuerta

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al profesor D. José García de la Torre, director de esta Tesis, por acogerme en su grupo de investigación y abrirme las puertas del maravilloso mundo de la investigación. Su apoyo, sus consejos y su eficaz dirección han sido fundamentales en mi formación y en la realización de esta Tesis.

A D. Álvaro Ortega Retuerta y D. José Ginés Hernández Cifre, co-directores de esta Tesis, por el seguimiento y supervisión del trabajo realizado y por el tiempo dedicado a la lectura y corrección de esta Tesis. Su conocimiento, sugerencias e ideas, además de su amistad y compañía en el día a día, han sido muy importantes.

A Dña. María del Carmen López Martínez, directora del Departamento de Química Física, por las facilidades prestadas en la realización de esta Tesis. Por su ayuda en los temas relacionados con gestión y docencia. Por su confianza y sus consejos en cuanto a lo personal.

A Guillermo por su colaboración, estímulo y facilidades recibidas que han contribuido a la realización de esta Tesis.

A mis compañeros del Grupo de Macromoléculas. A Ramón, Ricardo y en especial a Diego porque siempre han estado dispuestos a ayudarme y resolver mis dudas. A Mar y Vanesa que han hecho que esta etapa final de la Tesis sea más llevadera. Especialmente a Vanesa porque su amistad y su compañía diaria han sido fundamentales.

A los profesores del Departamento de Química Física por su cercanía: Quete, Joaquín, Carmiña, Manuela y Pedro Ruipérez. En particular a Ángela, porque sus consejos tanto en lo personal como en lo profesional me han ayudado mucho.

A mis compañeros de departamento en estos años. A los que están: José Pedro, José Manuel y José María, y a los que fueron: Javier Cerezo. A Carmen y Encarni por todos los momentos de amistad. A Marwa por tantos ratos compartidos.

También quisiera dar las gracias a los miembros del P.A.S. de la Facultad de Química. Especialmente a Úrsula por su cariño y a Pedro.

A todas mis amigas y amigos por estar conmigo siempre, en especial a M^a Paz y M^a Pilar por sacar un rato cada día para mandarme ánimos. A Estefanía y M^a Teresa por estar siempre pendientes de mí. A Óscar. A Edu, por permanecer a mi lado, por su infinita paciencia, por todo el apoyo y el ánimo recibidos durante estos años.

A mis tíos y mis primos. A mi tía Isa y a Mario por estar siempre para lo que necesite. A mi prima M^a Isabel porque es fundamental en mi vida y, sin darse cuenta, ha sido el mayor apoyo moral que he tenido para la realización de esta Tesis. A mis abuelos que estoy segura de que serían las personas más felices del mundo al ver lo que ha conseguido su nieta mayor. A mi hermano. Y como no, a mis padres, por haber estado siempre ahí, dispuestos a darlo todo. Porque me han enseñado que con constancia, trabajo e ilusión se pueden conseguir todas las metas.

Al resto de personas que han colaborado de un modo u otro en la elaboración de esta memoria y que no he nombrado por no extenderme demasiado.

La autora de estas Tesis y los co-directores de la misma desean expresar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España por la concesión de ayudas al proyecto CTQ2009-08030 (incluyendo fondos FEDER) sobre *“Propiedades conformacionales y dinámicas en disolución de macromoléculas biológicas, polímeros sintéticos y complejos macromoleculares”* al que fue asignada la ayuda para la Formación de Personal Investigador disfrutada por la autora de esta Tesis (BES-2010-03574). También agradecer el apoyo de la Fundación Séneca, órgano oficial para la investigación científica de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, cuya financiación proviene de la distinción como “Grupo de Excelencia Científica de la Región de Murcia,” para el proyecto 04531/GERM/06, sobre *“Metodologías para la simulación numérica y caracterización experimental de polímeros sintéticos y macromoléculas biológicas”*.

A mis padres

Índice general

I. Introducción	11
I.1. Prolegómeno	11
I.2. Motivación y desarrollo de este trabajo	12
II. Fundamentos	15
II.1. Aspectos generales	15
II.1.1. Tipos de experimentos	15
II.2. Instrumentación	17
II.2.1. Sistemas de detección	18
II.2.2. Celdas y rotor	23
II.3. Aspectos geométricos	27
II.4. Variación espacio-temporal de la señal y perfiles de concentración	29
II.5. Coeficiente de sedimentación	30
II.6. Ecuación de flujos	33
II.7. Velocidad de sedimentación	34
II.8. Equilibrio de sedimentación	39
II.9. Ecuación de Lamm en una célula con forma de sector	42
II.9.1. Solución aproximada de Faxén	43
II.10. Hidrodinámica para los modelos de partículas sedimentantes	44
II.11. Programas para la predicción de propiedades hidrodinámicas de las partículas sedimentantes	46
II.11.1. Metodología para partículas rígidas	47
II.11.2. Metodología para partículas flexibles	48
II.12. Programas para el análisis de datos experimentales de ultracentrifugación analítica	48

III. Experimentos de ultracentrifugación analítica	53
III.1. Características de la instrumentación utilizada	53
III.1.1. Ultracentrifugación analítica (AUC)	53
III.1.2. Otras técnicas utilizadas: DLS y SEC	54
III.2. Método experimental y tratamiento de datos	55
III.2.1. Preparación de los experimentos	55
III.2.2. Tratamiento de datos	56
III.3. Experimentos con macromoléculas tipo	57
III.3.1. Lisozima	58
III.3.2. Albúmina	62
III.3.2.a. Albúmina de suero bovino (BSA)	62
III.3.2.b. Ovoalbúmina	71
III.3.3. Efecto de la polidispersidad: carragenano, pectina y dextrano	75
III.3.4. Efecto de la polidispersidad y la fuerza iónica: poliestireno sulfonato	88
III.4. Experimentos con otras proteínas	96
III.4.1. Proteína HPr ^{bs}	96
III.4.2. Rabfilina-3A	101
III.4.3. Proteína TtCarH	106
IV. Predicción de experimentos de sedimentación. I. Sistemas homogéneos	121
IV.1. Simulación de dinámica browniana	122
IV.1.1. Dinámica browniana: version lineal-monodimensional	123
IV.2. Método de simulación	125
IV.2.1. Aspectos generales	125
IV.2.2. Versión simplificada monodimensional	125
IV.2.3. Versión rigurosa, con geometría radial	126
IV.2.4. Procedimiento y parámetros de la simulación	128
IV.3. Programas para predicción de experimentos de ultracentrifugación	129
IV.3.1. Programa SIMUSED. Versión para un componente	129
IV.3.2. El programa SEDFIT	130
IV.4. Comprobaciones de la metodología de simulación browniana	131
IV.4.1. SIMUSED vs. SEDFIT	131
IV.4.2. Sistemas	133
IV.4.3. Resultados	133

V. Predicción de experimentos de sedimentación. II. Sistemas heterogéneos	139
V.1. Generalidades sobre sistemas heterogéneos	139
V.2. Distribuciones de peso molecular	141
V.3. Sedimentación de un sistema heterogéneo	143
V.4. Predicción de perfiles de sedimentación. Consideraciones generales	144
V.5. Sobre el número de partículas en simulaciones brownianas	146
V.5.1. Elección del número de partículas	146
V.5.2. Relación entre el número de partículas y la señal	149
V.6. Ejemplos de muestras paucidispersas	150
V.6.1. Sistema bicomponente de proteínas: lisozima y fibrinógeno	150
V.6.2. Sistema tricomponente de fragmentos cortos de ADN.	152
V.7. Ejemplos de muestras polidispersas	153
V.7.1. Polímero sintético (PEO) con una relación s - M potencial	153
V.7.2. Cadenas de ADN vermiforme	156
 VI. El problema inverso	 161
VI.1. Generalidades	161
VI.2. Planteamiento	162
VI.3. Método de ajuste y minimización	163
VI.4. Programa ANASED	164
VI.5. Resultados. I. Sistemas paucidispersos, con datos experimentales “sintéticos”	166
VI.5.1. Ajuste monocomponente	167
VI.5.1.a. Lisozima	167
VI.5.1.b. ADN de ColE1	172
VI.5.2. Ajuste bicomponente	175
VI.5.2.a. Lisozima y fibrinógeno	175
VI.5.2.b. Aldolasa y ADN	179
VI.5.3. Ajuste tricomponente	182
VI.5.3.a. Tres proteínas	182
VI.6. Resultados. II. Sistemas polidispersos, con datos experimentales “sintéticos”	186
VI.6.1. Distribución de M log-normal y relación $s = K_s M^{a_s}$	187
VI.6.2. Distribución de M log-normal y conformación vermiforme	191
VI.7. ANASED vs. SEDFIT	195

VII. Conclusiones	197
Referencias	203

Glosario

Símbolos

Griegos

- α : parámetro que define el tipo de concentración utilizada en el cálculo de la señal óptica: $\alpha=0$ (concentración másica), $\alpha=1$ (concentración molar).
- a_η : exponente en la ley de potencia que relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular (ecuación de Mark-Houwink-Sakurada). Su valor depende de la conformación de la macromolécula y de las condiciones termodinámicas de la disolución.
- a_s : exponente en la ley de potencia que relaciona el coeficiente de sedimentación con el peso molecular. Su valor depende de la conformación de la macromolécula y de las condiciones termodinámicas de la disolución.
- χ : anchura de los intervalos en los que se divide la longitud de una celda en la simulación de dinámica browniana.
- δ : hidratación de la partícula expresada en gramos de agua por gramos de macromolécula.
- Δ : raíz cuadrada de la desviación cuadrática media en un ajuste por mínimos cuadrados.
- Δj : desplazamiento de franjas (*fringes*) en un experimento de ultracentrífuga con medidas de interferencia.
- Δt : duración de un paso en la simulación de dinámica browniana.
- Δx_{sed} : desplazamiento determinista (debido a la sedimentación) en la simulación de dinámica browniana.
- Δx_{brow} : desplazamiento estocástico (debido a la difusión) en la simulación de dinámica browniana.
- ϵ : coeficiente de absorción específico.
- ϵ_M : coeficiente de absorción molar.
- η : viscosidad de la disolución.
- η_0 : viscosidad del disolvente.
- $[\eta]$: viscosidad intrínseca.
- λ : longitud de onda del láser utilizado en las medidas de ultracentrífuga.
- λ : parámetro que define el rango de valores a ajustar por el algoritmo AMOEBA en el programa ANASED.

- ω : velocidad angular del rotor en la ultracentrífuga.
- ϕ : ángulo del sector de una celda de ultracentrífuga.
- Φ : función de error.
- π : número pi.
- ρ : densidad de la disolución.
- ρ_0 : densidad del disolvente.
- σ : sección transversal de la celda de ultracentrífuga.
- σ : desviación estándar; anchura de la curva de distribución.
- τ : intervalo de tiempo entre registros (*scans*).

Latinos

- a : longitud de persistencia (parámetro del modelo vermiforme de cadenas macromoleculares).
- a : radio de una partícula supuesta esférica.
- a : semiejes iguales en un elipsoide.
- A : absorbancia.
- A : sección transversal de la celda de ultracentrífuga.
- b : semieje diferente en un elipsoide.
- c : concentración másica.
- c_M : concentración molar.
- c_m : concentración en el menisco.
- $c(r, t)$: concentración en la posición radial r a tiempo t .
- c_0 : concentración inicial (uniforme en toda la celda).
- d : diámetro (parámetro del modelo vermiforme de cadenas macromoleculares).
- D : coeficiente de difusión traslacional.
- $D_{20,w}$: coeficiente de difusión traslacional en condiciones estándar (20°C, agua).
- dn/dc : variación del índice de refracción con la concentración.
- f : coeficiente de fricción traslacional.
- F_{fi} : fuerza de fricción.
- F_{sed} : fuerza centrífuga que actúa sobre una partícula a una distancia r del eje de giro hacia el fondo de la celda.
- $F(r)$: función de distribución acumulativa.

- g : aceleración de la gravedad terrestre.
- G_e : peso estadístico de cada experimento en el ajuste llevado a cabo por el programa ANASED.
- h : altura de la celda de la ultracentrífuga.
- i : índice que define la posición radial (intervalo) en que se encuentra una partícula en la simulación de dinámica browniana.
- IP : índice de polidispersidad.
- ITERMAX: número máximo de iteraciones a realizar en el ajuste llevado a cabo por el algoritmo AMOEBA en el programa ANASED.
- j : índice que define el instante de tiempo (intervalo) en que se encuentra una partícula en la simulación de dinámica browniana.
- J : flujo total.
- J_{dif} : flujo difusivo.
- J_{sed} : flujo sedimentante.
- k_B : constante de Boltzmann.
- K_η : constante en la ley de potencia que relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular (ecuación de Mark-Houwink-Sakurada) cuyo valor depende del sistema polímero/disolvente/temperatura.
- K_s : constante en la ley de potencia que relaciona el coeficiente de sedimentación con el peso molecular cuyo valor depende del sistema polímero/disolvente/temperatura.
- l : longitud de la celda de la ultracentrífuga.
- L : longitud de contorno (parámetro del modelo vermiforme de cadenas macromoleculares).
- m : masa de una partícula.
- m_b : masa flotante de una partícula.
- M : peso molecular.
- M_b : peso molecular flotante.
- M_L : masa por unidad de longitud (parámetro del modelo vermiforme de cadenas macromoleculares).
- M_{max} : valor de M máximo.
- M_{min} : valor de M mínimo.
- $\overline{M}_n$: peso molecular promedio en número.
- $\overline{M}_v$: peso molecular promedio viscoso.
- $\overline{M}_w$: peso molecular promedio en peso.
- $\overline{M}_z$: peso molecular promedio en zeta.

- $n(i, j)$: número de partículas por unidad de volumen que se encuentran en el intervalo i a tiempo j en la simulación de dinámica browniana.
- n_c : número de componentes de una muestra.
- N_A : número de Avogadro.
- N_{part} : número de partículas en la simulación de dinámica browniana.
- N_{steps} : número de pasos en la simulación de dinámica browniana.
- N_{scans} : número de *scans* generados (experimentalmente o mediante simulación).
- N_r : número de intervalos en los que se discretiza la posición radial.
- N_t : número de intervalos en los que se discretiza el tiempo.
- N_t : número de tiempos para los que se registra un *scan*. Determina el número de *scans* (del total de N_{scans}) utilizados por nuestros programas de ordenador.
- $N(M)$: función de distribución en número.
- p : relación axial de los elipsoides de revolución.
- $p(r)$: probabilidad de que una partícula se encuentre en la posición radial r .
- q_i : constante en el cálculo de la señal óptica que depende de la naturaleza de la especie i pero no de su peso molecular.
- P : función de Perrin.
- P : parámetro de regularización de Tikhonov-Phillips en los ajustes de tipo $ls - g * (s)$ del programa SEDFIT.
- Q : constante de proporcionalidad de carácter general.
- r : posición dentro de la celda con respecto al eje de giro del rotor (posición radial).
- r : radio de una esfera.
- r_b : posición del fondo de la celda de la ultracentrífuga respecto al eje de giro del rotor.
- r_{bnd} : posición del frente sedimentante respecto al eje de giro del rotor.
- r_i : posición radial correspondiente al intervalo de posición i .
- r_h : radio hidrodinámico.
- r_m : posición del menisco de la celda de la ultracentrífuga respecto al eje de giro del rotor.
- r_{min} : valor de r mínimo.
- r_{max} : valor de r máximo.
- R : constante de los gases perfectos.
- s : coeficiente de sedimentación.
- s^* : coeficiente de sedimentación “aparente”.
- $s_{20,w}$: coeficiente de sedimentación en condiciones estándar (20°C, agua).

- t : instante de tiempo.
- t_j : instante de tiempo en el intervalo j .
- t_{max} : valor de t máximo.
- t_{min} : valor de t mínimo.
- t_{run} : duración total del experimento.
- T : temperatura.
- TOL: factor de tolerancia del ajuste realizado por el algoritmo AMOEBA en el programa ANASED.
- $U(x)$: función escalón de Heaveside.
- v : velocidad lineal de la partícula.
- $\bar{v}$: volumen específico parcial de la partícula en la disolución.
- V_{sol} : volumen total de la disolución.
- w : fracción en peso.
- W_0 : masa inicial de soluto.
- $W(M)$: función de distribución en peso.
- x : coordenada de las partículas sedimentantes en la simulación de dinámica browniana que se identificará con la posición radial.
- x : fracción en número.
- y_k : contribución fraccional de cada componente k a la señal inicial.
- $z(r, t)$: señal óptica en la posición radial r en el instante de tiempo t registrada en un experimento de ultracentrifuga analítica.
- z_0 : valor inicial de la señal óptica (uniforme en toda la celda).

Acrónimos

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- AUC: ultracentrifugación analítica (Analytical Ultracentrifugation).
- ABS: medida de absorbancia.
- BSA: albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin).
- DB: dinámica browniana.
- DLS: dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering).
- EGTA: ácido etilenglicol tetraacético.
- GPC: cromatografía de permeación en gel (Gel Permeation Chromatography).
- HEPES: ácido 4-(2-Hydroxethyl)piperazina-1-etano-sulfónico.

- HPr^{ps}: variedad de la proteína HPr (histidina fosfotransportadora) procedente de la bacteria *Bacillus Sphaericus*.
- IF: medida de interferencia.
- NaPSS: poliestireno sulfonato de sodio.
- OD: densidad óptica (Optical Density).
- PEO: óxido de polietileno.
- TI: ruido en los experimentos de AUC que depende de la posición radial pero es independiente del tiempo (Time Independent).
- Tris: tris(hidroximetil)aminometano.
- TtCarH: variedad de la proteína CarH procedente de la bacteria *Thermus Thermophilus*.
- RI: ruido en los experimentos de AUC que depende del tiempo pero es independiente de la posición radial (Radial Independent).
- RI: índice de refracción (Refractive Index).
- SEC: cromatografía de exclusión por tamaño (Size Exclusion Chromatography)

Capítulo I

Introducción

I.1. Prolegómeno

La ultracentrifugación analítica (AUC, acrónimo del inglés *analytical ultracentrifugation*) consiste en someter partículas inmersas en un líquido – una disolución molecular, o una dispersión coloidal – a una intensa fuerza centrífuga que hace que sedimenten hacia el fondo de la célula, cuando ésta está girando a gran velocidad, midiéndose por algún método óptico de detección, y analizándose numéricamente, la velocidad de desplazamiento de las partículas determinada por la evolución de la señal $z(r, t)$ en cada punto de la célula a distancia radial r a lo largo del tiempo, t . Esta evolución ha de depender, en lo que a las partículas se refiere, de características tales como su masa, tamaño, forma, etc, siendo por ello una fuente de abundante información estructural.

Concebir esa relación entre sedimentación y estructura de las partículas, construir un aparato que (i) pudiera conseguir aceleraciones centrífugas de hasta 10^5 veces mayor que la de la gravedad (a distancia radial $r = 6.5$ cm girando a 40 000 rpm), y que (ii) al tiempo pudiera detectar la variación espacio-temporal de una señal óptica que suministrara $z(r, t)$, así como (iii) conectar la física de este fenómeno con otros, como el movimiento browniano, fue un extraordinario logro conseguido hace ya casi 100 años, por el científico sueco Theodor Svedberg, que le valió el Premio Nobel de Química en 1926. Pronto, la AUC, con la que Svedberg pretendía principalmente estudiar suspensiones de partículas coloidales, extendió su aplicabilidad al campo de las macromoléculas sintéticas (polímeros) y biológicas (proteínas, ácidos nucleicos, etc). La técnica es tan importante, que aparece descrita en la casi totalidad de los libros de texto de Química Física [1], Cien-

cia de Polímeros [2, 3], Biofísica [4, 5], etc, además de en numerosísima bibliografía. Como fuentes recientes de información general cabe destacar publicaciones relacionadas con los periódicos congresos internacionales de AUC, como los libros editados por Harding y colaboradores [6–8], o números especiales de revistas [9, 10] así como algún libro de texto [4, 5], monografía [11] o colecciones recientes de artículos [12, 13].

Durante mucho tiempo, la AUC fue una herramienta básica para determinar con exactitud tamaños moleculares de macromoléculas y coloides, con particular impacto en biología molecular, siendo la técnica esencial para determinar los pesos moleculares de biomacromoléculas de tamaño moderado, cual es el caso de muchas proteínas. Aunque los instrumentos de AUC, y en particular el más extendido la ultracentrífuga Beckman Model E, poseían amplia funcionalidad, su uso y mantenimiento era laborioso y costoso. No obstante, por su potencialidad, la AUC era una técnica esencial en los laboratorios de bioquímica, o de polímeros. Hacia finales de la década 1970-80, la mejoras en técnicas tales como electroforesis y cromatografía hicieron que éstas fueran desplazando a la AUC para la determinación de tamaños, y la dispersión dinámica de luz, desarrollada en esa década, brindaba una alternativa para el estudio de características hidrodinámicas, aunque sin llegar nunca a suministrar el poder de resolución y la precisión de la AUC. Por ello, se desarrolló una nueva ultracentrífuga, la Beckman XL/A, con detección de absorbancia, a la que siguió la Beckman XL/I, que incorpora además la mucho más sensible detección por interferencia. Así, en las últimas dos décadas, la AUC ha resurgido como una técnica plenamente actual, aplicándose de nuevo para la caracterización de estructuras, y recientemente, sobre todo, de interacciones en biomacromoléculas, y cobrando nuevo auge también en cuanto a la caracterización de sistemas coloidales, cuyo interés ha resurgido en lo que actualmente se denomina nanotecnología. En el Capítulo II se describen las características esenciales de esta técnica

I.2. Motivación y desarrollo de este trabajo

El Grupo de Química Física Macromolecular (Polímeros) en el que se ha realizado esta Tesis es un grupo de referencia en el desarrollo de metodologías teóricas y computacionales que permiten la obtención de información estructural de macromoléculas y nanopartículas a partir de diversas propiedades en disolución o suspensión, teniendo, entre dichas propiedades, un papel predominante la AUC. Entre otras muchas contribuciones del Grupo,

a título de ejemplo pueden citarse algunas a la bibliografía de AUC antes mencionada [14–21]. El interés del Grupo en abordar una investigación plenamente experimental, y la disponibilidad de una ultracentrífuga Beckman XL/I, motivaron el adoptar como tema monográfico para esta Tesis la AUC.

Ello supuso, en primer lugar el entrenamiento en los aspectos instrumentales y de procesamiento de datos experimentales. La ultracentrífuga analítica es, pese a las mejoras en el modelo XL/I, un instrumento complejo y delicado. Son muchas las modalidades en la que se pueden realizar experimentos, cada una con un protocolo de trabajo diferente. La AUC suministra, como resultado primario, la variación espacio-temporal $z(r, t)$ antes aludida, de la cual hay que extraer a posteriori la información acerca de peso molecular, coeficientes de sedimentación, características estructurales, etc de las macromoléculas o nanopartículas. Para ello existen algunos programas de procesamiento de datos, que son potentes pero complicados. Por todo ello, se ha invertido un notable esfuerzo en el aprendizaje de todas estos aspectos de metodología experimental.

En cuanto a los sistemas a estudiar experimentalmente por AUC, se han abordado algunos adecuados para esa fase de entrenamiento metodológico; básicamente, sistemas constituidos por proteínas o polímeros bien conocidos, que sirvieran para comprobar la corrección de nuestros procedimientos. Otros han tenido origen en colaboraciones con otros laboratorios. Nuestro Grupo no desarrolla proyectos avanzados en bioquímica molecular, por lo que algunas contribuciones originales realizadas en este ámbito lo han sido en relación con problemas y muestras suministradas por otros laboratorios [22, 23]. Asimismo, se ha comenzado en este trabajo la caracterización por AUC de algunos tipos de sistemas poliméricos que son objetos de estudio en otras líneas de trabajo que se vienen desarrollando en el Grupo de Investigación [24–26], como las relativas a ciertos polisacáridos y polielectrolitos sintéticos. Todo este trabajo se recoge en el Capítulo III.

Además de esta línea principal experimental, se ha procurado emplear la experiencia y los recursos para trabajo teórico y computacional, propios del Grupo, desarrollando por otra parte contribuciones en este ámbito para el tratamiento de datos de AUC. Como antes se apuntaba, el tratamiento de los datos que produce la máquina Beckman XL/I para llegar a los resultados finales, se hace mediante programas de ordenador. Para ello, los más utilizados son los desarrollados a lo largo de ya casi 15 años por P. Schuck y colaboradores, SEDFIT [27–29] y SEDPHAT [30]. Estos, y otros programas, se basan en la solución numérica de la ecuación diferencial de Lamm que rige el balance entre los procesos competitivos de sedimentación y difusión, expresados macroscopicamente (sección II.9) [31],

mediante procedimientos basados en un método numérico propuesto bastante antes por Claverie et al [32], que posteriores autores refinaron e implementaron. En base a la experiencia del Grupo de Investigación en simulaciones en ordenador de la dinámica molecular en disolución, se ha concebido y publicado un método alternativo a los basados en la ecuación macroscópica de Lamm. En él, la predicción de la evolución espacio-temporal de la concentración, y por ello los perfiles de señal $z(r, t)$, se realiza con base en una visión microscópica de los procesos de sedimentación y difusión, implementada en un algoritmo de simulación de dinámica browniana [33]. En los capítulo IV y V se presentan métodos de cálculo, implementados en un programa, **SIMUSED**, basado en nuestra idea de simulación browniana, que permiten la simulación de los perfiles de señal, mostrando en una variedad de casos la capacidad predictiva de nuestro procedimiento.

Se ha continuado en esa línea, tratando de desarrollar métodos basados en este algoritmo para el problema inverso, esto es, para la determinación de información estructural a partir de los perfiles de señal experimentales, como hacen **SEDFIT** y programas similares. El problema inverso es mucho más complicado que el simple cálculo de perfiles, pues involucra procesos de ajuste de parámetros. Y, sobre todo, los datos primarios instrumentales que suministra la ultracentrífuga, presentan una serie de detalles que hacen muy laborioso el desarrollo de programas para su análisis. En el Capítulo VI se presentan las líneas maestras de unos procedimientos de análisis de datos AUC, y se han implementado en un programa de ordenador, **ANASED**. Cronológicamente, estos desarrollos de *software* han constituido la parte final del trabajo de esta Tesis. Por ello, y para evitar los farragosos problemas que presentan las peculiaridades de los datos experimentales primarios de la XL/I, y centrar el estudio en los aspectos fisico-matemáticos esenciales, la primera versión de **ANASED** trabaja con datos experimentales “sintéticos” (generados mediante **SIMUSED**), pero su correcto funcionamiento suministra una prueba de concepto, demostrando que es posible extraer de los perfiles $z(r, t)$ una amplia gama de información estructural.

Capítulo II

Fundamentos

II.1. Aspectos generales

En rasgos generales, la ultracentrifugación analítica consiste en someter una disolución o suspensión a centrifugación, de manera que las partículas de soluto o de la fase dispersa se desplacen hacia el fondo de la celda (o célula) que las contiene, midiéndose la distribución de estas partículas a lo largo de la celda para distintos tiempos. La variación de la concentración de las partículas $c(r, t)$, con el tiempo, t , y en cada posición radial, r , suministra importante información acerca de las mismas. Esta distribución (o perfil) de concentración puede medirse, como se indicará después, mediante procedimientos ópticos que registran una señal, $z(r, t)$, dependiente de la concentración.

La técnica de la ultracentrifugación analítica está ampliamente descrita en la literatura. Además de las referencias dadas en la Introducción, son también muy informativas las referencias [34–36]. En este capítulo se pretende dar una visión de esta técnica y de sus fundamentos teóricos.

II.1.1. Tipos de experimentos

Se distinguen dos tipos de experimentos de sedimentación: velocidad y equilibrio. Posteriormente se hará una descripción matemática y física detallada de estos métodos. Un experimento de velocidad de sedimentación consiste en la aplicación de una velocidad de centrifugación muy alta, de manera que se observa esencialmente el fenómeno de migración de las partículas hacia el fondo de la célula. El perfil de concentración presenta un escalón

más o menos abrupto, el frente de sedimentación, que separa la disolución del disolvente sobrenadante.

Por otra parte, un experimento de equilibrio de sedimentación se realiza a una velocidad menor, de manera que cobra importancia un segundo fenómeno, la difusión de las partículas en sentido contrario debido al gradiente de concentración que se crea al centrifugar, de tal manera que al cabo de un tiempo suficiente se alcanza un perfil de concentración estacionario, en el que la concentración varía gradualmente a lo largo de toda la célula. A modo de ejemplo, la Figura II.1 muestra la apariencia de los perfiles de concentración en ambos tipos de experimento.

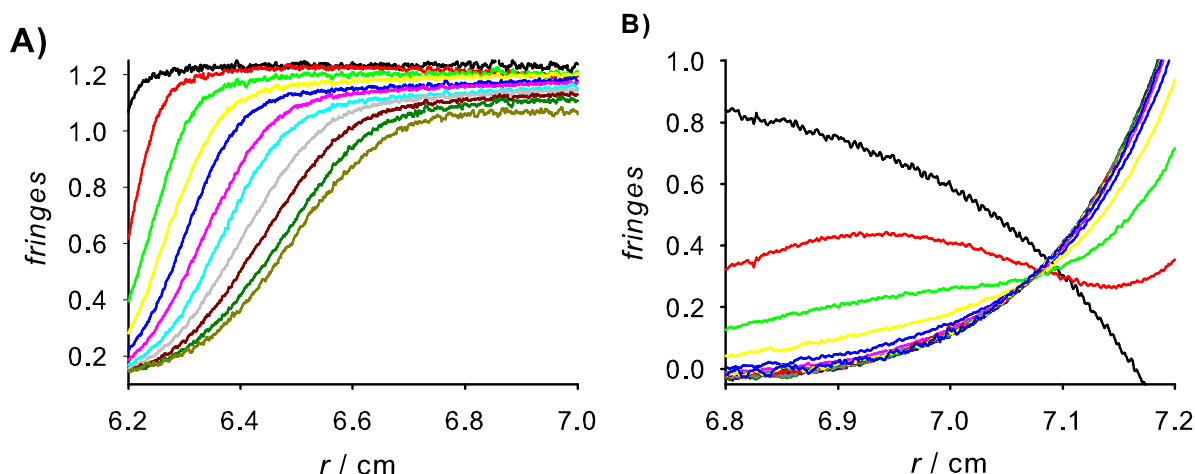


Figura II.1: Perfiles de concentración para experimentos de ultracentrifugación de una muestra de la proteína rabfilina-3A de concentración total inicial, $c_0 = 0.3 \text{ mg/mL}$ en disolvente-tampón HEPES 25 mM, NaCl 100 mM y EGTA 1 mM a 4°C . A) Experimento de velocidad de sedimentación realizado a 40 000 rpm durante 15 horas. B) Experimento de equilibrio de sedimentación realizado a 15 000 rpm durante 160 horas. En A), las curvas de izquierda a derecha corresponden a tiempos sucesivos. En B), las curvas que se superponen corresponden a tiempos para los que se ha alcanzado ya el equilibrio.

Ambos tipos de experimentos permiten la determinación de importantes propiedades del sistema en estudio, siendo en la mayoría de los casos métodos complementarios. A partir de los experimentos de velocidad de sedimentación pueden determinarse:

- Coeficientes de sedimentación.

- Número de especies en disolución.
- Masas moleculares aproximadas.
- Estados de oligomerización.
- Asociaciones libres y hetero-asociaciones.

Por otra parte, los experimentos de equilibrio de sedimentación permiten la determinación de:

- Interacciones entre proteínas que forman complejos de forma reversible.
- Constantes y estequiometría de unión.
- Masas moleculares de partículas no interactuantes o complejos estables.
- Estados de oligomerización.
- Asociaciones libres y hetero-asociaciones.

En este trabajo, cuando se consideran sistemas heterógeneos se consideran no interaccionantes por lo que la información que se obtiene consiste, esencialmente, en pesos moleculares, coeficientes de sedimentación y composición.

II.2. Instrumentación

A lo largo de la historia de la ultracentrifugación analítica se han desarrollado y utilizado diversos equipos para la obtención de perfiles de sedimentación pero los componentes básicos de los mismos han permanecido invariables. Una ultracentrífuga analítica consta básicamente de un motor cuya función es controlar la velocidad, un sistema de control de temperatura, un sistema de control de vacío, un sistema de detección óptica y un rotor. Estos elementos se sitúan en una cámara teniendo el sistema de vacío la función de minimizar en dicha cámara el calentamiento producido por la fricción del rotor con el aire (ver Figura II.2).

En la actualidad únicamente se encuentran disponibles los sistemas de la compañía Beckman Coulter, que, como se detallará en el apartado siguiente, se clasifican según el sistema de detección que emplean para la medida de la concentración de la muestra a

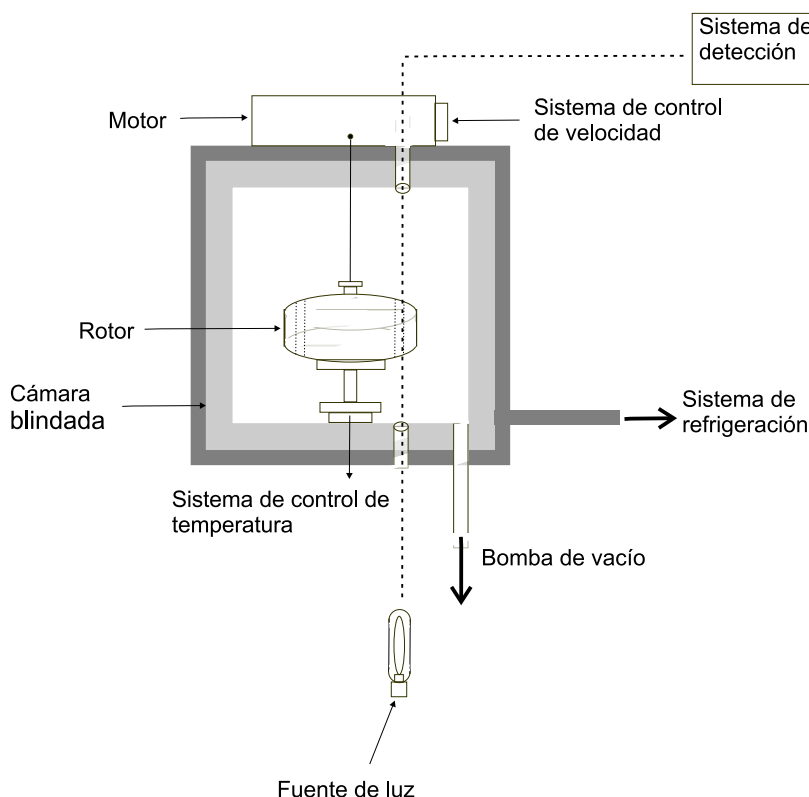


Figura II.2: Esquema de una ultracentrífuga analítica. Inspirado en [37]

lo largo de la célula que la contiene (se anticipa que el equipo empleado en este trabajo incorpora los dos más importantes: absorbancia e interferencia).

A continuación se describirán con detalle dos de los elementos más importantes de una ultracentrífuga analítica: los sistemas de detección y el rotor.

II.2.1. Sistemas de detección

Como se ha adelantado al comienzo de este capítulo, la distribución (o perfil) de concentración se determina experimentalmente para diversos tiempos mediante algún procedimiento óptico que permita evaluar la concentración en cada posición de la célula. Los métodos ópticos más utilizados son la absorbancia y la interferencia. En el primer caso, el sistema de detección está compuesto por un espectrofotómetro ultravioleta-visible de doble haz con un monocromador y se usará para muestras que presenten grupos cromóforos como las proteínas. En el caso de la interferencia, el detector es un dispositivo llamado interferómetro, del cual existen al menos dos variantes habituales. Dicho detector permi-

te analizar muestras que presentan una baja absorbancia o incluso que no tienen, como es el caso de ciertos polímeros. En los últimos tiempos se ha añadido a estos detectores el sistema de detección de fluorescencia, que permite observar concentraciones mucho más pequeñas de muestras que estén marcadas con sondas fluorescentes. Así, para la ultracentrífuga de la casa Beckman Coulter se distinguen el modelo XL-A, que contiene únicamente un sistema de detección por absorbancia, y el XL-I que utiliza además, el método de interferencia (ver Figura II.3). El detector de fluorescencia consiste en un bloque anexo que se acopla en la ultracentrífuga Beckman, tanto XL-A como XL-I, si bien el instrumento que se ha empleado no lo tiene.



Figura II.3: Ultracentrífuga analítica modelo ProteomeLab™ XL-I de Beckman Coulter (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA).

A partir de este momento el estudio se centrará en los sistemas de detección de absorbancia e interferencia por ser los más comúnmente usados. Los valores que indican los detectores, absorbancia o densidad óptica (*optical density*, OD) en el caso de absorbancia y desplazamiento de franjas de interferencia (*fringe displacements* o, abreviadamente, *fringes*) en el caso de interferencia, están relacionados de manera lineal con la concentración de la muestra que estamos midiendo en nuestro experimento.

Para el caso de la absorbancia se cumple la ley de Lambert-Beer:

$$A = l\epsilon c \quad (\text{II.1})$$

o bien:

$$A = l\epsilon_M c_M \quad (\text{II.2})$$

donde A es el valor de absorbancia medido por el detector de la ultracentrífuga, l es la longitud que atraviesa el rayo de luz (en una celda típica son 1.2 cm, aunque las hay de grosores menores), c es la concentración másica de la muestra y ϵ es el coeficiente de absorción específico, o bien, si c_M es la concentración molar de la muestra, ϵ_M es el coeficiente de absorción molar. El coeficiente de absorción es característico de la especie que absorbe la radiación, y depende de la longitud de onda de la radiación incidente λ .

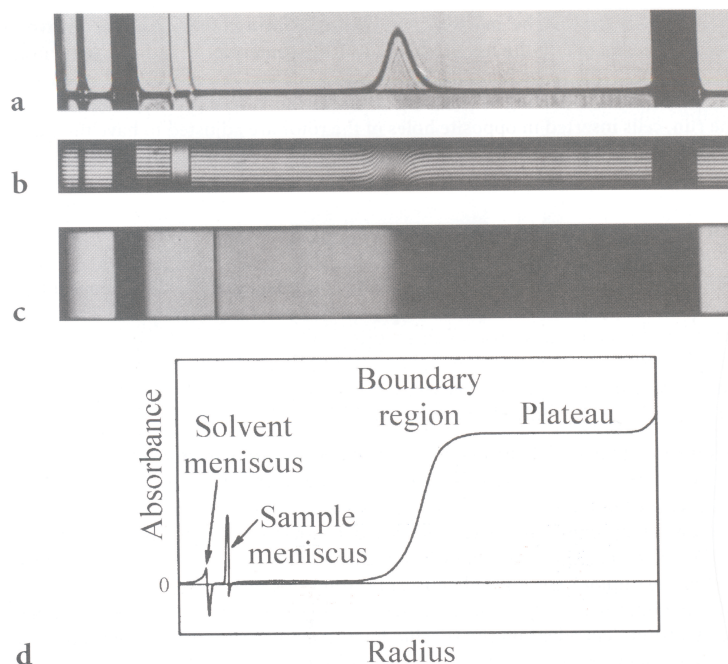


Figura II.4: Diversos tipos de registros ópticos obtenidos (a) en modo interferencia, mediante óptica Schlieren (b) en modo interferencia, mediante óptica Rayleigh (c) en modo absorbancia UV mediante registro fotográfico, y (d) modo absorbancia, barrido radial de intensidad (original de [34] reproducido en Mächtle y Börger [11]).

En la Figura II.4c se muestra lo que sería una imagen instantánea de la célula observada por el método de absorbancia, correspondiendo el mayor ennegrecimiento a las zonas de mayor concentración. En la instrumentación actual se realiza, en cada toma de medidas (o *scan*) un barrido de absorbancia a lo largo de toda la célula, que da lugar a un perfil como el mostrado en la Figura II.4d.

En el caso de detección por interferencia, el fundamento es la variación del índice de refracción de la disolución con la concentración. La interferencia entre rayos cuya longitud de onda ha cambiado dependiendo de la concentración de la zona que hayan atravesado es la base de este método de detección. Si bien en antiguas ultracentrífugas se

empleaba la técnica de Schlieren (Figura II.4a), actualmente en la Beckman XL-I se utiliza el método de Rayleigh, que suministra una imagen de la célula compuesta por franjas. Si la concentración a lo largo de toda la célula fuese uniforme, las franjas serían paralelas unas a otras y dirigidas en la dirección radial. Al haber cambios de concentración, las franjas se inclinan y curvan, como se muestra en la Figuras II.4b y II.5. Si la concentración en un punto de la célula es $c(r_1, t)$ y en otro $c(r_2, t)$, una línea en dirección radial que va de r_1 a r_2 cruza un número de franjas igual a:

$$\left(\frac{l}{\lambda}\right) \left(\frac{dn}{dc}\right) [c(r_2, t) - c(r_1, t)] \quad (\text{II.3})$$

Una explicación detallada del método de interferencia Rayleigh puede encontrarse en el libro de Van Holde [36]. En el modo de interferencia, la máquina trabaja con una longitud de onda fija ($\lambda = 655 \text{ nm}$ y $l = 12 \text{ mm}$ en nuestro caso).

Así pues, la técnica mide no concentraciones absolutas, sino cambio de concentración másica. Tomando como referencia el menisco se tendría, para el desplazamiento de franjas

$$\Delta j = \left(\frac{l}{\lambda}\right) \left(\frac{dn}{dc}\right) [c(r, t) - c(r_m, t)] \quad (\text{II.4})$$

de manera que, en un experimento de velocidad de sedimentación, pasado un tiempo suficiente desde el comienzo de la ultracentrifugación, se tendría $c(r_m, t) \approx 0$ en el menisco, con lo que Δj sería proporcional a $c(r, t)$ (como lo es A en el modo de absorbancia) quedando, obviamente,

$$\Delta j = \left(\frac{l}{\lambda}\right) \left(\frac{dn}{dc}\right) c(r, t) \quad (\text{II.5})$$

Y con $l = 1.2 \text{ cm}$ y la longitud de onda $\lambda = 670 \text{ nm}$, la expresión que se obtiene es:

$$c(r, t) = [5.58 \times 10^{-5} / (dn/dc)] \Delta j \quad (\text{II.6})$$

Una referencia a esta expresión aparece en [38].

Estos dos métodos presentan diferencias en función de las cuales se seleccionará uno u otro. La detección por absorbancia es selectiva ya que solo detecta los componentes que absorben y además permite diferenciar entre los mismos en función de la longitud de onda a la que absorben, mientras que el método de interferencia no es selectivo. Sin embargo, esto se convierte en una ventaja en la elección del disolvente-tampón en el está disuelta la muestra, debido a que ahora éste puede estar compuesto por sustancias que

presenten absorbancia, lo que no es posible si se utiliza la detección mediante medidas de absorbancia ya que pueden interferir en las mismas. Por contra, cuando se utiliza el método de interferencia es muy importante asegurarse de que el disolvente-tampón (*buffer*) en la muestra y en la referencia estén en perfecto equilibrio químico ya que por las características de las medidas cualquier diferencia entre ambos puede ocasionar resultados indeseables (cuestión que no es tan crítica en el caso de medidas de absorbancia). Debido a lo anterior se debe realizar un proceso previo de diálisis o de filtración en gel.

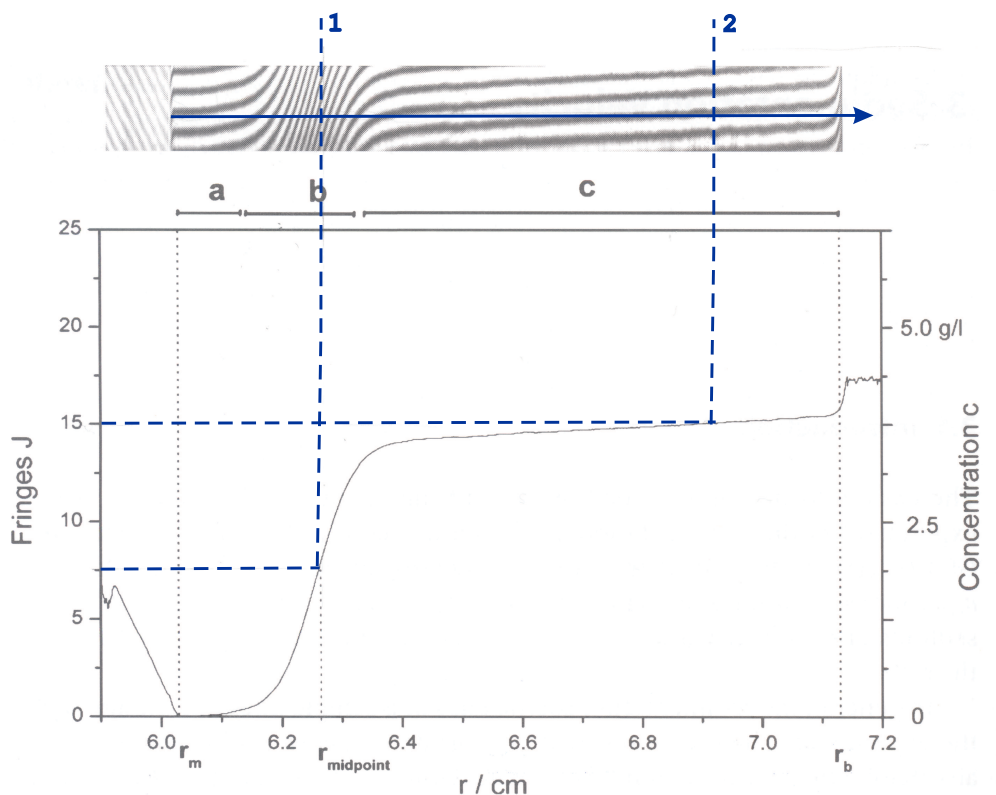


Figura II.5: Imagen instantánea de interferencia Schlieren: (a) disolvente sobrenadante, (b) zona de transición, en la que se encuentra el frente sedimentante, (c) región de *plateau*. Barriendo la imagen de interferencia en dirección radial, desde el menisco hasta el fondo de la célula, se cuenta el número de franjas (*fringes*) que son atravesadas (denotado como J en la gráfica y como Δj en el resto de la Tesis). En (1), en torno al punto medio de la zona del frente sedimentante, el número de franjas atravesadas es aproximadamente 8.5, y en (2), en la región *plateau* cerca del fondo, es aproximadamente 15 (adaptada de Mächtle y Börger [11]).

Otra de las ventajas del sistema de interferencia es que el rango en el que existe un comportamiento lineal de la señal Δj con la concentración es ilimitado, no sucediendo

esto en el caso de la absorbancia donde se debe trabajar entre 0.1 y 1.5 OD. Asimismo, al utilizar el método de interferencia la adquisición de datos es rápida (unos pocos segundos) mientras que utilizando el método de absorbancia el tiempo de adquisición de datos es del orden de minutos. Sin embargo, la relación entre la señal y el ruido, y por tanto, la posibilidad de estudiar solutos muy diluidos, es mucho más alta en interferencia que en absorbancia (del orden de 100 veces más). Una última diferencia que cabe reseñar entre los dos sistemas de detección se debe a la línea base o ruido sistemático, como se detallará en el apartado siguiente.

Línea base o ruido sistemático

Se distinguen dos tipos de desplazamiento de la señal que aparecen de manera sistemática en los perfiles de concentración procedentes de experimentos de ultracentrifugación analítica. El primero de ellos es una línea base que cambia con la posición radial pero que es independiente del tiempo (TI, *time independent*). Aparece sea cual sea el sistema de detección utilizado siendo mucho más significativa en el caso de la interferencia. Esto se produce en el sistema de detección de absorbancia por imperfecciones en las ventanas, y en el caso de interferencia por imperfecciones en alguno de los componentes del sistema de detección. El segundo tipo de desplazamiento, que solo aparece cuando se utiliza el detector de interferencia, es un desplazamiento de la señal independiente de la posición pero dependiente del tiempo (RI, *radial independent*), un ejemplo del cual sería el desplazamiento denominado *jitter* consistente en un cambio en la línea base (con un Δj espúreo y entero, tal como ± 1 , etc). Al igual que sucede con el TI, este desplazamiento puede eliminarse fácilmente en velocidad después del análisis de los datos pero no es fácil si el experimento es de equilibrio [39, 40].

II.2.2. Celdas y rotor

El rotor es una pieza de titanio que tiene huecos donde se insertan las celdas que contienen las muestras a analizar (una foto de una celda preparada para su utilización se muestra en la Figura II.6). Los huecos, y por tanto las celdas, están colocados paralelos al eje de rotación de la ultracentrífuga. Existen dos tipos de rotores [41]: An-50 Ti y An-60 Ti. El primero de ellos, que es del que se dispone (ver Figura II.7), tiene 8 huecos. En siete de esos huecos se colocarán celdas con muestra y en el restante lo que se denomina contrapeso o *counterbalance*. El *counterbalance* es un tipo especial de célula (que no contiene muestra)

cuyo peso se puede variar adicionando pesas (de forma que contraresta el peso de la celda que tiene enfrente) y cuya utilidad es la de calibrar la distancia radial, acción necesaria para experimentos de absorbancia. Este rotor es capaz de soportar una velocidad de 50 000 rpm lo que produce un campo centrífugo en la celda unas 200 000 veces mayor que el campo de la gravedad terrestre, g . El rotor AnTi-60 tiene solo 4 huecos (3 para las celdas que contienen la muestra y uno para el *counterbalance*). Con este rotor se puede trabajar a velocidades mayores, soporta hasta 60 000 rpm (produce un campo centrífugo 290 000 veces mayor que g).



Figura II.6: Imagen de una celda de ultracentrífuga lista para su uso.

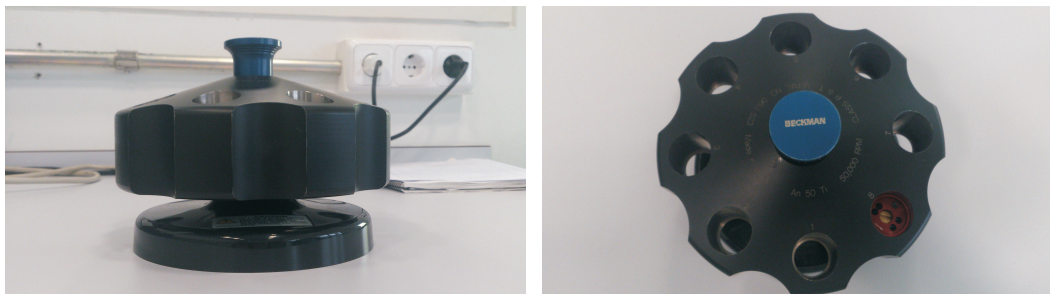


Figura II.7: Imagen de un rotor de ultracentrífuga An-50 Ti .

En las celdas o células es donde tiene lugar el proceso de sedimentación por ultracentrifugación [41]. Éstas están constituidas por varios elementos que han de ensamblarse para realizar el experimento con la ultracentrífuga. Un típico esquema del adecuado montaje de todos los componentes de una de estas células se muestra en la Figura II.9. De estos componentes destacan la denominada pieza central (*centerpiece*) y las ventanas (*windows*). Estas últimas pueden ser de cuarzo, en el caso de que el experimento a realizar sea de absorbancia, o de zafiro, válidas tanto para experimentos de absorbancia como de interferencia. La pieza central puede ser de aluminio, de un epóxido reforzado o de un

polímero. Las utilizadas actualmente son resinas EponTM rellenas de carbón vegetal. Estas piezas suelen tener dos sectores que pueden contener cada uno de ellos $400\mu\text{L}$, siendo entonces el camino óptico de 12 mm. En uno de los sectores se coloca la muestra y en el otro, el disolvente de referencia que debe estar en equilibrio químico con la muestra. Como se comentó anteriormente, este aspecto es muy importante en el caso de la utilización del detector de interferencia. También existen piezas de seis canales que permiten colocar 3 muestras en una fila con sus referencias correspondientes en la fila de enfrente. Este último tipo de piezas centrales se utilizan en experimentos de equilibrio ya que la cantidad de muestra necesaria para realizarlos es mucho menor (en torno a $100\text{--}150\mu\text{L}$) siendo entonces el camino óptico de 1 a 3 mm. La Figura II.8 muestra fotos de sendos tipos de *centerpieces* (ambos disponibles en nuestro laboratorio).

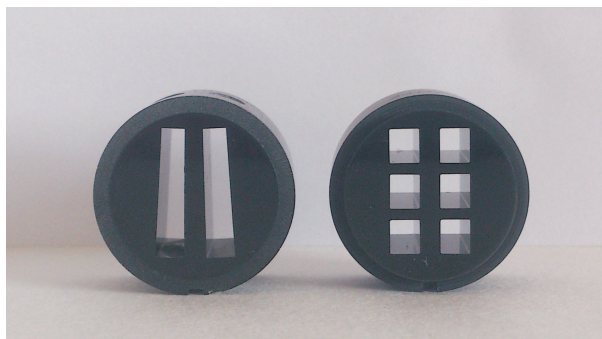


Figura II.8: Fotos de dos *centerpieces* con 2 y 6 sectores.

Las células, deben ser capaces de soportar el alto campo centrífugo generado por las elevadas velocidades utilizadas, así como evitar fugas y otros inconvenientes que puedan distorsionar las medidas realizadas. Además, el peso de las mismas debe estar perfectamente equilibrado al situarlas en el rotor dando lugar a que el rotor sea estable ya que cualquier inestabilidad puede provocar problemas en el experimento realizado.

Así pues, resulta evidente que las celdas o células en AUC no son unas simples cubetas como las de un espectrofotómetro, sino unas complejas piezas de diversos componentes que han de ensamblarse antes y desensamblarse después de cada medida.

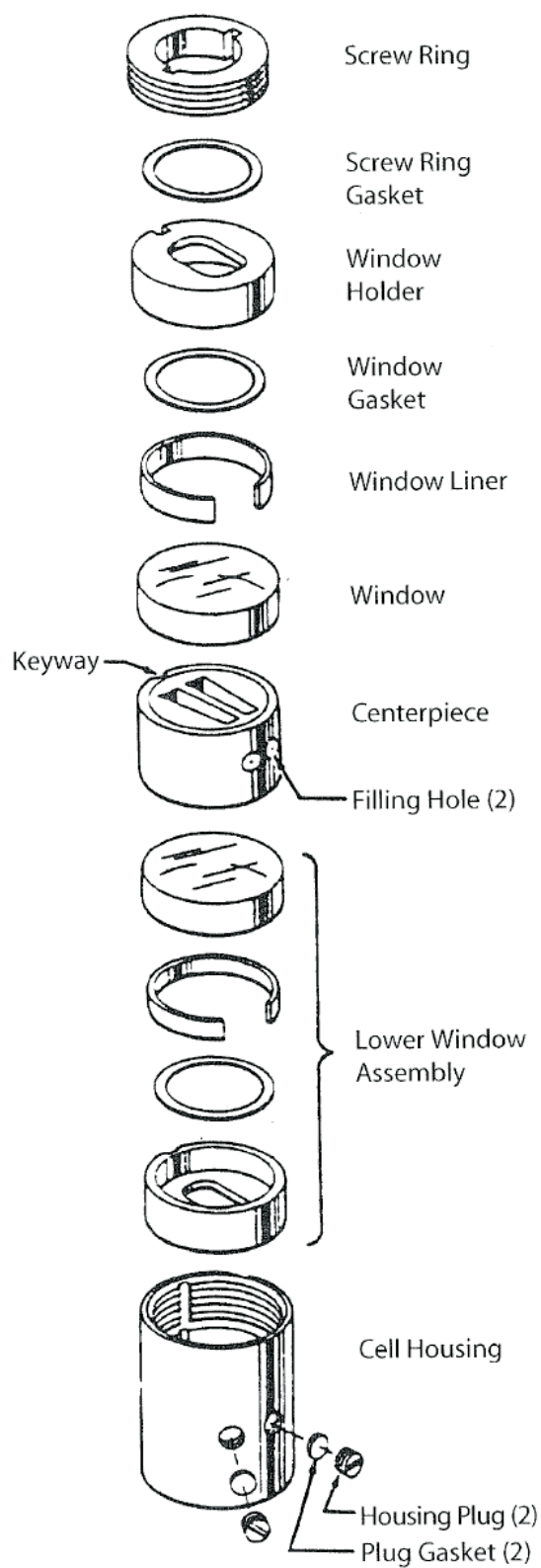


Figura II.9: Ilustración del montaje de las piezas que componen una celda de AUC.
Reproducido de [11].

II.3. Aspectos geométricos

En la Figura II.10 se muestra un esquema de uno de los sectores que conforman el *centerpiece* de una celda. La forma de sector circular está diseñada para evitar el choque de las partículas de soluto con las paredes laterales durante el movimiento radial propio del proceso de sedimentación. La geometría del sector está caracterizada por un ángulo ϕ , y una posición dentro del mismo está caracterizada por la distancia r al eje de giro. La célula gira con una velocidad angular de rotación ω . A partir de ahora se hablará en términos de célula o celda, aunque en rigor nos estemos refiriendo a un sector del *centerpiece* de la celda.

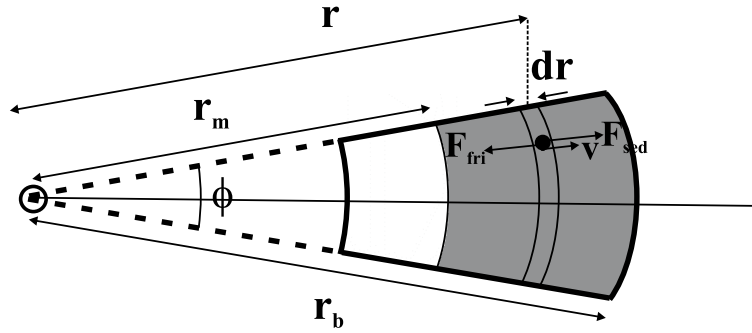


Figura II.10: Geometría de una celda de ultracentrífuga convencional. Obsérvese la posición del menisco, r_m , del fondo, r_b , y la posición instantánea de una partícula de soluto, r , sometida a una fuerza centrífuga, F_s cuando gira con una velocidad angular de rotación ω y a una fuerza de fricción F_f .

Inicialmente, la célula se carga con una disolución, en la que la concentración másica de soluto es uniforme, c_0 . Según transcurre el proceso de sedimentación, la concentración cambia a lo largo de la célula, y para cada posición, r , varía con el tiempo, t , siendo por ello una función de dos variables, $c(r, t)$.

Nótese en la Figura II.10 que el elemento de volumen comprendido entre r y $r + dr$ es una franja o rodaja cuya área es ϕhr y su espesor es dr , siendo igual a $dV = \phi hr dr$, donde h es la altura de la célula. El volumen total de la disolución es

$$V_{sol} = \int_{r_m}^{r_b} dV = \frac{1}{2} \phi h (r_b^2 - r_m^2) \quad (\text{II.7})$$

La cantidad de masa de soluto en el sistema es trivialmente $W_0 = V_{sol}c_0$. La ley de conservación de la masa implica que, en cada momento, la integral sobre la célula de la masa o concentración (pues el volumen del sistema no cambia) será igual a la masa inicial, esto es, para cualquier tiempo t :

$$W_0 = \int_{r_m}^{r_b} c(r, t) dV = \phi h \int_{r_m}^{r_b} r c(r, t) dr \quad (\text{II.8})$$

o análogamente,

$$c_0 = \frac{2}{(r_b^2 - r_m^2)} \int_{r_m}^{r_b} r c(r, t) dr \quad (\text{II.9})$$

La forma de sector circular es responsable de un efecto que afecta a los perfiles de concentración. Además de lo que ocurre por efecto de la fuerza centrífuga (y de la difusión), hay un mero efecto consistente en que, si el soluto que está en una rodaja de posición radial r se mueve a otra con r' mayor, al ser el volumen de la rodaja proporcional a r , aumentando en r' , se produce un efecto llamado de dilución radial. En este trabajo se tratará de considerar siempre este efecto, aunque en algunos tratamientos de los datos de ultracentrifugación se ignora para simplificar la forma de sector circular, tomando la célula como un paralelepípedo. En tal caso las expresiones anteriores se simplifican a:

$$V_{sol} = \int_{r_m}^{r_b} dV = \sigma(r_b - r_m) \quad (\text{II.10})$$

siendo σ la sección transversal de la célula,

$$W_0 = \int_{r_m}^{r_b} c(r, t) dV = \sigma \int_{r_m}^{r_b} c(r, t) dr \quad (\text{II.11})$$

o análogamente,

$$c_0 = \frac{1}{(r_b - r_m)} \int_{r_m}^{r_b} c(r, t) dr \quad (\text{II.12})$$

Estas expresiones se han escrito para un soluto único, pero tienen igual validez para cada componente en un soluto heterogéneo.

II.4. Variación espacio-temporal de la señal y perfiles de concentración

Considerando el caso más general de una disolución con varios solutos, la ultracentrifugación dará lugar a que la concentración de cada uno de ellos, en cada posición r de la célula, varíe con el tiempo de manera diferente. Los perfiles de concentración másica de la especie i , dependientes del tiempo, se denominan genéricamente $c_i(r, t)$. Por otra parte, lo que el sistema de detección registra es un perfil, dependiente del tiempo, de la señal detectada por el sistema óptico a lo largo de la célula, $z(r, t)$. Sea el registro de absorbancia, de interferencia (los dos más comunes y disponibles en nuestra Beckman XL-I), o cualquier otro, se asume que la señal es (i) aditiva sobre la de los diversos componentes z_i , y (ii) para cada componente, z_i es proporcional, bien a la concentración másica c_i , o bien a la concentración molar $c_{M,i} = c_i/M_i$.

En el caso de interferencia, la señal, expresada como desplazamiento de franjas (ecuación II.5), es proporcional a c_i . También lo es en la modalidad de absorbancia si ésta se expresa en términos del coeficiente de absorción específico (ecuación II.1), pero si se expresa en términos del coeficiente de absorción molar (ecuación II.2), sería proporcional a $c_{M,i}$. También podría ser este último, el caso (menos común) de detección por fluorescencia, en el cual cada especie contribuiría a la señal de manera proporcional al número de moléculas de ella presentes, determinado por $c_{M,i}$. Todas estas situaciones se pueden formular de una manera conjunta como:

$$z_i = \frac{q_i}{M_i^{\alpha_i}} c_i \quad (\text{II.13})$$

donde α_i valdrá 0 ó 1 según los casos (proporcionalidad a c_i o a $c_{M,i}$, respectivamente), y la constante q_i dependerá de la naturaleza de la especie pero no de su peso molecular.

Así, la relación entre la señal espacio-temporal y las concentraciones másicas de cada especie quedará como:

$$z(r, t) = \sum_i \frac{q_i}{M_i^{\alpha_i}} c_i(r, t) \quad (\text{II.14})$$

De esta relación se pueden escribir casos particulares. En interferencia, por lo antedicho, $\alpha_i = 0$ y $q_i = (l/\lambda)(\frac{dn}{dc})_i$. En absorbancia se puede tomar $\alpha_i = 0$ y $q_i = l\epsilon_i$, con lo cual se tiene tanto para absorbancia como para interferencia una forma común simplificada – que es la que se asumirá habitualmente:

$$z(r, t) = \sum_i q_i c_i(r, t) \quad (\text{II.15})$$

si bien la expresión en términos de absorbancia molar daría lugar a la ecuación II.14 con $\alpha_i = 1$ y $q_i = l\epsilon_{M_i}$.

Hay casos en los que las constantes q_i pueden ser iguales a un único valor q para todas las especies. Así ocurre en sistemas heterógeneos en los que las diversas especies son oligómeros o polímeros constituidos de una cierta unidad repetitiva. En interferencia, q_i depende de la naturaleza pero no del peso molecular. En absorbancia, si cada unidad repetitiva tiene un grupo cromóforo (por ejemplo en homo-oligómeros de proteínas, o en polímeros de un monómero que absorbe), se tiene $\epsilon_{M,i} = i\epsilon_{M,1}$, y como $M_i = iM_1$ (el subíndice 1 indica el monómero), entonces el coeficiente específico ϵ_i es el mismo para todas las especies. En todas estas situaciones

$$z(r, t) = q \sum_i c_i(r, t) \quad (\text{II.16})$$

En los Capítulos V y VI, al tratar sistemas heterogéneos compuestos por macromoléculas con polidispersidad continua, se adoptará este caso, que es el que se da en la mayoría de las situaciones. No obstante, cabe aquí mencionar un posible caso diferente, en el que cada especie, independientemente de su grado de polimerización y peso molecular, tuviera un solo grupo cromóforo o fluoróforo. Entonces, se tendría una ecuación como la II.16 con la concentración molar en lugar de la másica, quedando

$$z(r, t) = q \sum_i c_i(r, t)/M_i \quad (\text{II.17})$$

esto es, lo correspondiente a la ecuación II.14 con q común y $\alpha_i = 1$.

II.5. Coeficiente de sedimentación

La fuerza que actúa sobre una partícula situada a una distancia r del eje de giro hacia el fondo de la célula viene dada por

$$F_{sed} = \omega^2 r m_b \quad (\text{II.18})$$

donde ω es la velocidad angular de rotación de la célula y, $m_b = m(1 - \bar{v}\rho)$ es la masa flotante de la partícula, igual a la masa m descontando de ella el término de flotación,

determinado por el volumen específico parcial de la partícula $\bar{v}$ y la densidad de la disolución, ρ . A veces, es conveniente definir un peso molecular flotante, como $M_b = M(1 - \bar{v}\rho)$. La masa de la partícula está relacionada con el peso molecular $m = M/N_A$, donde N_A es el número de Avogadro.

Al moverse las partículas con velocidad v experimentan una fuerza de fricción en dirección contraria al movimiento:

$$F_{fri} = -fv \quad (\text{II.19})$$

donde f es el coeficiente de fricción traslacional, relacionado con el coeficiente de difusión traslacional, D , mediante la ecuación de Einstein

$$f = k_B T / D \quad (\text{II.20})$$

siendo k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

En régimen estacionario (régimen viscoso), una partícula alcanza una velocidad estacionaria, en la que no hay inercia y las dos fuerzas se compensan ($F_{sed} = -F_{fri}$) para dar una resultante nula:

$$0 = \omega^2 r m_b - f v \quad (\text{II.21})$$

de donde se obtiene para la velocidad:

$$v = \frac{\omega^2 r m_b}{f} \quad (\text{II.22})$$

El coeficiente de sedimentación se define como la relación entre la velocidad lineal de la partícula y la aceleración centrífuga $\omega^2 r$,

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} \quad (\text{II.23})$$

de manera que

$$s = \frac{m_b}{f} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{M_b}{N_A f} \quad (\text{II.24})$$

Nótese que el coeficiente de sedimentación tiene unidades de tiempo. Los valores más bajos que se encuentran son del orden de 10^{-13} s, y a esta cantidad se la denomina unidad Svedberg, S.

Se recuerda que el coeficiente de fricción de una macromolécula o partícula en disolución diluida puede expresarse, en términos generales, como $f = \eta_0 \times [\text{tamaño, conformación}]$ donde η_0 es la viscosidad del disolvente, y “[tamaño, conformación]” es un término que

dependerá de la conformación (forma, o flexibilidad) de la partícula y del tamaño de ésta. Por ejemplo, en el caso más simple de una partícula esférica de radio a , el término [tamaño,conformación] sería igual a $6\pi a$ (ecuación de Stokes). En este caso, la ecuación II.20 se puede escribir de la siguiente forma

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 a} \quad (\text{II.25})$$

que se conoce como ecuación de Stokes-Einstein.

En general, el coeficiente de sedimentación dependerá de la viscosidad y densidad del disolvente, que será prácticamente igual a la densidad de la disolución en el caso de la disolución diluida, y de ciertas características de la partícula, concretamente de su volumen específico parcial y, lo que es más importante a efectos de caracterización estructural, de su tamaño y conformación.

Teniendo en cuenta la ecuación de Einstein (ecuación II.20), la ecuación II.24 queda en la forma

$$s = \frac{m_b}{f} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)D}{RT} \quad (\text{II.26})$$

siendo $R = N_A k_B$ la constante de los gases perfectos, que puede escribirse como la llamada ecuación de Svedberg,

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (\text{II.27})$$

que muestra como la combinación de s y D puede suministrar el valor del peso molecular, sin previo conocimiento de la conformación y tamaño geométrico de las partículas. Se insite en que en las ecuaciones II.26 y II.27 podría emplearse el peso molecular flotante, $M_b = M(1 - \bar{v}\rho)$.

En la ecuación II.27 se supone que s y D se dan a la misma temperatura, ya que el coeficiente de fricción depende de la viscosidad que es muy sensible a la temperatura. Generalmente, tanto s como D se corrigen a la condición estándar consistente en expresar sus valores en el disolvente agua a una temperatura de 20°C, en cuyo caso dichos coeficientes se denotan por $s_{20,w}$ y $D_{20,w}$, respectivamente. Para realizar dicha transformación es necesario conocer las volúmenes específicos de los solutos tanto a 20°C como a la temperatura de trabajo, así como los valores de densidad y viscosidad del agua a 20°C y del disolvente utilizado a la temperatura de trabajo.

Para las descripciones teóricas que se exponen en las siguientes secciones es importante notar que, dado el coeficiente de sedimentación de una partícula s , la velocidad v con la

que ésta se aleja del eje de rotación cuando está a una distancia r de éste es

$$v = s\omega^2 r \quad (\text{II.28})$$

estando determinada, para una ω fija, únicamente por s . Si el movimiento convectivo debido a la fuerza centrífuga, es el único componente del movimiento, lo cual es prácticamente aplicable a la modalidad de velocidad de sedimentación (aunque luego se tendrá en cuenta la necesaria contribución de la difusión o movimiento browniano), la anterior ecuación escrita como

$$\frac{dr}{dt} = s\omega^2 r \quad (\text{II.29})$$

conduce trivialmente a una ecuación de movimiento

$$r(t) = r(t_0) \exp[s\omega^2(t - t_0)] \quad (\text{II.30})$$

la cual da la posición de la partícula sedimentante, $r(t)$, a partir de la posición en un instante anterior, $r(t_0)$.

II.6. Ecuación de flujos

En un experimento de ultracentrifugación, el flujo total J a través de una sección perpendicular a la dirección de movimiento es la resultante de los flujos difusivo y sedimentante, lo cual puede escribirse como

$$J = J_{dif} + J_{sed} \quad (\text{II.31})$$

Para el flujo difusivo J_{dif} se adopta la primera ley de Fick:

$$J_{dif} = -D \frac{\partial c}{\partial r} \quad (\text{II.32})$$

y en cuanto al flujo sedimentante, puede razonarse fácilmente que es igual al producto de la velocidad por la concentración en la posición r , $J_{sed} = vc$ (como en cualquier otro flujo conductivo [4]) y, recordando la expresión II.28 para v , se tiene

$$J_{sed} = s\omega^2 rc \quad (\text{II.33})$$

de manera que

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial r} + s\omega^2 rc \quad (\text{II.34})$$

Un razonamiento más elegante, basado en la termodinámica, mediante el que se demuestra la ecuación II.34 es el que aparece en el libro de Van Holde [4].

II.7. Velocidad de sedimentación

Si se aplica la ecuación II.30 a las moléculas más alejadas del fondo, que inicialmente ($t = 0$) se encuentran en el menisco r_m , al cabo de un tiempo seguirán siendo las más alejadas y formarán un frente sedimentante (*boundary*), situado en una posición dependiente del tiempo, $r_{bnd}(t)$, de manera que entre r_m y r_{bnd} ya habrá casi solamente disolvente, estando todo el soluto más allá de r_{bnd} . Esta posición $r_{bnd}(t)$ puede observarse experimentalmente, y de acuerdo con la ecuación II.30 se tendrá

$$r_{bnd}(t) = r_m \exp[s\omega^2 t] \quad (\text{II.35})$$

o bien

$$\ln \frac{r_{bnd}(t)}{r_m} = s\omega^2 t \quad (\text{II.36})$$

cabiendo también la posibilidad de tomar como referencia la posición del frente en cierto instante inicial

$$\ln \frac{r_{bnd}(t)}{r_{bnd}(t_0)} = s\omega^2 (t - t_0) \quad (\text{II.37})$$

Una versión muy simplificada del experimento de ultracentrifugación – pero aún útil para la interpretación más sencilla y medida más inmediata del coeficiente de sedimentación – puede llevarse a cabo efectuando una o varias de las siguientes simplificaciones:

- (I) Ignorar la difusión, que lógicamente debería tenerse en cuenta dado que en la célula, por motivo de la sedimentación, se crea un gradiente de concentración. Ignorando este efecto, el único movimiento sería el descrito por las ecuaciones II.28 - II.30.
- (II) Ignorar el fondo de la célula (como si ésta se extendiese desde r_m hasta $r_b = \infty$), en el que las partículas podrían acumularse o rebotar.
- (III) Ignorar la forma de sector y la dilución radial.

De hecho, en lo antes comentado acerca de una frontera bien definida, $r_{bnd}(t)$, ya se ha tenido en cuenta la suposición I.

Bajo la suposición III, el flujo a través de una sección es igual en cualquier posición y, bajo la suposición I, está determinado solamente por la velocidad, por lo que, tal y como ya se ha mencionado en la sección anterior, $J_{sed} = vc$ o, lo que es igual, $J_{sed} = s\omega^2 rc$ (ecuación II.33). Considérese una franja de la célula comprendida entre r y $r + \delta r$. Si la célula es paralelepípedica (ignorando la forma de sector, y la dilución radial), las dos caras de la franja tienen la misma sección σ . En un intervalo δt , entra por la cara izquierda una cantidad (masa) de soluto $J_{sed}(r - \delta r)\sigma\delta t = \sigma v(r - \delta r)c(r - \delta r, t)\delta t$, y sale por la derecha una cantidad $J_{sed}(r)\sigma\delta t = \sigma v(r)c(r, t)\delta t$; la resultante es la variación de masa en esa franja

$$\delta m = [J_{sed}(r - \delta r) - J_{sed}(r)]\sigma\delta t \quad (\text{II.38})$$

de donde se puede deducir la variación de concentración

$$\delta c = \frac{\delta m}{\sigma\delta r} = \frac{J_{sed}(r - \delta r) - J_{sed}(r)}{\delta r}\delta t \quad (\text{II.39})$$

Con intervalos infinitesimalmente pequeños, se tiene

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial J_{sed}}{\partial r} = -\frac{\partial(vc)}{\partial r} \quad (\text{II.40})$$

y teniendo en cuenta la ecuación II.28

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -s\omega^2 \left(c + r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (\text{II.41})$$

La ecuación II.41 es una ecuación diferencial para la cual la condición de contorno es $c(r, 0) = c_0$ si $r > r_m$ (concentración uniforme inicial en toda la célula, extendida hasta infinito, condición II). Con esta condición, la solución es

$$c(r, t) = c_0 \exp(-2\omega^2 st) = c_0 \left(\frac{r_b}{r_m} \right)^{-2} \quad (\text{II.42})$$

para $r > r_{bnd} = r_m \exp(s\omega^2 t)$, y $c(r, t) = 0$ para $r < r_{bnd}$.

También se puede escribir [42]

$$c(r, t) = c_0 \exp(-2\omega^2 st) U(r_{bnd} - r_m) = c_0 \left(\frac{r_b}{r_m} \right)^{-2} U(r_{bnd} - r_m) \quad (\text{II.43})$$

donde la función escalón de Heaveside es $U(x) = 1$ para $x > 0$ y $U(x) = 0$ para $x < 0$.

Este resultado es algo más detallado que el del primer tratamiento, en el sentido de indicar la concentración más allá de la frontera pero, como aquél, identifica la frontera y

permite el análisis más sencillo posible del coeficiente de sedimentación, que se basa en una representación o ajuste, según la ecuación II.36 o II.37, de $\ln(r_{bnd}(t)/r_m)$ frente a t , o de $\ln(r_{bnd}(t)/r_{bnd}(t_0))$ frente a $t - t_0$, para dar una recta de pendiente $s\omega^2$, de donde se extrae el coeficiente de sedimentación.

Se toma como ejemplo la proteína lisozima, que tiene $s = 1.89\text{ S}$ y $M = 14.3\text{ KDa}$ [43], centrifugada a un régimen de revoluciones de $\omega = 60\,000\text{ rpm}$, estando el menisco situado a $r_m = 5.8\text{ cm}$ del eje de revolución. De acuerdo con la versión extremadamente simplificada, que incluye las tres anteriores suposiciones, los perfiles de concentración serían los escalones que aparecen en la Figura II.11. Por conveniencia, en esta Figura y en las sucesivas de esta Tesis se expresará la concentración en mg/mL que es una unidad de concentración habitual en la práctica.

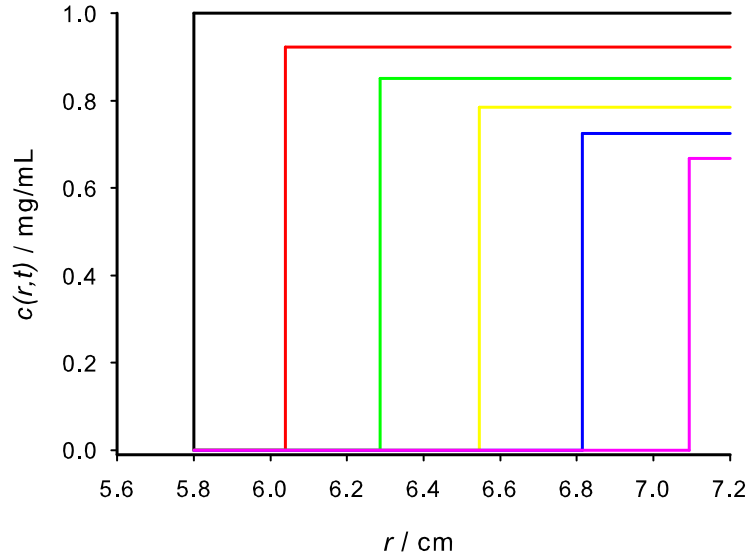


Figura II.11: Perfil de concentración de una muestra de lisozima de $c_0 = 1\text{ mg/mL}$ con $r_m = 5.8\text{ cm}$, $c_0 = 1\text{ mg/mL}$ a velocidad angular $\omega = 60\,000\text{ rpm}$. El intervalo de tiempo entre los perfiles sucesivos es de $5\,400$ segundos (desde tiempo 0 hasta $21\,600\text{ s}$).

Los perfiles de concentración observados experimentalmente difieren bastante de los esquemáticos de la Figura II.11. Una diferencia esencial es que los perfiles experimentales no presentan una frontera totalmente abrupta sino gradual, por diversos motivos, algunos ya apuntados. Para una especie monodispersa, un motivo suficiente es el efecto de la difusión. Si no se realiza la aproximación I, sino que se tiene en cuenta el efecto difusivo, como se hará a lo largo de esta Tesis, los perfiles son más parecidos a los que aparecen en

la Figura II.1A o en la Figura II.12 (perfiles pre-evaluados con la ecuación aproximada de Faxén, expuesta en II.9.1, que siguen siendo inválidos, sobre todo por efecto de la aproximación II).

Así en los perfiles reales, la posición del frente no está inmediatamente definida. A efectos de emplear la ecuación II.36 o II.37 para estimar el coeficiente de sedimentación, se puede tomar – como caso más sencillo – que r_{bnd} es la posición donde se alcanza la mitad de la altura (concentración) del *plateau*. En la Figura II.12 se muestra un ejemplo, marcando los puntos medios de los perfiles sigmoidales.

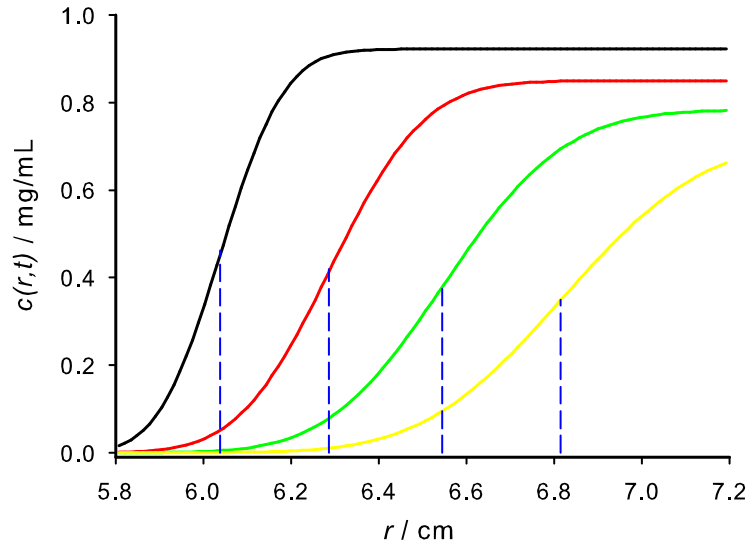


Figura II.12: Perfil de concentración de la lisozima en agua a 20°C con $r_m = 5.8$ cm, $c_0 = 1$ mg/mL a velocidad angular $\omega = 60\,000$ rpm para tiempos comprendidos entre 5 400 s y 21 600 s. Los perfiles de esta figura son datos experimentales “sintéticos” evaluados para esos valores de r_m y ω , y para los valores $s = 1.89$ S y $D = 11.2 \times 10^{-7}$ cm²/s de lisozima en agua a 20°C, mediante la ecuación de Faxén. Pueden observarse en dicha figura los puntos medios, r_{bnd} , de las curvas $c(r, t)$ vs. r para sucesivos t (líneas discontinuas azules).

En la Figura II.13 se representa $\ln(r_{bnd}/r_m)$ frente a t . De la pendiente de la recta, dada por $s\omega^2$ para la que se encuentra el valor 7.46×10^{-6} s⁻¹, se obtiene que el valor del coeficiente de sedimentación es $s = 1.89 \times 10^{-13}$ s = 1.89 S, que resulta, pese a lo aproximado del método, idéntico al de partida.

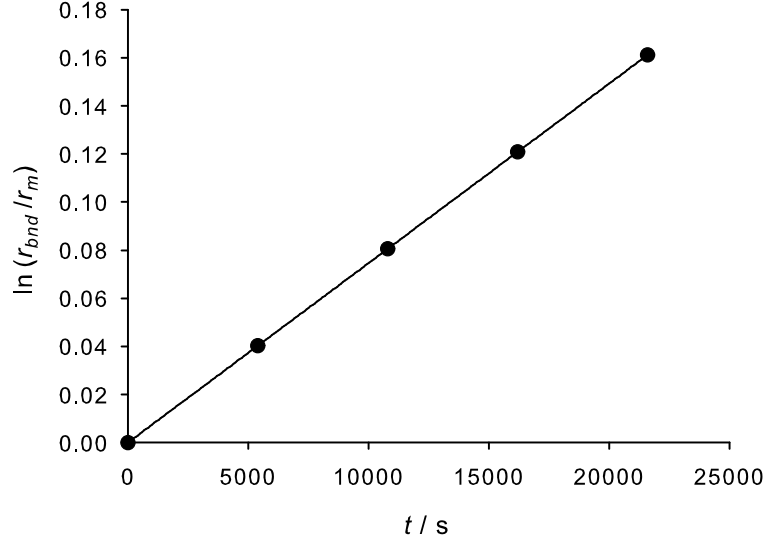


Figura II.13: Representación de $\ln(r_{bnd}/r_m)$ frente a t para el caso de la lisozima con $r_m = 5.8$ cm, $c_0 = 1$ mg/mL a velocidad angular $\omega = 60\,000$ rpm. Puede observarse en dicha representación cómo los datos siguen una tendencia lineal ajustándose a una línea recta que se rige por la ecuación II.36.

Una manera alternativa de establecer la posición del frente sedimentante, se basa en un criterio que lo identifica con el punto de inflexión de las curvas, de aspecto sigmoidal, de concentración frente a posición. Este punto se define por la condición

$$\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = 0 \quad (\text{II.44})$$

lo cual se corresponde con un máximo en la función derivada primera,

$$c'(r, t) = \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} \quad (\text{II.45})$$

donde $c'(r, t)$ es la pendiente de la tangente de $c(r, t)$ vs. r . En los cálculos, r está discretizado en intervalos de anchura χ . Una aproximación sencilla para evaluar esta pendiente es tomar la media de los intervalos que hay a la izquierda y a la derecha de r_i , que vale:

$$c'(r_i, t) \approx \frac{1}{2} \left[\frac{c(r_i, t) - c(r_{i-1}, t)}{\chi} + \frac{c(r_{i+1}, t) - c(r_i, t)}{\chi} \right] = \frac{c(r_{i+1}, t) - c(r_{i-1}, t)}{2\chi} \quad (\text{II.46})$$

Para un tiempo t , la posición r del frente sería aquella para la cual $c'(r, t)$ tendría el valor máximo. Estos perfiles derivada y su máximo se pueden programar fácilmente. Así, en la

Figura II.14 se representan las derivadas $c'(r, t)$ correspondientes a los perfiles de la Figura II.12, notándose cómo los máximos de las curvas – que se corresponden con la posición del frente sedimentante, r_{bnd} – se aprecian perfectamente.

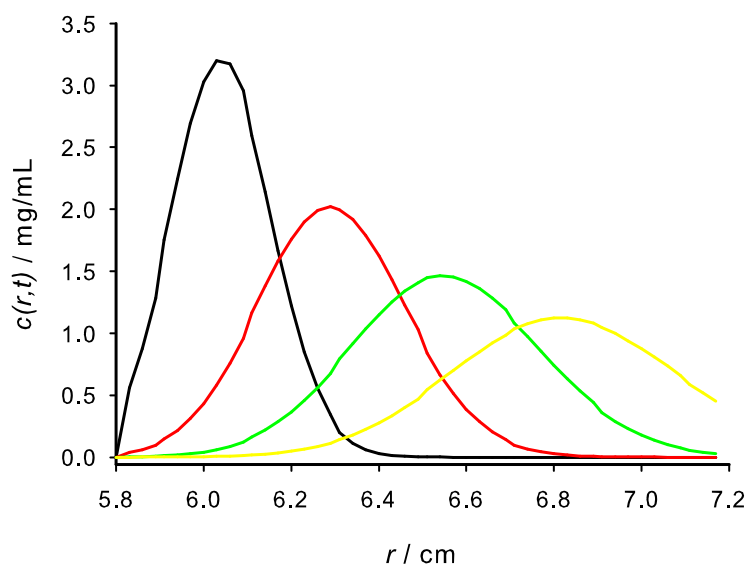


Figura II.14: Representación de las derivadas $c'(r, t)$ correspondientes a los perfiles de la Figura II.12, es decir, derivadas de los perfiles de concentración para el caso de la lisozima con $r_m = 5.8$ cm, $c_0 = 1$ mg/mL a velocidad angular $\omega = 60\,000$ rpm.

Así, utilizando este método numérico para determinar r_{bnd} , con los valores resultantes, la misma representación semilogarítmica conduce ahora a un coeficiente de sedimentación de 1.90 S, prácticamente igual al valor experimental con el que fueron generados los perfiles sedimentantes.

II.8. Equilibrio de sedimentación

La segunda de las principales variantes de los experimentos de ultracentrifugación analítica es el equilibrio de sedimentación. Es obvio que, a la larga, la coexistencia de dos transportes en direcciones opuestas tienen que dar lugar a un equilibrio en el que los flujos se igualen en cualquier punto, y en el que el perfil de concentración a lo largo de la célula ya no varíe con el tiempo.

Los experimentos de velocidad de sedimentación se hacen en un límite muy lejano al de equilibrio: ω muy elevada, con $s\omega^2$ muy grande (lo cual se favorece con especies de s grande) de manera que el término difusivo resulta despreciable tras un tiempo muy breve.

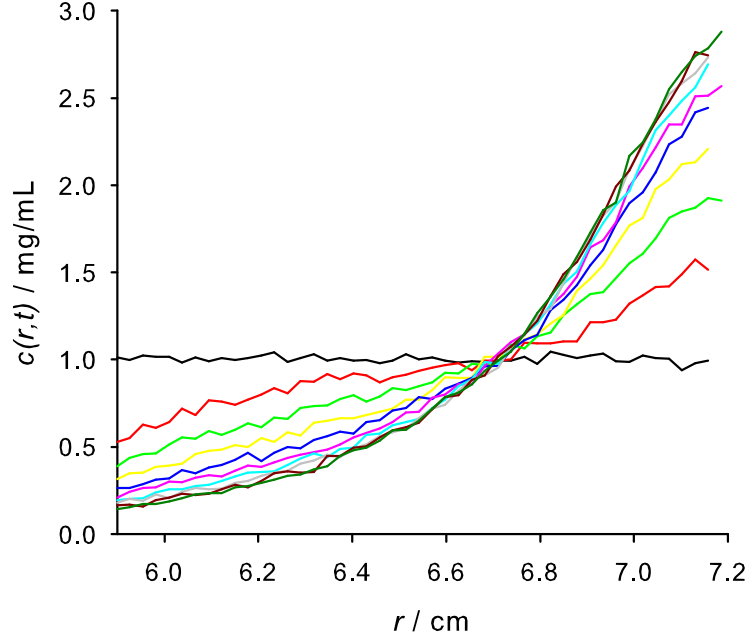


Figura II.15: Perfiles de concentración obtenidos utilizando simulaciones de dinámica browniana (programa SIMUSED) para la lisozima con $r_m = 6.7$ cm, $t_{run} = 500\,000$ s, $n_{steps} = 51$ $\omega = 15\,000$ rpm. Obsérvese que los perfiles para los últimos tiempos están superpuestos, lo que demuestra que se ha llegado al equilibrio.

Si por el contrario, se centrifuga con ω pequeña, y durante un tiempo suficientemente largo, se puede llegar a alcanzar ese equilibrio, con una distribución de concentración $c(r)$ que es independiente del tiempo. El equilibrio de flujos impone $J = 0$ en la ecuación II.31, quedando:

$$-D \frac{\partial c}{\partial r} + s\omega^2 r c = 0 \quad (\text{II.47})$$

de donde

$$s\omega^2 r = \frac{D}{c} \frac{\partial c}{\partial r} \quad (\text{II.48})$$

Sustituyendo s/D por su valor dado en la ecuación de Svedberg II.27, queda:

$$\frac{S}{D} = \frac{1}{r^2 \omega^2} \frac{\partial c}{\partial r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (\text{II.49})$$

Esta ecuación tiene una solución genérica trivial, y si se particulariza para las condición de contorno $c = c_m$ para $r = r_m$, se obtiene que:

$$c(r) = c_m \exp \left[\frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)(r^2 - r_m^2)}{2RT} \right] \quad (\text{II.50})$$

ecuación en la que no aparece el coeficiente de sedimentación, s , pero sí M , por lo que así se ve que esta técnica permite la determinación de la masa molecular de las especies macromoleculares que sedimentan. Usando ahora, y anticipando, a título de ejemplo, resultados de simulaciones de dinámica browniana, que se mostrarán posteriormente, en la Figura II.15 se observan perfiles de concentración obtenidos en condiciones de equilibrio de sedimentación. Nótese que los perfiles correspondientes a los últimos intervalos de tiempo están superpuestos lo que significa que se ha llegado al equilibrio.

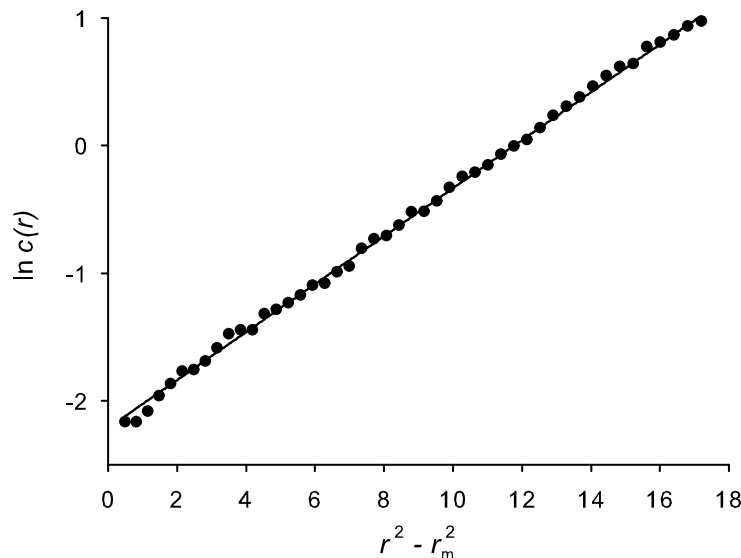


Figura II.16: Representación de $\ln c(r)$ frente a $r^2 - r_m^2$ para el caso de la lisozima con $r_m = 6.7$ cm, $c_0 = 1$ mg/mL a velocidad angular $\omega = 15000$ rpm, a partir de los valores de la Figura II.15. Puede observarse cómo los datos siguen una tendencia lineal ajustándose a una línea recta que se rige por la ecuación II.51.

El tratamiento clásico de los perfiles de equilibrio de sedimentación consiste en linealizar la ecuación II.50, en la forma:

$$\ln c(r) = \ln c_m + \frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT}(r^2 - r_m^2) \quad (\text{II.51})$$

Analizando la ecuación II.51 se observa que, si los resultados se adecúan al modelo establecido en la ecuación, al realizar la representación de $\ln c(r)$ en el eje de ordenadas frente a $(r^2 - r_m^2)$ en el eje de abscisas se debe observar un comportamiento lineal de los puntos representados. Así, se obtendrá una línea recta cuya ordenada en el origen es $\ln c_m$ y su pendiente es $\frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT}$, por lo que conocidos ω y el factor de flotación de la molécula se determina el peso molecular de la misma, M (o si no se conociera, se determinaría el peso molecular flotante, $M_b = M(1 - \bar{v}\rho)$), a partir de la pendiente de la recta. Esta representación se indica en la Figura II.16.

El valor determinado de los datos de la Figura II.15 del peso molecular de la lisozima es $M = 12.6 \text{ kDa}$, valor parecido al peso molecular de la lisozima experimental, utilizado en la simulación de dichos datos, que es $M = 14.4 \text{ kDa}$.

II.9. Ecuación de Lamm en una célula con forma de sector

La concentración en función de la posición y el tiempo $c(r, t)$ en un experimento de ultracentrifugación es la solución de la denominada ecuación diferencial de Lamm que, como se verá, regula el balance sedimentación-difusión. Los perfiles de concentración a diferentes instantes de tiempo son curvas $c(r, t)$ vs. r para sucesivos t y la resultante de los dos efectos de transporte que se dan en el experimento: el de sedimentación y el de difusión. Es la conjunción de ambos efectos, tratados con la geometría particular de la célula, lo que determina la ecuación diferencial que rige la dependencia espacio-temporal de la concentración, la denominada ecuación de Lamm [44] que se discutirá a continuación.

La ecuación II.34 puede considerarse como una extensión de la primera ley de Fick, incluyendo el flujo de la sedimentación. Los problemas de difusión se abordan resolviendo la segunda ley de Fick, que es conjunción de la primera con la condición de continuidad, expresando la variación de la concentración con el tiempo en un punto determinado. Además de esa condición, hay que considerar la geometría de la célula, que conduce al empleo de coordenadas cilíndricas, con lo que la condición de continuidad se escribe como:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r} \frac{\partial(rJ)}{\partial r} \quad (\text{II.52})$$

lo cual da lugar a

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial c}{\partial r} - s\omega^2 r^2 c \right] \quad (\text{II.53})$$

Esta es la forma en la que la clásica ecuación de Lamm [44] aparece habitualmente en la literatura (véase, por ejemplo [45–48]). Desarrollando el segundo miembro se llega a una ecuación equivalente:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right] - s\omega^2 \left[r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right] \quad (\text{II.54})$$

Esta segunda forma puede encontrarse en la monografía de Mächtle y Börger [11] (además de incluso en Wikipedia [49]), si bien en dicha monografía aparece la ecuación II.53 con una errata: falta el factor “ c ” al final de la misma.

Los perfiles de concentración $c(r, t)$ más rigurosos serían los resultantes de resolver esta ecuación diferencial, con la condición de contorno adicional de que, como las moléculas no pueden traspasar los límites de la célula, en ellos no puede haber transporte, verificándose, para $r = r_m$ y $r = r_b$ que [49]:

$$D \frac{\partial c}{\partial r} - s\omega^2 r c = 0 \quad (\text{II.55})$$

lo cual viene a expresar que el flujo neto, composición del difusivo (primer término) y sedimentante (segundo término), se cancelan.

II.9.1. Solución aproximada de Faxén

Una solución aproximada de la ecuación de Lamm es la propuesta por Faxén [50]. Sus condiciones son:

- El sistema sedimentante es ilimitado en la dirección de la sedimentación esto es, la célula “no tiene fondo”.
- Se ignora el efecto de dilución radial.

En estas condiciones, la solución de la ecuación de Lamm es la ecuación de Faxén:

$$c(r, t) = \left[\frac{c_0 e^{-2s\omega^2 t}}{2} \right] \left[1 - \Phi \left(\frac{r_m [s\omega^2 t + \ln r_m - \ln r]}{2\sqrt{Dt}} \right) \right] \quad (\text{II.56})$$

donde Φ es la llamada función de error, que no es analítica, pero para la cual se pueden encontrar rutinas de cálculo en ordenador. Por ejemplo, en la librería de funciones matemáticas IMSL, dicha función Φ está implementada en la función `erf`.

Desde un punto de vista cualitativo esta solución describe adecuadamente muchos de los comportamientos relativos a la ecuación de Lamm, en particular las curvas $c(r, t)$ vs. r para sucesivos t . No obstante, cuantitativamente la solución no es muy precisa y no incluye muchos aspectos relevantes de dicha ecuación, como la acumulación de material en el fondo de la celda, o la interdependencia de los efectos de la propagación difusional, la dilución radial y la dependencia radial de la fuerza [31, 51]. Además, la ecuación de Faxén no es aplicable en condiciones de equilibrio de sedimentación, ya que el establecimiento del equilibrio requiere que el sistema sedimentante este confinado, esto es, que tenga un fondo, de manera que se establezca la variación de concentración estacionaria entre el menisco, r_m , y el fondo, r_b .

II.10. Hidrodinámica para los modelos de partículas sedimentantes

En esta sección se van a introducir algunos conceptos de teoría hidrodinámica relacionados con la forma de las partículas sedimentantes ya que luego serán utilizados en el tratamiento de los datos experimentales.

La forma global de muchas macromoléculas rígidas, como algunas proteínas (albúmina, lisozima), puede representarse mediante esferas y elipsoides, lo que permite calcular de forma sencilla propiedades hidrodinámicas. Por ejemplo, para partículas esféricas, el coeficiente de difusión traslacional se calcula fácilmente mediante la ecuación II.25 (ecuación de Stokes-Einstein).

Hacia 1930, Perrin [52, 53] extendió los trabajos de Einstein sobre la hidrodinámica de partículas esféricas al caso de elipsoides de revolución. Es destacable que estas expresiones constituirían, durante bastantes años, la base para distinguir la forma de partículas (compactas o alargadas) en disolución, dando fundamento a métodos para distinguir las proteínas globulares, como la albúmina o la hemoglobina, de las fibrosas, como el colágeno o la miosina.

Los elipsoides de revolución se caracterizan por su relación axial $p = b/a$, siendo b el semieje de simetría rotacional o axial y a los dos semiejes perpendiculares equivalentes.

La esfera es, entonces, un caso particular de este modelo para el que $p = 1$. Los valores $p < 1$ corresponden a elipsoides oblatos, y los valores $p > 1$ corresponden a elipsoides prolatos (ver Figura II.17).

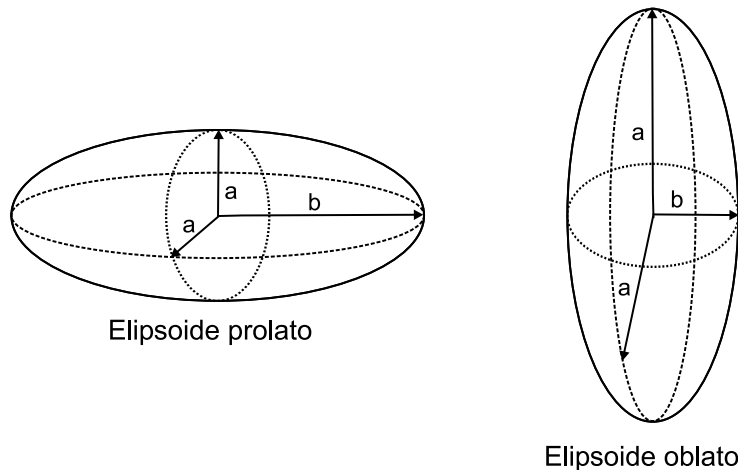


Figura II.17: Elipsoides de revolución prolato y oblató.

La denominada función de Perrin, P , depende de la relación axial p y cuantifica la anisotropía de la forma de la partícula. En concreto, para una esfera $P = 1$. Cuanto más se aleje P de la unidad, mayor es la “anesfericidad” de la partícula. El valor de la función de Perrin se puede calcular a partir del coeficiente de fricción traslacional de la partícula, f , como $P = f/f_0$, donde f_0 es el coeficiente de fricción de la esfera que tuviera el mismo peso molecular (M) y el mismo volumen específico parcial ($\bar{v}$) que la partícula. La relación entre coeficientes de fricción f/f_0 (*frictional ratio*) nos informa, por tanto, de la forma global de una partícula.

Si la partícula fuera anhidra, el valor del coeficiente de fricción de la esfera utilizada en el *frictional ratio* se calcula directamente con la ecuación de Stokes mencionada con anterioridad, es decir $f_0 = f_{0,anh} = 6\pi\eta_0 r$, siendo η_0 la viscosidad del disolvente y r el radio de la esfera (que se obtiene a partir de M y $\bar{v}$ de la partícula). Sin embargo, una macromolécula en disolución se encuentra normalmente hidratada, es decir, con partículas de disolvente unidas a su estructura. Calculando f_0 como el valor anhidro, el *frictional ratio* contiene, además del efecto de la geometría representado por la función P , un factor debido a la hidratación

$$f/f_0 = P \left(1 + \frac{\delta}{\bar{v}\rho_0} \right)^{1/3} \quad (\text{II.57})$$

donde δ es la hidratación de la partícula expresada en gramos de agua por gramos de macromolécula y ρ_0 la densidad del disolvente.

A partir del coeficiente de sedimentación es posible evaluar f/f_0 y P , y así dilucidar la forma de la partícula sedimentante. La relación entre los coeficientes de fricción f/f_0 puede evaluarse mediante la relación $s_{esfera}/s_{20,w} = f/f_0$ donde $s_{20,w}$ es el valor del coeficiente de sedimentación experimental corregido en agua a 20°C y s_{esfera} es el coeficiente de sedimentación teórico de una esfera con el mismo peso molecular (M) y volumen específico parcial ($\bar{v}$). El valor s_{esfera} se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$s_{esfera} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{N_A 6\pi\eta_0 \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A}\right)^{1/3}} \quad (\text{II.58})$$

Es conveniente mencionar que s_{esfera} corresponde al valor máximo del coeficiente de sedimentación para una partícula con un determinado volumen. Al considerar una partícula como una esfera anhidra, se descartan dos efectos: (i) el mayor tamaño debido a la hidratación, y (ii) la forma no esférica; ambos efectos incrementan el coeficiente de fricción, f , por lo que, como se desprende evidentemente de la ecuación II.24, al desestimar estos efectos se sobreestima s . En la ecuación II.58 aparece el término δ que, como se ha indicado, es la hidratación en gramos de agua por gramos de macromolécula. Para proteínas este valor es 0.3 g/g [35,54] y para la doble hélice de ADN 0.55 g/g [55]. Valores típicos de f/f_0 son 1.2–1.3 para estructuras globulares y 1.5–1.8 para estructuras elongadas asimétricas.

II.11. Programas para la predicción de propiedades hidrodinámicas de las partículas sedimentantes

Las partículas sedimentantes se pueden representar de forma más o menos detallada utilizando modelos de esferas, a partir de los cuales se predicen sus propiedades hidrodinámicas y así, mediante la comparación con los resultados experimentales, se puede dilucidar su estructura. Nuestro Grupo de Investigación viene desarrollando una serie de programas que emplean la metodología del modelo de esferas para hacer sencillo y rápido el cálculo de esas propiedades. Estos programas están a disposición pública en la página web <http://leonardo.inf.um.es/macromol> y son útiles para el cálculo de propiedades

de macromoléculas en disolución como proteínas, ácidos nucleicos, etc. A continuación se presentan los programas más representativos que se han desarrollado.

II.11.1. Metodología para partículas rígidas

Para el cálculo de propiedades de macromoléculas rígidas de topología arbitraria en disolución se ha desarrollado el conjunto de programas **HYDRO** [56] que contiene las siguientes utilidades:

- **HYDRO++** [56, 57]. Este programa emplea la metodología del modelo de bolas en sentido estricto y permite el cálculo de un gran número de propiedades hidrodinámicas así como aquellas derivadas de medidas de dispersión estática de luz.
- **HYDROPRO** [54, 58]. En los últimos tiempos se ha logrado obtener mediante diversas técnicas como cristalografía de rayos X o por espectroscopia de RMN la estructura atómica de gran cantidad de proteínas, agregados supramoleculares, ácidos nucleicos y muchos más ejemplos de biopolímeros. Esta información de la estructura atómica de la macromolécula es utilizada por el programa **HYDROPRO** para construir un modelo de concha de la macromolécula (variante del modelo de esferas que modela la superficie de la partícula con pequeñas esferas) a partir del cual se calculan las propiedades.
- **HYDROSUB** [59, 60]. Aunque es posible la modelización utilizando estructuras de alta resolución (**HYDROPRO**), hay ocasiones en que es imposible acceder a la estructura atómica de la partícula. El programa **HYDROSUB** nos permite modelar estructuras complicadas utilizando composiciones de modelos geométricos sencillos como son los elipsoides tanto prolatos como oblatos (y por tanto esferas) y los cilindros. El programa crea un modelo de concha de la estructura formada por estas subunidades y calcula las propiedades en disolución. El programa incluye la posibilidad de introducir un modelo de bolas en sentido estricto (junto al modelo de concha utilizado para cilindros y elipsoides), con lo que se puede construir un modelo híbrido. Este programa se aplicará a uno de los sistemas experimentales estudiados en esta Tesis (Capítulo III).

II.11.2. Metodología para partículas flexibles

Existe la posibilidad de representar una estructura flexible mediante un modelo de esferas, al que se añaden conectores, de flexibilidad variable, y una diversidad de interacciones intramoleculares, representadas por los correspondientes potenciales o fuerzas. Para facilitar la tarea de generación de conformaciones y cálculo de propiedades, se han desarrollado los siguiente programas:

- **MONTEHYDRO** [61]. Implementa una simulación de Monte Carlo (generación de conformaciones al azar) sobre un modelo de esferas y conectores. Las propiedades conformacionales, y algunas propiedades hidrodinámicas globales (a las que este método, que no es realmente dinámico, se pueden aplicar), se calculan como promedios conformacionales sobre los valores calculados para cada conformación como si fuese rígida (empleando para ello alguno de los programas de la serie **HYDRO**). A este procedimiento de cálculo de propiedades lo denominaremos RBMC, pues combina el método de Monte Carlo con el tratamiento de cuerpo rígido (RB: “rigid body”).
- **SIMUFLEX** [62]. Comprende dos programas: **BROWFLEX** que se encarga de la generación de una trayectoria browniana, y **ANAFLEX** que se encarga del análisis de dicha trayectoria, realizando promedios conformacionales, funciones de correlación, etc. La técnica de simulación de dinámica browniana, de la que se hablará posteriormente en esta Tesis (Capítulo IV), se basa en resolver la ecuación diferencial estocástica que rige el movimiento de las partículas de soluto, por lo que permite estudiar su evolución temporal.

II.12. Programas para el análisis de datos experimentales de ultracentrifugación analítica

Existen bastantes programas para el tratamiento de datos procedentes de los experimentos de ultracentrifugación analítica. De entre ellos, destacan el programa **SEDFIT**, desarrollado por P. Schuck y colaboradores [27–29] para el análisis de experimentos de velocidad de sedimentación, y **SEDPHAT** [30] para experimentos de equilibrio.

El programa **SEDFIT** es un extenso programa con una gran variedad de capacidades, controladas mediante una interfaz gráfica de usuario (GUI). En dicha variedad radica precisamente su complejidad, que puede resultar algo inconveniente cuando se emplea para

un propósito concreto y sencillo. Este programa dispone de varios modelos (distribución continua $c(s)$, distribución continua $c(M)$, $ls-g^*(s)$, especies discretas no interactuantes, etc), la mayoría de los cuales se basan en simulaciones numéricas de la ecuación de Lamm, para realizar el análisis de los experimentos de ultracentrifugación analítica y obtener los parámetros moleculares de interés en cada caso (s , D , M , etc) [63]. Como se verá en el capítulo siguiente, en esta Tesis se utilizan el modelo de distribución continua $c(s)$ y el modelo denominado $ls-g^*(s)$, por lo que serán los que se describan en esta sección con más detalle.

En primer lugar se comenzará abordando el modelo de distribución continua $c(s)$ [27]. Del análisis con este modelo se obtiene una función de distribución $c(s)$ de tal manera que $c(s)ds$ es la concentración, salvo por un factor de normalización, de especies en el rango $(s, s + ds)$. En sistemas multicomponente paucidispersos $c(s)$ presenta una serie de picos (se mostrarán numerosos ejemplos en el Capítulo III) que se asocian a las diversas especies de la muestra, tomándose como coeficiente de sedimentación de cada especie el centro del pico. El método está basado en la aproximación de que todas las especies en disolución tienen el mismo f/f_0 (valor al que no es muy sensible la distribución $c(s)$). Schuck hizo esta *aproximación* conociendo que f/f_0 depende *débilmente* de la anisometría y del grado de hidratación de los posibles componentes, lo cual le permitió diseñar un método robusto y elegante. No obstante, no deja de ser un aspecto digno de mención. El modelo de distribución continua $c(s)$ es un modelo adecuado para el análisis de experimentos de sedimentación de moléculas no interactuantes o de moléculas que interaccionan tan lentamente que son estables durante el proceso de sedimentación. Por ello, una de las aplicaciones más relevantes de este método es identificar el número de especies que hay en la muestra (o lo que es equivalente en algunos casos, determinar la pureza de la misma) y las cantidades relativas en las que éstas se encuentran. Asimismo, este modelo se utiliza para caracterizar la distribución de tamaños de una mezcla de macromoléculas [64].

Por otro lado, el método $ls-g^*(s)$ [65] se basa en el llamado coeficiente de sedimentación “aparente” (s^*). En este modelo el ajuste se realiza utilizando únicamente el coeficiente de sedimentación (partículas no difusivas), ignorando la aportación de la difusión de las partículas a los perfiles de sedimentación, caso válido cuando las moléculas son suficientemente grandes (coeficiente de difusión tan pequeño que se puede despreciar) o cuando la difusión de las moléculas en estudio no se adecuaba al tratamiento que se realiza con las funciones de distribución continua en SEDFIT [66, 67].

Los dos procedimientos mencionados, distribución continua $c(s)$ y $ls-g^*(s)$, se basan en la resolución de un algoritmo tipo SIMPLEX [68] y necesitan de la introducción de ciertos parámetros, aparte de los que definen el sistema físico, para su funcionamiento. Así, el modelo $c(s)$ requiere que se defina el rango de coeficientes de sedimentación que se va a explorar (es decir unos valores de s mínimo y máximo), el número de intervalos en los que se va a dividir ese rango y un factor de tolerancia o nivel de confianza para el ajuste. El modelo $ls-g^*(s)$ utiliza un procedimiento de regularización, la regularización de Tikhonov-Phillips, para eliminar o minimizar fluctuaciones de la señal [69], el cual necesita de un valor para el parámetro de tolerancia que se denomina P . En el Capítulo III se mostrarán, para cada sistema experimental estudiado, los valores asignados a estos parámetros en los análisis efectuados con SEDFIT. Esos valores son los que se han considerado más apropiados en cada caso.

Estos dos modelos tienen muchas similitudes y pueden utilizarse indistintamente en ciertos análisis. Sin embargo, $ls-g^*(s)$ es mucho más simple por la ausencia de la difusión lo que hace que tenga una menor resolución y sensibilidad que el modelo distribución continua $c(s)$. En esta Tesis, en los casos en los que el denominado modelo de análisis de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT está limitado, como puede ser para el análisis de muestras polidispersas, se decidió utilizar el método $ls-g^*(s)$.

Como se ha indicado al comienzo de esta sección, para el análisis de los perfiles de sedimentación procedentes de experimentos de equilibrio se utiliza el programa SEDPHAT. Este programa es una versión extendida del programa SEDFIT que permite realizar análisis de experimentos de velocidad de sedimentación, de equilibrio de sedimentación y de experimentos de dispersión de luz dinámica [70]. Asimismo, estos perfiles también se pueden analizar utilizando la ecuación II.50 descrita anteriormente, procedimiento que se utilizará en el caso de perfiles procedentes de experimentos simulados. Como ya se ha mencionado, la ecuación II.50 se linealiza tomando logaritmos para dar lugar a la ecuación II.51. La representación adecuada de dicha ecuación da lugar a una línea recta de cuya pendiente se determina el peso molecular M de la especie sedimentante. No obstante, se ha preferido utilizar el programa SEDPHAT para el análisis de los experimentos de equilibrio de sedimentación debido a su mayor exactitud y por coherencia en el uso de programas bien establecidos para este cometido.

Por último, mencionar que otro programa necesario en el tratamiento de los datos procedentes de los experimentos de ultracentrifugación analítica es SEDNTERP [71], el cual se utiliza para calcular propiedades de los solutos y de los disolventes-tampón a partir

II.12. PROGRAMAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

de la composición de los mismos. Estas propiedades son el volumen específico parcial del sistema en estudio, el coeficiente de extinción del mismo, y la densidad y la viscosidad del disolvente-tampón, que son utilizadas por los programas **SEDFIT** y **SEDPHAT** para realizar ajustes y transformar magnitudes de condiciones experimentales a condiciones estándar.

Capítulo III

Experimentos de ultracentrifugación analítica

En este capítulo quedan recogidos los experimentos de sedimentación (la mayoría de velocidad y alguno de equilibrio) que se han realizado en esta Tesis para distintos tipos de macromoléculas (principalmente proteínas y polisacáridos) con el fin tanto de poner a punto la técnica como de emplearla para la caracterización de nuevas proteínas fruto de la colaboración con otros grupos de investigación.

III.1. Características de la instrumentación utilizada

III.1.1. Ultracentrifugación analítica (AUC)

Los experimentos de sedimentación se realizaron con una ultracentrífuga analítica modelo ProteomeLabTM XL-I de Beckman Coulter (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) equipada con detectores de absorbancia e interferencia, lo que permite realizar ambos tipos de medidas. La programación, el control y la adquisición de datos de los experimentos se llevaron a cabo con las siguientes versiones del firmware/software de Beckman: DAB 4.19 y GUI 5.7. Como ya se ha indicado en la sección dedicada a la instrumentación (Capítulo II), el rotor del que se dispone es del tipo An-50 Ti con ocho huecos para alojar las celdas. Las celdas utilizadas en dichos experimentos alojaban ventanas de zafiro tanto para el caso de experimentos de interferencia como de absorbancia. Las piezas centrales (*centerpiece*) son de resinas EponTM rellenas de carbón vegetal con dos sectores (uno para

la muestra y otro para la referencia), siendo el camino óptico de 12 mm. Estos *centerpieces* permiten trabajar de forma segura a una velocidad de rotación de hasta 45 000 rpm.

III.1.2. Otras técnicas utilizadas: DLS y SEC

Algunos de los experimentos realizados con la ultracentrífuga analítica se complementaron con otras dos técnicas: DLS (dispersión de luz dinámica) y/o SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). Por ello, a continuación se hará una breve mención de ambas técnicas y de los aparatos que se utilizaron para la realización de las correspondientes medidas.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering* o DLS) se basa en analizar las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada (y detectada a cierto ángulo) por una disolución de partículas tras hacer incidir sobre la misma una luz de longitud de onda no mucho mayor que el tamaño de dichas partículas. Estas fluctuaciones son consecuencia del movimiento browniano de las partículas y, por tanto, se pueden correlacionar con el coeficiente de difusión de las mismas y con su radio hidrodinámico [72].

El aparato utilizado pertenece a la serie Zetasizer Nano de Malvern Instruments (UK). Este aparato permite la determinación de la distribución de tamaño hidrodinámico de partículas en un amplio rango así como su peso molecular. La temperatura de medida puede llegar hasta los 120°C. El láser de nuestro equipo tiene una longitud de onda de 632.8 nm, lo que corresponde a la zona roja del espectro. El aparato mide la intensidad de luz dispersada a un ángulo de 173° respecto de la prolongación del rayo incidente, técnica denominada detección de gran ángulo o *backscatter*.

Los datos adquiridos durante la medida son procesados por el software del propio aparato obteniéndose la correspondiente función de correlación temporal. Dicho software trabaja con el algoritmo CONTIN [73], a partir del cual se obtiene una distribución del radio hidrodinámico, r_h , determinado a través del coeficiente de difusión mediante la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación II.25). El análisis mediante CONTIN permite expresar los resultados obtenidos en dos modos a los que el *software* del aparato denomina: (a) distribución en intensidad y (b) distribución en volumen. El primero de ellos permite detectar partículas de gran tamaño, aun en muy escasa fracción másica. Dependiendo del objetivo se dará preponderancia a una u otra distribución.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La cromatografía por exclusión de tamaño (*size exclusion chromatography* o SEC) también se denomina cromatografía de permeación en gel (*gel permeation chromatography* o GPC), siendo esta última denominación, GPC, la que se suele utilizar para hacer referencia al instrumento con que se lleva a cabo esta técnica. Dicha técnica se basa en hacer pasar una disolución de partículas con distinto tamaño por una o varias columnas rellenas de gel con poros de distinto tamaño. Las partículas más grandes atraviesan la/s columna/s (eluyen) primero, mientras que las más pequeñas se quedan retrasadas, eluyendo después. De este modo es posible separar por tamaño las especies que constituyen la muestra para, a continuación, hacerlas pasar por una serie de detectores (normalmente de índice de refracción, de dispersión de luz y/o de viscosidad), a partir de cuyas señales es posible determinar los tamaños o pesos moleculares de las especies presentes en la muestra inicial [72].

El aparato utilizado es el modelo Viscotek GPCmax VE-2001 de Malvern, el cual posee tres tipos de detectores capaces de realizar medidas de índice de refracción, viscosidad, y dispersión de luz integrados en el módulo instrumental TDA 305. El análisis de los datos experimentales es realizado por el propio software del GPC (OmniSEC 4.7). De este análisis se obtienen propiedades características de la muestra como por ejemplo el peso molecular promedio en peso ($\bar{M}_w$), el peso molecular promedio en número ($\bar{M}_n$), y el índice de polidispersidad (IP). El GPC utilizado también permite estudiar la evolución de la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, con el peso molecular promedio, $\bar{M}_w$, de donde se puede obtener una ley de potencia que relaciona ambas propiedades denominada ecuación viscosimétrica o de Mark-Houwink-Sakurada, $[\eta] = K_\eta M^{a_\eta}$, donde a_η es un sencillo coeficiente adimensional dependiente de la conformación macromolecular.

III.2. Método experimental y tratamiento de datos

III.2.1. Preparación de los experimentos

En el Capítulo anterior de esta Tesis se ha mencionado que las muestras que se quieren estudiar mediante experimentos de ultracentrifugación analítica se introducen en las celdas, que es donde tiene lugar el proceso de sedimentación por ultracentrifugación. Las celdas están formadas por numerosos componentes, los más relevantes de los cuales fueron

detallados en el Capítulo II, que hay que ensamblar de manera adecuada antes de introducir la muestra en ellas. En la Figura II.9 se observó un esquema del adecuado montaje de todos los componentes de una celda.

Como se ha comentado al comienzo de esta Tesis se distinguen dos tipos de experimentos de sedimentación, velocidad y equilibrio, y dos modos de medición, absorbancia e interferencia. En el caso de medidas de absorbancia se realizó, previamente al experimento de sedimentación, un espectro de la muestra con la propia ultracentrífuga funcionando a una velocidad de 3 000 rpm, velocidad suficientemente baja para que no sedimenten las especies estudiadas en esta Tesis. El objetivo de dicho espectro era determinar con precisión la longitud de onda apropiada para efectuar las mediciones. De esta forma se asegura que la señal de absorbancia está dentro del rango adecuado (0.1 a 1.5 OD). En cada uno de los casos estudiados se discutirán los valores de longitud de onda elegidos.

En el caso de medidas de interferencia, todas se realizaron utilizando la longitud de onda $\lambda = 655$ nm, para la que las muestras estudiadas (proteínas y polisacáridos), no presentan absorbancia. En este caso, también se realiza, previamente al inicio del experimento, un *scan* a 3 000 rpm para realizar ciertos ajustes del sistema óptico requeridos por el protocolo de medida. Como se ha adelantado en el Capítulo II, siempre que se utiliza el método de interferencia como método de detección hay que realizar un proceso previo de diálisis ya que, por las características de dicho método, es fundamental que la muestra y la referencia estén en perfecto equilibrio químico.

III.2.2. Tratamiento de datos

Los perfiles de concentración obtenidos experimentalmente fueron analizados con objeto de determinar los parámetros moleculares de interés en cada caso, el principal de los cuales para nuestro propósito es, obviamente, el coeficiente de sedimentación. Como se comentó en el Capítulo II, los análisis se llevan a cabo con el software **SEDFIT** v11.71 en el caso de experimentos de velocidad de sedimentación y con **SEDPHAT** v6.21 si se trata de experimentos de equilibrio. También se utilizó el programa **DCDT+** [74] para realizar análisis de experimentos de velocidad de sedimentación en los casos en los que el denominado modelo de análisis de distribución continua $c(s)$ de **SEDFIT** está limitado, como puede ser para el análisis de muestras polidispersas. Asimismo, como ya se adelantó también, se utilizó el programa **SEDNTERP** para calcular el volumen específico parcial del

sistema en estudio, el coeficiente de extinción del mismo, y la densidad y la viscosidad del disolvente-tampón.

La preparación concreta de cada experimento y los métodos para su análisis y ajuste dependen de la muestra en estudio y del tipo de experimento que se está realizando (velocidad o equilibrio). Debido a ello, estos detalles se indicarán para cada caso en particular.

III.3. Experimentos con macromoléculas tipo

Se realizaron una serie de experimentos con disoluciones de macromoléculas bien conocidas con el objetivo de comprobar que los procedimientos empleados son adecuados y poner a punto la ultracentrífuga analítica. Asimismo se estudiaron diferentes procedimientos de análisis contenidos en los programas **SEDFIT** y **DCDT+** con el fin de seleccionar el más apropiado para cada sistema en concreto.

En primer lugar, se estudió una proteína típica, la lisozima, ejemplo de muestra monodispersa. Con ella se pondrá a prueba el modelo de distribución continua $c(s)$ de análisis de **SEDFIT**. A continuación, se realizaron estudios experimentales de la proteína albúmina, tanto de la seroalbúmina (albúmina de suero bovino o BSA) como de la ovoalbúmina (albúmina procedente de la clara de huevo). Ambos tipos de la proteína albúmina están formadas por monómeros, dímeros e incluso oligómeros lo que hace que presenten distribuciones discretas de coeficientes de sedimentación, siendo así un ejemplo de muestra paucidisversa. Todas estas proteínas presentan absorbancia en torno a 280 nm debido a que tienen aminoácidos como el triptófano y la tirosina que contienen grupos aromáticos responsables de la absorción a dicha longitud de onda. Para finalizar, se mostrarán ejemplos de macromoléculas polidispersas, en este caso polisacáridos y polímeros sintéticos que, al no presentar absorbancia en el rango 220–800 nm (que cubre el sistema de detección de la XL-I), únicamente se pueden estudiar por interferencia. En estos casos resulta de más utilidad, debido principalmente a la polidispersidad de la muestra, el modelo $ls - g^*(s)$ contenido en **SEDFIT**, así como el método diferencial utilizado por **DCDT+**, a pesar de que no deconvolucionan la aportación de la difusión al movimiento de la partícula; por ello, la dispersión debida a la difusión de las partículas es difícilmente discernible de la producida por la polidispersidad de la muestra, razón por la cual el modelo $c(s)$ de **SEDFIT** resulta poco útil en estos casos.

III.3.1. Lisozima

Se realizó un experimento de velocidad de sedimentación con la proteína lisozima, que ya se introdujo en el Capítulo II, seleccionada por su buen comportamiento, fácil manejo, y por la cantidad de datos previos de caracterización de que se disponen. Debido a su sencillez, los parámetros moleculares de esta enzima son perfectamente conocidos y han sido medidos mediante diversas técnicas. Así, se podrán comparar nuestros resultados con los que se encuentran en la literatura y comprobar que el procedimiento seguido es adecuado.

La lisozima utilizada procede de la clara de huevo y su referencia es BioChemika 62970 (Lote: 1178026). Se preparó una muestra de 1 mg/mL de lisozima en disolvente-tampón Tris 20 mM y NaCl 150 mM (pH = 8), la cual fue sometida a un proceso de diálisis durante 24 horas en un tubo de membrana de celulosa de 10 mm de anchura con un tamaño de poro que retiene especies con un peso molecular mayor de 12.4 kDa. Una vez dializada, la muestra de lisozima se diluyó para conseguir una muestras de menor concentración (0.5 mg/mL). 390 μ L de cada una de estas muestras se inyectaron en tres celdas distintas. Análogamente, se inyectaron 400 μ L de referencia en el sector correspondiente, siendo ésta el disolvente-tampón procedente de la diálisis a la que se sometió la muestra. El experimento de velocidad de sedimentación se llevó a cabo a una velocidad del rotor $\omega = 45\,000$ rpm y a una temperatura de 5°C, por ser la enzima más estable a dicha temperatura. La duración del experimento fue de 15 horas. Se realizaron 300 registros sin intervalos de tiempo entre los sucesivos *scans* de absorbancia.

En este caso, la evolución del experimento se siguió realizando tanto medidas de absorbancia a 280 nm como de interferencia.

Con la propia ultracentrífuga se realizó un espectro de absorbancia entre 220 y 700 nm (ver Figura III.1) con el objetivo de calcular la concentración real de la muestra en la celda y observar la longitud de onda adecuada para realizar las medidas de absorbancia.

Con el fin de obtener los valores del coeficiente de sedimentación y la masa molecular de la lisozima, los perfiles de concentración obtenidos experimentalmente mediante velocidad de sedimentación fueron analizados con el anteriormente mencionado software SEDFIT utilizando el método de distribución continua de $c(s)$ y el algoritmo SIMPLEX para realizar el ajuste con una resolución de 100 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 15 S y un nivel de confianza de 0.95.

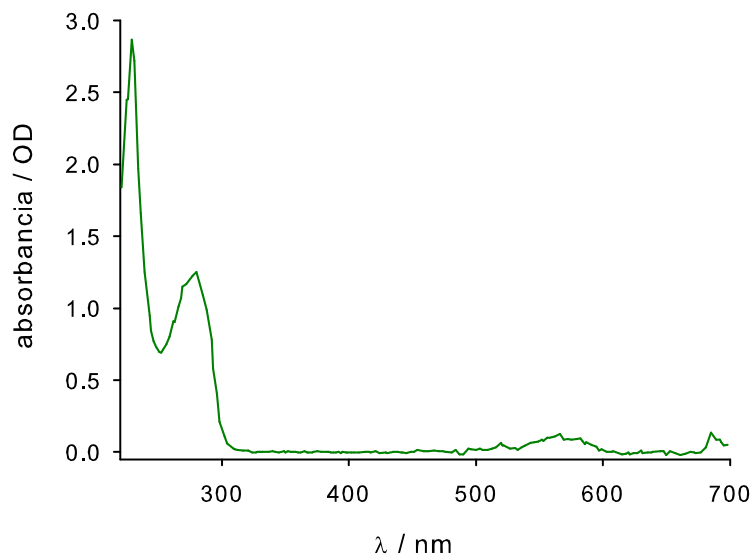


Figura III.1: Espectro de absorción de una muestra de lisozima de 0.5 mg/mL realizado entre 220 y 700 nm. Se observa el máximo a 280 nm, correspondiente a 1.252 OD (unidades de absorbancia). Nota: el pico de mayor intensidad corresponde al tampón.

El valor del volumen específico parcial de la lisozima calculado a partir de la secuencia de aminoácidos mediante el programa **SEDNTERP** es de 0.702 mL/g (valor similar al encontrado en la bibliografía obtenido mediante medidas experimentales [36]). Los valores de la densidad (1.0068 g/mL) y de la viscosidad del disolvente (1.54 cP) a 5°C necesarios para que el programa **SEDFIT** suministre los valores de $s_{20,w}$ se obtuvieron también con **SEDNTERP** a partir de los componentes del mismo.

Las distribuciones $c(s)$ resultantes del análisis con **SEDFIT** de los datos de interferencia y absorbancia correspondientes a las dos concentraciones utilizadas tienen un aspecto similar. En todos los casos, aparece un pico principal en torno a $s_{20,w} = 1.9 S$, que contribuye casi a la totalidad de la muestra y algunos picos secundarios a valores de coeficiente de sedimentación próximos a cero que no son destacables. La contribución de esas especies a la concentración de la muestra no es relevante y dichos picos pueden corresponderse con impurezas que han contaminado la muestra en la preparación y manipulación de la misma, pertenecer a componentes del tampón, o deberse a errores en la determinación de la posición del menisco. Como ejemplo, en la Figura III.2 puede observarse la distribución $c(s)$ correspondiente a la muestra de 0.5 mg/mL a 5°C a $\omega = 40\,000$ rpm así como el

perfil de concentración resultante del ajuste de los datos experimentales para esa misma muestra con **SEDFIT**.

Tras realizar el procedimiento descrito en el párrafo anterior para una serie de concentraciones y sistemas de detección, se obtienen los valores que quedan recogidos en la Tabla III.1 para el coeficiente de sedimentación y el peso molecular de la lisozima.

$c_{\text{muestra}} / \text{mg/mL}$	metodo de detección	$s_{20,w} / \text{S}$	M / kDa
0.5	ABS	1.92	14.3
	IF	1.88	13.7
1.0	ABS	1.78	14.9
	IF	1.92	14.6
Referencia [36]		1.91	14.4
Calculado a partir de la secuencia con SEDNTERP			14.3

Tabla III.1: Valores de s y M obtenidos a partir de los perfiles experimentales de velocidad de sedimentación de las muestras de lisozima en estudio mediante el análisis con **SEDFIT**. Los acrónimos hacen referencia al sistema de detección empleado, ABS: absorbancia e IF: interferencia). Se muestran también el valor de M de la lisozima calculado a partir de la secuencia y los valores de s y M de dicha proteína encontrados en la bibliografía.

Analizando los resultados de la Tabla III.1 se observa que los valores del coeficiente de sedimentación obtenidos son muy similares en todos los casos. Lo mismo ocurre con los valores del peso molecular, encontrando que el correspondiente a las medidas de interferencia de la muestra de 0.5 mg/mL es el que más difiere. Todos, estos valores muestran un buen acuerdo con el indicado para esta proteína en la Tabla 12 del capítulo 5 del libro de Van Holde [36] ($M = 14\,400 \text{ Da}$ y $s_{20,w} = 1.91 \text{ S}$) y con el valor de M obtenido a partir de la secuencia conocida de la proteína (ver Tabla III.1).

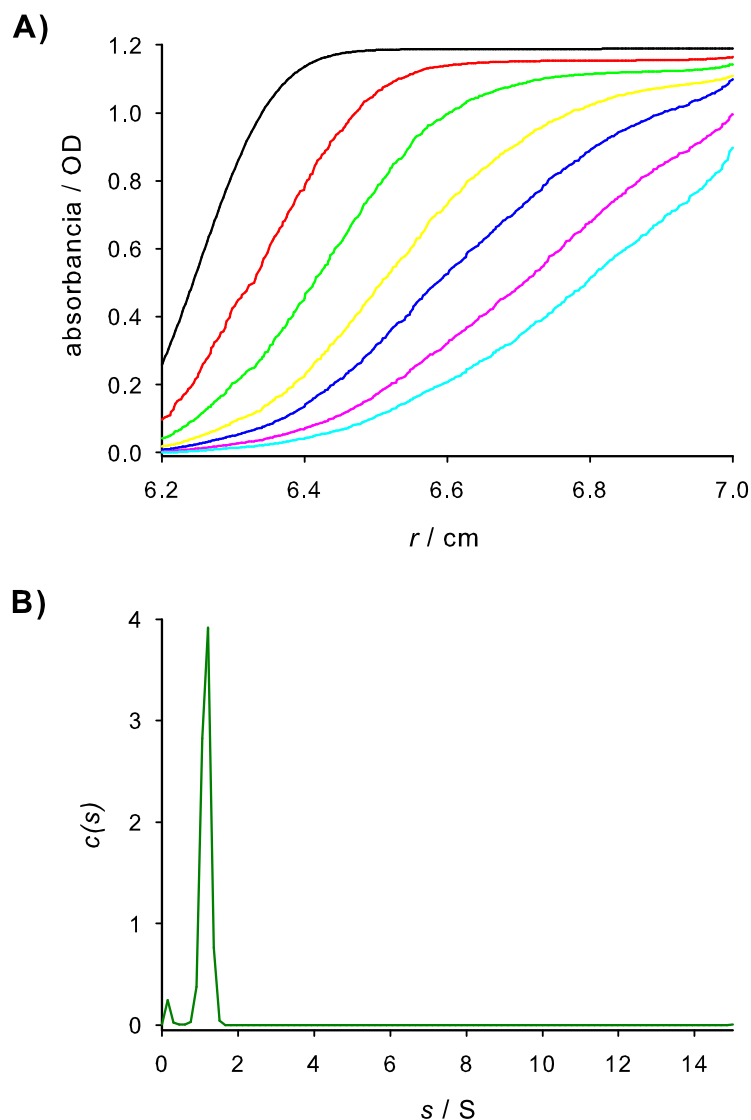


Figura III.2: A) Perfiles de concentración experimentales de una muestra de 0.5 mg/mL de lisozima a 5°C a $\omega = 40\,000$ rpm para diferentes tiempos representados por los distintos colores en un experimento de velocidad de sedimentación. B) Distribución continua $c(s)$ obtenida para esta muestra mediante el análisis de perfiles por SEDFIT. Se recuerda que conforme avanza el experimento los perfiles evolucionan con el tiempo de izquierda a derecha (desde el perfil de color negro al de color azul celeste).

III.3.2. Albúmina

Después de caracterizar mediante experimentos de ultracentrifugación analítica la proteína lisozima, se realizaron estudios de otras dos proteínas ampliamente caracterizadas y descritas en la bibliografía: albúmina de suero bovino (BSA) y ovoalbúmina.

III.3.2.a. Albúmina de suero bovino (BSA)

Experimentos de DLS

Se comenzó por realizar el estudio mediante DLS de la proteína BSA. Para ello, se prepararon dos disoluciones de BSA Sigma A7888-10G (Lote: 127K0701) de 4 mg/mL, una de ellas en agua y otra en Tris 20 mM / NaCl 150 mM. Ambas muestras (BSA en agua y BSA en Tris/NaCl) se diluyeron hasta conseguir disoluciones de 2 mg/mL y 1 mg/mL, que son las que se utilizaron para realizar las medidas. Con lo que en resumen, se realizaron medidas de 4 muestras: BSA en agua 2mg/mL, BSA en agua 1 mg/mL, BSA en Tris/NaCl 1 mg/mL y BSA en Tris/NaCl 2 mg/mL. Antes de realizar las medidas las 4 muestras que se van a estudiar se filtraron con un microfiltro de celulosa de 0.22 μ m.

Se tomaron 1.5 mL de cada una de las muestras y para cada una de ellas se realizaron 3 repeticiones de las medidas en modo automático (11 repeticiones de 10 segundos de duración). La temperatura seleccionada fue 25°C con un tiempo de precalentamiento de 120 segundos y los valores de la viscosidad e índice de refracción de los disolventes, necesarios para realizar las medidas a 25°C, son: $\eta_{agua} = 0.8872$ cP, $RI_{agua} = 1.33$, $\eta_{Tris/NaCl} = 0.9077$ cP, $RI_{Tris/NaCl} = 1.33$.

Después del análisis de los datos con CONTIN con el propio software del aparato de DLS, se obtuvieron las distribuciones de intensidad que se muestran en las Figuras III.3 y III.4 para cada una de las muestras en estudio. Los valores de los radios hidrodinámicos (r_h) resultantes están recogidos en la Tabla III.2.

III.3. EXPERIMENTOS CON MACROMOLÉCULAS TIPO

Muestra	c / mg/mL	r_h / nm
BSA agua	2	4.314
BSA agua	1	4.313
BSA Tris/NaCl	2	4.570
BSA Tris/NaCl	1	4.363

Tabla III.2: Valores de radio hidrodinámico (r_h) resultantes del análisis con CONTIN de las muestras estudiadas. El valor del r_h elegido es el valor que el programa indica como promedio Z.

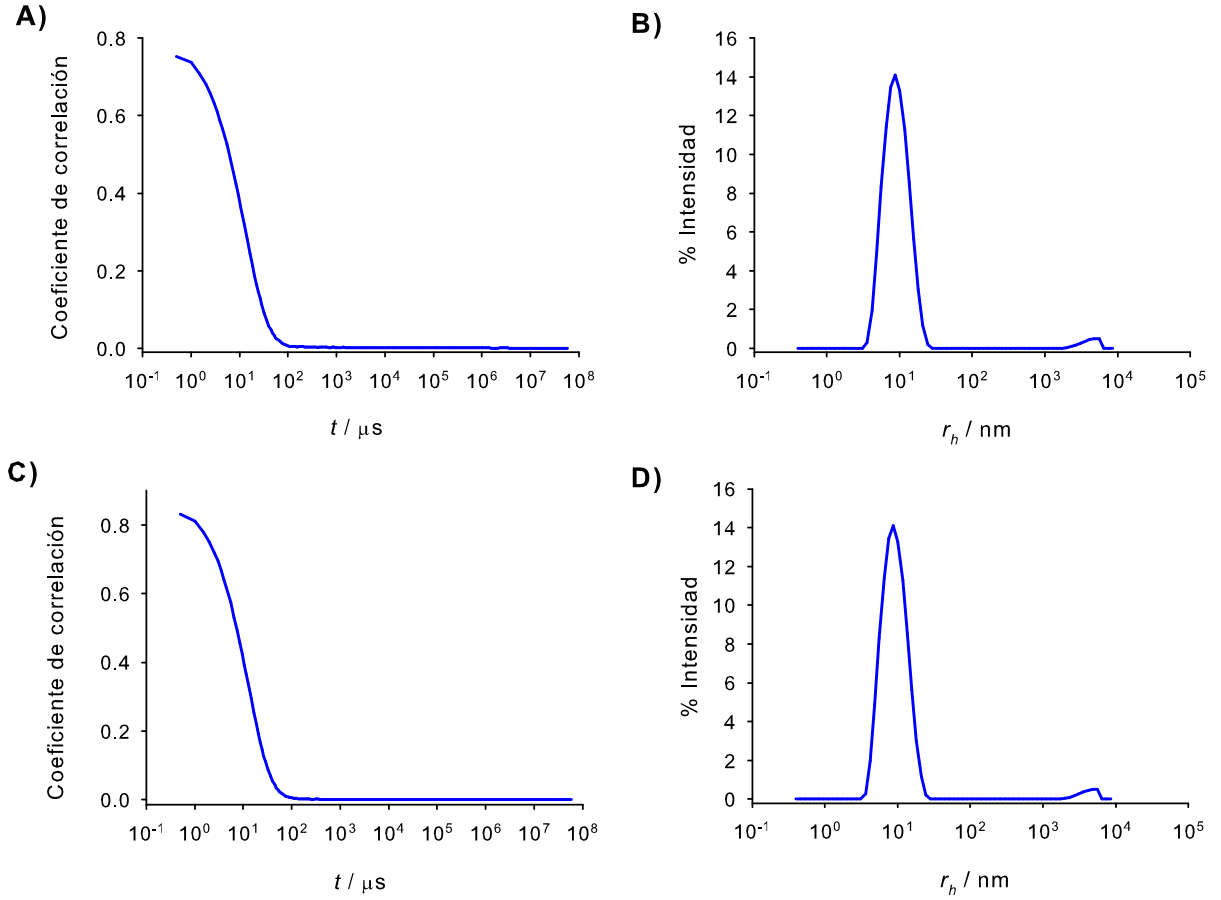


Figura III.3: Funciones de correlación (A) BSA en agua 1 mg/mL y C) BSA en agua 2 mg/mL) y resultados del análisis con CONTIN del experimento de DLS (B) BSA en agua 1 mg/mL y D) BSA en agua 2 mg/mL).

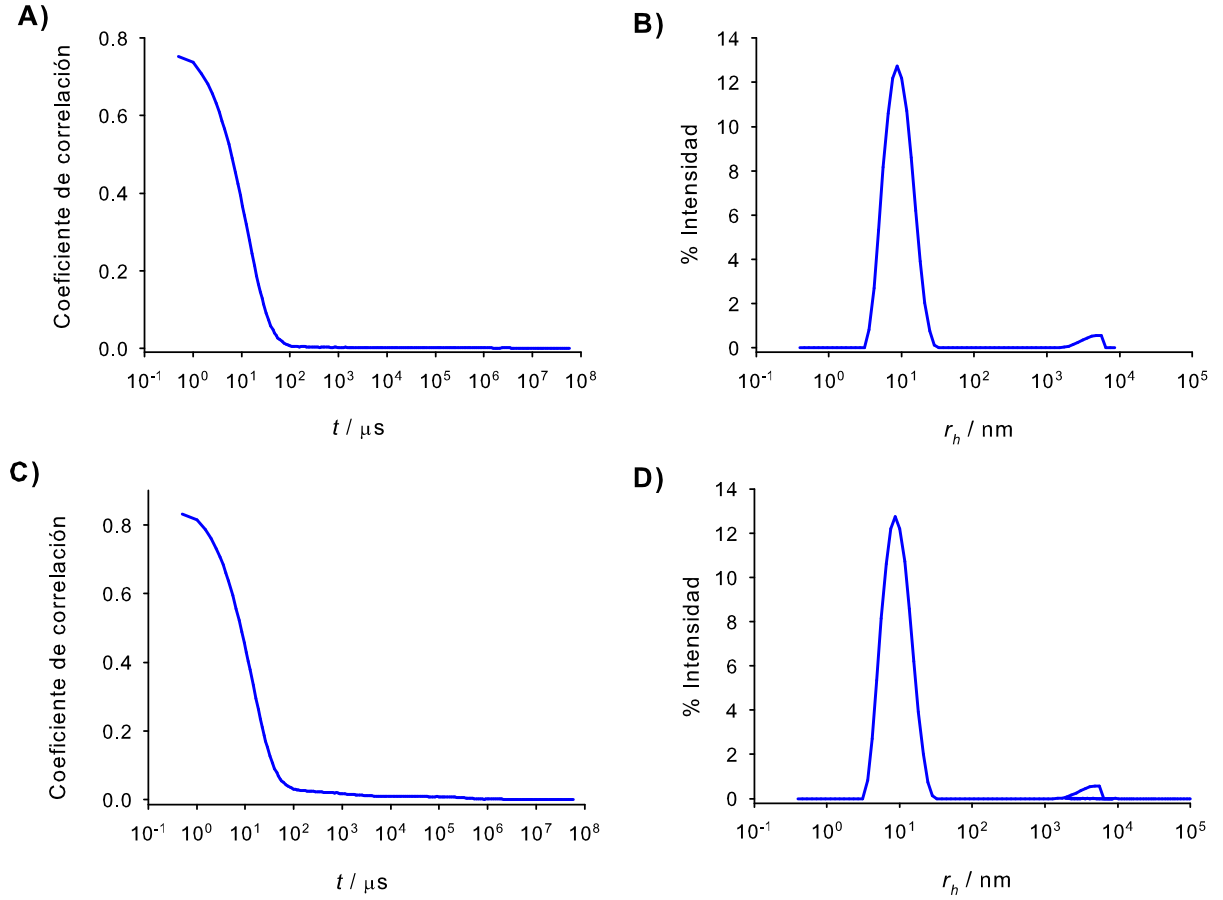


Figura III.4: Funciones de correlación (A) BSA en TRSI/NaCl 1 mg/mL y C) BSA en TRSI/NaCl 2 mg/mL) y resultados del análisis con CONTIN del experimento de DLS (B) BSA en Tris/NaCl 1 mg/mL y D) BSA en Tris/NaCl 2 mg/mL).

Los valores obtenidos para el r_h de la BSA se comparan con los calculados mediante la ecuación de Stokes-Einstein a partir de los coeficientes de difusión, $D_{20,w}$, indicados en [75] para el monómero de BSA y el dímero. De acuerdo con [75], $D_{20,w}$ para el monómero de BSA es $6.15 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, resultando un r_h de 3.49 nm y $D_{20,w}$ para el dímero es $4.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, resultando un r_h de 4.77 nm. Se puede observar que los valores obtenidos en las medidas realizadas se encuentran entre estos dos valores. Esto es así, ya que en las muestras que se están midiendo están presentes ambas especies, además de poder existir trímeros o incluso tetrámeros que hagan que el valor del r_h aumente ya que el DLS no es capaz de distinguir entre estas especies.

Hay que indicar que en todos los casos aparece un segundo pico con un valor de 2000 nm para el r_h . Dicho pico contribuye muy poco a la totalidad de la muestra (en torno al 2%) y puede deberse a que a pesar de haber filtrado la muestra, haya entrado algo de polvo o a que las celdas de medida tuviesen polvo.

Experimentos de AUC

Siguiendo con el estudio de la proteína BSA, se realizó un experimento de velocidad de sedimentación de dicha muestra a tres concentraciones distintas. Para ello se prepararon tres muestras de BSA (BSA Sigma A7888-10G, lote: 127K0701) de concentraciones 0.2, 0.5 y 0.8 mg/mL en Tris 20 mM y NaCl 150 mM (pH = 7). 400 μ L de cada una de estas muestras se inyectaron en tres celdas distintas. Análogamente, se inyectaron 400 μ L de referencia en el sector correspondiente. El experimento de velocidad de sedimentación se llevó a cabo a una velocidad del rotor $\omega = 40\,000$ rpm y a una temperatura de 18°C. La duración del experimento fue de 16 horas. Se realizaron 142 medidas sin intervalos de tiempo entre los sucesivos *scans* de absorbancia.

Al igual que en el caso de la lisozima, la evolución del experimento se siguió realizando medidas de absorbancia a 280 nm.

Con el fin de obtener los valores del coeficiente de sedimentación y la masa molecular de la BSA, los perfiles de concentración obtenidos experimentalmente fueron analizados con el anteriormente mencionado software **SEDFIT**. El valor del volumen específico parcial de la BSA calculado a partir de la secuencia de aminoácidos mediante el programa **SEDNTERP** es de 0.735 mL/g (que coincide con el indicado en [5] que ha sido obtenido mediante medidas experimentales). Los valores de la densidad (1.0054 g/mL) y de la viscosidad del disolvente (1.07 cP) necesarios para realizar el análisis con **SEDFIT** se obtuvieron a partir del mismo programa a partir de los componentes del mismo. De nuevo, se utilizó el método de distribución continua de $c(s)$ y el algoritmo **SIMPLEX** para realizar el ajuste con una resolución de 300 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 15 S (a 18°C) y un nivel de confianza de 0.95. Asimismo, se realizó el ajuste de los datos con el modelo de especies discretas no interactuantes, que es uno de los modelos opcionales en **SEDFIT**, con el fin de comprobar lo adecuado de este modelo, no obteniéndose los resultados esperados ya que se alejaban de los encontrados en la bibliografía. Además, el tiempo empleado en la realización de los análisis mediante este método es mucho mayor que al emplear la distribución continua $c(s)$ de **SEDFIT**.

En la Figura III.5 se observan las distribuciones $c(s)$ resultantes del análisis con SEDFIT con el modelo de distribución continua $c(s)$ de los datos de absorbancia correspondientes a las tres concentraciones utilizadas, las cuales tienen un aspecto similar pero con algunas diferencias destacables. En todos los casos, aparecen dos picos: un pico principal en torno a 4.4S y con un peso molecular estimado sobre 62kDa y, un pico secundario en torno a los 7S y un peso molecular estimado de aproximadamente 130kDa. Sólo en el caso de la muestra de 0.8mg/mL se observa un tercer pico a 10S con un peso molecular estimado de 230kDa. La contribución al total de la muestra del pico principal (aproximadamente 4.4S) va disminuyendo conforme aumenta la concentración. Esto se debe a que conforme aumenta la concentración de la muestra de BSA se favorece la formación de dímeros, trímeros e incluso tetrameros. Por ello, la contribución del pico secundario va aumentando conforme lo hace la concentración llegando a aparecer un tercer pico en la muestra de 0.8mg/mL que se corresponde con el tetramero de BSA. En todos los casos aparece un pico a valores de coeficiente de sedimentación próximos a cero que se debe a fracciones de la proteína de bajo peso molecular que pueden existir en la muestra comercial. La contribución de esas especies a la concentración de la muestra no es relevante.

Con objeto de estudiar la formación de posibles especies que aparezcan a valores elevados de concentración así como la dependencia del coeficiente de sedimentación de la proteína en función de la concentración de la misma se realizan medidas a mayores concentraciones que las estudiadas anteriormente.

Así, se preparó una disolución de BSA en Tris 20mM / NaCl 150mM de concentración 4mg/mL y se dializaron 4mL de la misma durante 24 horas en tubos de diálisis de membrana de celulosa (D9277-100 FT) de 10mm de anchura con un tamaño de poro que retiene especies con un peso molecular mayor de 12.4kDa. Una vez dializadas se diluye dicha muestra con el tampón de diálisis hasta conseguir disoluciones de 0.5, 0.8, 1.5mg/mL.

Para poder realizar el estudio de ultracentrifugación analítica mediante medidas de absorbancia de estas muestras en condiciones óptimas, se debe elegir una longitud de onda distinta a la utilizada anteriormente ($\lambda = 280$ nm) para que dichas muestras de elevada concentración den lugar a absorbancias dentro del rango aconsejado (0.1 a 1.5 OD). Por este motivo, se realiza un espectro de absorbancia de la proteína entre 190 y 390nm y se decide realizar las medidas a $\lambda = 250$ nm, ya que como se puede observar en la Figura III.6 a esta longitud de onda la proteína BSA presenta absorbancia pero ésta es lo suficientemente baja como para permitir medidas de muestras de concentración elevada.

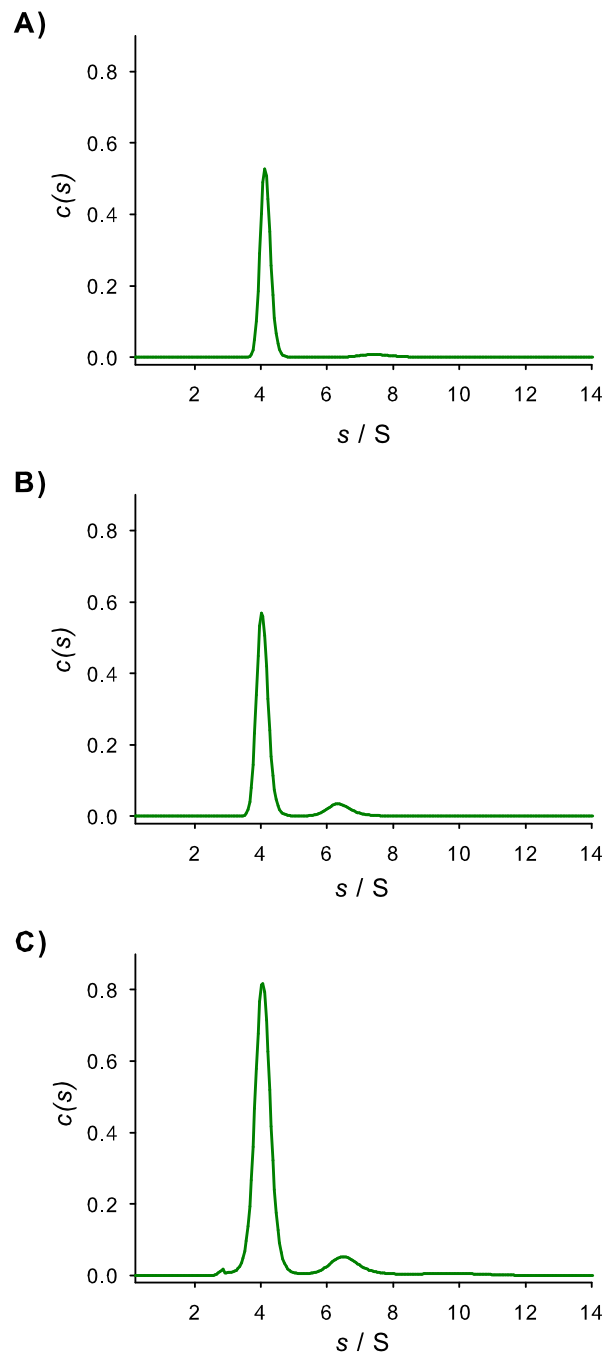


Figura III.5: Distribución continua $c(s)$ obtenida para tres muestras de BSA de distinta concentración (A) 0.2 mg/mL, B) 0.5 mg/mL y C) 0.8 mg/mL) mediante el análisis con SEDFIT de los datos obtenidos del experimento realizado a 18°C a $\omega = 40\,000$ rpm.

Así, se realizó un experimento de velocidad de sedimentación mediante medidas de absorbancia ($\lambda = 250$ nm) con las 4 muestras preparadas a 25°C y 45 000 rpm.

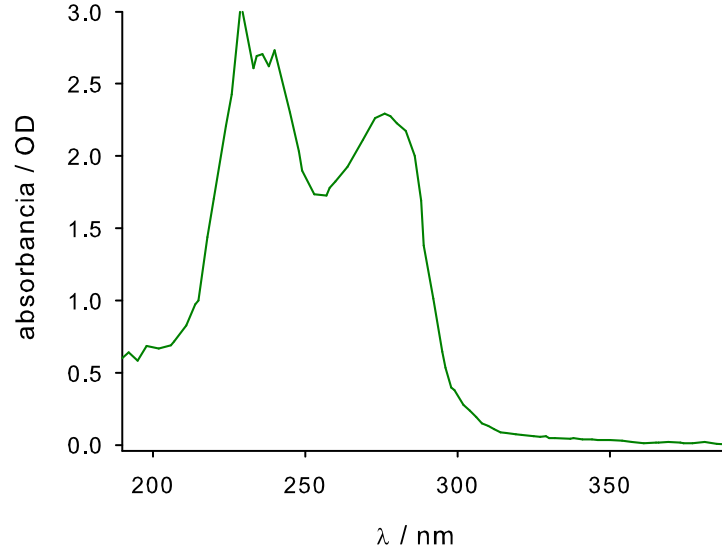


Figura III.6: Espectro de absorción de una muestra de BSA de 4 mg/mL realizado entre 190 y 390 nm.

A modo de resumen se muestra la Tabla III.3 en la que quedan recogidos los resultados obtenidos para el coeficiente de sedimentación y el peso molecular tras realizar los análisis descritos anteriormente para todas las muestras de BSA en estudio. Como puede observarse, no existe dependencia del coeficiente de sedimentación con la concentración de proteína. Asimismo, se muestran los valores de la diferencia cuadrática entre los datos experimentales y los ajustados para cada análisis, *rmsd* (*root-mean square deviation*), los cuales son aceptables. En dicha tabla también se recogen los valores de f/f_0 reportados por SEDFIT (aunque se trae a colación el ya mencionado “defecto” de SEDFIT de asignar el mismo f/f_0 a todos los componentes, lo cual no es rigurosamente correcto al variar de uno a otro la conformación global). Como ya se explicó en la sección II.10 (ecuación II.57), estos valores indican que la proteína es bastante esférica,

Los valores obtenidos para los coeficientes de sedimentación del primer pico son muy similares para todas las concentraciones estudiadas. En todos los casos aparece un pico principal con un valor para el coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$ en torno a 4.4 S. Asimismo, estos valores muestran un buen acuerdo con el valor experimental de $s_{20,w}$ indicado en la bibliografía para esta proteína [76, 77] (en la primera referencia se encuentra entre

3.8 y 4.62 S en función del disolvente utilizado y en la segunda el valor encontrado en condiciones similares a las del experimento realizado es de 4.02 S). Lo mismo sucede en el caso del coeficiente de sedimentación del segundo pico (en torno a 6.6 S) a excepción del valor encontrado en el caso de la muestra de 0.2 mg/mL. El coeficiente de sedimentación experimental obtenido es similar al encontrado en la bibliografía para el dímero [76] ($s_{20,w} = 6.71$ S). Incluso llegan a aparecer eventualmente especies de mayor peso molecular pudiéndose llegar a encontrar especies de 215 kDa. El peso molecular calculado desde la secuencia de aminoácidos con el software **SEDNTERP** para el monómero de la proteína BSA es 66 463 Da. Se observa entonces que los valores de los pesos moleculares estimados para el monómero de BSA con el modelo $c(s)$ de **SEDFIT** para el primer pico son muy similares al calculado, excepto para la muestra de 0.2 mg/mL y para la de 0.5 mg/mL a 40 000 rpm y 18°C. Asimismo, este valor de M obtenido con **SEDFIT** muestra un buen acuerdo con el indicado en la bibliografía para el monómero de BSA [76,77]. Se concluye también, que el peso molecular estimado para el segundo pico ($M \approx 120$ kDa) se corresponde con el peso molecular del dímero ya que es aproximadamente el doble que el del monómero.

También se comparan los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación de la BSA con los calculados mediante la ecuación II.27 a partir de los coeficientes de difusión $D_{20,w}$ indicados en [75] para el monómero y el dímero de la proteína y del peso molecular procedente de la secuencia (M del monómero es 66 463 Da, por lo que para el dímero M será igual a 132 926 Da). De acuerdo con [75], el valor de $D_{20,w}$ para el monómero de BSA es 6.19×10^{-7} cm²/s, resultando un coeficiente de sedimentación $s_{20,w} = 4.38$ S, mientras que el valor de $D_{20,w}$ para el dímero es 4.5×10^{-7} cm²/s, obteniendo en este caso un valor para el coeficiente de sedimentación $s_{20,w} = 6.4$ S. Ambos valores son similares a los obtenidos mediante los experimentos de velocidad de sedimentación realizados.

Por último, en la bibliografía [78] pueden encontrarse valores para algunas propiedades hidrodinámicas de BSA y HSA (albúmina de suero humano, proteína de estructura similar a la BSA) que han sido calculadas con los programas **HYDRO** e **HYDROPRO**, que fueron mencionados en el Capítulo II. Los valores de s indicados en dicha referencia para el caso del cálculo de la BSA con **HYDRO** están entre 4.19–4.85 S, en función de las características del modelo utilizadas. En el caso del cálculo con el programa **HYDROPRO** del coeficiente de sedimentación de la proteína HSA, los valores que se obtienen están en el rango de 4.27–4.64 S, en función también de las características de los parámetros del modelo utilizados en el cálculo. En ambos casos, los valores de s muestran un buen acuerdo con el resultante para el monómero de BSA del experimento realizado.

$c_{\text{muestra}} / \text{mg/mL}, \omega / \text{rpm}, T / ^\circ\text{C}$	$rmsd$	f/f_0	$s_{20,w} / \text{S}$	M / kDa
4, 45 000, 25	0.0173	1.31	4.3 6.65 9.24	64.3 120 215
1.5, 45 000, 25	0.0077	1.25	4.3 6.67 9.15	60 115 187
0.8, 45 000, 25	0.059	1.22	4.4 6.54 9.28	61 112 163
0.5, 45 000, 25	0.0136	1.14	4.16 6.93	48 114
0.2, 40 000, 18	0.01	1.25	4.52 8.04	50.2 120
0.5, 40 000, 18	0.0030	1.29	4.42 6.96	66.5 133
0.8, 40 000, 18	0.059	1.22	4.43 7.09 10.5	61.8 127 232
Referencia [76]		-	3.8 - 4.621 6.71	66.7 -
Referencia [77]		-	4.02 6.71	67.0 -
Calculado con HYDRO Referencia [78]			4.19 - 4.85	-
Calculado con HYDROPRO para HSA Referencia [78]			4.27 - 4.64	-
Calculado a partir de $D_{20,w}$ de la Referencia [75]		-	4.38 6.4	- -
Calculado a partir de la secuencia con SEDNTERP				66.5

Tabla III.3: Valores de $s_{20,w}$ y M obtenidos a partir de los perfiles experimentales de la BSA mediante el análisis con **SEDFIT** así como los valores de la desviación $rmsd$ de cada análisis. Se muestra también el valor de M de la proteína calculado a partir de la secuencia y los valores de s y M de la misma encontrados en la bibliografía.

III.3.2.b. Ovoalbúmina

Para terminar los experimentos previos con proteínas, se decidió realizar el estudio de la ovoalbúmina con dos objetivos. El primero de ellos estudiar la dependencia del coeficiente de sedimentación de la proteína en función de la concentración de la misma en un rango de concentraciones pequeñas y, el segundo, estudiar el proceso de dimerización de la proteína en función de la concentración. La proteína utilizada en este trabajo es ovoalbúmina de clara de huevo de gallina procedente de Sigma (A5503-10G, Lote: 126K7009). Como disolvente-tampón se utilizó una disolución de Tris 20 mM y NaCl 150 mM ($\text{pH} = 7$), que como se ha comentado anteriormente es típico para el estudio de proteínas. Se preparó una disolución de ovoalbúmina en Tris/NaCl de concentración 2 mg/mL. Se dializaron 2 mL de esta disolución durante 24 horas en un tubo de membrana de celulosa de 10 mm de anchura con un tamaño de poro que retiene especies con un peso molecular mayor de 12.4 kDa. Una vez dializada se diluye dicha muestra con el tampón de diálisis hasta conseguir disoluciones de 2, 1 y 0.5 mg/mL.

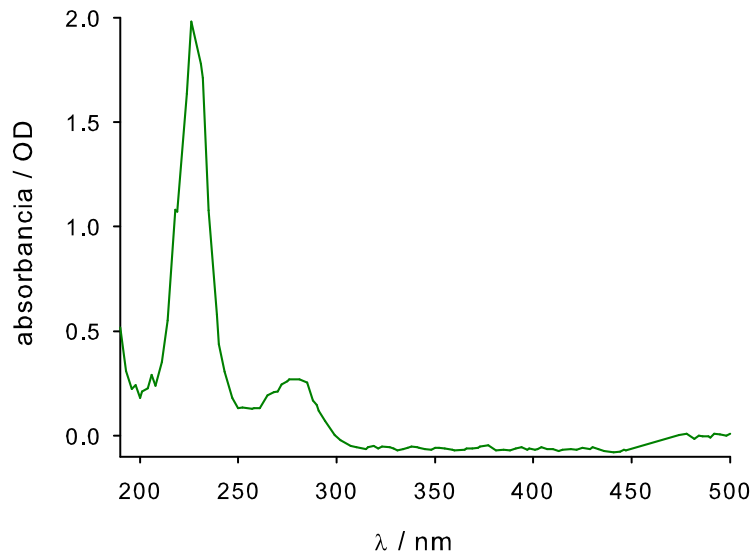


Figura III.7: Espectro de absorción de una muestra de ovoalbúmina de 0.5 mg/mL realizado entre 180 y 450 nm. El valor de absorbancia a la longitud de onda seleccionada $\lambda = 280 \text{ nm}$ es 0.3 OD.

Los experimentos de ovoalbúmina se siguieron mediante medidas de absorbancia ya que en su estructura hay aminoácidos con grupos aromáticos responsables de la absorción.

Así, se inyectaron 390 μL de cada una de las 3 muestras preparadas en el sector correspondiente de cada una de las celdas y 400 μL de disolución de referencia, siendo ésta el tampón de la diálisis a la que se sometió la muestra.

Como en los casos anteriores, hay que seleccionar la longitud de onda adecuada para realizar las medidas de absorbancia. Para ello se realizó un espectro de absorbancia en la propia ultracentrífuga entre 180 y 450 nm de las cuatro muestras disponibles. Como puede observarse, en la Figura III.7 la longitud de onda que produce una absorbancia adecuada para realizar las medidas de ultracentrifugación analítica es 280 nm ya que el valor de la absorbancia obtenido se encuentra en el rango adecuado (0.1 a 1.5 OD).

Después de realizar el registro del espectro de absorbancia se llevó a cabo el experimento de velocidad de sedimentación a una velocidad del rotor $\omega = 45\,000$ rpm, a una temperatura de 25°C y $\lambda = 250$ nm. Se realizaron 400 medidas sin intervalos de tiempo entre los sucesivos *scans* de absorbancia.

A modo de ejemplo, se presenta la Figura III.8 en la que se muestran, para el caso de concentración de 1 mg/mL medida en modo absorbancia, los perfiles de concentración experimentales y los perfiles procedentes del ajuste de **SEDFIT** con el algoritmo **SIMPLEX**. Asimismo, se muestran también, la función de distribución continua $c(s)$ obtenidas al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra.

Una vez realizados los experimentos se analizan los datos obtenidos con el modelo de distribución continua $c(s)$ de **SEDFIT**. Dichos análisis se realizaron con 300 puntos de resolución equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 15 S y un nivel de confianza de 0.95. Los valores del volumen específico parcial de la ovoalbúmina de pollo ($\bar{v} = 0.739$ mL/g) y de la viscosidad ($\eta = 0.009077$ P) y densidad ($\rho = 1.0038$ g/mL) del disolvente-tampón fueron obtenidos con **SEDNTERP**. El valor de $\bar{v}$ calculado con **SEDNTERP** es similar al encontrado en la bibliografía obtenido mediante medidas experimentales [79]. Los resultados finales se recogen en la Tabla III.4.

En la función de distribución $c(s)$ aparece en todos los casos un pico principal con un valor para el coeficiente de sedimentación $s_{20,w}$ en torno a 3.4 S que muestra un buen acuerdo con el valor experimental de $s_{20,w}$ indicado en la bibliografía para esta proteína en condiciones similares a las del experimento realizado [77, 80] (3.5 S en ambos casos). El peso molecular M correspondiente a ese pico está en torno a 36 000 Da, valor ligeramente inferior al calculado con el software **SEDNTERP** (42.9 kDa) a partir de la secuencia de la proteína y al encontrado en la bibliografía [77, 80] (43 y 41 kDa, respectivamente). Esta diferencia puede deberse a que el peso molecular que se obtiene mediante **SEDFIT** es un

$c_{\text{muestra}} \text{ / mg/mL}$	$rmsd$	f/f_0	$s_{20,w} \text{ / S}$	$M \text{ / kDa}$
4	0.01	1.1	1.57	11.5
			3.40	35.9
			5.45	72.8
			8.5	155
1	0.006	1.08	1.15	6.84
			3.46	35.7
			5.65	74.5
			8.63	140
0.5	0.005	1.2	3.39	40.2
			5.54	80.54
			8.6	171
Calculado a partir de la secuencia con SEDNTERP			-	42.9
[77]			3.5	41.0
[80]			3.5	43.0

Tabla III.4: Valores de $s_{20,w}$ y M obtenidos a partir de los perfiles experimentales mediante el análisis con **SEDFIT** así como los valores de la desviación $rmsd$ de cada análisis. Se muestra también el valor de M de la proteína calculado a partir de la secuencia y los valores de s y M encontrados en la bibliografía.

peso molecular aparente que no es muy exacto. Al igual que sucedía en el caso de la BSA aparecen otros picos a mayores valores de coeficiente de sedimentación y con valores de pesos moleculares atribuibles a oligómeros de dicha proteína. Se puede deducir que el segundo pico ($s_{20,w}$ en torno a 5.5 S y M en torno a 70 kDa) se corresponde con el dímero y el tercero ($s_{20,w}=8.5$ S y $M=150$ kDa) con el trímero, y así sucesivamente. Por último mencionar que para las concentraciones mayores (4 y 2 mg/mL) aparece un pico con un coeficiente de sedimentación pequeño ($s_{20,w}$ en torno 1.2 S). Como se comentó con anterioridad, dicho pico puede corresponderse con impurezas que han contaminado la muestra en la preparación y manipulación de la misma, pertenecer a componentes del tampón, o deberse a errores en la determinación de la posición del menisco.

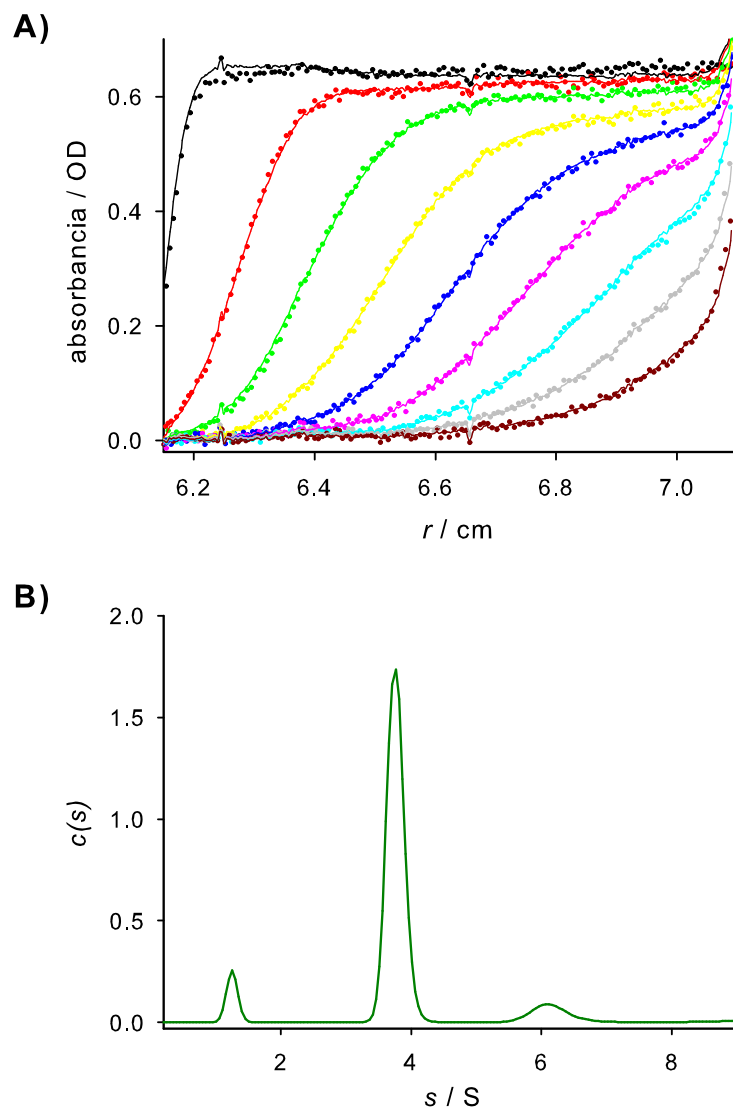


Figura III.8: A) Perfiles de concentración experimentales (puntos) y ajustados mediante SEDFIT (líneas continuas) para diferentes tiempos (representados por los distintos colores) para el caso de la muestra de ovoalbúmina de 1 mg/mL, $\omega = 45\,000$ rpm y $T = 25^\circ\text{C}$. B) Función de distribución continua $c(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de dicha muestra.

III.3.3. Efecto de la polidispersidad: carragenano, pectina y dextrano

Una vez estudiadas las muestras de proteínas, se realizaron simultáneamente experimentos con tres macromoléculas distintas, de las cuales dos son polisacáridos (pectina y carragenano) y la otra es un polímero sintético (dextrano), todas ellas muestras polidispersas. Se inyectaron $390\ \mu\text{L}$ de cada una de estas muestras en tres celdas distintas y $400\ \mu\text{L}$ de referencia (el disolvente de la muestra correspondiente) en los sectores adecuados (posteriormente se detallarán las concentraciones empleadas en cada caso).

La velocidad del rotor elegida fue, $\omega = 45\,000\ \text{rpm}$ y la temperatura, $T = 23^\circ\text{C}$. Se realizaron $900\ \text{scans}$ con un intervalo de espera entre los mismos de un minuto, por lo que el experimento tuvo una duración de 15 horas. Al igual que entonces se realizó un espectro de absorbancia entre 220 y $700\ \text{nm}$ para observar si las muestras absorbían y poder así realizar medidas de absorbancia e interferencia. Sin embargo, ninguna de las muestras presentó señal en el espectro de absorbancia. Por dicho motivo únicamente se utilizaron medidas de interferencia.

Como se ha comentado al principio de este capítulo, se utilizaron los programas **SEDFIT** y **DCDT+** para realizar los análisis de los datos procedentes de los experimentos de velocidad de sedimentación de las tres especies en estudio (carragenano, pectina y dextrano) y así decidir el método de análisis a utilizar para este tipo de muestras en los estudios posteriores.

Carragenano

Se comienza mostrando los resultados obtenidos para la muestra de carragenano. El carragenano empleado en este análisis es Sigma C1013 (Gelatin, vegetable; Irish Moss; Lot: 25H0840). Esta sustancia está compuesta en su mayor parte por κ -carragenano, aunque presenta trazas de λ -carragenano. La muestra de carragenano utilizada en los experimentos tenía una concentración de $0.5\ \text{mg/mL}$ y estaba disuelta en $\text{NaCl}\ 0.2\ \text{M}$. Se realiza un primer análisis de los datos experimentales mediante el método de distribución continua de $c(s)$ y el algoritmo **SIMPLEX** para realizar el ajuste con una resolución de 200 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0.5 a 15 S y un nivel de confianza de 0.95. El valor del volumen específico parcial del carragenano es de $0.51\ \text{mL/g}$ [81]. Al igual que en el caso anterior, los valores de la densidad y la viscosidad

del disolvente se calculan con **SEDNTERP**, obteniéndose en el caso de la disolución de NaCl 0.2 M $\rho = 1.0058$ g/mL y $\eta = 0.95$ cP.

Al realizar el ajuste ($rmsd = 0.007$) de los perfiles de concentración experimentales obtenidos para el carragenano (Figura III.9A) se observa que en la función de distribución $c(s)$ aparece entre 1 y 12 S un pico muy ancho que pertenece a un 90 % de la muestra resultado de la aglomeración de muchos picos superpuestos (Figura III.9B). La irregularidad de dicho pico es el resultado de que el algoritmo empleado por **SEDFIT** para determinar la distribución $c(s)$ se basa en la búsqueda de especies discretas (este modelo está orientado a la detección de estados de oligomerización de proteínas). Al integrar globalmente los picos resultantes se obtiene un valor representativo de 4.84 S para $s_{20,w}$. Del mismo modo, se observan otros dos picos cuya proporción al total de la muestra es insignificante. El primero de ellos es un pico estrecho y alto que se encuentra en torno a los 0.5 S mientras que el segundo es un pico ancho con un valor para $s_{20,w}$ de 13.56 S. Es importante indicar también el valor de la relación entre los coeficientes de fricción traslacionales, f/f_0 , ya que dicho valor, como se dijo en el Capítulo II, es indicativo de la conformación de la macromolécula en la disolución así como de su grado de hidratación. Si este valor es menor de 1.3 la partícula se encontrará compactada, presentando una forma globular próxima a la esférica, mientras que si es mayor la conformación de la partícula en disolución será más alargada y asimétrica. En este caso, el valor que se obtiene para el carragenano es $f/f_0 = 9.2$ lo que indica que dicha macromolécula adopta una conformación estirada en esa disolución. En todo caso, como se indicó en la sección anterior, el modelo de distribución continua $c(s)$ puede confundir la dispersión producida por difusión con la debida a la propia polidispersidad de la muestra, provocando una malinterpretación del valor del coeficiente de difusión, y por tanto del valor obtenido por este modelo para f/f_0 , por tanto se toman las referencias a la asimetría determinada para estas partículas con la debida cautela, y servirán simplemente como una información orientativa.

Se observa que los picos obtenidos a partir del análisis por método de distribución continua $c(s)$ no están bien definidos, por este motivo se decidió utilizar el método de análisis $ls-g^*(s)$ ya que la difusión de las moléculas en estudio no se adecuaba al tratamiento que se realiza con las funciones de distribución en **SEDFIT**. El análisis se lleva a cabo mediante el método $ls-g^*(s)$ (con regularización Tikhonov-Phillips, $P = 0.68$) y el algoritmo **SIMPLEX** para realizar el ajuste con una resolución de 200 valores equiespaciados de coeficiente de sedimentación en el rango de 0.5 a 15 S. En este caso, tal y como se observa en la Figura III.9C, al realizar el ajuste ($rmsd = 0.007$) se observa un pico muy ancho

(entre 1 y 12S) en la representación de $ls-g^*(s)$ frente al coeficientes de sedimentación que corresponde casi a la totalidad de la muestra (98% del total) con un coeficiente de sedimentación representativo para el polisacárido de 4.74 S, valor muy próximo al obtenido mediante el método de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT. Al igual que en el caso anterior, se observa otro pico ancho pero de escasa contribución al total de la muestra que se corresponde con 13.71 S.

Por ambos métodos se llega a la conclusión de que hay un pico principal en torno a 4.8 S y otros insignificantes en cuanto a la proporción de muestra se refiere. Por este motivo se centra la atención en el pico principal, siendo el valor obtenido para el coeficiente de sedimentación de dicho pico ($s_{20,w} = 4.8$ S) muy próximo al correspondiente a una muestra formada únicamente por κ -carragenano tal y como obtuvieron Sloodmaekers y colaboradores [82] mediante medidas de velocidad de sedimentación ($s_{20,w} = 4.9$ S). Los resultados obtenidos son adecuados ya que el carragenano empleado en nuestro trabajo está compuesto por una proporción mayoritaria de κ -carragenano aunque existían también pequeñas cantidades de λ -carragenano.

Por último se decidió emplear el programa DCDT+ para realizar los análisis de los experimentos y así compararlos con los obtenidos por SEDFIT. Se recuerda que este programa emplea el coeficiente de sedimentación “aparente”, mediante el método desarrollado por Stafford [74] basado en la derivada de la concentración en función del tiempo (dc/dt) seguido de un ajuste mediante el método de la derivada de la función $g^*(s)$, aportando información acerca del peso molecular y el coeficiente de sedimentación de la muestra en estudio. El ajuste que se obtiene de los datos de la distribución $g^*(s)$ a una sola especie y utilizando el método mejorado para el mismo tiene una desviación $rmsd = 0.004$. En la Figura III.10 se observa que aparece un único pico para el que se obtiene un valor de 4.5 S para el coeficiente de sedimentación. El valor que se obtiene del coeficiente de sedimentación obtenido con el programa DCDT+ es tan sólo un poco menor que el obtenido con SEDFIT (4.8 S) pero los ajustes realizados con el primero son muchos mejores.

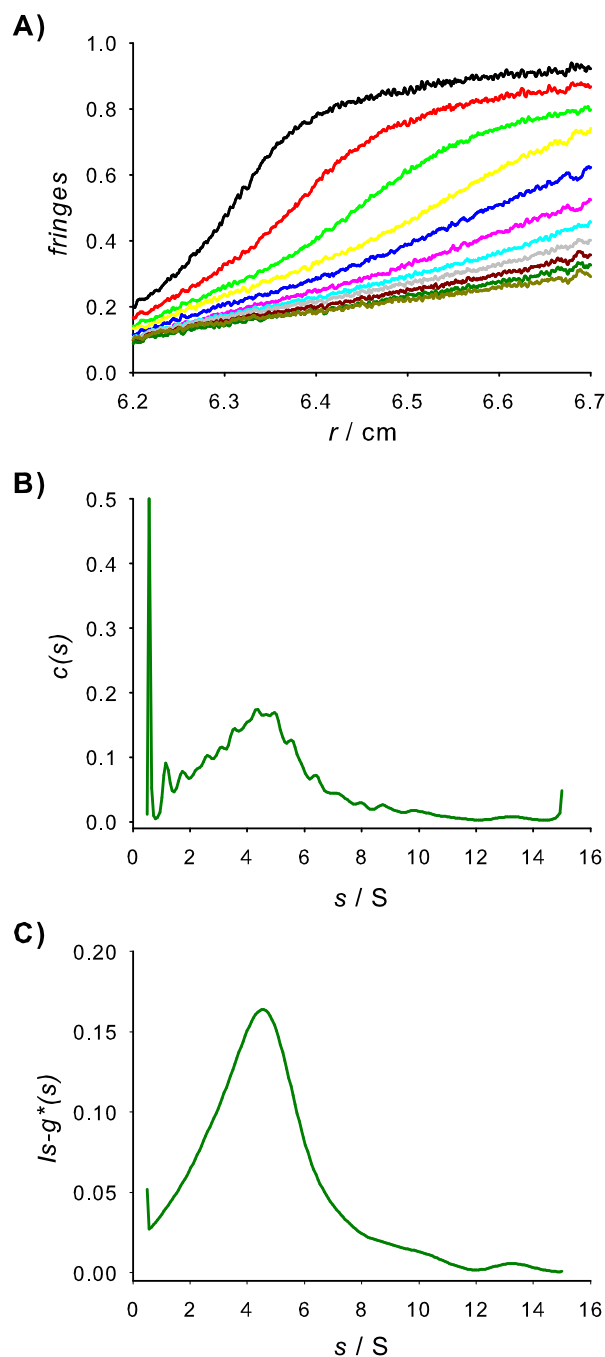


Figura III.9: A) Perfiles de concentración experimentales para una muestra de 0.5 mg/mL de carragenano a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm para diferentes tiempos representados por los distintos colores. B) Función de distribución continua $c(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de carragenano con SEDFIT mediante el método de distribución continua $c(s)$. C) Representación de la función $ls-g^*(s)$ frente a s procedente del análisis de los datos experimentales de la muestra de carragenano con SEDFIT mediante el método $ls-g^*(s)$.

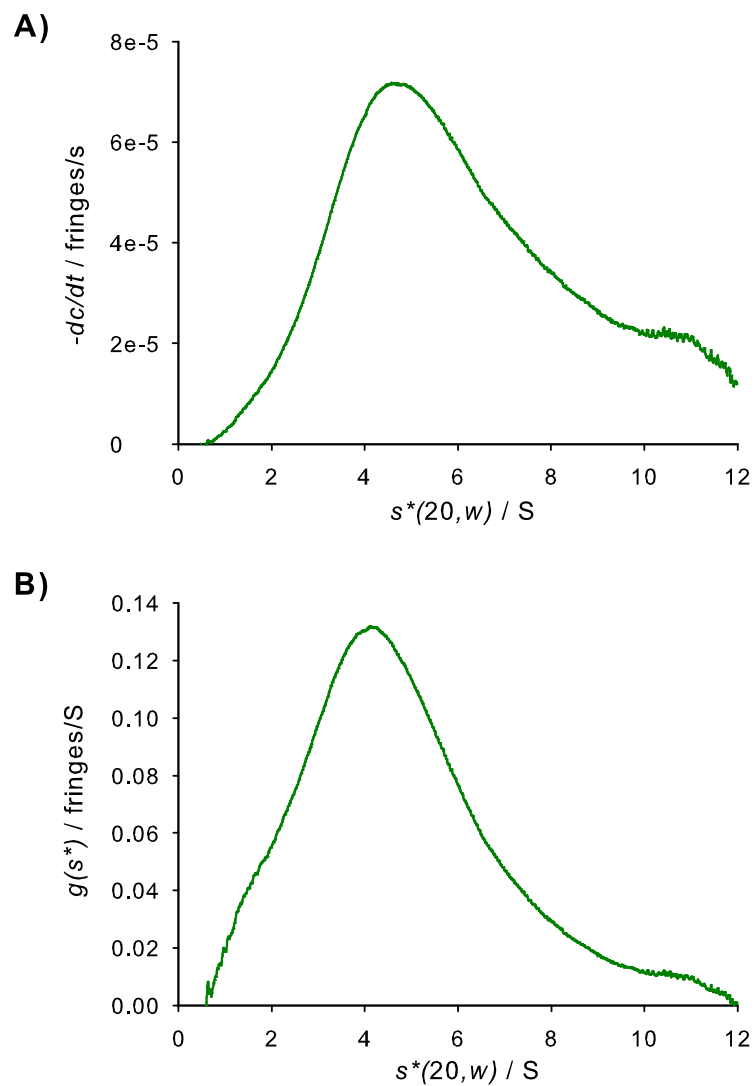


Figura III.10: A) Curva de la derivada de la concentración con respecto al tiempo en función del coeficiente de sedimentación para una muestra de 0.5 mg/mL de carragenano a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm. B) Función de distribución $g^*(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de carragenano.

Pectina

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos para la pectina. Al igual que en el caso del carragenano se preparó una muestra de pectina de 0.5 mg/mL en NaCl 0.2 M. La pectina utilizada era pectina de limón Sigma 1-9135 (lote: 108H0913). Se realizó un primer análisis mediante el método de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT y el algoritmo SIMPLEX para realizar el ajuste con una resolución de 200 valores de coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 15 S y un nivel de confianza de 1.2. Teniendo en cuenta que el valor del volumen específico parcial de la pectina es 0.63 mL/g [83] y que los valores de la densidad y la viscosidad del disolvente calculados con SEDNTERP para la disolución de NaCl 0.2 M son $\rho = 1.0058$ g/mL y $\eta = 0.95$ cP se obtiene como resultado del ajuste mediante SEDFIT la distribución continua $c(s)$ que se muestra en la Figura III.11B con una desviación $rmsd = 0.008$. En dicha función se observan varios picos, entre los que destacan dos principales. El primero de ellos, con un valor $s_{20,w} = 0.31$ S, es el mismo que aparecía para el carragenano pero a diferencia de entonces, en este caso contribuye un 40 % a la totalidad de la muestra. El otro pico principal es un poco más ancho que el anterior y al integrarlo se obtiene un valor de 1.86 S para $s_{20,w}$ y un valor estimado del peso molecular de 48 kDa. Los otros picos aparecen a mayores valores de $s_{20,w}$ pero no son destacables ya que su contribución al total de la muestra es insignificante. Es importante destacar también que el valor de la relación entre los coeficientes de fricción, f/f_0 , es 3.6 lo que indica que la conformación de la pectina en la disolución es bastante alejada de la esférica.

Asimismo se realizó el análisis mediante el método $ls-g^*(s)$ (con regularización Tikhonov-Phillips, $P = 0.68$) y el algoritmo SIMPLEX para realizar el ajuste con una resolución de 200 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 20 S. Como resultado del ajuste ($rmsd = 0.016$) se observa en la Figura III.11C un pico ancho con $s_{20,w} = 2.1$ S que se corresponde con un 80 % de la muestra. Al mismo tiempo se observa otro pico ancho pero de escasa contribución al total de la muestra que se corresponde con $s_{20,w} = 5.08$ S.

Teniendo en cuenta los dos análisis se puede decir que existe una especie cuyo coeficiente de sedimentación, $s_{20,w}$, está en torno a 2 S. Dicho valor muestra un buen acuerdo con los valores que se indican en el artículo de Morris et al. [84] para el coeficiente de sedimentación de distintas pectinas con distintos grados de esterificación, los cuales están entre 2.02 y 2.08 en función del grado de esterificación. No sucede lo mismo con el valor

de f/f_0 ya que los valores mostrados en dicho artículo son aproximadamente el doble (se encuentran relaciones entre 7 y 8) que el que se ha obtenido ($f/f_0 = 3.65$). No es de extrañar esta circunstancia, dada la falta de relevancia de f/f_0 para macromoléculas lineales que además, como lo son estas, son propensas a formar agregados.

Al igual que en el caso anterior se realiza un último análisis de la muestra de pectina con el programa DCDT+. Ajustando los datos de la distribución $g(s^*)$ a una sola especie y utilizando el método mejorado para el cálculo se observa un pico muy bien definido (ver Figura III.12) para el que se obtiene un valor de 26.4 kDa para el peso molecular y de 1.91 S para el coeficiente de sedimentación. El valor obtenido para el coeficiente de sedimentación se muestra en buen acuerdo con el obtenido con SEDFIT (aproximadamente 2S) y con el que aparece en la bibliografía [84]. Sin embargo, el valor para el peso molecular del polisacárido resultante del análisis con DCDT+ es la mitad que el obtenido con SEDFIT, si bien hay que tener en cuenta que el método utilizado por DCDT+ para obtener el peso molecular (a partir del coeficiente de difusión extraído de la anchura del pico de la curva $g^*(s)$) provoca que la polidispersidad de la muestra influya en la medida obtenida para la difusión, y por tanto el valor de peso molecular no es más que orientativo, y en absoluto un valor a tener en cuenta. Del mismo modo que en el caso anterior el ajuste realizado con el programa DCDT+ es mejor que el realizado con SEDFIT.

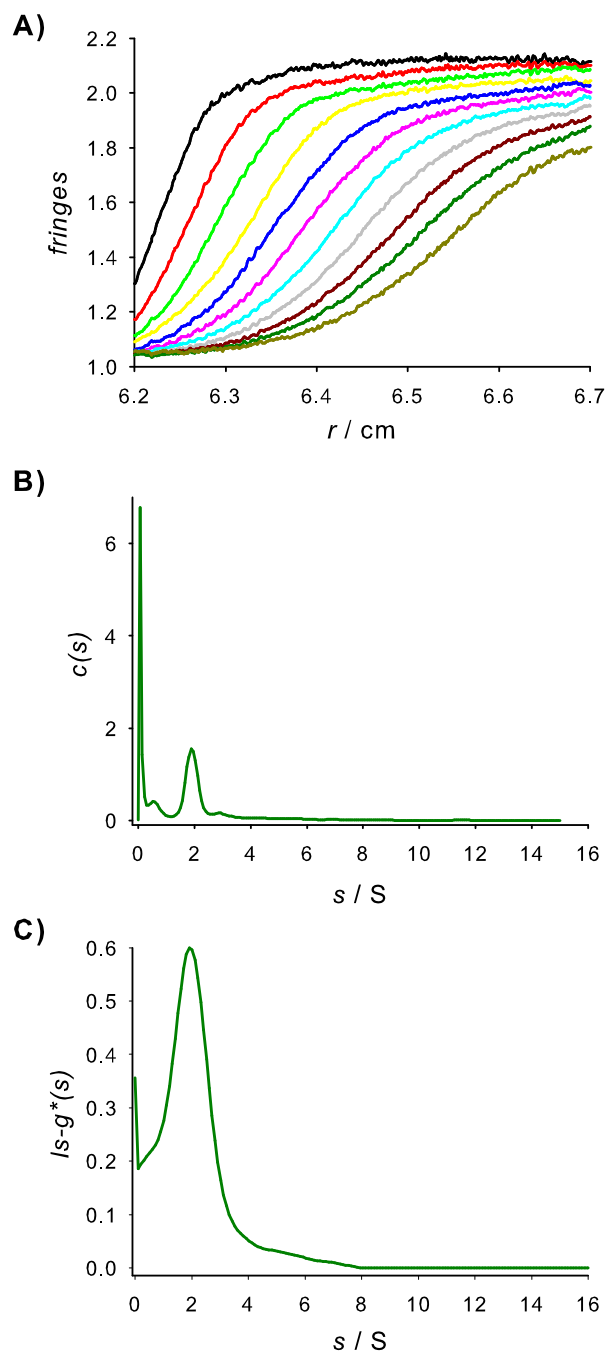


Figura III.11: A) Perfiles de concentración experimentales para una muestra de 0.5 mg/mL de pectina a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm para diferentes tiempos representados por los distintos colores. B) Función de distribución continua $c(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de pectina con SEDFIT mediante el método de distribución continua $c(s)$. C) Representación de la función $ls-g^*(s)$ frente a s procedente del análisis de los datos experimentales de la muestra de pectina con SEDFIT mediante el método $ls-g^*(s)$.

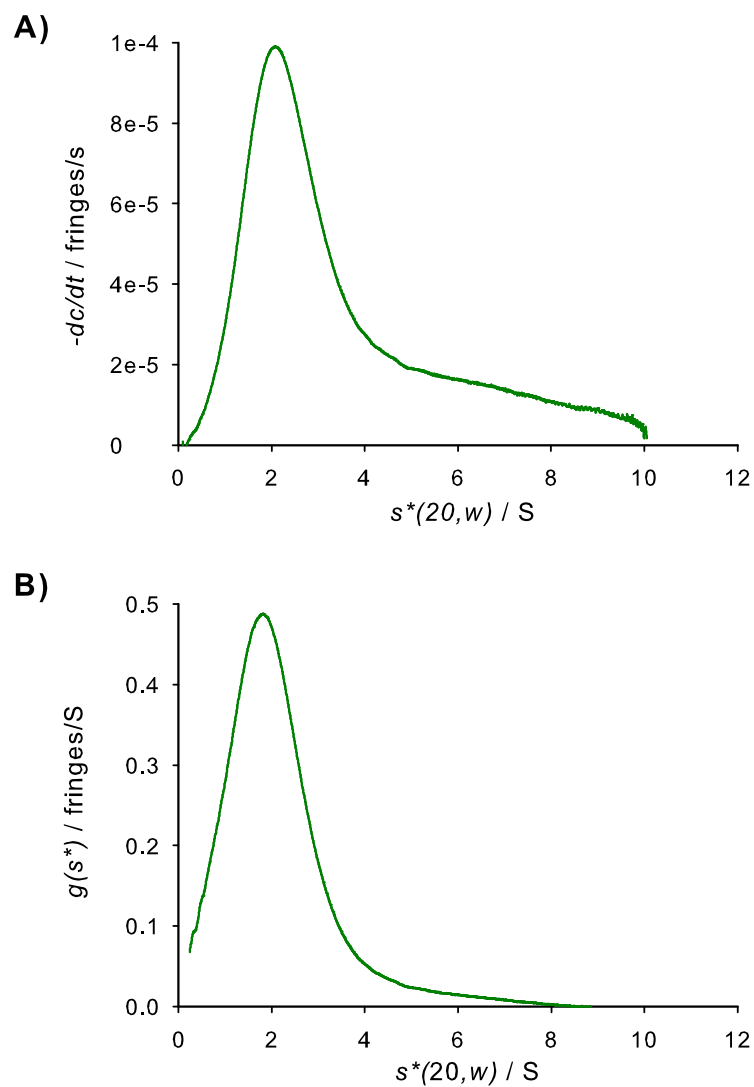


Figura III.12: A) Curva de la derivada de la concentración con respecto al tiempo en función del coeficiente de sedimentación para una muestra de 0.5 mg/mL de pectina a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm. B) Función de distribución $g(s^*)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de pectina.

Dextrano

Por último, se analizaron los datos obtenidos de los experimentos de velocidad de sedimentación del dextrano. La muestra de dextrano utilizada fue dextrano Sigma Standard 80K (Lote: 1413485). Para ello se preparó una disolución de 1mg/mL en 0.1 M de NaNO_3 con 2 % de azida. Dicha muestra se analizó con el programa **SEDFIT** mediante los dos tipos de análisis utilizados en muestras anteriores: modelo de distribución continua $c(s)$ y $ls-g^*(s)$ (Figura III.13). Para ello se deben tener en cuenta los valores del volumen específico parcial del dextrano que es 0.6 mL/g (página VII/112 en [85]) y los valores de la densidad y la viscosidad del disolvente calculados con **SEDNTERP** para la disolución de NaNO_3 0.1 M con 2 % de azida que son, $\rho = 1.0033$ g/mL y $\eta = 0.94$ cP.

En primer lugar, se realiza el análisis mediante el método de distribución continua $c(s)$ y el algoritmo **SIMPLEX** para llevar a cabo el ajuste con una resolución de 200 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 15 S y un nivel de confianza de 0.95. Se obtiene así la función de distribución que se observa en la Figura III.13B en la que pueden observarse dos picos destacables entre 2 y 5 S, así como el pico estrecho a menos de 0.5 S y otros picos a valores mayores de 5 S. La especie que más contribuye a la concentración total de la muestra (60 %) tiene un valor $s_{20,w}$ de 3.1 S y un peso molecular aproximado de 60 kDa. El otro pico destacado (31 % del total) tiene un valor de 4.38 S para $s_{20,w}$ y 107 kDa para el peso molecular. El valor obtenido para f/f_0 es 2.63, lo que indica que al igual que en los casos anteriores, el dextrano muestra una conformación alargada.

Al analizar los datos experimentales (Figura III.13A) mediante el método $ls-g^*(s)$ (con regularización Tikhonov-Phillips, $P = 0.68$) y el algoritmo **SIMPLEX** para realizar el ajuste con una resolución de 200 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 20 S, se obtiene la función mostrada en la Figura III.13C en la que únicamente se observa un pico ancho de cuya integración resulta $s_{20,w} = 3.98$ S.

Como la muestra de dextrano procede de un Standard se dispone de valores de algunas propiedades de dicho compuesto suministradas por el fabricante, como los promedios de peso molecular y la viscosidad intrínseca, a partir de los cuales se puede calcular un coeficiente de sedimentación aproximado promedio y compararlo con el obtenido experimentalmente. El $\overline{M}_w$ (peso molecular promedio en peso) de la muestra de dextrano es como ya se anticipó 80 kDa y el $\overline{M}_n$ (peso molecular promedio en número) es 55 kDa, por lo que la media geométrica del peso molecular es 67 kDa (también suministrada por el

fabricante). Este último valor se compara razonablemente bien con el obtenido mediante los experimentos de velocidad (M aproximadamente 60 kDa).

En lo que se refiere a la viscosidad intrínseca se puede calcular a partir de ella el coeficiente de sedimentación conocido el valor de la relación entre el radio equivalente de la viscosidad intrínseca y el radio equivalente del coeficiente de fricción, IT [86]. Dado que $f/f_0 = 1.6$, se sabe que el dextrano se encuentra como una cadena flexible en disolución siendo el disolvente en el que está (NaNO_3 0.1 M con 2 % de azida) un buen disolvente para el mismo. En estas condiciones $IT = 1.1$. Teniendo en cuenta esto y los valores de la viscosidad y densidad del disolvente calculados con **SEDNTERP**, se obtiene a partir de la viscosidad intrínseca suministrada por el fabricante ($[\eta] = 31.5 \text{ cm}^3/\text{g}$) un coeficiente de sedimentación teórico de 4.47 S. Este valor es similar al obtenido después de realizar el análisis con el método de la distribución continua $c(s)$ ($s_{20,w} = 4.38 \text{ S}$) a diferencia de lo que sucede con el obtenido mediante el análisis $ls-g^*(s)$ ($s_{20,w} = 3.98 \text{ S}$).

Por último se realiza el análisis con el programa **DCDT+** para la muestra de dextrano siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores (ajustar los datos de la distribución $g^*(s)$ a una sola especie y utilizar el método mejorado para el cálculo). Tras realizar dicho análisis se observa un único pico muy bien definido con un *rmsd* de 0.0148 (ver Figura III.14) para el que se obtiene un valor de 22.6 kDa para el peso molecular y de 3.73 S para el coeficiente de sedimentación. En este caso, el valor obtenido para el coeficiente de sedimentación es similar al obtenido mediante el método de análisis de $ls-g^*(s)$ de **SEDFIT** (3.98 S) mientras que se aleja del obtenido teóricamente. Del mismo modo el peso molecular obtenido con **DCDT+** difiere mucho del experimental por la misma razón expuesta anteriormente de las características del método de análisis.

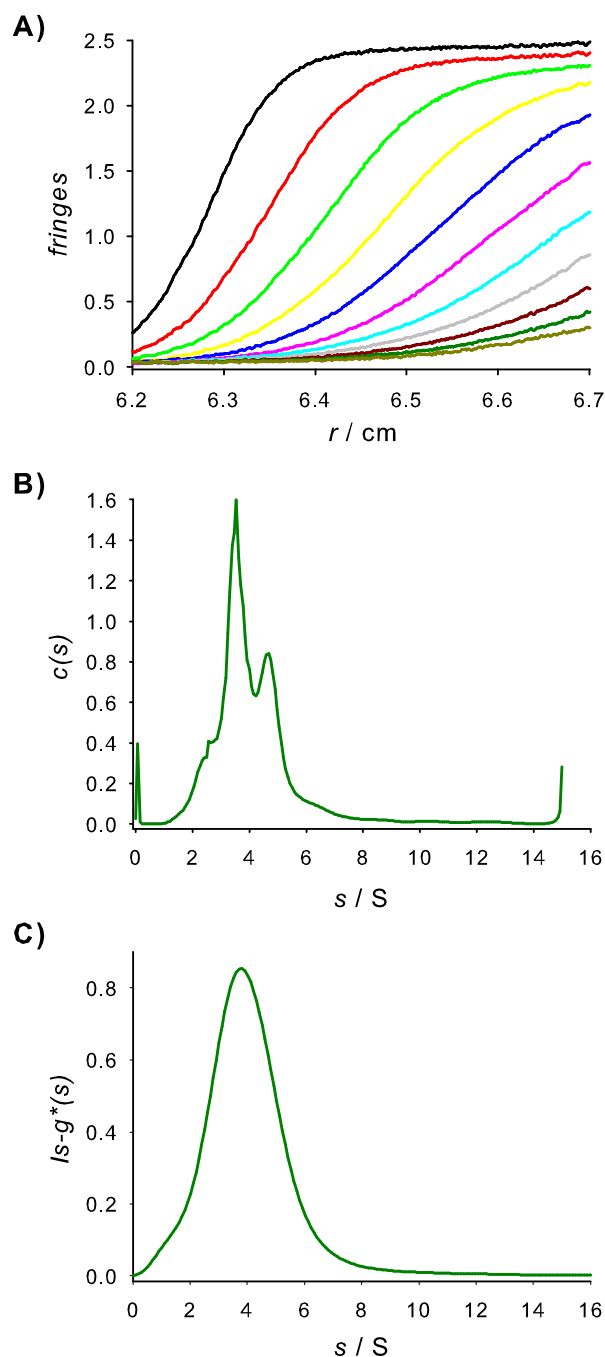


Figura III.13: A) Perfiles de concentración experimentales para una muestra de 0.5 mg/mL de dextrano a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm para diferentes tiempos representados por los distintos colores. B) Función de distribución continua $c(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de dextrano con SEDFIT mediante el método de distribución continua $c(s)$. C) Representación de la función $ls-g^*(s)$ frente a s procedente del análisis de los datos experimentales de la muestra de dextrano con SEDFIT mediante el método $ls-g^*(s)$.

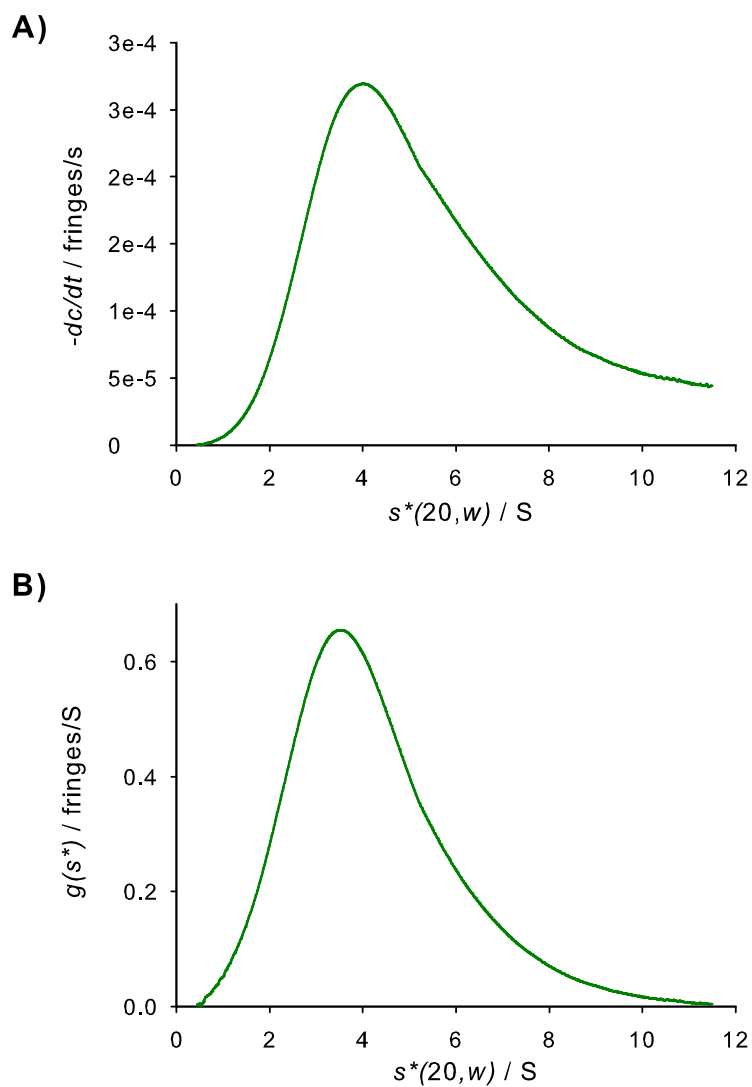


Figura III.14: A) Curva de la derivada de la concentración con respecto al tiempo en función del coeficiente de sedimentación para una muestra de 0.5 mg/mL de dextrano a 23°C a $\omega = 45\,000$ rpm. B) Función de distribución $g(s^*)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra de dextrano.

III.3.4. Efecto de la polidispersidad y la fuerza iónica: poliestireno sulfonato

Introducción

El poliestireno sulfonato de sodio (NaPSS) es un ejemplo típico de polielectrolito flexible. Además, las muestras estudiadas son polidispersas, con lo que en esta sección se va a poner de manifiesto tanto el efecto de la carga eléctrica como el efecto de la polidispersidad en las medidas de AUC. Como complemento, también se van a utilizar otras dos técnicas de caracterización disponibles en el Grupo de Investigación: DLS y GPC.

El proceso de sedimentación de estos polielectrolitos está influido, entre otros factores, por la presencia de cargas en la disolución, lo que dificulta su estudio y hace que la interpretación del comportamiento del polielectrolito bajo la acción de una fuerza centrífuga sea un campo abierto a la especulación. En esta sección se muestra un estudio del comportamiento de disoluciones de NaPSS con diferente fuerza iónica.

Métodos y resultados

Con objeto de realizar los estudios indicados, se prepararon disoluciones de dos muestras de NaPSS de diferente peso molecular promedio (en peso), $\bar{M}_w$, una de $\bar{M}_w = 70\,000$ Da (ACROS Organics 222271000, Lote: A0316071) y otra de $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da (Aldrich 434574-100G, Lote: MKA3419 V), ambas a una concentración de 0.5 mg/mL de polímero. Como disolvente se utilizó una disolución de nitrato sódico con concentraciones de NaNO_3 de 0.01, 0.1, 1 y 5 M, con el fin de variar la fuerza iónica en un amplio rango.

c_{NaNO_3} / mg/mL	ρ / g/mL	η / cP
0.01	0.9974	0.89051
0.1	1.0028	0.89398
1	1.0524	0.94164
5	1.2574	1.60208

Tabla III.5: Valores de ρ en g/mL y de η en cP de las distintas disoluciones de NaNO_3 obtenidos con SEDNTERP.

Las densidades y viscosidades de las distintas disoluciones de NaNO_3 a la temperatura de trabajo 25°C , que se necesitan para realizar el análisis de los datos obtenidos, fueron calculadas con SEDNTERP y se muestran en la Tabla III.5.

Experimentos de DLS

Se comenzó por la realización de los estudios de las muestras de NaPSS mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando el instrumento Zetasizer nano-ZS de Malvern. Para ello, se tomó 1 mL de cada una de las muestras preparadas y se filtró con un filtro de jeringa de $0.2\ \mu\text{m}$ de tamaño. Una vez filtradas las muestras se introdujeron en la cubeta y se realizaron 5 medidas, cada una de ellas consistente en 10 repeticiones de 20 segundos, lo que lleva a un tiempo de adquisición de datos total de 3 minutos. La temperatura a la que se realizaron los experimentos fue 25°C .

$c_{\text{NaNO}_3} / \text{M}$	$\bar{M}_w = 70\,000\ \text{Da}$	$\bar{M}_w = 1\,000\,000\ \text{Da}$
	r_h / nm	r_h / nm
0.01	15 ± 2	35 ± 2
0.1	11 ± 1	35 ± 1
1	18.5 ± 4.5	33 ± 2
5	6.6 ± 0.1	22 ± 2

Tabla III.6: Radios hidrodinámicos promedio de las muestras de NaPSS de $\bar{M}_w = 70\,000\ \text{Da}$ y $\bar{M}_w = 1\,000\,000\ \text{Da}$ a $0.5\ \text{mg/mL}$ en distintas fuerzas iónicas.

Del análisis de los datos mediante el algoritmo CONTIN incorporado al software que posee el aparato, se obtiene la distribución de tamaños e intensidades. Así, en la Tabla III.6 se recogen los valores del radio hidrodinámico medio, r_h , de las muestras de NaPSS de $\bar{M}_w = 70\,000\ \text{Da}$ y $\bar{M}_w = 1\,000\,000\ \text{Da}$ para distintas fuerzas iónicas. Como puede observarse en la Figura III.15, la distribución por intensidad del radio hidrodinámico muestra en todos los casos una banda ancha, lo que demuestra la polidispersidad de las muestras de NaPSS. Para ambos pesos moleculares, a valores altos de la fuerza iónica ($5\ \text{M}$ de NaNO_3) esa banda se estrecha y se desplaza hacia valores más bajos de diámetro, lo que se debe a que a esos valores de fuerza iónica las conformaciones de las moléculas de NaPSS son más uniformes y ovilladas, como consecuencia del apantallamiento de las cargas, por lo tanto de menor tamaño que a valores menores de fuerza iónica.

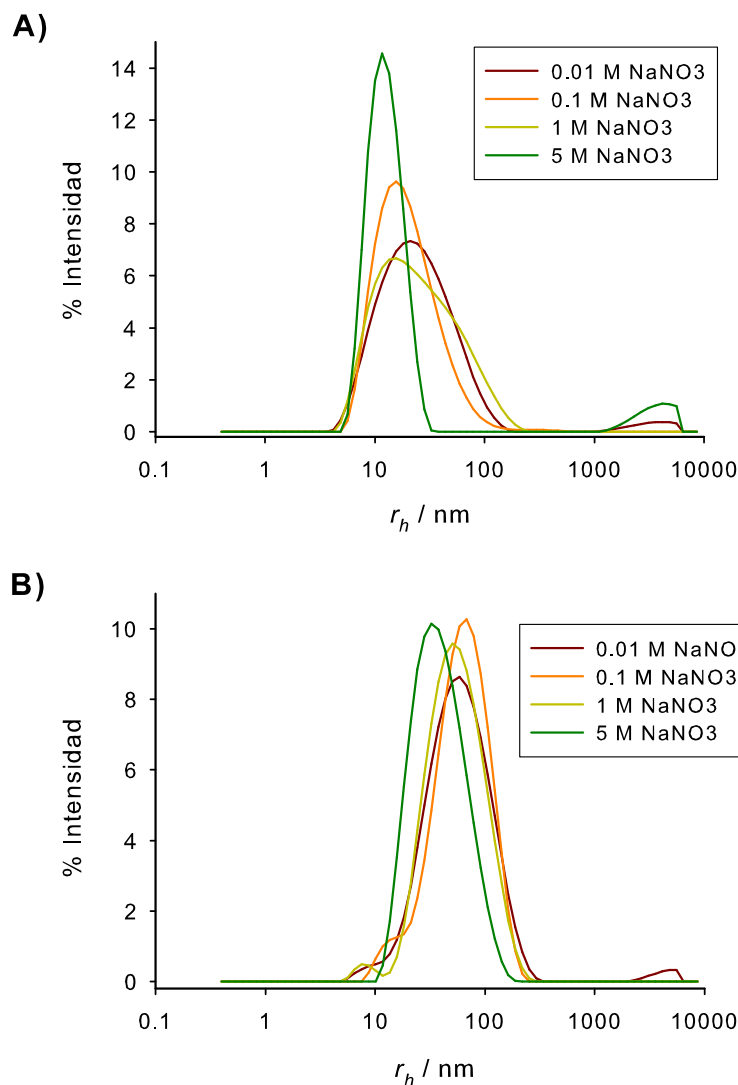


Figura III.15: Distribución de tamaños (por intensidad) resultante del análisis con CONTIN del experimento de DLS realizado para la muestras de NaPSS de 0.5 mg/mL en distintas fuerzas iónicas de: (A) $\bar{M}_w = 70\,000$ Da, y (B) $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da.

Experimentos de SEC

Cuando la muestra es polidispersa, como en este caso, la técnica cromatográfica denominada SEC proporciona valiosa información sobre la polidispersidad de la misma, lo que supone un buen complemento a los resultados obtenidos mediante AUC y DLS.

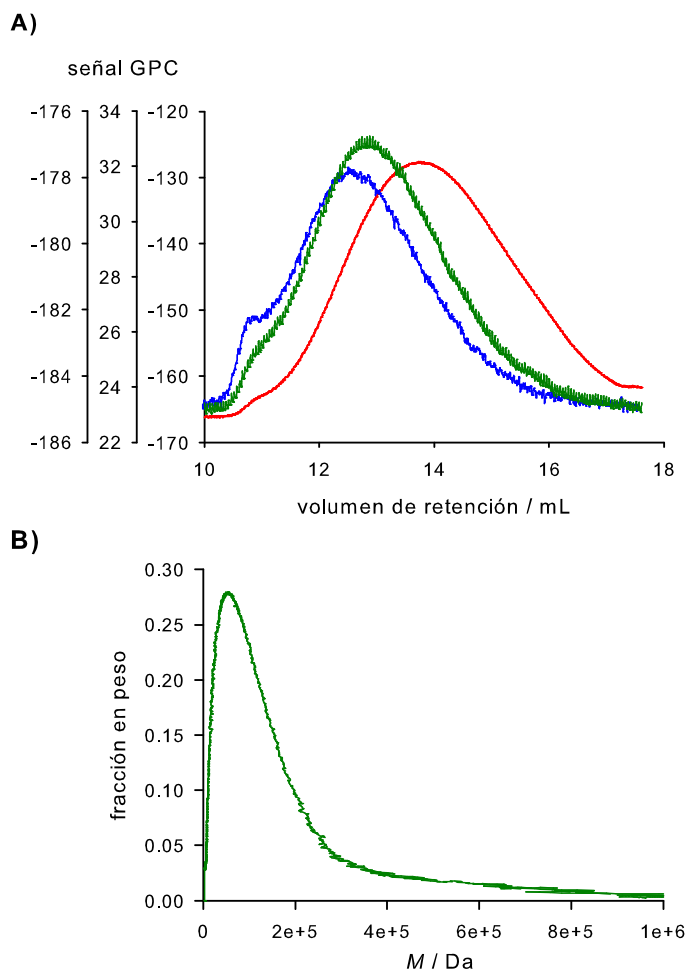


Figura III.16: A) Picos cromatográficos provenientes de distintos detectores para la disolución de NaPSS de $\bar{M}_w = 70\,000$ Da y fuerza iónica 0.1 M. Detector de índice de refracción: línea roja y eje y interior. Detector de dispersión de luz a 90° : línea azul y eje y intermedio. Detector de viscosidad: línea verde y eje y exterior. B) Función de distribución del peso molecular para dicha muestra.

Por ello, se decidió realizar un estudio de las muestras de NaPSS mediante esta técnica. La temperatura a la que se realizaron las medidas fue $25\text{ }^\circ\text{C}$. A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos mediante dicha técnica.

El primer caso corresponde a una disolución de NaPSS de $\bar{M}_w = 70\,000$ Da a una concentración de 1 mg/mL y con una fuerza iónica $I = 0.1\text{ M}$. La Figura III.16A muestra una superposición de los datos experimentales tal y como son registrados por los distintos detectores. En el eje x se representa el denominado volumen de retención o elución, que es proporcional al instante de tiempo al cual eluyen las distintas especies de la columna

cromatográfica. Para una mejor visualización de las gráficas, se ha restringido dicho eje a la zona donde aparece el pico cromatográfico. En el eje y se representan, en escalas independientes, las señales que se generan en cada uno de los detectores. La anchura de los picos es indicativa de la polidispersidad de la muestra.

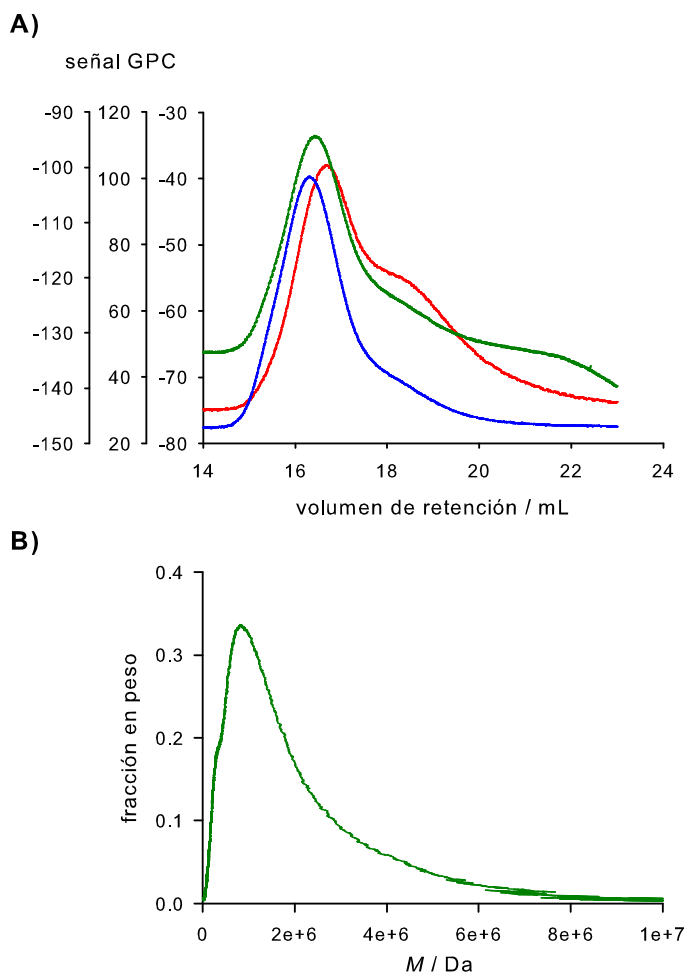


Figura III.17: A) Picos cromatográficos provenientes de distintos detectores para la disolución de NaPSS de $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da y fuerza iónica 0.1 M. Detector de índice de refracción: línea roja y eje y interior. Detector de dispersión de luz a 90° : línea azul y eje y intermedio. Detector de viscosidad: línea verde y eje y exterior. B) Función de distribución del peso molecular para dicha muestra.

Tras el análisis de los datos experimentales por el propio software del GPC (OmniSEC 4.7) se obtienen propiedades características de la muestra. A partir de la señal en bruto (Figura III.16A) se obtiene la función de distribución del peso molecular que aparece en la Figura III.16B. Por ejemplo, para el caso que se está tratando, se obtiene como peso

molecular promedio en peso $\bar{M}_w \approx 68\,300$ Da (próximo al especificado por el fabricante, $\bar{M}_w = 70\,000$ Da) y un índice de polidispersidad $IP \approx 2.7$. Como se ha indicado en apartado III.1.2, el GPC utilizado permite obtener la ecuación viscosimétrica o de Mark-Houwink-Sakurada. Para el caso que se muestra, se obtiene el siguiente valor para el exponente de dicha ley: $a_\eta \approx 0.73$. Éste es un valor característico de ovillos al azar muy expandidos, como debe corresponder al polielectrolito NaPSS en un medio con fuerza iónica intermedia.

El segundo caso corresponde a una disolución de NaPSS de $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da a una concentración de 1 mg/mL y con una fuerza iónica $I = 0.1$ M. Como en el caso anterior, la Figura III.17 A muestra una superposición los datos experimentales en bruto registrados por los distintos detectores, en el rango en el que aparece el pico cromatográfico. En este caso, se obtiene $\bar{M}_w \approx 793\,000$ Da (algo menor del especificado por el fabricante, $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da) y un índice de polidispersidad $IP \approx 2.0$. En la Figura III.17B se observa la función de distribución del peso molecular que se obtiene después del tratamiento de los datos mostrados en la Figura III.17A. Para este caso, se obtiene un valor del exponente de la ecuación viscosimétrica $a_\eta \approx 0.65$, típico de ovillos al azar expandidos. Este valor es menor que en el caso anterior porque la mayoría de las cadenas son mucho más largas y por tanto también más flexibles.

Experimentos de AUC

Se realizaron dos experimentos de velocidad de sedimentación a distintas fuerzas iónicas, uno para cada una de las muestras de NaPSS de distinto $\bar{M}_w$. Todas las medidas se realizaron en modo interferencia, por lo que es conveniente dializar las disoluciones de NaPSS preparadas antes de ser utilizadas en los experimentos. Se dializó 1 mL de cada una de estas disoluciones durante 24 horas en un tubo de membrana de celulosa de 10 mm de anchura con un tamaño de poro que retiene especies con un peso molecular mayor de 12.4 kDa.

Para cada experimento, 400 μ L de cada una de las muestras dializadas se inyectaron en celdas distintas. Análogamente, se inyectaron 400 μ L de disolución de NaNO_3 procedente de la diálisis en el sector de referencia. El experimento de velocidad de sedimentación se llevó a cabo a una velocidad del rotor $\omega = 40\,000$ rpm y a una temperatura de 25°C. Se realizaron 900 *scans* de un minuto cada uno de ellos siendo la duración de cada experimento de 15 horas.

Con el fin de obtener los valores del coeficiente de sedimentación y la masa molecular de las muestras de NaPSS se analizaron los perfiles de concentración obtenidos con el software SEDFIT. Para el volumen específico parcial del poliestireno sulfonato de sodio se tomó un valor de 0.62 mL/g [87]. Los valores de la densidad y de la viscosidad del disolvente necesarios para realizar el análisis con SEDFIT se obtuvieron con el programa SEDNTERP a partir de los componentes del mismo y son los que se mostraban en la Tabla III.5.

Debido a la polisipersidad de la muestra, el análisis mediante el método $c(s)$ de SEDFIT no da resultados concluyentes, por lo que se optó por utilizar el método de análisis $ls-g^*(s)$ (con regularización Tikhonov-Phillips, $P = 0.68$) y el algoritmo SIMPLEX para realizar el ajuste con una resolución de 300 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 20 S. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la Tabla III.7.

$c_{\text{NaNO}_3} / \text{M}$	$\bar{M}_w = 70\,000 \text{ Da}$			$\bar{M}_w = 1\,000\,000 \text{ Da}$		
	s / S	$s_{20,w} / \text{S}$	$rmsd$	s / S	$s_{20,w} / \text{S}$	$rmsd$
0.01	3.32	3.31	0.026	5.53	5.52	0.012
0.1	3.98	4.0	0.021	9.09	9.46	0.008
1	4.46	4.89	0.031	9.08	9.95	0.053
5	2.74	4.74	0.022	4.54	7.94	0.069

Tabla III.7: Resultados del análisis con el modelo $ls-g^*(s)$ de SEDFIT de los experimentos de AUC realizados para la muestras de NaPSS de $\bar{M}_w = 70\,000 \text{ Da}$ y $\bar{M}_w = 1\,000\,000 \text{ Da}$ a 0.5 mg/mL en distintas fuerzas iónicas.

Así, se observó (ver Figura III.18) que para todas las muestras estudiadas aparecía un pico principal muy ancho en la representación de la función $ls-g^*(s)$ frente a s . La anchura del pico es debida a la elevada polidispersidad de la muestra. Como puede observarse en la Figura III.18A, en el caso de la muestra de $\bar{M}_w = 70\,000 \text{ Da}$ el pico se extiende desde aproximadamente 1 S hasta 8 S. Para el caso de $\bar{M}_w = 1\,000\,000 \text{ Da}$ (ver Figura III.18B) el pico observado es más ancho y está desplazado hacia valores más elevados de coeficiente de sedimentación lo que es esperable debido a su mayor $\bar{M}_w$. También hay que destacar que en ambos casos, los picos obtenidos en la representación de la función $ls-g^*(s)$ frente a s son más estrechos para las fuerzas iónicas menor (0.01 M NaNO₃) y mayor (5 M NaNO₃), es decir para los casos límite estudiados. Esto es así debido a que en estos casos

la variabilidad conformacional es menor. A 0.01 M de NaNO_3 la mayoría de las moléculas de NaPSS se encuentran muy estiradas mientras que a 5 M la mayor parte de las moléculas están, como se ha comentado anteriormente, en forma de ovillo.

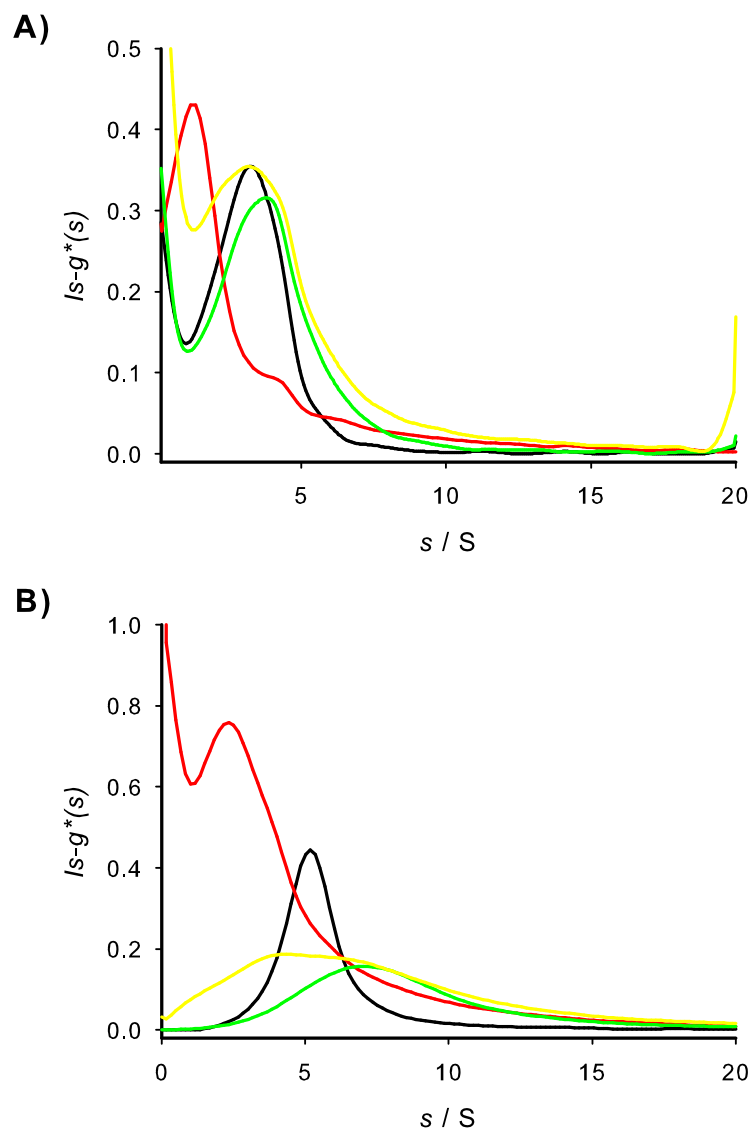


Figura III.18: Representación de las funciones $ls-g^*(s)$ frente a s procedente del análisis con SEDFIT mediante el método $ls-g^*(s)$ de las muestras de NaPSS de 0.5 mg/mL: A) $\bar{M}_w = 70\,000$ Da y B) $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ Da en distintas fuerzas iónicas (0.01 M línea negra, 0.1 M línea verde, 1 M línea amarilla y 5 M línea roja).

Es interesante observar que el coeficiente de sedimentación obtenido a mayor fuerza iónica es menor que el resto, siendo, sin embargo, el que corresponde al caso en que las

cadena polimérica están más ovilladas y presentan un menor tamaño. Esto es debido a que la viscosidad del disolvente aumenta significativamente con la concentración de sal, y el coeficiente de sedimentación es inversamente proporcional a la viscosidad del medio. Este efecto del disolvente desaparece al transformar los valores del coeficiente de sedimentación a los valores standard de 20°C agua, como se observa en la Tabla III.7.

Por último señalar que los valores de los coeficientes de sedimentación obtenidos para ambos pesos moleculares están en muy buen acuerdo con los valores obtenidos en otros trabajos experimentales para pesos moleculares de NaPSS y fuerzas iónicas parecidas [87,88].

III.4. Experimentos con otras proteínas

Una vez puesta a punto la ultracentrífuga analítica y comprobada la validez de la metodología empleada en el análisis de los datos experimentales, se estudiaron una serie de proteínas aisladas recientemente por otros grupos de investigación con los que se colabora.

III.4.1. Proteína HPr^{bs}

Introducción

Los experimentos de ultracentrifugación analítica que se describirán en esta sección son parte de un trabajo conjunto con el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche [23]. El objetivo de este estudio es la detección de posibles oligómeros de la proteína “histidina fosfotransportadora” procedente de la bacteria *Bacillus sphaericus*, HPr^{bs}. La sensibilidad de la ultracentrifugación analítica para detectar la presencia de oligómeros hace de ella una técnica ideal para este propósito. En este trabajo también se ha utilizado la técnica de dispersión de luz dinámica como apoyo para interpretar las medidas provenientes de la ultracentrifugación analítica.

Para la realización de los experimentos de DLS y AUC se disponía de una muestra de la proteína HPr^{bs} dializada y disuelta en 90 % H₂O y 10 % D₂O, siendo su concentración aproximadamente 2mM. A simple vista se observaron en dicha muestra partículas precipitadas por lo que antes de realizar las medidas mediante ambas técnicas se filtró la muestra a través de filtros micrométricos. Como consecuencia, la concentración disminuyó llegando a alcanzar el valor de 0.07 mM, la cual está por debajo del límite de detección de

la técnica de ultracentrifugación analítica lo que podría causar problemas en las medidas y en el análisis de los datos obtenidos.

Experimentos de DLS

Para realizar el experimento de dispersión de luz se tomó 1 mL de la muestra filtrada y se realizaron 12 medidas, cada una de ellas consistente en 11 repeticiones de 30 segundos, lo que lleva a un tiempo de adquisición de datos total de 11 minutos. La temperatura a la que se realizaron los experimentos fue 20°C y la viscosidad del disolvente a esa temperatura obtenida por **SEDNTERP** fue $\eta = 1.0031$ cP.

En la Figura III.19 se muestran las distribuciones de tamaños (por intensidad y por volumen) obtenidas al realizar las medidas indicadas. Como puede observarse, la distribución por intensidad muestra un pico con una cierta anchura en el rango de 200 a 500 nm, lo que demuestra la tendencia de la partícula a agregar, pero también aparece un pico a 1.77 ± 0.06 nm, que claramente corresponde a la proteína monomérica. En la distribución por volumen, solo se observa un pico centrado a 1.7 nm, también ancho, correspondiente al monómero de proteína. La ausencia del segundo pico (que aparecía en la distribución por volumen en torno a 200–500 nm) indica que el volumen de muestra que ocupan los posibles agregados es insignificante. Por último indicar que las anchuras de los picos pueden ser atribuidas al análisis mediante **CONTIN** ya que este algoritmo tiende a dar picos artificiales, incluso para muestras absolutamente monodispersas.

A partir del peso molecular de la proteína obtenido desde la secuencia de aminoácidos, 10921 Da, se puede hacer una estimación del radio hidrodinámico, r_h , con la teoría clásica de la hidrodinámica de partículas hidratadas elongadas (teoría que ya se introdujo en el Capítulo II):

$$r_h = r_{anh,sph} \left(1 + \frac{\delta}{\bar{v}\rho} \right)^{1/3} F(p) \quad (\text{III.1})$$

donde r_{anh} es el radio de la partícula si ésta fuese esférica y anhidra,

$$r_{anh,sph} = \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A} \right)^{1/3} \quad (\text{III.2})$$

Con un grado de hidratación típico $\delta = 0.3$ g(agua)/g(proteína) y los valores de $\bar{v} = 0.736$ mL/g (calculado desde la secuencia de aminoácidos utilizando **SEDNTERP**) y $\rho = 1.0089$ g/mL, se obtuvo un valor para el radio hidrodinámico de una esfera hidratada

(para la que $F(p) = 1$) de 1.65 nm. Este valor es próximo al obtenido experimentalmente mediante medidas de DLS. Sin embargo, si se considera que la forma de esta proteína no es esférica, el valor calculado se puede hacer coincidir exactamente con el valor experimental.

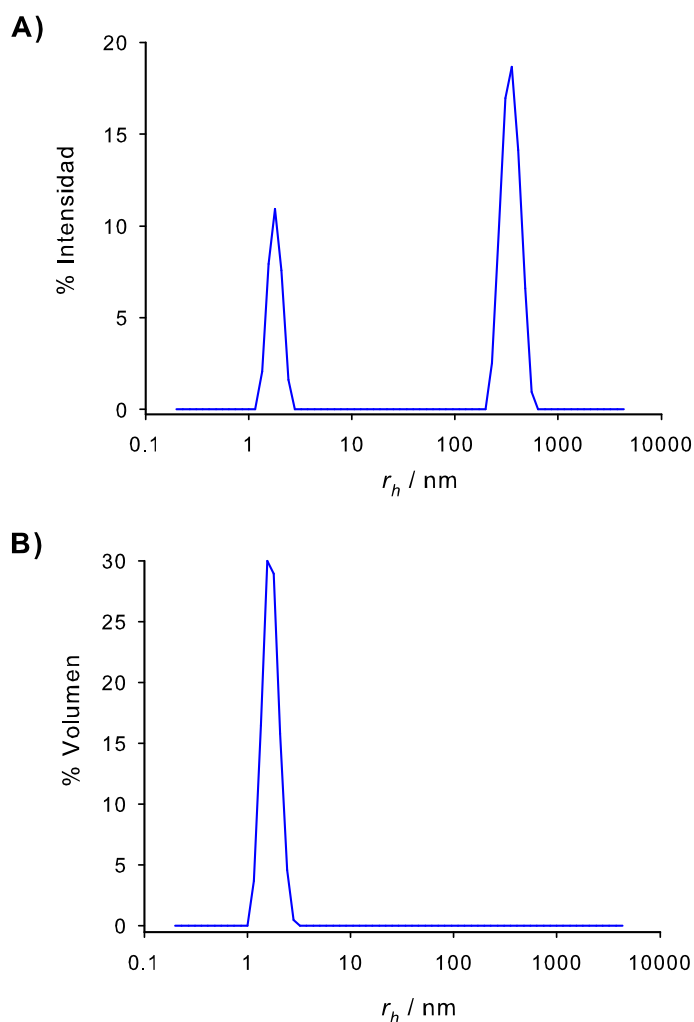


Figura III.19: Resultados del análisis con CONTIN del experimento de DLS realizado para la muestra de proteína. Distribución de tamaños: A) mediante intensidad y B) mediante volumen.

Experimentos de AUC

Para caracterizar de manera completa la proteína, se realizó un experimento de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica mediante medidas de absorbancia

e interferencia para una muestra de concentración 0.07 mM a 20°C y a una velocidad $\omega = 45\,000$ rpm. Para ello, 390 μ L de la muestra se introdujeron en el sector adecuado de la celda correspondiente y 400 μ L de referencia (disolvente de diálisis en el que está disuelta la muestra 90 % H₂O / 10 % D₂O) en el otro sector. Se realizaron 400 *scans* sin intervalo de tiempo entre medidas de absorbancia sucesivas.

Para calcular el coeficiente de sedimentación de la muestra se utilizó el modelo de distribución continua $c(s)$ de **SEDFIT**. Con objeto de expresar los resultados de manera estándar $s_{20,w}$ hay que suministrar a **SEDFIT** los valores de la densidad ($\rho = 1.0089$ g/mL) y la viscosidad ($\eta = 1.002$ cP) del disolvente a 20°C, los cuales fueron estimados desde la composición del mismo usando el software **SEDNTERP**. Asimismo, es necesario el volumen específico parcial de la proteína que, calculado desde la secuencia de aminoácidos utilizando **SEDNTERP**, fue 0.736 mL/g.

Debido a la baja concentración de la muestra después de ser filtrada (7 mM) la señal registrada en los experimentos de ultracentrifugación analítica (tanto de absorbancia como de interferencia) fue demasiado pequeña. Los agregados que pudiesen quedar en la muestra tras filtrar sedimentaron inmediatamente debido a su gran tamaño (según las medidas de DLS entre 200–500 nm) y no fue posible detectarlos, siendo entonces la proteína monomérica la única especie significativa y detectable. Por otro lado, debido a la poca intensidad de la señal, el ruido en los perfiles de concentración era muy acusado. Como ejemplo, se puede observar el perfil de concentración que aparece en la Figura III.20A donde la absorbancia inicial detectada era 0.08 OD, cuando el límite inferior que se considera usualmente adecuado es 0.1 OD.

De todas maneras, los perfiles de concentración obtenidos mediante medidas de absorbancia e interferencia pudieron ser analizados con el modelo de distribución continua $c(s)$ de **SEDFIT**. En el caso del análisis del perfil de absorbancia que se muestra en la Figura III.20 se obtiene un pico (que no se muestra aquí) muy ancho con un valor de $s_{20,w}$ entre 0.8 y 2.0 S, coincidente con el valor del coeficiente de sedimentación procedente de los análisis de las medidas de interferencia. La anchura del pico puede atribuirse a la baja relación señal/ruido de los datos en bruto ya que como puede observarse en la Figura III.20B, los residuales resultantes del ajuste se distribuyen aleatoriamente. Esto quiere decir que, aparte del problema de la baja concentración mencionado, el experimento no se vió afectado por ningún otro artefacto.

A partir del valor obtenido por DLS del r_h se puede calcular el valor del coeficiente de sedimentación de la proteína a partir de la ecuación II.58, obteniéndose un valor

$s_{20,w} = 1.5\text{S}$, que se encuentra dentro de los valores obtenidos en los experimentos de ultracentrifugación analítica ($\simeq 1.7\text{S}$).

Analizando los resultados de ambos tipos de experimentos, se puede concluir que se ha detectado una proteína de 1.7nm de radio hidrodinámico que es compatible con una forma globular, ligeramente elongada, de 10kDa . Debido a la baja resolución de los resultados de ultracentrifugación analítica consecuencia de la baja concentración de la muestra disponible, no se puede confirmar la presencia de oligómeros. Si bien tampoco puede descartarse, ya que los valores de $s_{20,w}$ correspondientes a los posibles oligómeros no difieren mucho de los encontrados para el monómero. Por ejemplo, la relación entre los valores de $s_{20,w}$ de un dímero y un monómero esférico es, como mucho 1.5 .

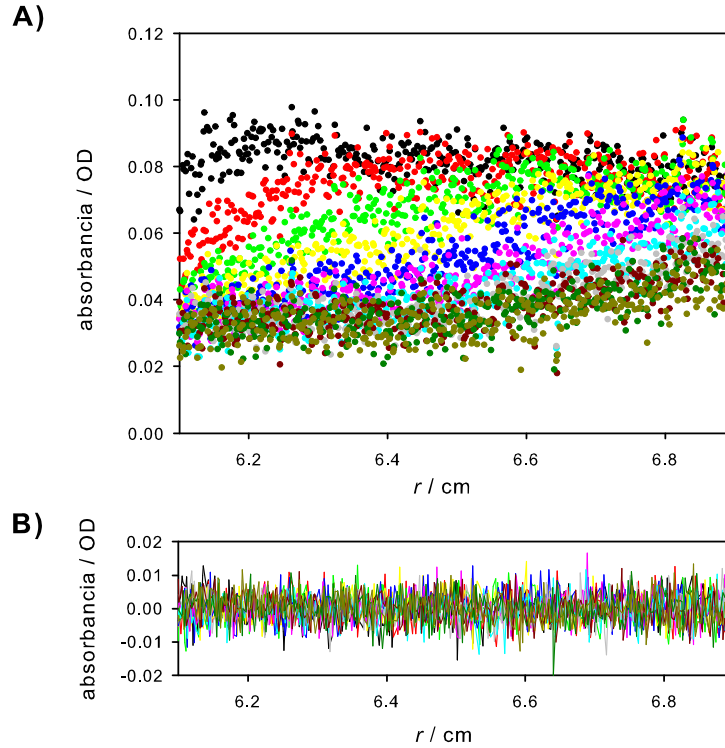


Figura III.20: A) Perfil de concentración obtenido mediante un experimento de AUC de la muestra de HPr^{bs} . B) Residuales porcentes del ajuste de dicho perfil con la función de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT.

III.4.2. Rabfilina-3A

Introducción

Este trabajo es una colaboración con el Grupo de Investigación de Biomembranas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia. En este caso, se realizó el estudio mediante experimentos de ultracentrifugación analítica de la proteína rabfilina-3A.

La rabfilina-3A es una proteína citosólica efectora de las proteínas Rab3 y Rab27 [89] todas ellas involucradas en el tráfico de vesículas en distintos tipos de células como las del sistema nerviosos, sistemas endocrino y exocrino, e incluso el sistema inmune [90]. La función de la rabfilina-3A está relacionada con estadios específicos en el proceso de reciclado de vesículas como pueden ser la interacción con el citoesqueleto de actina [91], su anclaje en la membrana plasmática [92], su recuperación después de la liberación de neurotransmisores u hormonas [93], o incluso la endocitosis [94].

La rabfilina-3A es una proteína que posee una región rica en cisteínas o dominio efector de Raben en su extremo amino-terminal [95], una región central con sitios consenso para fosforilación por diferentes proteínas quinasa y un extremo carboxilo-terminal que posee dos dominios C2 localizados en tandem [96, 97].

Se ha demostrado que los dominios C2 son esenciales para la función de la rabfilina-3A en el proceso de tráfico vesicular. Se ha descrito que interaccionan con diversas proteínas como SNAP-25 (4), β -adducin [98], CASK [99] y annexin A4 [100]. Otras dianas muy importantes en la función de estos dominios son el Ca^{2+} y los lípidos de membrana fosfatidilserina y fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato. Sin embargo, la forma en que cada una de estas interacciones modula la función de la rabfilina-3A es hoy en día totalmente desconocida y por eso es necesario un estudio detallado de todas ellas a nivel molecular.

Medidas de ultracentrifugación analítica

Con el objetivo indicado anteriormente y con el fin de obtener un estudio completo de la proteína de interés, se decidió realizar dos experimentos de velocidad de ultracentrifugación analítica. Uno de ellos mediante medidas de interferencia y otro mediante medidas de absorbancia. Para finalizar se realizó un experimento de equilibrio de sedimentación mediante medidas de interferencia. Las características de cada uno de estos experimentos así como los resultados obtenidos se indican a continuación.

En primer lugar se realizaron los experimentos de velocidad de sedimentación, inicialmente midiendo en modo interferencia. Para ello, $400\ \mu\text{L}$ de cada una de estas muestras se inyectaron en tres celdas distintas. Análogamente, se inyectaron $400\ \mu\text{L}$ del disolvente-tampón referencia en el sector correspondiente. Antes de comenzar el experimento se realiza un *scan* a 3 000 rpm para ciertos ajustes del sistema óptico requeridos por el protocolo de medida. Se realizaron 900 *scans* de interferencia de un minuto de duración siendo entonces la duración total del experimento de 15 horas.

Una vez terminado el experimento de interferencia se realizó el de absorbancia. Así, $390\ \mu\text{L}$ de cada una de estas muestras se inyectaron en tres celdas distintas. Análogamente, se inyectaron $400\ \mu\text{L}$ de referencia en el sector correspondiente. En este caso, a 3 000 rpm, se registró en la propia ultracentrífuga el espectro de cada una de las tres muestras entre 220 y 700 nm con el objetivo de averiguar la longitud de onda adecuada para realizar las medidas de absorbancia. La longitud de onda elegida para realizar las medidas de absorbancia es de 280 nm, ya que es donde la absorbancia de la proteína alcanza su máximo (ver Figura III.21). Se realizaron 400 *scans* de un minuto de duración sin intervalo de tiempo entre los mismos.

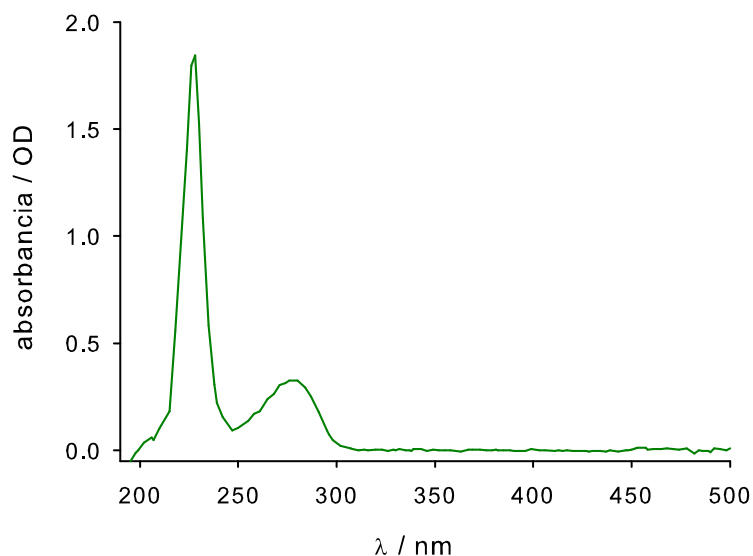


Figura III.21: Espectro de absorbancia de una muestra de proteína de $0.6\ \text{mg/mL}$ realizado entre 220 y 700 nm. Se observa el máximo a 280 nm, correspondiente a 0.3 OD. El pico de mayor intensidad corresponde al tampón.

Con el fin de obtener los valores del coeficiente de sedimentación y la masa molecular de la proteína, los perfiles de concentración obtenidos experimentalmente fueron analizados con **SEDFIT** utilizando el método de distribución continua $c(s)$ y el algoritmo **SIMPLEX** para realizar el ajuste con una resolución de 300 valores equiespaciados para el coeficiente de sedimentación en el rango de 0 a 10S y con un nivel de confianza de 0.95. Para expresar los resultados de manera estándar ($s_{20,w}$) hay que suministrar al programa **SEDFIT**, los valores de ρ y η del disolvente, y $\bar{v}$ de la proteína. La densidad del disolvente ($\rho = 1.067$ g/mL) y la viscosidad ($\eta = 1.613$ cP) a 4°C fueron estimados a partir de la composición del mismo usando el software **SEDNTERP**. El volumen específico parcial de la proteína fue calculado a partir del volumen total de la misma, 44 023 Å, y su peso molecular, 36 401 Da (obtenido mediante espectrometría de masas), dando como resultado $\bar{v} = 0.73$ mL/g.

Tras realizar los análisis con **SEDFIT**, los resultados obtenidos para todos los casos se recogen en la Tabla III.8. Es necesario indicar que los perfiles experimentales obtenidos en los dos modos de medida (absorbancia e interferencia) para la concentración de 0.1 mg/mL no tienen una resolución adecuada para poder analizarse correctamente. Sin embargo, en el caso de los experimentos de absorbancia, los perfiles experimentales pudieron ser analizados con **SEDFIT** obteniéndose unos resultados razonables.

A modo de ejemplo, en la Figura III.22 se muestran, para el caso de concentración de 0.3 mg/mL medida en modo interferencia y absorbancia, los perfiles de concentración experimentales (con los ruidos correspondientes (TI, RI) sustraídos) junto con los perfiles procedentes del ajuste de **SEDFIT** con el algoritmo **SIMPLEX**. Asimismo, se muestran también las funciones de distribución continua $c(s)$ obtenidas al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra.

Analizando la Tabla III.8 se observa que el coeficiente de sedimentación no depende de la concentración (las diferencias observadas son muy escasas e interpretables como meras fluctuaciones). Así, para todos los casos existe un pico muy acusado en torno a 1.7S que corresponde al coeficiente de sedimentación de la proteína en las condiciones de trabajo ($T = 4^\circ\text{C}$ y, HEPES 25 mM, NaCl 100 mM y EGTA 1 mM), resultando un valor para el coeficiente de sedimentación de la proteína en condiciones estándar $s_{20,w} = 3.3$ S. La masa molecular aparente que resulta del análisis correspondiente a ese pico está en torno a 40 kDa.

Hay que indicar que se observaron eventualmente algunos picos secundarios a valores de coeficiente de sedimentación y pesos moleculares mayores cuya contribución a la con-

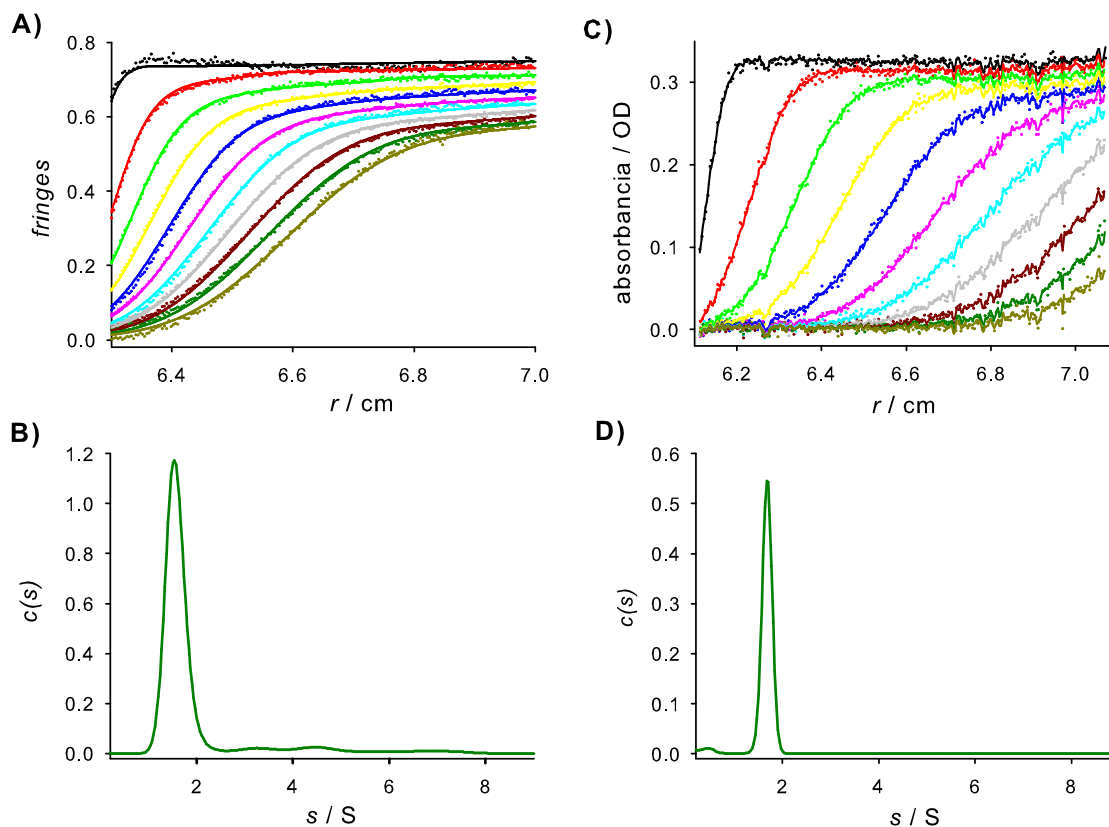


Figura III.22: Perfiles de concentración experimentales (puntos) y ajustados mediante SEDFIT (líneas continuas) para diferentes tiempos (representados por los distintos colores) para el caso de la muestra de rabfilina-3A de 0.3 mg/mL, $\omega = 40\,000$ rpm y $T = 4^\circ\text{C}$: A) modo interferencia y C) modo absorbancia. Función de distribución continua $c(s)$ obtenida al realizar el ajuste de los datos experimentales de la muestra: B) modo de interferencia y D) modo absorbancia.

centración de la muestra era irrelevante. La aparición de estos picos puede deberse a la presencia de cantidades despreciables de especies oligoméricas.

Se puede concluir entonces que existe una especie con un valor medio de $s_{20,w}$ de 3.29 ± 0.06 S y un peso molecular aparente de $40\,000 \pm 2\,000$ Da. El valor de peso molecular estimado mediante el experimento de velocidad de sedimentación es ligeramente mayor que el obtenido a partir de la secuencia ($M = 36\,383$ Da) y por espectrometría de masas ($M = 36\,401$ Da). De todos modos la diferencia es razonablemente escasa y está dentro del rango esperable en experimentos de velocidad de sedimentación, que no es una técnica que suministre pesos moleculares con alta precisión. La calidad de los ajustes a tenor de los valores de la desviación *rmsd* es plenamente aceptable.

III.4. EXPERIMENTOS CON OTRAS PROTEÍNAS

$c_{\text{muestra}} / \text{mg/mL}$	modo de detección	$rmsd$	s / S	$s_{20,w} / S$	$M_{\text{aparente}} / \text{Da}$
0.6	IF	0.01	1.66	3.27	40233
	ABS	0.003	1.71	3.35	43130
0.3	IF	0.005	1.58	3.11	34779
	ABS	0.003	1.68	3.30	44674
0.1	IF	-			
	ABS	0.003	1.74	3.42	39382

Tabla III.8: Valores de los parámetros de interés resultantes del análisis con **SEDFIT** de los perfiles experimentales obtenidos de las muestras estudiadas de rabfilina-3A.

Si con el valor del peso molecular obtenido por espectrometría de masas ($M = 36\,401 \text{ Da}$) y el valor medio de $s_{20,w}$ ($3.29 \pm 0.06 S$) se calcula f/f_0 a partir de la ecuación II.24, se obtiene un valor de 1.16. Este valor indica que la forma global de la proteína es casi esférica, es decir, esta proteína es poco elongada.

Por último se realizó un experimento de equilibrio de sedimentación mediante medidas de interferencia de las tres muestras estudiadas por velocidad (0.6, 0.3 y 0.1 mg/mL en HEPES 25 mM, NaCl 100 mM y EGTA 1 mM). Para estimar la velocidad y el tiempo de duración de dicho experimento se realizaron simulaciones con **SEDFIT** a distintas velocidades y distintos tiempos. Así, se estimó un valor para la velocidad de 15 000 rpm.

Conocida la velocidad, se inyectaron 180 μL de cada una de las muestras y del disolvente-tampón en las celdas correspondientes y se inició el experimento de equilibrio a 4°C. Se realizaron los *scans* suficientes a intervalos de 8 horas hasta que dos scans sucesivos fueran superponibles. En total se realizaron 20 *scans*.

Los datos procedentes de este tipo de experimento se analizaron con el software **SEDPHAT** utilizando el modelo de especies individuales no interactuantes. La Figura III.23 muestra un ejemplo de los análisis llevados a cabo. En ella se muestra el perfil experimental correspondiente al último *scan* junto con el perfil procedente del ajuste con **SEDPHAT** para la muestra de concentración 0.6 mg/mL.

Los análisis realizados con las muestras de concentración 0.3 mg/mL y 0.1 mg/mL dieron resultados anómalos para el peso molecular ($M \simeq 120\,000 \text{ Da}$ y $M \simeq 250\,000 \text{ Da}$, respectivamente), lo cual es esperable en el caso de la concentración de 0.1 mg/mL según lo visto en el experimento de velocidad de sedimentación. La anomalía del valor encontrado

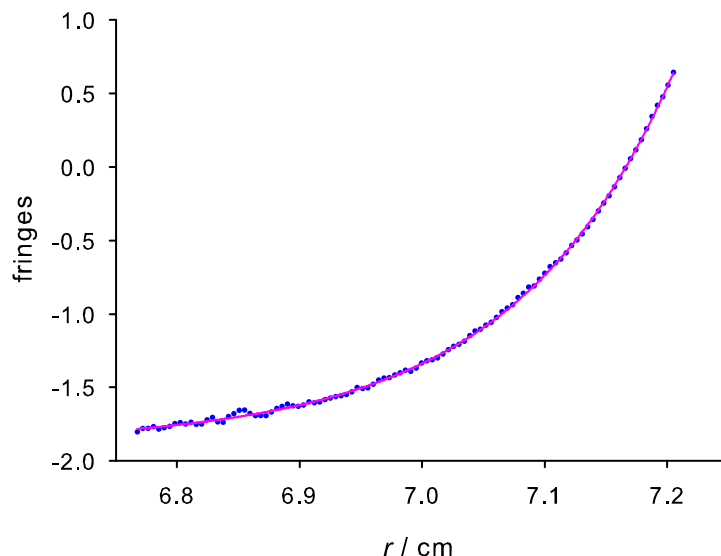


Figura III.23: Perfil de concentración experimental correspondiente al último *scan* (puntos azules) y ajustado mediante SEDPHAT (línea continua rosa) para el caso de la muestra de rabfilina-3A de 0.6 mg/mL, $\omega = 15\,000$ rpm y $T = 4^\circ\text{C}$.

en los experimentos correspondientes a las muestra de 0.3 mg/mL podría tener la misma causa. No obstante, en el caso de 0.6 mg/mL se obtiene un excelente ajuste a un sistema monodisperso con un valor del peso molecular $M = 44\,368$ Da que coincide en gran medida con el obtenido mediante los experimentos de velocidad.

III.4.3. Proteína TtCarH

Introducción

Este trabajo forma parte de una colaboración con el Área de Genética del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad de Murcia [22]. Se va a trabajar sobre una variedad de la proteína enzimática CarH que ha sido extraída de la bacteria *Thermus thermophilus* por primera vez y a la que se denominará TtCarH. Se pretendía demostrar, como ya se sugería en algunos trabajos [101, 102], que su actividad depende del ligando AdoB₁₂ y de la presencia de luz. La sensibilidad de la AUC para detectar oligómeros hace de ella una técnica ideal para este propósito.

La TtCarH es un regulador transcripcional del ADN que controla la síntesis de carotenoides. Para realizar esta función, estas proteínas fotoreceptoras usan la 5'-desoxiade-

nosilcobalamina (AdoB₁₂) como un cromóforo sensible a la luz visible. En la oscuridad, éste se une a la TtCarH fomentando la oligomerización, mejorando su unión con el ADN y bloqueando la transcripción. Por el contrario, la luz dificulta la oligomerización debido a la fotólisis del AdoB₁₂.

Por un lado, se realizó el estudio de las autoasociaciones de la proteína TtCarH en presencia y ausencia de AdoB₁₂, y en presencia y ausencia de luz. Por otro lado, se estudiaron las asociaciones de la proteína TtCarH con ADN, también en presencia y ausencia de luz y de AdoB₁₂. Para ello se llevaron a cabo experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación tanto en interferencia como en absorbancia. En el caso de interferencia, se utilizó luz en el rango del rojo (655 nm) donde el AdoB₁₂ no absorbe ni es fotosensible, mientras que en absorbancia se utilizaron longitudes de onda en el rango de UV a azul/verde para las que el AdoB₁₂ presenta absorbancia.

Método

Todas las muestras de la proteína TtCarH estaban disueltas en una disolución de NaCl 150 mM y fosfato de sodio 50 mM de pH=7.5. Los estudios de esta proteína se realizaron a 20°C, a excepción de casos concretos que se comentarán más adelante. Las concentraciones utilizadas en los experimentos se encontraban en el rango de 8 μ M hasta 160 μ M de proteína H₆TtCarH y 0.005, 0.1 y 0.2 μ M de ADN. La preparación de las disoluciones así como el llenado de celdas y posterior manipulación se realizaron en la oscuridad o en presencia de luz según el fin del experimento.

Con el software SEDNTERP se calcularon la densidad ($\rho = 1.0099$ g/mL) y la viscosidad ($\eta = 0.0103$ Poise) del tampón a 20°C. Del mismo modo se calculó el volumen específico parcial de TtCarH ($\bar{v} = 0.739$ mL/g) a partir de su secuencia de aminoácidos. Para el fragmento de ADN de 177 pares de bases se estima un valor de $\bar{v} = 0.55$ mL/g. La masa molecular de la proteína ($M = 330\,141$ Da) se determinó tanto a partir de la secuencia de aminoácidos, sin tener en cuenta el extremo N-terminal, como con espectrometría de masas. La masa del fragmento de ADN de 177 pares de bases ($M = 109\,414$ Da) fue calculada desde la secuencia de nucleótidos.

Como ya se adelantó, se realizaron medidas de absorbancia e interferencia. Las medidas de absorbancia se realizaron a tres longitudes de onda distintas: 260 nm, 280 nm y 522 nm, a excepción de los casos que se comentarán posteriormente. Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 45 000 rpm usando 400 μ L tanto de las mues-

tras como de la referencia. Para cada muestra, se realizaron 300 *scans* sin intervalo de tiempo entre *scans* sucesivos. Los datos resultantes de los experimentos fueron analizados con **SEDFIT** utilizando el modelo de distribución continua $c(s)$. Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron a tres velocidades distintas comenzando por la menor y terminando por la mayor. Para cada velocidad se realizaron los *scans* suficientes a intervalos de 6 horas hasta que dos *scans* sucesivos fueran superponibles. En este caso se utilizó menos cantidad de muestra que en el caso de los experimentos de velocidad de sedimentación, 180 μL . Los datos procedentes de este tipo de experimento se analizan con el software **SEDPHAT**. Se utilizó bien el modelo de especies individuales no interactuantes o el modelo de especies individuales, según el caso, para obtener el peso molecular.

El programa **HYDROSUB** [59] (mencionado en el Capítulo II) fue empleado para el cálculo de las propiedades hidrodinámicas de los complejos TtCarH-ADN, y el programa **WORMCYL** [103] se utilizó para la simulación de propiedades hidrodinámicas de un fragmento corto de ADN a partir de los modelos cilíndrico y vermiforme.

Resultados

En presencia de luz, TtCarH muestra la misma conformación y estado de oligomerización (monómeros) tanto en ausencia como en presencia de AdoB₁₂

Con objeto de estudiar el comportamiento de TtCarH en las condiciones en las que se ha supuesto que era inactiva (presencia de luz), se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación mediante medidas de absorbancia e interferencia tanto en ausencia de AdoB₁₂ (apo-TtCarH) como en presencia de AdoB₁₂.

Se prepararon disoluciones de TtCarH de tres concentraciones distintas (30 μM , 15 μM y 8 μM) y se realizaron medidas de velocidad de sedimentación a 20°C, 45 000 rpm y a una longitud de onda de 280 nm. Al realizar el análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se observa (ver Figura III.24A), para las tres concentraciones, un único pico que se corresponde con un valor para el coeficiente de sedimentación $s_{20,w} = 2.59 \pm 0.04 \text{ S}$. Además la calidad del ajuste es buena, como puede observarse en la Figura III.24B. Por otro lado, el peso molecular obtenido mediante la solución de la ecuación de Lamm incluida en el modelo $c(s)$ de **SEDFIT** fue $32.1 \pm 0.8 \text{ kDa}$, valor que coincide con el calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de un monómero de TtCarH ($M = 33.14 \text{ kDa}$). Utilizando los valores de M y $s_{20,w}$ en las ecuaciones II.58 y II.57, y tomando un valor típico para la hidratación $\delta = 0.3 \text{ g/g}$, el valor obtenido de la función de Perrin es $P = 1.1$, lo que

lleva a concluir que los monómeros tienen una forma ligeramente alargada. Estos valores aparecen recogidos al final de esta sección en la Tabla III.9.

Como los complejos AdoB₁₂-TtCarH son los que interesan, se añadió AdoB₁₂ a la muestra y se purificó el complejo obtenido. Luego, se expuso la muestra durante 5 minutos a la luz blanca y se midió en las mismas condiciones que la forma apo-TtCarH. Se prepararon 3 concentraciones, 160 μ M, 40 μ M y 15 μ M, en el mismo tampón y a la misma temperatura que la muestra anterior (20 °C). La velocidad del rotor también es la misma ($\omega = 45\,000$ rpm). De igual modo, tanto para los experimentos de absorbancia como para los de interferencia se observa en la distribución $c(s)$ un único pico a $s_{20,w} = 2.64$ S con un buen ajuste de los perfiles de concentración (ver Figura III.24 B y Tabla III.9). De nuevo, se obtiene un valor para el peso molecular aproximado de 31.5 ± 0.8 kDa, lo que es indicativo de que la única especie presente a esa concentración y en esas condiciones es el monómero. La función de Perrin obtenida en este caso es $P = 1.15$, lo que corresponde también a una estructura alargada.

Para confirmar los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de sedimentación de la proteína TtCarH suponiendo que la molécula de dicho compuesto fuera esférica, lo que proporciona una cota superior al valor de dicho coeficiente para un peso molecular dado. Si se considera una hidratación δ de 0.3 g(agua)/g(proteína), el coeficiente de sedimentación sería 3.1 S, que es mucho mayor que el obtenido experimentalmente, lo que indica nuevamente que la molécula de TtCarH se encuentra en la disolución de manera alargada y en estado monomérico.

La conclusión general que se puede extraer de los experimentos de velocidad de sedimentación realizados con apo-TtCarH y AdoB₁₂-TtCarH, es que ambas especies son, en gran parte, idénticas, con un peso molecular similar, lo que indica que cualquier contribución del ligando es pequeña.

Como ya se ha comentado, la longitud de onda elegida para la realización de los experimentos fue 280 nm. Sin embargo, TtCarH es fotosensible a 360, 438 y 540 nm, observándose que interrumpe la oligomerización después de ser irradiada con luz de esas longitudes de onda. Con motivo de eliminar cualquier posible efecto en la enzima por su exposición a la luz de 280 nm empleada en el sistema de detección, y determinar si la intensidad del láser empleado en el sistema de la ultracentrífuga analítica es demasiado alta para la muestra, se repitieron los experimentos realizando la detección mediante interferencia, donde la exposición a la luz es mucho menos prolongada, y la longitud de onda utilizada es 655 nm (CarH no absorbe a esa longitud, como se muestra en [101]).

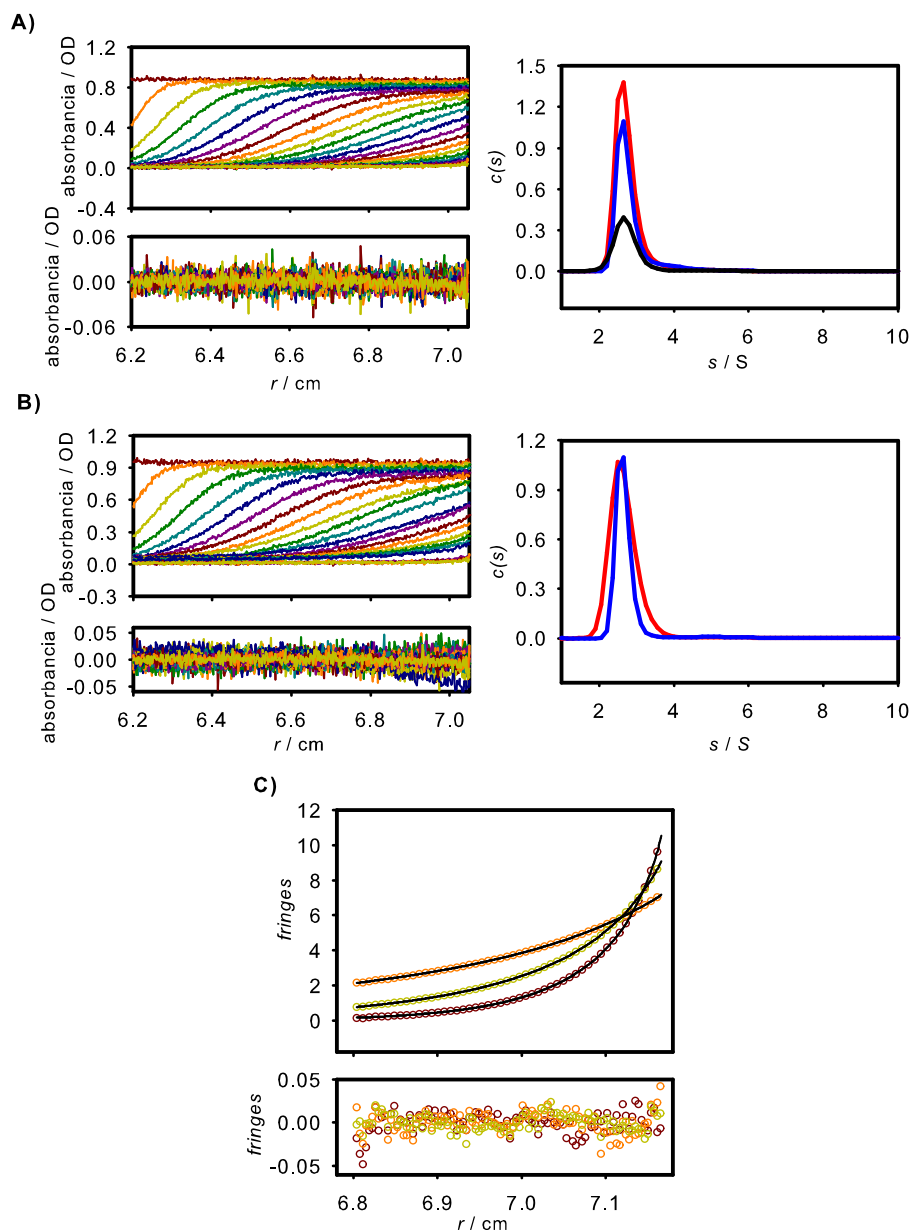


Figura III.24: A) y B) Experimentos de velocidad de sedimentación ($\omega = 45\,000$ rpm y $T = 20^\circ\text{C}$) en modo absorbancia ($\lambda = 280$ nm) con la proteína TtCarH: A) en ausencia de AdoB₁₂ (apo-TtCarH) y B) en presencia de AdoB₁₂ (AdoB₁₂-TtCarH) tras haber sido expuesta a luz blanca. A la izquierda se muestran los perfiles de concentración para: A) $30\,\mu\text{M}$ y B) $40\,\mu\text{M}$. Debajo de dichas figuras se muestran los residuales. A la derecha se muestran las distribuciones $c(s)$ correspondientes a las muestras de concentración: A) $30\,\mu\text{M}$ (rojo), $15\,\mu\text{M}$ (azul) y $8\,\mu\text{M}$ (negro), y B) $40\,\mu\text{M}$ (rojo) y $10\,\mu\text{M}$ (azul). C) Experimentos de equilibrio de sedimentación en modo interferencia (655 nm) con $22\,\mu\text{M}$ de apo-TtCarH a 20°C y a tres velocidades: 10 000 rpm (círculos naranjas), 15 000 rpm (círculos verdes) y 20 000 rpm (círculos morados). Las líneas continuas se corresponden con el mejor ajuste obtenido con SEDPHAT (modelo de especies discretas para dos especies). Los residuales se muestran en la parte de abajo.

Las distribuciones del coeficiente de sedimentación reproducen exactamente las obtenidas mediante los experimentos de absorbancia en todos los casos, con lo que se concluye que el tamaño y la forma de la partícula no se ven afectadas por la radiación de 280 nm utilizada para las medidas de absorbancia, siendo ambos métodos adecuados para la realización de estudios de ultracentrifugación analítica de apo-TtCarH y AdoB₁₂-TtCarH en presencia de luz. Esto, como se verá posteriormente, es más evidente en el caso del tetrámero, al ser esta forma oligomérica sensible a la radiación de la luz azul.

Además de los experimentos de velocidad de sedimentación, se realizaron experimentos de equilibrio con el objetivo de determinar de una manera más exacta el peso molecular flotante de TtCarH en esas condiciones.

Se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación a varias velocidades, donde se analizan tanto la forma apo-TtCarH a concentraciones diferentes (30 μ M y 22 μ M) como los complejos formados entre TtCarH y AdoB₁₂ después de la exposición a la luz blanca a dos concentraciones distintas (50 μ M y 38 μ M). Los valores para el peso molecular fueron calculados con SEDPHAT directamente del ajuste global de los tres perfiles de concentración en equilibrio a las tres velocidades. La media de dichos valores fue, 32.6 ± 0.3 kDa y 30 ± 3 kDa para apo-TtCarH y TtCarH con AdoB₁₂ y luz, respectivamente (ver Tabla III.9). Estos resultados muestran un excelente acuerdo con los valores estimados mediante experimentos de velocidad así como con los calculados a partir de la secuencia para una especie monomérica. En la Figura III.24C se muestra un experimento de equilibrio de sedimentación, realizado a varias velocidades, de la muestra de la forma apo-TtCarH de concentración 22 μ M.

TtCarH es un tetrámero en presencia de AdoB₁₂ solo cuando no está expuesto a la luz azul

Una vez realizado el estudio de la proteína TtCarH en ausencia de AdoB₁₂ y con AdoB₁₂ en presencia de la luz, se estudió el comportamiento de la misma en condiciones de oscuridad mediante experimentos de ultracentrifugación analítica, con el fin de evaluar si es estable como monómero o forma estados de alto nivel de oligomerización.

Los estudios de velocidad de sedimentación tanto de interferencia como de absorbancia fueron realizados con un cuidado extremo para que las muestras no tuviesen exposición alguna a la luz. Debido a ello todo el proceso de manipulación de las mismas, de carga de las celdas y de la alineación de éstas con el rotor, se realizó con una lámpara de luz

roja ($\lambda > 650$ nm) de baja intensidad, evitando así la exposición a la luz que podría causar la fotólisis de AdoB₁₂ y que consecuentemente afectaría a la oligomerización de AdoB₁₂-TtCarH.

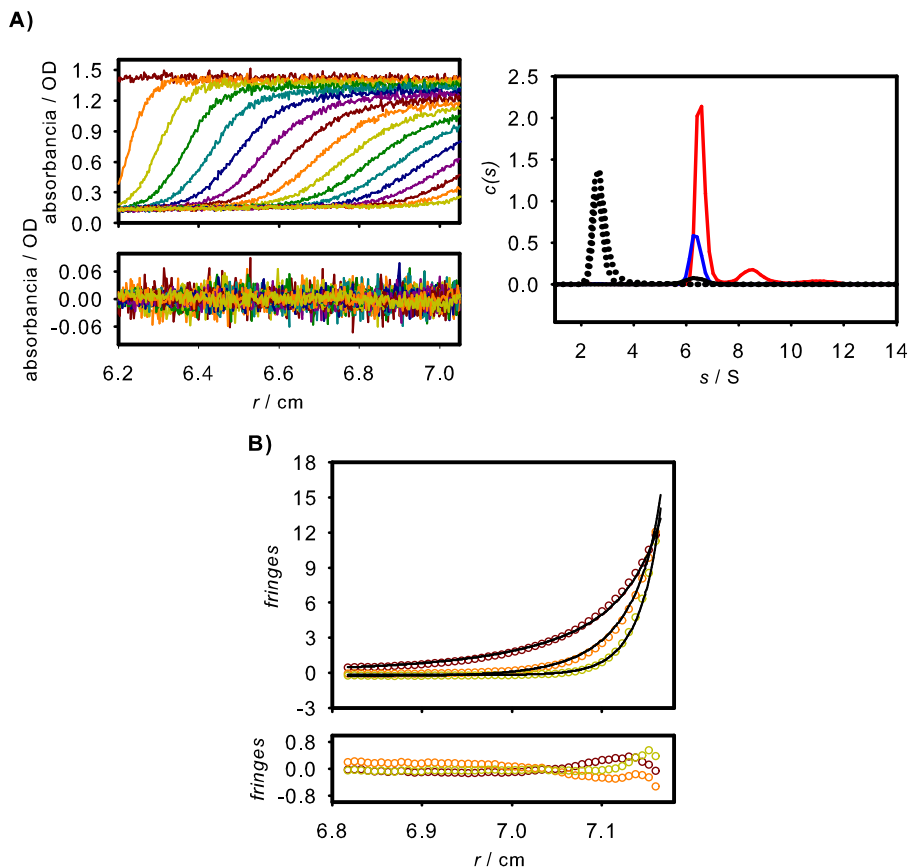


Figura III.25: A) Experimentos de velocidad de sedimentación ($\omega = 45\,000$ rpm y $T = 20^\circ\text{C}$) en modo absorbancia ($\lambda = 522$ nm) con AdoB₁₂-TtCarH en condiciones de oscuridad. En la parte izquierda se muestran los perfiles de concentración para una muestra de $40\,\mu\text{M}$. Debajo de dichas figuras se muestran los residuales. A la derecha se muestran las distribuciones $c(s)$ correspondientes a las muestras de concentración $160\,\mu\text{M}$ (rojo), $40\,\mu\text{M}$ (azul) y $10\,\mu\text{M}$ (negro). Las líneas de puntos se corresponden con la distribución mostrada en la Figura III.24 para la forma apo-TtCarH ($30\,\mu\text{M}$) y AdoB₁₂-TtCarH tras exposición a la luz ($40\,\mu\text{M}$). B) Experimentos de equilibrio de sedimentación de la muestra de $50\,\mu\text{M}$ de TtCarH en presencia de AdoB₁₂ en condiciones de oscuridad a tres velocidades: $10\,000$ rpm (círculos morados), $15\,000$ rpm (círculos naranjas) y $20\,000$ rpm (círculos verdes). Las líneas continuas se corresponden con el mejor ajuste obtenido con SEDPHAT (modelo de especies discretas para dos especies). Los residuales se muestran en la parte de abajo.

El proceso de sedimentación de las partículas se siguió mediante medidas de absorbancia a tres longitudes de onda. A 260 nm para comparar los resultados obtenidos con los de la siguiente sección; a 280 nm a la que absorben proteína y ligando, y a 522 nm, longitud de onda a la que únicamente absorbe el ligando AdoB₁₂. Al igual que en los estudios anteriores, para confirmar que esas longitudes de onda no afectan al proceso se repiten los experimentos con interferencia y se observan las diferencias en los resultados para el número de especies o la distribución de pesos moleculares.

Las concentraciones de AdoB₁₂-TtCarH utilizadas para los experimentos de velocidad de sedimentación fueron 160 μ M, 40 μ M y 10 μ M. Estos experimentos fueron analizados con el software **SEDFIT** utilizando la distribución $c(s)$. En las funciones de distribución $c(s)$ que se muestran en la Figura III.25A se observa un pico en torno a 6.2–6.4 S para las tres concentraciones, por lo que no aparece una dependencia con la concentración. Para la mayor concentración utilizada (160 μ M) aparecen otros picos a mayores coeficientes de sedimentación que probablemente se deban a agregados pero que están en muy poca proporción.

Hay que destacar que los resultados que se obtienen para las medidas de absorbancia a 522 nm (Figura III.25A) son similares a los obtenidos para 260 nm y 280 nm. Solo AdoB₁₂ absorbe en esta región. La intensidad de la señal depende de la concentración y también del coeficiente de absorción a esa longitud de onda, pero la posición del pico no cambia con respecto a las de 260 y 280 nm. Esto indica que las especies que se observan son las mismas a 522 nm, por tanto la complejación entre AdoB₁₂ y TtCarH es total y la única especie disponible a esa concentración sedimenta conjuntamente con AdoB₁₂ como un tetramero de TtCarH ($s_{20,w} = 6.2$ S).

Utilizando un valor medio de 6.25 S para $s_{20,w}$ y un peso molecular de 138 kDa, cuatro veces el peso molecular del monómero ($M = 35.4$ kDa), se realiza el análisis de la función de Perrin como en los casos anteriores, obteniéndose $P = 1.6$. La anisotropía de la forma tetramérica es, por tanto, semejante a la de las formas monoméricas (apo-TtCarH y AdoB₁₂-TtCarH con luz). Esto permite suponer que el tetramero no debe ser mucho más elongado que el propio monómero. Del conocimiento previo de la hidrodinámica de oligómeros compuestos por subunidades esférico-elipsoidales [104–107], se sospecha que una disposición en la que estas subunidades se agrupen lateralmente entre sí sería más probable que una disposición lineal de las mismas.

Esto demuestra que el pico principal observado en la distribución de los coeficientes de sedimentación se corresponde, con un alto grado de precisión, con una especie tetramérica,

y que esta especie es estable en el rango de concentraciones estudiado, desde $10\text{ }\mu\text{M}$ a $60\text{ }\mu\text{M}$, dando esto una idea de la fuerte estabilidad del tetrámero cuando TtCarH está en presencia de AdoB₁₂. La especie tetramérica adopta una forma más esférica y compacta que la monomérica, lo que se comprueba por el buen acuerdo entre el modelo esférico y el coeficiente de sedimentación observado.

Con objeto de definir las especies tetraméricas y confirmar los resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación, se realizaron experimentos de equilibrio de sedimentación de cinco muestras de $125\text{ }\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$, $40\text{ }\mu\text{M}$, $20\text{ }\mu\text{M}$ y $10\text{ }\mu\text{M}$ de TtCarH a múltiples velocidades ($10\,000$, $15\,000$ y $20\,000\text{ rpm}$) en condiciones de oscuridad y a 20°C . Después de 6 días, los equilibrios se analizaron con el modelo de una y dos especies discretas de SEDPHAT encontrando una única especie de $122 \pm 11\text{ kDa}$ (ver Figura III.25B y Tabla III.9).

Los análisis de los datos de experimentos de equilibrio de sedimentación obtenidos mediante el modo de absorbancia a 280 nm o 522 nm y para concentraciones de proteína de $40\text{ }\mu\text{M}$ y $10\text{ }\mu\text{M}$ indican la existencia de una sola especie con un peso molecular de $121 \pm 14\text{ kDa}$ similar al obtenido por interferencia a 655 nm . Esto sugiere que el modo de absorbancia es adecuado para realizar estudios de ultracentrifugación analítica en la oscuridad de la especie sensible a la luz AdoB₁₂-TtCarH. Este peso molecular estimado desde experimentos de equilibrio de sedimentación para AdoB₁₂-TtCarH en la oscuridad es algo menor que el calculado para un tetrámero así como al estimado mediante experimentos de velocidad. Una posible razón de la disminución del peso molecular de la proteína puede ser la tendencia de la proteína a degradarse parcialmente. Este hecho ocurre ocasionalmente durante los experimentos de equilibrio debido a su larga duración.

La unión de TtCarH a un fragmento de ADN en la oscuridad tiene lugar en su estado tetramérico

Por último, se realizó el estudio mediante ultracentrifugación analítica, en presencia y ausencia de luz, del comportamiento en disolución de AdoB₁₂-TtCarH cuando está presente un fragmento de ADN (que contiene la secuencia del operador TtCarH). Se decidió realizar experimentos de velocidad de sedimentación en las mismas condiciones que los realizados anteriormente: $45\,000\text{ rpm}$, 20°C y medidos en modo absorbancia a 258 nm y 280 nm (no se realizó a 522 nm porque el ADN no absorbe a dicha longitud de onda). Los casos estudiados fueron los siguientes: a) fragmento de ADN, b) ADN en

presencia de $10\text{ }\mu\text{M}$ de AdoB₁₂-TtCarH tanto en la oscuridad como expuesto a la luz, y c) ADN en presencia de apo-TtCarH. En todos los casos se utilizaron dos concentraciones de ADN, $0.1\text{ }\mu\text{M}$ y $0.2\text{ }\mu\text{M}$.

Tras realizar el análisis con el modelo de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT de los datos procedentes de los experimentos de velocidad de sedimentación de las dos muestras de ADN (caso “a”) a las dos longitudes de onda utilizadas, se observó un único pico estrecho (ver Figura III.26A), lo que indica la existencia de una única especie. Dicho pico se corresponde con un valor de $s_{20,w} = 5.2 \pm 0.1\text{ S}$.

Para comprobar si el coeficiente de sedimentación del fragmento de ADN obtenido a partir de nuestros experimentos coincide con el predicho mediante modelado computacional, se utilizaron dos modelos hidrodinámicos alternativos, el cilíndrico y el de cadena vermiforme, junto con los programas desarrollados por el Grupo de Investigación HYDROSUB y WORMCYL. El ADN utilizado en el experimento realizado contiene 177 pares de bases y puede ser caracterizado por los siguientes parámetros del modelo vermiforme: longitud de contorno $L = 60\text{ nm}$ y longitud de persistencia $a = 55\text{ nm}$. Como puede comprobarse, la relación entre dichos valores es próxima a la unidad, por lo que el ADN se comporta como una varilla muy larga pero todavía rígida que puede modelarse como un cilindro [108]. Además, para cualquier ADN doble-helicoidal, la masa por unidad de longitud es $M_L = 1\,950\text{ Da/nm}$ y el diámetro hidrodinámico es $d = 23\text{ nm}$ [108]. Con los valores de d , L , a , M_L y la teoría de cilindros [109] se obtiene un coeficiente de sedimentación de 5.3 S , lo que confirma que el pico observado en los resultados de nuestros experimentos se corresponde con el fragmento de 177 pares de bases de ADN. Asimismo, el peso molecular estimado a partir de nuestros experimentos de velocidad de sedimentación, 112 kDa , muestra un buen acuerdo con el valor obtenido para el fragmento de 177 pares de base de ADN, que es aproximadamente 109 kDa .

Tal y como puede observarse en las Figuras III.26B y III.26C, los resultados obtenidos después del análisis de los perfiles de concentración procedentes de los experimentos de las muestras de ADN con AdoB₁₂-TtCarH (caso “b”) son más complejos. En todos ellos pueden observarse dos picos con $s_{20,w} = 6.11\text{ S}$ y $s_{20,w} = 7.90\text{ S}$. Además, existe la evidencia de una tercera especie con coeficiente de sedimentación de $s_{20,w} = 11.0\text{ S}$.

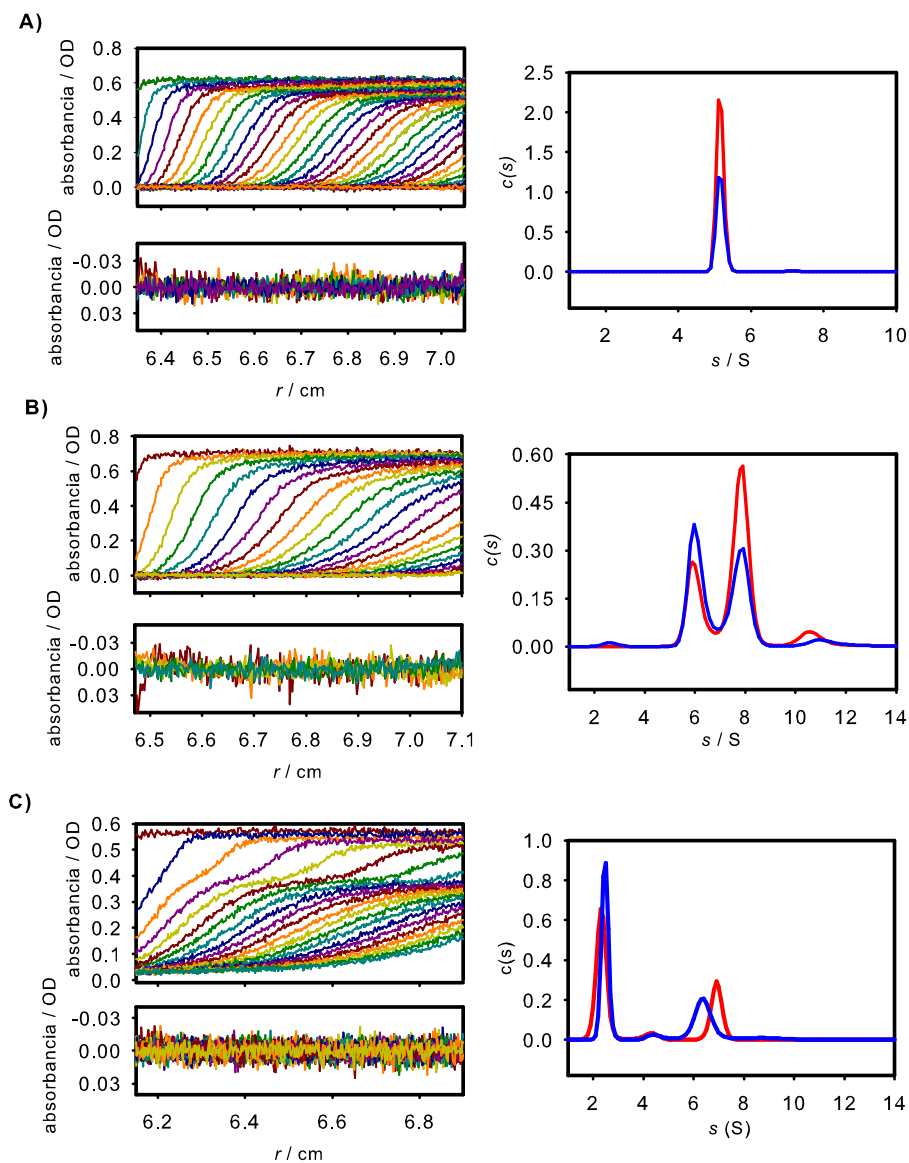


Figura III.26: Experimentos de velocidad de sedimentación ($\omega = 45\,000$ rpm, $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 260$ nm) de: A) fragmento de ADN de 177 pares de bases en presencia del operador TtCarH, B) muestra de AdoB₁₂-TtCarH y del fragmento de ADN de 177 pares de bases, y C) misma muestra que en B) en condiciones de oscuridad. A la izquierda se muestran los perfiles de concentración para: el caso A) de 0.1 μM de ADN; los casos B) y C) de 10 μM de proteína y 0.1 μM de ADN. Debajo de dichas figuras se muestran los residuales. A la derecha se muestran las distribuciones $c(s)$ correspondientes a: el caso A) para muestras de concentración 0.1 μM (azul) y 0.2 μM (rojo); los casos B) y C) para muestras medidas a 260 nm (línea roja) y 280 nm (línea azul).

Debido a la falta de resultados concluyentes, se realizó un cálculo con HYDROSUB para estimar el coeficiente de sedimentación de las especies presentes. Para realizar dicho cálculo se consideró AdoB₁₂-TtCarH en su estado tetramérico modelado como una esfera de radio equivalente 37.7 Å (estimado a partir del peso molecular del tetramero añadiendo un grado de hidratación $\delta = 0.3$ g/g) unido a una molécula de ADN cilíndrica de 600×22 Å. La Figura III.27 muestra una imagen del modelo que se acaba de describir, el cual fue generado y utilizado por HYDROSUB para realizar el cálculo del coeficiente de sedimentación del complejo de ADN con AdoB₁₂-TtCarH en las mismas condiciones en las que se realizó el experimento de ultracentrifugación analítica resultando $s_{20,w} = 8.00$ S. Este resultado permite deducir que la segunda especie observada en nuestros experimentos ($s_{20,w} = 7.90$ S) se corresponde con el complejo formado entre el tetramero de AdoB₁₂-TtCarH y el fragmento de ADN de 177 pares de bases. De la misma manera se concluye que el valor de $s_{20,w} = 6.11$ S se correspondería con el exceso de proteína añadido mientras que el valor de $s_{20,w} = 11.4$ S puede ser asignado a distintas especies remanentes. Probablemente hay una especie de mayor estado de oligomerización de AdoB₁₂-TtCarH que está unida al ADN.

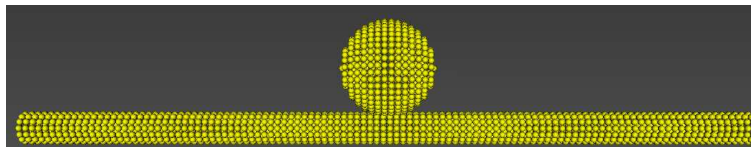


Figura III.27: Imagen del modelado del complejo de ADN con AdoB₁₂-TtCarH necesario para realizar el cálculo del coeficiente de sedimentación del mismo con el software HYDROSUB. El cilindro representa el segmento de ADN y la esfera a la proteína AdoB₁₂-TtCarH en su estado tetramérico.

Los análisis de los experimentos de velocidad de sedimentación de las muestras que contienen 0.1 μ M de ADN y 10 μ M de AdoB₁₂-TtCarH expuesto a la luz (Figura III.26C) revelan la existencia de una especie con $s_{20,w} = 2.47$ S que podría ser la proteína libre sin unirse a ADN, ya que es un valor próximo al obtenido para AdoB₁₂-TtCarH (Figura III.26B y Tabla III.9). También puede detectarse una significativa población de especies con $s_{20,w} = 6.43$ S, y otra con $s_{20,w} = 4.7$ S. Ninguno de esos picos aparece en las muestras de ADN solo ($s_{20,w} \approx 5.2$ S) o en la proteína sola expuesta a la luz (Figura III.26C). La aparición únicamente en la muestra que contiene ADN junto con el exceso de proteína sometida a la luz sugiere que estas especies puedan ser complejos de ADN-proteína de menores tamaños que el tetramero formado en la oscuridad. La especie de 6.4 S puede corresponderse con un complejo de ADN con dos monómeros de proteína. El cálculo

CAPÍTULO III. EXPERIMENTOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

con HYDROSUB, donde se modelan los dos monómeros de proteína como esferas de radio 24.2 Å ligados a un cilindro de ADN, muestra un coeficiente de sedimentación de 6.49 S.

Muestra	V			E	
	c / μM	$s_{20,w}$ / S	IF	c / μM	M / kDa
apo-TtCarH	30	2.60	2.59	30	32.6 $\pm$ 0.3
	15	2.57	2.58	22	
	8	2.58	2.62		
	0	$s_{20,w}=2.59$ P = 1.11	p $\approx$ 3.0		
AdoB ₁₂ -TtCarH (luz)	160	2.56 $\pm$ 0.14	-	50	30 $\pm$ 3
	40	2.63 $\pm$ 0.13	2.76	38	
	10	2.61 $\pm$ 0.12	2.68		
	0	$s_{20,w}=2.64$ P = 1.15	p $\approx$ 3.5		
AdoB ₁₂ -TtCarH (oscuridad)	160*	6.39	6.24	50 ^c , 40 ^c	122 $\pm$ 11 ^c
	40*	6.34	6.21	20 ^c , 10 ^c	
	10	6.31		125 ^d	121 $\pm$ 14 ^c
	0	$s_{20,w}=6.25$ P = 1.16	p $\approx$ 3.7	38 ^d	
ADN	0.1	5.19	-		122 $\pm$ 6
	0.2	5.16	-		
		Modelo cilíndrico, predicción: $s_{20,w}=5.3$			
apo-TtCarH + ADN	10 ^a	2.31	2.29		
	0.05 ^b	4.40	4.50		
		6.87	6.83		
		Ver texto			
AdoB ₁₂ -TtCarH + ADN (luz)	10 ^a	2.47	2.46		
	0.1 ^b	4.67	4.80		
		6.43	6.49		
		Ver texto			
AdoB ₁₂ -TtCarH + ADN (oscuridad)	10 ^a	6.11 ^f			
	0.1 ^b	7.90 ^g			
		11			
		HYDROSUB			
		$s_{20,w}=8.0$			

Tabla III.9: Resumen de los resultados obtenidos en los análisis de los experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación para la proteína TtCarH. V: experimentos de velocidad de sedimentación. E: experimentos de equilibrio de sedimentación. *10 % de especies con $s_{20,w}$ (promedio) = 9.4. ^a TtCarH; ^b ADN; ^c Interferencia; ^d Absorbancia; ^f Asignado a AdoB₁₂-TtCarH; ^g Asignado a AdoB₁₂-TtCarH + complejo de ADN.

Los experimentos de velocidad de sedimentación de las disoluciones que contienen $0.1\ \mu\text{M}$ de ADN y $10\ \mu\text{M}$ apo-TtCarH (caso “c”) dan resultados similares. Una especie mayoritaria que se puede asignar a la proteína libre ($s_{20,w} = 2.31\ \text{S}$), y una segunda población significativa con $s_{20,w} = 6.87\ \text{S}$ que puede ser un complejo de ADN con dos monómeros de apo-TtCarH. Además, aparecen en menor cantidad especies indeterminadas con $s_{20,w}$ en torno $4.4\ \text{S}$.

En resumen, los experimentos de ultracentrifugación analítica sugieren que tanto apo-TtCarH y el complejo AdoB₁₂-TtCarH en presencia de luz pueden unirse con el ADN, pero el complejo que se forma es significativamente más pequeño que el complejo que se forma en la oscuridad entre el tetrámero de AdoB₁₂-TtCarH y el ADN.

Como conclusión, se muestra a modo de resumen la Tabla III.9, en la que quedan recogidos los valores de los coeficientes de sedimentación y los pesos moleculares procedentes de los experimentos de velocidad y de equilibrio de sedimentación realizados para la proteína TtCarH.

Capítulo IV

Predicción de experimentos de sedimentación. I. Sistemas homogéneos

En este capítulo y en el siguiente se describirán procedimientos para predecir teóricamente el resultado de un experimento de sedimentación. En éste, los principios y métodos básicos se describen para el caso de un sistema homogéneo con un solo tipo de soluto. Así, las concentraciones másica y molar son proporcionales entre sí, y a su vez ambas son proporcionales a cualesquiera formas de expresar la señal óptica. Las relaciones de proporcionalidad involucran los valores de M y/o q , que son fijos para el único soluto. La relación señal-concentración (ecuación II.13) es trivialmente una proporcionalidad $z(r, t) = [q/M^\alpha] c(r, t)$ donde el factor $[q/M^\alpha]$ viene dado por las características del soluto y el tipo de detección; por ejemplo, $z(r, t) = l\epsilon c(r, t)$ en absorbancia (ecuación II.2), o $z(r, t) = (l/\lambda) (dn/dc) c(r, t)$ en interferencia (ecuación II.4). Por tanto, se hace referencia genéricamente a una concentración $c(r, t)$ que represente a cualquiera de las concentraciones, másica o molar, o de las señales.

El planteamiento básico en la explicación de los experimentos de centrifugación analítica estriba, como ya se ha descrito en el Capítulo II, en el balance entre un transporte determinista asociado a la centrifugación y un transporte asociado a la difusión browniana que, necesariamente, ha de ocurrir de manera simultánea. El primero de ellos tiene un tratamiento relativamente trivial, el de la velocidad de sedimentación. En cuanto al proceso difusivo, de manera clásica – y que se sepa, hasta el presente trabajo – se ha caracterizado

mediante las leyes de Fick que están asociadas al gradiente macroscópico de concentración que la sedimentación provoca. La conjunción de estos dos enfoques da lugar a la ecuación de Lamm (ecuación II.53), descrita en el Capítulo II, en cuya solución (que no tiene solución analítica explícita, y cuya solución numérica es extremadamente problemática) se han basado hasta ahora todos los métodos de tratamiento de datos de ultracentrifugación analítica.

En el presente trabajo se va a introducir una novedad conceptual, que modifica totalmente la metodología. Consiste en tratar la difusión como un proceso microscópico regido por las leyes del movimiento browniano. El conjunto del fenómeno de sedimentación es tratado con este enfoque: las moléculas de soluto son partículas que se mueven bajo el efecto simultáneo de (a) una fuerza centrífuga, determinista, y (b) un movimiento aleatorio, browniano, independiente del anterior y superponible con él.

Con el objeto de evaluar los resultados para los perfiles de concentración $c(r, t)$ obtenidos por nuestros nuevos procedimientos de dinámica browniana, que se expondrán a continuación, se va a usar como referencia los que se obtienen de una solución numérica rigurosa de la ecuación de Lamm. Como ya se indicó, a efectos de comparación y validación, son muchos los protocolos que se han propuesto para esta solución [46], pero el que nos parece más apropiado es el que, con base en una idea original de Claverie [32] ha sido implementado por Schuck y colaboradores en el amplio paquete de *software* SEDFIT [27, 110], presentado en la última sección del Capítulo II. Para algunos propósitos en los que interese un cálculo rápido, se podrá utilizar también la ecuación de Faxén (ecuación II.56), recordando lógicamente cuáles son sus diversas limitaciones.

IV.1. Simulación de dinámica browniana

En nuestra concepción del método de simulación de dinámica browniana para predecir la evolución de un sistema de partículas al ser centrifugado, se considera el sistema como un gran número de partículas que, inicialmente ($t = 0$), están distribuidas en la celda de una forma determinada (lo más habitual es que estén distribuidas uniformemente, salvo en experimentos especiales).

Las partículas se moverán bajo la influencia de la fuerza centrífuga y del movimiento browniano. Como se están considerando partículas no interactuantes, la trayectoria de una partícula es independiente de las demás, siendo función del coeficiente de difusión, D ,

y de la fuerza, F , que actúa sobre la misma. Se trata de encontrar un algoritmo que genere la trayectoria de cada una de estas partículas, evaluando su posición en cada momento. Así se podrá determinar, en cada momento, como están las partículas distribuidas en la célula y calcular los perfiles de concentración $c(r, t)$ y de la señal registrada, $z(r, t)$.

IV.1.1. Dinámica browniana: version lineal-monodimensional

Se considera el movimiento de las partículas a lo largo de una coordenada, x , que después se identificará con la dirección radial. Se puede empezar a afrontar el presente problema con un procedimiento basado en un algoritmo simple en el cual la duración de un paso es bastante pequeña, dt . Es habitual en dinámica browniana que el paso sea suficientemente pequeño para que las condiciones en las que se encuentra la partícula en ese paso discreto – que en este problema se concretan en la fuerza centrífuga que experimenta – no cambien mucho, pues en la centrifugación dicha fuerza varía con la posición, $F = \omega^2 m_b r$. Entonces, la dinámica de una partícula individual (que no interactúa con las demás) puede simularse mediante el algoritmo:

$$x(t + dt) = x(t) + dx_{sed} + dx_{brow} \quad (IV.1)$$

donde $x(t + dt)$ es la posición después de un paso browniano de duración dt , a partir de una posición inicial $x(t)$, y donde el desplazamiento sedimentante viene dado por el término

$$dx_{sed} = s\omega^2 x dt \quad (IV.2)$$

donde $s\omega^2 x$ es la velocidad en el instante inicial del paso. El segundo sumando es un desplazamiento aleatorio browniano monodimensional, que según la ley de Einstein en una dimensión será un número aleatorio con distribución gaussiana de media cero y varianza

$$\langle (dx_{brow})^2 \rangle = 2Ddt \quad (IV.3)$$

Aunque se han tenido en cuenta, los efectos terminales en los límites de la celda (menisco y fondo) no tienen demasiada importancia. Para el problemático movimiento browniano cerca de los límites y de las paredes, se adopta un criterio *ad hoc*. En cuanto al menisco, si para una partícula resultase $x < r_m$ (“se ha salido de la disolución”), se tomará $x = r_m$. Nótese que esto ocurrirá raras veces, sólo al principio de la sedimentación

y con las partículas que se encontrasen muy próximas al menisco (solo afectará a $t \simeq 0$ y $x \simeq r_m$). En cuanto al fondo de la celda, se asume que las partículas rebotan en el fondo de la misma. Cuando para una partícula se hace $x > r_b$, se la introduce hacia dentro tanto como se ha salido, tomando en lugar de esa x el valor $x - 2(x - r_b)$ o, lo que es lo mismo, $2r_b - x$. Se anticipa aquí que, en los procesos de análisis de perfiles de sedimentación experimentales, los tiempos iniciales y los valores de x (posteriormente denotados como r) próximos a los límites suelen ser descartados.

Es habitual en simulaciones de dinámica (molecular, browniana, etc) usar pasos dt cortos para evitar efectos asociados con la discretización del tiempo, y por si hubiera alguna magnitud que, durante un paso largo, variase apreciablemente. Sin embargo, esto no ocurre – por lo menos en este primer planteamiento – con nuestro problema. La ecuación diferencial estocástica IV.1 contiene la adición de dos términos bien diferenciados, que se pueden integrar por separado, de acuerdo con su naturaleza, por lo cual será posible utilizar una duración del paso más grande, Δt , y escribir el desplazamiento a lo largo de ese paso de larga duración como la suma de dos términos:

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \Delta x_{sed} + \Delta x_{brow} \quad (\text{IV.4})$$

En cuanto al desplazamiento debido a sedimentación (determinista, no estocástico), se integra fácilmente para un intervalo de tiempo entre t y $t + \Delta t$ resultando

$$\Delta x_{sed} = x(t) \left[1 - \exp(s\omega^2 \Delta t) \right] \quad (\text{IV.5})$$

Por otro lado, gracias a la naturaleza fractal del movimiento browniano, los pasos brownianos siguen la misma ley a lo largo del tiempo independientemente de cuan larga sea su duración, de manera que la ecuación IV.3 sigue siendo aplicable en un intervalo largo. Por tanto, Δx_{brow} será un número aleatorio con media cero y varianza:

$$\langle (\Delta x_{brow})^2 \rangle = 2D\Delta t \quad (\text{IV.6})$$

Por ello, el algoritmo basado en las ecuaciones IV.4, IV.5 y IV.6 puede ser aplicable arbitrariamente para pasos de larga duración (incluso para pasos tan grandes como el intervalo de tiempo, τ , entre los registros del perfil en un experimento real). Tan solo hay un detalle que puntualizar: cuando la molécula está muy próxima al menisco o al fondo de la célula es cuando el paso largo puede introducir errores. Esto afectará a los valores del perfil de concentración en puntos próximos a uno de esos dos extremos. Pero

se insiste en que en el análisis práctico de los experimentos reales, estas zonas extremas de la célula no son tenidas en detallada consideración, pues también hay efectos terminales experimentales, por lo que esta excepción es irrelevante.

IV.2. Método de simulación

IV.2.1. Aspectos generales

Se considera que la célula se carga inicialmente de manera homogénea, con una disolución de concentración c_0 , de manera que $c(r, 0) = c_0$.

En la simulación el soluto está representado por un gran número de partículas, N_{part} . Sus posiciones estarán comprendidas entre el menisco, r_m , y el fondo de la celda, r_b . Se considera este rango dividido en un elevado número de intervalos, N_r , de anchura $\chi = (r_b - r_m)/N_r$. El intervalo i estará situado entre $r_i - \chi$ y r_i , siendo $r_i = i\chi + r_m$. La simulación durará un tiempo t_{run} , y será discretizada en un número suficiente de instantes, N_t , correspondiendo el instante j al tiempo $t_j = j\tau$, siendo τ el intervalo entre instantes, $\tau = t_{run}/N_t$. La concentración en función de la posición y del tiempo, $c(r_i, t_j)$, estará relacionada con el número de moléculas que se encuentran en el intervalo i a tiempo j , $n(i, j)$.

Para cada partícula, se asigna una posición inicial como se describirá después. En $t = 0$ arranca la centrifugación con una velocidad angular, ω . Mediante el algoritmo antes descrito se determina su trayectoria. Así, para cada instante de tiempo considerado, j , se determina en qué intervalo de la célula, i , se encuentra la partícula a partir de su posición, acumulándose una unidad en el contador de partículas: $n(i, j) \leftarrow n(i, j) + 1$. (Nótese que en cualquier instante j , se debe cumplir que la suma de los números de partículas que hay en cada intervalo es $\sum_i n(i, j) = N_{part}$).

Siendo éstos aspectos generales del método, los dos siguientes son específicos de la geometría de la célula: la asignación de posiciones iniciales a las partículas y cómo relacionar $n(i, j)$ con $c(r_i, t_j)$.

IV.2.2. Versión simplificada monodimensional

Si se considerase una célula con forma de paralelepípedo (sección transversal A) y con las trayectorias de las moléculas no dirigidas en direcciones radiales, sino todas paralelas

(como si la sedimentación transcurriera en una cubeta cuadrada bajo la acción de la gravedad), esos aspectos restantes son extremadamente sencillos.

En primer lugar, siendo constante la sección transversal, la posición inicial de las partículas es uniformemente aleatoria entre r_m y r_b . Entonces, el valor a asignar sería $r_0 = r_m + u(r_b - r_m)$, siendo u un número aleatorio con distribución uniforme $u \in (0, 1)$. Además, la concentración en cada intervalo sería proporcional al número de partículas que hay en él. En una célula de sección constante (independientemente de r) igual a A y de longitud $r_b - r_m$, la relación inicial entre la concentración y el número de partículas por unidad de volumen es:

$$c_0 = Q \frac{N_{part}}{A(r_b - r_m)} \quad (IV.7)$$

siendo Q cierta constante de proporcionalidad. Esta misma proporcionalidad se aplicaría a una franja de grosor χ , de manera que:

$$c(r_i, t_j) = Q \frac{n(i, j)}{A\chi} \quad (IV.8)$$

de donde se desprende:

$$\frac{c(r_i, t_j)}{c_0} = \frac{(r_b - r_m)n(i, j)/N_{part}}{\chi} \quad (IV.9)$$

IV.2.3. Versión rigurosa, con geometría radial

Como se indica en la Figura II.10, la celda de la ultracentrífuga tiene forma de sector truncado de un disco, lo que provoca el efecto de la dilución radial. La sección transversal de la célula, a una distancia r_i del rotor, ahora depende de r , siendo igual a $A = \phi h r_i$, donde ϕ es el ángulo del sector que comprende la celda, y h su altura (Figura II.10). Si, como se ha indicado, el rango de distancias r se ha dividido en intervalos de anchura χ , y h es la altura de la célula, el volumen de una porción situada a una distancia r_i ($i = 1, \dots, N_r$) comprendida entre r_i y $r_i + \chi$ es $\phi h \chi r_i$.

En función de esta geometría de la célula se introducen variantes en cuanto a los dos aspectos señalados al final del apartado IV.2.1. En primer lugar, en cuanto a la distribución inicial de las partículas, antes de centrifugar, cuando la concentración es uniforme en toda la celda, la cantidad de moléculas que hay a una distancia r es proporcional al volumen de la franja comprendida entre r y $r + dr$, que es $\phi h r dr$, y por ello dicho número de moléculas,

o la probabilidad $p(r)$ de que una molécula se encuentre inicialmente a la distancia r , es proporcional a r . Aplicando la condición de normalización,

$$\int_{r_m}^{r_b} p(r)dr = 1 = \text{const} \int_{r_m}^{r_b} r dr \quad (\text{IV.10})$$

resulta

$$p(r) = \frac{2}{r_b^2 - r_m^2} r \quad (\text{IV.11})$$

En este caso, para generar la posición inicial de una partícula de manera que se obedezca esta densidad de probabilidad, se sigue el procedimiento general para una distribución arbitraria, consistente en considerar la función de distribución acumulativa,

$$F(r) = \int_{r_m}^r p(r)dr = \frac{r^2 - r_m^2}{r_b^2 - r_m^2} \quad (\text{IV.12})$$

Se genera un número aleatorio uniforme $u \in (0, 1)$, se iguala a $F(r)$ y se obtiene el r correspondiente,

$$r = \sqrt{u(r_b^2 - r_m^2) + r_m^2} \quad (\text{IV.13})$$

apreciándose que resultará $r \in (r_m, r_b)$.

Sabiendo cómo generar la posición inicial de la una partícula, su trayectoria browniana se genera como en el caso monodimensional. La coordenada x es ahora la distancia radial r . Cabe indicar que en tres dimensiones hay también difusión en las otras dos dimensiones; sin embargo, esta difusión no produce cambios en la distribución radial del número de moléculas o de la concentración, por lo que se puede ignorar. El algoritmo de generación de la trayectoria es el indicado en el apartado IV.1.1, con las ecuaciones IV.1, IV.2 y IV.3 para pasos cortos, o las ecuaciones IV.4, IV.5 y IV.6 para pasos largos, poniendo r en lugar de x . Como allí se indicó, para cada partícula de un total de N_{part} se hace la simulación, tras lo cual se dispone de la distribución de las moléculas en los intervalos de la célula a lo largo del tiempo, $n(i, j)$.

La otra variante debida a la geometría de sector es que, al tener en cuenta la dilución radial, la concentración no es simplemente proporcional a $n(i, j)$. Dado que el volumen de la franja de grosor χ a la distancia r_i es $\phi h \chi r_i$, el número de partículas simuladas por unidad de volumen valdrá $n(i, j)/\phi h \chi r_i$, y la concentración ha de ser proporcional a este valor,

$$c(r_i, t_j) = Q \frac{n(i, j)}{\phi h \chi r_i} \quad (\text{IV.14})$$

siendo Q cierta constante de proporcionalidad. Inicialmente, antes de centrifugar, la concentración es $c(r, 0) = c_0$, uniforme en toda la célula, y el número de partículas por unidad de volumen se obtiene dividiendo el número de partículas N_{part} por el volumen de la célula, $\frac{1}{2}\phi h(r_b^2 - r_m^2)$. En este caso la relación de proporcionalidad es:

$$c_0 = Q \frac{2N_{part}}{\phi h(r_b^2 - r_m^2)} \quad (\text{IV.15})$$

y combinando la ecuación IV.14 con la ecuación IV.15 se obtiene finalmente,

$$\frac{c(r_i, t_j)}{c_0} = \frac{(r_b^2 - r_m^2)}{2\chi} \frac{n(i, j)/N_{part}}{r_i} \quad (\text{IV.16})$$

que establece la relación entre la fracción de las partículas simuladas que se encuentran en el intervalo, $n(i, j)/N_{part}$, y la concentración relativa al valor inicial, $c(r_i, t_j)/c_0$. Nótese cómo, aparte de diversas constantes instrumentales o de simulación, la concentración no está determinada por $n(i, j)$ sino por $n(i, j)/r_i$.

Una verificación apropiada de la ecuación IV.16 es la siguiente. Inicialmente ($t = 0$), el número de moléculas en cada franja, $n(i, 0)$ es igual al número de moléculas N_{part} multiplicado por la probabilidad de que una molécula se encuentre en esa franja, $p(r_i)dr$, o $p(r)\chi$ en forma discreta. Según la ecuación IV.11 dicho número vale, $2N_{part}\chi r_i/(r_b^2 - r_m^2)$. Sustituyendo en la ecuación IV.16 se encuentra $c(r_i, t_j)/c_0 = 1$, como debe ser.

IV.2.4. Procedimiento y parámetros de la simulación

Si t_{run} es el tiempo total del experimento (normalmente, algunas horas), la simulación para cada partícula consiste en un número de pasos $N_{steps} = t_{run}/\Delta t$. Para fines en los que se necesite registrar el perfil de concentración, el número de registros que hay que utilizar (*scans* en experimentos de ultracentrifugación analítica) es igual a $N_{scans} = t_{run}/\tau$. N_{scans} puede ser igual a N_{steps} si se registran todos los pasos, o un divisor entero con $N_{steps}/N_{scans} = \tau/\Delta t$, debiendo ser τ igual o múltiplo entero de Δt . Así, en un instante j se observa la distancia radial, y por lo tanto el índice i , del tramo en el que la partícula se encuentra en ese instante, acumulándose una unidad en el contador $n(i, j)$. Repitiendo esto para muchas partículas, al final el contador $n(i, j)$ indicará el número de partículas que estaban en la posición r_i en el instante t_j . Habiendo prefijado la concentración inicial

c_0 , mediante la ecuación IV.16 se determina $c(r_i, t_j)$, y a partir de ésta, se calcula la contribución a la señal, $z(r_i, t_j)$ mediante la ecuación II.13.

Los datos empleados en las simulaciones reflejan los utilizados en experimentos reales de ultracentrifugación analítica. La geometría de la celda viene dada por $r_m = 5.80$ cm, $r_b = 7.20$ cm, y un ángulo del sector $\phi = 3$ grados (0.052 radianes). La velocidad del rotor, ω , y la duración del experimento, t_{run} , dependen tanto de la molécula que se está simulando como del modo (velocidad o equilibrio) del experimento. Se ha encontrado que $N_{part} = 10^5$ es un número de partículas suficiente para obtener un nivel de ruido bastante bajo, como puede observarse en las comprobaciones que se expondrán a continuación.

IV.3. Programas para predicción de experimentos de ultracentrifugación

IV.3.1. Programa SIMUSED. Versión para un componente

Con base en la exposición teórica de las anteriores secciones, y de acuerdo a nuestro nuevo método de dinámica browniana para simular experimentos de ultracentrifugación analítica, se ha desarrollado un programa, **SIMUSED**, para predecir lo que se observaría en un experimento de sedimentación.

En su modo más simple, para un componente único, los principales datos que el programa requiere son los datos físicos de la muestra (s , M , $\bar{v}$ y ρ), los del instrumento y los del experimento (r_m , r_b , ϕ , ω , t_{run}), los números N_{steps} y N_{scans} , el número de posiciones r_i (N_r), y otros datos de trabajo del programa. El programa presenta las opciones de utilizar nuestro método browniano (con un N_{part} especificado) o la ecuación de Faxén.

La extrema simplicidad del algoritmo browniano utilizado para simular la trayectoria de una molécula hace que el esquema de simulación pueda ser fácilmente paralelizado, lo que presenta un enorme beneficio para plataformas de múltiples núcleos *multi-core* ya que cada trayectoria puede ser generada en un hilo/núcleo independiente y simultánea a las que corren en los demás. Se han implementado directivas *OpenMP* a nuestro código en Fortran90 (Intel Fortran Compiler sobre Windows XP). En un ordenador DELL T5500 con dos procesadores Intel Xeon X5660, de seis núcleos cada uno, con *Hyperthreading* activado, de manera que el equipo funciona con 24 hilos, el tiempo necesario para generar una simulación con $N_{part} = 10^5$ es de 0.05 segundos aproximadamente (de hecho, la prueba

consistió en realizar 1000 simulaciones repetitivas (independientes), para que el tiempo de CPU no fuera demasiado pequeño, tardando en hacerlas 46.5 segundos).

Una gran ventaja de nuestro método consiste en hacer factible esa paralelización, con la consiguiente rebaja en el tiempo de cálculo. Tiempos tan pequeños, para una simple predicción, como las que se realizan en el programa **SIMUSED**, son de poca relevancia, pero resultan muy ventajosos para la metodología de análisis de datos experimentales, en los que hay que hacer ajustes que requieren muchas simulaciones consecutivas para ajustar los parámetros que se buscan, como se describirá en un capítulo posterior.

El resultado del programa **SIMUSED** es el conjunto de valores de la señal, $z(r_i, t_j)$, $i = 1, \dots, N_r$, $j = 1, \dots, N_t$, para las posiciones y tiempos requeridos. Se produce la salida en archivos de diversos formatos, dependiendo del uso que se pretenda. En el programa **SIMUSED** se ha incorporado el programa de dominio público **GNU PLOT** [111], que presenta al final de su ejecución una gráfica de los perfiles señal-posición para tiempos sucesivos, $z(r, t)$ vs. r para sucesivos t . Uno de los formatos de archivo de salida está preparado para ser post-procesado o representado mediante utilidades tales como **EXCEL** o **SigmaPlot**. También se produce un archivo con trayectorias de partículas individuales, a partir del cual mediante el programa realizado por el Grupo de Investigación **MovieBeads** [112] (que produce animaciones del movimiento de un conjunto de partículas), se pueden realizar videos que ilustran como se mueven las partículas durante la sedimentación.

IV.3.2. El programa SEDFIT

SEDFIT contiene la posibilidad de simular experimentos de sedimentación, por lo que resulta de utilidad a efectos de verificar nuestros resultados. En esta modalidad, el conjunto de datos es el mismo que para **SIMUSED**. Igual que éste está adaptado para muestras paucidispersas, como después se indicará, **SEDFIT** también puede predecir un experimento con hasta cuatro componentes independientes.

Es necesario puntualizar que esta herramienta de simulación de perfiles de concentración o señal a partir de datos de la muestra que contiene **SEDFIT** no es la principal utilidad de este paquete de *software*, cuya principal finalidad es, como ya se describió en el Capítulo II, analizar perfiles experimentales para extraer de ellos información acerca de la muestra. Esta es también la finalidad del programa **ANASED**, que será descrito en el Capítulo VI.

En lo que sigue, se va a utilizar **SEDFIT** en dos modos: i) para comparar los perfiles de concentración obtenidos con **SIMUSED** y ii) para analizar las predicciones de **SIMUSED** verificando que los parámetros que **SEDFIT** produce coinciden con los que se emplearon en **SIMUSED**.

IV.4. Comprobaciones de la metodología de simulación browniana

IV.4.1. **SIMUSED** vs. **SEDFIT**

Se analizan, en primer lugar, algunas características de nuestro programa, tomando **SEDFIT** como referencia.

En la Figura IV.1A se muestra un ejemplo relativo al efecto de optar por el algoritmo de pasos largos (ecuación IV.4) o el de pasos cortos (ecuación IV.1). Se superponen las curvas de referencia, tomadas de **SEDFIT** y de la ecuación de Faxén. Excepto en las zonas terminales, en el menisco principalmente, y solo en una zona muy reducida, se aprecia como el algoritmo de pasos largos da unos resultados tan buenos como el de pasos cortos, con un número de pasos extraordinariamente inferior. Dado que el tiempo de cálculo en ordenador es proporcional al número de pasos, el algoritmo de pasos largos es extraordinariamente más rápido. Además, los pasos se pueden hacer tan largos como se quiera; esto es, se puede identificar un paso de simulación Δt con los intervalos entre los perfiles para tiempos sucesivos (el número de pasos sería igual al número de tales tiempos), aunque en algunos casos, por prudencia o seguridad, se pueden probar Δt algo menores. Con esto queda confirmada la eficiencia del algoritmo de pasos de larga duración por lo que dicho algoritmo será el empleado en las simulaciones realizadas con **SIMUSED** a partir de este momento.

Es de destacar también la excelente concordancia de los resultados de **SIMUSED** con la referencia, la de los cálculos de **SEDFIT**, y en cuanto a la ecuación de Faxén es de notar su muy buen comportamiento en este caso, aun con el consabido defecto de no describir apropiadamente la parte final (fondo) de la célula.

En la Figura IV.1B se estudia, para el mismo caso de ejemplo, el efecto del número de partículas, N_{part} en los resultados finales. También el tiempo de cálculo es proporcional a dicho número.

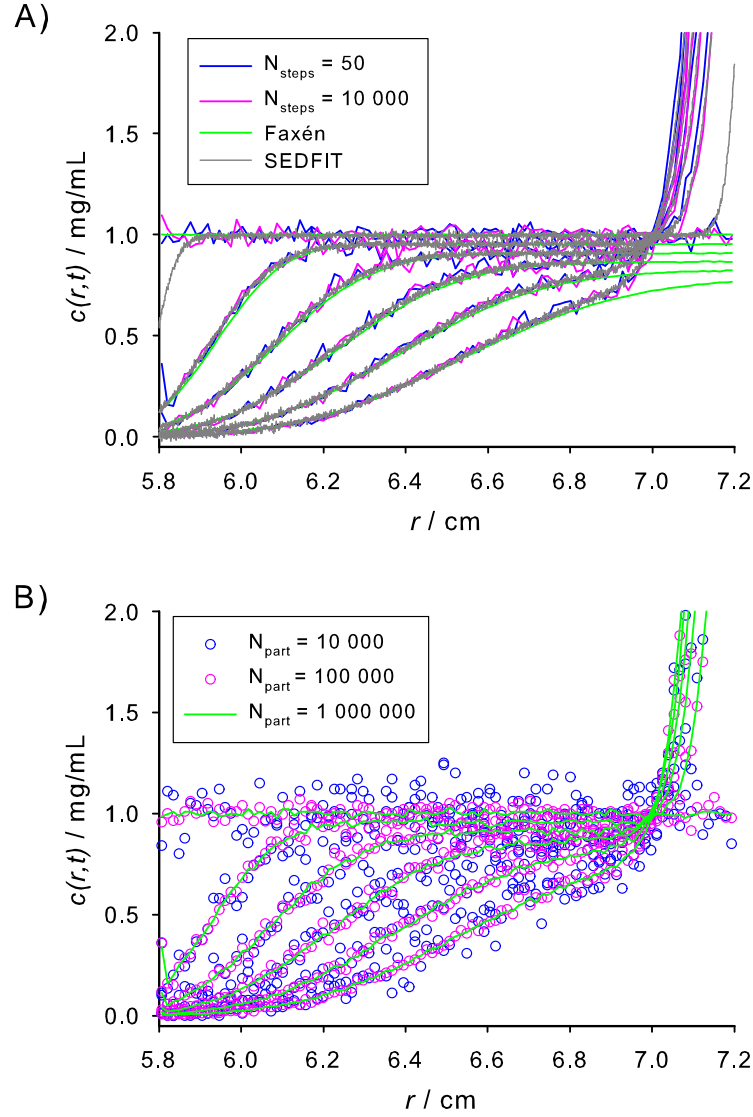


Figura IV.1: Representación de los perfiles de concentración obtenidos mediante simulaciones de experimentos de velocidad de sedimentación con dinámica browniana para una muestra de lisozima de $c_0 = 1$ mg/ml con $r_m = 5.8$ cm, $r_b = 7.2$ cm, $t_{\text{run}} = 36\,000$ s, $\omega = 40\,000$ rpm para los siguientes tiempos (de izquierda a derecha): 0 s, 7 200 s, 14 400 s, 21 600 s, 28 800 s y 36 000 s. A) Estudio de la influencia de la longitud de los pasos en los perfiles de concentración simulados con $N_{\text{part}} = 100\,000$. B) Estudio del número de partículas en los perfiles de concentración.

Es evidente que la tendencia de los resultados es la misma en todos los casos, dependiendo de N_{part} la fluctuación o error estadístico. Si se toman como referencia los

resultados para el mayor valor de N_{part} , 10^6 , para los que la fluctuación es casi inapreciable, se ve que con $N_{part} = 10^5$ los errores son bastante pequeños, del orden de los que se suelen observar en los experimentos reales, por lo que éste valor será el que se adopte habitualmente.

IV.4.2. Sistemas

Se han realizado simulaciones tanto de experimentos de velocidad de sedimentación como de equilibrio de cuatro especies distintas que abarcan un amplio rango de coeficientes de sedimentación y difusión (es decir, que abarcan una gama muy amplia de masa molecular). Se ha simulado una molécula bastante pequeña (γ -ciclodextrina), una pequeña proteína globular (lisozima), un polímero moderadamente largo y flexible (óxido de polietileno, PEO), y una muestra muy larga y rígida de ADN (ADN de bacteriofago T7).

La muestra de PEO elegida como ejemplo para realizar las simulaciones es una muestra monodispersa. Para polímeros de peso molecular, M , variable, la ecuación que permite relacionar el coeficiente de sedimentación, s , con el peso molecular es del tipo $s = K_s M^{a_s}$. Para este polímero, según [113], $K_s = 6.14 \times 10^{-3}$ y $a_s = 0.47$.

Los valores de s , D y M se han tomado de la literatura [4, 43, 113–115] y se muestran en las Tablas IV.1 y IV.2. En dichas tablas también pueden observarse los valores del tiempo de duración del experimento simulado y de la velocidad del rotor para cada una de las muestras en ambos tipos de experimentos de sedimentación, velocidad y equilibrio.

Se supone por sencillez que la señal es proporcional a la concentración másica, c , por lo cual la relación z/z_0 es igual entre concentraciones c/c_0 . Numéricamente, se trabaja con $c_0 = 1$ mg/mL, con lo cual el valor numérico de c es idéntico al de z/z_0 . En las siguientes figuras, $c(r, t)$ es numéricamente equivalente a $z(r, t)/z_0$.

IV.4.3. Resultados

Con el objeto de evaluar la precisión en la predicción de perfiles de concentración de experimentos de velocidad de sedimentación, se comparan los resultados calculados con las simulaciones realizadas con **SIMUSED** con los calculados con **SEDFIT** ya que como se indicó anteriormente con esta herramienta se pueden predecir fiablemente perfiles de concentración. Como se muestra en la Figura IV.2, los perfiles procedentes de nuestras

simulaciones y los predichos por **SEDFIT** muestran un buen acuerdo, lo que manifiesta que, al menos en la capacidad predictiva, nuestro programa es equivalente a **SEDFIT**.

Además de la comparación exitosa entre las predicciones de **SIMUSED** y **SEDFIT**, se ha adoptado una segunda vía de validación de las predicciones de **SIMUSED**, consistente en considerarlas como si de datos experimentales se tratasen, tratándolas mediante la herramienta de análisis de **SEDFIT** para deducir los valores de los datos de la muestra, s , D y M , que deben ser prácticamente coincidentes con los de partida de **SIMUSED**. El modelo elegido para realizar estos análisis es el *modelo de partículas no interactuantes*. Los análisis con **SEDFIT** se realizan con 50 *scans* (valores de t) y 50 posiciones radiales (valores de r).

Molécula	γ -ciclodextrina	Lisozima	PEO	ADN T7
$1-\bar{v}\rho$	0.333	0.298	0.170	0.450
$10^{-3}M \times$ / g/mol	1.50	14.3	300	26 000
s (S)	0.53	1.89	2.30	31.8
$10^7 D$ / cm ³ /g	27.0	10.8	1.10	0.066
ω / rpm	55 000	40 000	40 000	10 000
t_{run} / s	54 000	54 000	54 000	54 000
$10^{-3}M_{calc}$ / g/mol	1.44 (-4)	13.9 (-3)	300 (0)	23 278 (-10)
s_{calc} (S)	0.54 (+2)	1.84 (-3)	2.26 (-2)	31.4 (-1)
$10^7 D_{calc}$ / cm ³ /g	27.4 (+1)	10.8 (0)	1.08 (-2)	0.073 (+11)
Referencia	[114]	[4, 43]	[113]	[115]

Tabla IV.1: Moléculas y propiedades experimentales usadas como datos en las simulaciones de experimentos de velocidad de sedimentación, y propiedades obtenidas a partir de los perfiles simulados después del análisis con **SEDFIT**. Los números entre paréntesis son las desviaciones en tanto por ciento de los valores obtenidos con respecto a los usados para la simulación.

En la Tabla IV.1 se muestran los valores de s , M , D para las cuatro muestras consideradas. Se observa una alta precisión en los resultados obtenidos para estos tres parámetros, lo que se refleja en las pequeñas desviaciones de los valores obtenidos, particularmente en el caso de los valores de s , con respecto a los empleados en la simulación. El acuerdo es bueno para los cuatro casos, concluyendo así que el algoritmo browniano implementado en **SIMUSED** puede ser utilizado en un amplio rango de la relación sedimentación-difusión y

masa molecular, incluyendo experimentos de velocidad de sedimentación de una molécula tan pequeña como la ciclodextrina.

Molécula	γ -ciclodextrina	Lisozima	PEO
ω / rpm	30 000	15 000	5 000
t_{run} / s	300 000	500 000	500 000
$10^{-3} M_{calc}$ / g/mol	1.27 (-16)	12.6(-12)	250.0 (-17)

Tabla IV.2: Condiciones para las simulaciones de los experimentos de equilibrio de sedimentación, y peso molecular obtenido mediante análisis de los perfiles de concentración usando la ecuación II.50. Los números entre paréntesis tienen el mismo significado que en la Tabla IV.1.

Las simulaciones de equilibrio se realizaron durante un tiempo largo, siguiendo la evolución del perfil de concentración para asegurarnos de que una nueva prórroga del tiempo de ejecución no cambiaría el resultado final, confirmando así que se había llegado al equilibrio. Un ejemplo se presenta en la Figura IV.3. Para los análisis de los resultados procedentes de las simulaciones de equilibrio se realizó el tratamiento clásico indicado en el Capítulo II, que utiliza la ecuación clásica linealizada II.51:

$$\ln c(r) = \ln c_m + \frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} (r^2 - r_m^2)$$

Así, como los datos procedentes de las simulaciones de experimentos de equilibrio de sedimentación realizados se ajustan al modelo establecido, al realizar la representación de $\ln c(r)$ frente a $r^2 - r_m^2$ se obtiene para todos los casos una línea recta de cuya pendiente $(\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)/2RT)$ se calcula el valor de M . Los resultados se muestran en la Tabla IV.2. Aquí se observa que los valores de M obtenidos no son tan buenos como los obtenidos en las simulaciones de experimentos de velocidad, siendo las desviaciones de un 15 %. Entre otras razones (como la menor cantidad de información resultante de los experimentos de equilibrio, y los errores inherentes a la determinación de la pendiente en el ajuste linealizado de la ecuación) esto puede deberse a que la ecuación II.50 no considera la dilución radial.

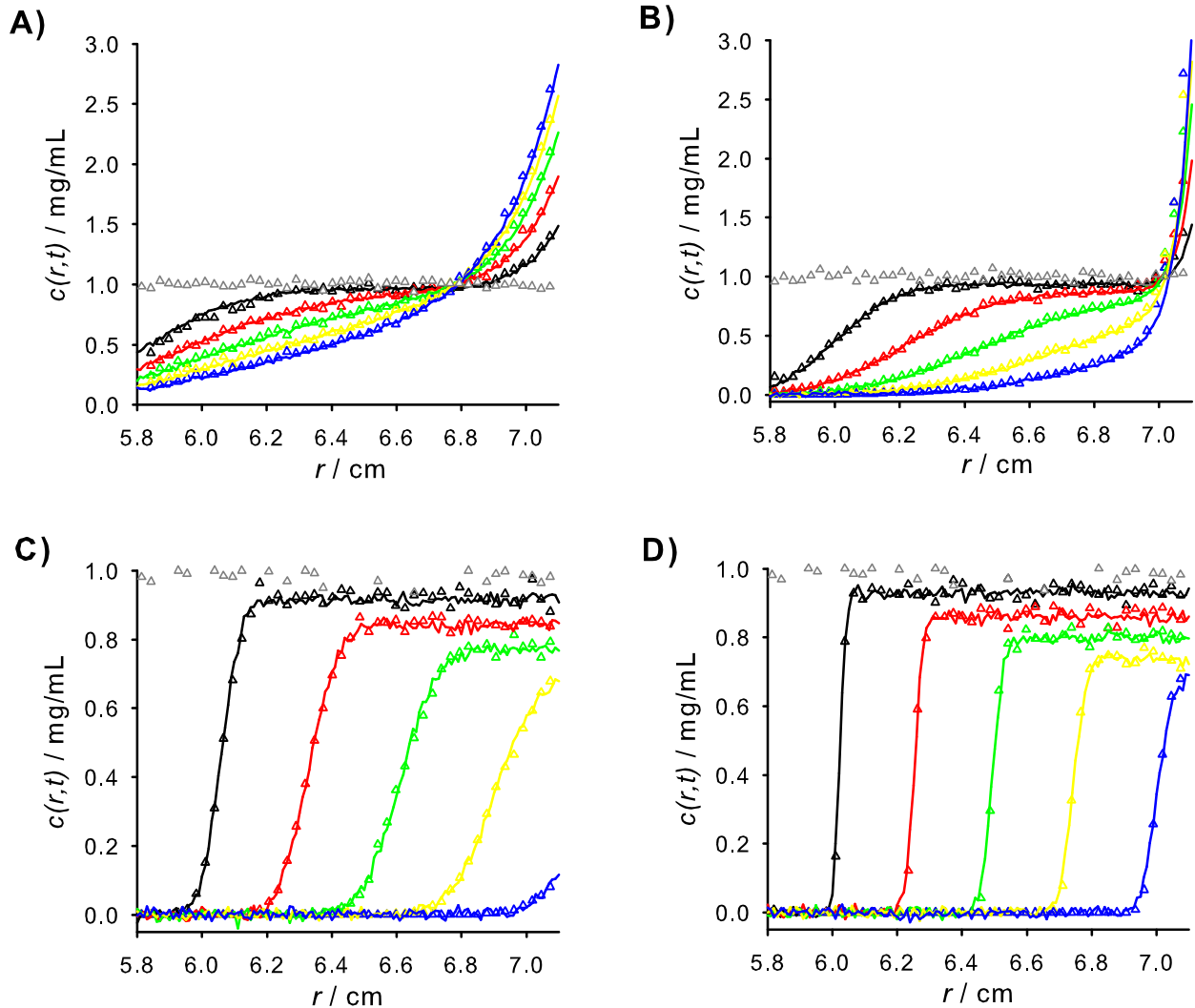


Figura IV.2: Comparación de los perfiles de concentración obtenidos para simulaciones de experimentos de velocidad de sedimentación para las cuatro especies estudiadas con los datos que se indican en la Tabla IV.1: A) γ -ciclodextrina, B) lisozima, C) PEO y D) ADN de bacteriófago T7. Los perfiles están realizados para los tiempos 0 (gris) 10800 s (negro), 21600 s (rojo), 32400 s (verde), 43200 s (amarillo) y 54000 s (azul). Los valores de ω de cada caso están en la Tabla IV.1. Pueden observarse los resultados de las simulaciones con $N_{steps} = 50$ (triángulos abiertos) junto con los perfiles predichos por SEDFIT (líneas finas).

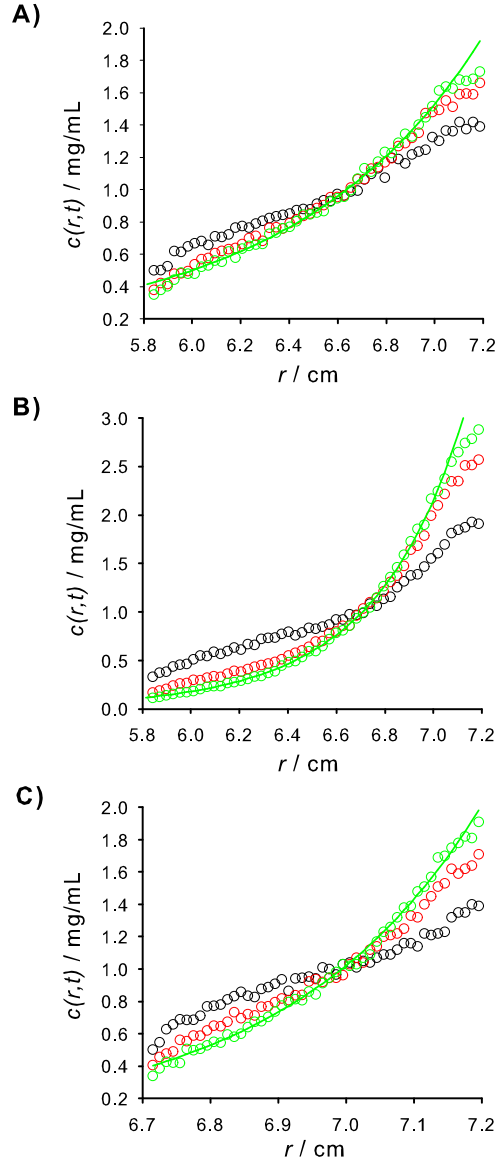


Figura IV.3: Comparación de los perfiles de concentración obtenidos para simulaciones de experimentos de equilibrio de sedimentación para tres especies de las estudiadas con los datos que se indican en la Tabla IV.2: A) γ -ciclodextrina, B) lisozima y C) PEO. Los perfiles están realizados para los tiempos 111 111 s (negro), 277 778 s (rojo) y 500 000 s (verde). Los valores de ω de cada caso están en la Tabla IV.2. Al igual que en la Figura IV.2, se observan los resultados de las simulaciones con $N_{steps} = 50$ (círculos abiertos). Las líneas continuas representan los perfiles obtenidos aplicando la ecuación clásica de la sedimentación II.50.

Capítulo V

Predicción de experimentos de sedimentación. II. Sistemas heterogéneos

V.1. Generalidades sobre sistemas heterogéneos

La mayoría de los polímeros en disolución, a diferencia de los compuestos de bajo peso molecular, no aparecen como especies químicas puras ya que no tienen un peso molecular único, sino que poseen una distribución de pesos moleculares. Esto es así debido a que los polímeros que se obtienen mediante una reacción de polimerización están formados por distintas cadenas macromoleculares (uniones de monómeros entre sí), cada una con un grado de polimerización y un peso molecular determinado, M_k .

Las macromoléculas biológicas son en muchos casos monodispersas, debido a que la biosíntesis tiene un estricto control (genético); tal es el caso habitual de proteínas y ácidos nucleicos. Pero esto no es así en otros casos, como en los polisacáridos, que suelen tener una distribución ancha de pesos moleculares.

También propia del campo de las biomacromoléculas es una situación consistente en que una muestra heterogénea contiene un número pequeño de especies; por ejemplo una proteína con un peso molecular, M , bien definido, puede coexistir con sus oligómeros (dímero, tetrámero, etc), o simplemente casos en los que hay una mezcla, contaminación, etc. Este tipo de heterogeneidad, con una distribución discreta de pesos moleculares se

denomina *paucidispersidad* y el término genérico de polidispersidad se sobreentiende a menudo para distribuciones continuas.

En uno u otro caso se debe hablar de peso molecular promedio, que puede calcularse de diferentes maneras a partir de distintas técnicas experimentales, cada una de las cuales da lugar a un tipo de promedio diferente. Así, se tiene el peso molecular promedio en número ($\overline{M}_n$), que se obtiene a partir de osmometría; peso molecular promedio viscoso ($\overline{M}_v$), que se obtiene mediante medidas de viscosidad capilar (no considerado en este trabajo); peso molecular promedio en peso ($\overline{M}_w$), que se obtiene a partir de experimentos de difusión de luz; y peso molecular promedio en z ($\overline{M}_z$), que es accesible en ciertas variantes del análisis de equilibrio de sedimentación [36]. Los más utilizados son los promedios en peso y en número que se pueden calcular con las siguientes expresiones:

$$\overline{M}_n = \sum_k x_k M_k \quad (\text{V.1})$$

y

$$\overline{M}_w = \sum_k w_k M_k \quad (\text{V.2})$$

siendo x_k y w_k , respectivamente, las fracciones en número y en peso de la fracción de muestra de peso molecular M_k . El promedio en número puede también obtenerse como:

$$\overline{M}_n = \frac{1}{\sum_k w_k / M_k} \quad (\text{V.3})$$

Se denomina índice de polidispersidad al cociente entre el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número, esto es:

$$IP = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (\text{V.4})$$

El valor de IP refleja la falta de homogeneidad en los tamaños moleculares que componen el polímero, es decir, la anchura de la distribución. Puede demostrarse que sea cual sea la distribución de pesos moleculares, se verifica que $\overline{M}_w \geq \overline{M}_n$, de manera que $IP \geq 1$. Si todas las cadenas tuviesen igual longitud, $IP = M_w/M_n$ sería igual a la unidad, estando entonces ante un polímero monodisperso o de tamaño molecular homogéneo. Por el contrario, si las cadenas son de diversa longitud, $IP = \overline{M}_w/\overline{M}_n$ es mayor que la unidad y se desvía tanto más de ésta cuanto más heterogénea es la mezcla de longitudes, es decir cuanto más polidisperso es el polímero [116].

V.2. Distribuciones de peso molecular

En la sección anterior se ha tratado un caso particular de polidispersidad: el caso de una muestra paucidisversa compuesta por un cierto número de especies discretas (con índice k). En el caso de muchos polímeros sintéticos y algunos biológicos (polisacáridos), están presentes en la muestra, en mayor o menor proporción, moléculas de una amplia gama de pesos moleculares, por lo que presentan una polidispersidad continua. Para caracterizarlas, en lugar de las fracciones de especies discretas, x_k o w_k , se emplean funciones de distribución continuas.

Según [117], la distribución en peso, $W(M) dM$, se define como la fracción de masa de la muestra total de polímero cuyo valor de peso molecular, M , se encuentra en el rango de M a $M + dM$. Otra forma de expresar la distribución en peso de un polímero es a través de la fracción en número, $N(M)$. Aquí, $N(M) dM$ es el número de moléculas (cadenas de polímeros), cuyo valor de peso molecular se encuentra en el rango de M a $M + dM$, cabiendo expresar ese número como fracción del número total de moléculas que componen el polímero muestra. Estas dos funciones, $W(M) dM$ y $N(M) dM$, son dos modos distintos de expresar la misma realidad y no son independientes, estando relacionados entre sí a través de:

$$W(M) = \frac{M}{\overline{M}_n} N(M) \quad (\text{V.5})$$

siendo $\overline{M}_n$ el promedio en número del peso molecular de la muestra de polímero. Este promedio, además de calcularse por medio de la ecuación V.3, se calcula de la siguiente manera:

$$\overline{M}_n = \int_0^\infty MN(M) dM \quad (\text{V.6})$$

La función $W(M)$ se utiliza con más frecuencia que $N(M)$ porque la distribución en masa es más práctica que la distribución en número. El peso molecular promedio en número se puede obtener también a partir $W(M)$:

$$\overline{M}_n = \left[\int_0^\infty \frac{W(M)}{M} dM \right]^{-1} \quad (\text{V.7})$$

que se deduce de la ecuación V.5, dividiendo por M e integrando. Del mismo modo, el peso molecular promedio en peso, $\overline{M}_w$, también puede calcularse como:

$$\overline{M}_w = \int_0^\infty MW(M)dM \quad (V.8)$$

Con el objeto de describir la distribución en peso de los polímeros polidispersos reales se han propuesto diversas formas funcionales. Para dotar a dichas funciones de mayor versatilidad y aumentar el rango de aplicación, suelen hacerse depender de, al menos, dos parámetros. Son varias las ecuaciones que se adaptan bien a las distribuciones de pesos moleculares reales. Una utilizada frecuentemente es la distribución *log-normal*, que emplea escala logarítmica para el peso molecular. Esta distribución es una función normal, gaussiana, que tiene la siguiente forma:

$$W(\ln M) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sigma} \exp \left[-\frac{(\ln M - \ln M_m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (V.9)$$

donde $\ln M_m$ es el valor máximo de $\ln M$, y σ la desviación estándar. Los promedios de peso molecular para esta distribución son [2]:

$$\overline{M}_n = M_m e^{-\sigma^2/2} \quad (V.10)$$

$$\overline{M}_w = M_m e^{\sigma^2/2} \quad (V.11)$$

$$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = e^{\sigma^2} \quad (V.12)$$

Hay que advertir que si M se maneja en escala lineal, la distribución contiene un término $1/M$:

$$W(M) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sigma} \frac{1}{M} \exp \left[-\frac{(\ln M - \ln M_m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (V.13)$$

Un ejemplo, entre muchos otros, de distribución *log-normal* es la de quitosanos despolimerizados enzimáticamente [118].

Otra distribución de dos parámetros frecuentes es la de Zimm-Schulz:

$$W(M) = \text{const} M^Z e^{-y_m M} \quad (V.14)$$

donde *const* es una constante de normalización. Los promedios para esta distribución son:

$$\overline{M}_n = \frac{Z}{y_m} \quad (V.15)$$

$$\overline{M}_w = \frac{Z+1}{y_m} \quad (V.16)$$

$$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = \frac{Z+1}{Z} \quad (V.17)$$

V.3. Sedimentación de un sistema heterogéneo

Como se puso de manifiesto en el Capítulo II, el perfil de sedimentación de una especie depende, aparte de parámetros instrumentales (velocidad angular del rotor) y de la disolución (temperatura, densidad), de parámetros moleculares de la propia especie. Éstos son, en primer lugar, el coeficiente de sedimentación s y, en segundo lugar, el coeficiente de difusión D , si bien éste puede reemplazarse por el conocimiento del peso molecular M y del volumen específico parcial $\bar{v}$, ya que mediante ambos se puede calcular D mediante la ecuación de Svedberg (ecuación II.27). Se prefiere ahora adoptar la segunda alternativa para basar la descripción en pesos moleculares. Sobre los parámetros instrumentales, se tendrá en cuenta explícitamente la velocidad rotacional, ω , ya que cabe que se hagan series de experimentos en los que ésta cambie. Por los métodos que se han descrito anteriormente, es posible hacer la predicción de los perfiles de sedimentación (en términos de la señal) $z(r, t)$. De manera general, se podría expresar su dependencia con las distintas magnitudes como $z(r, t; \omega, \bar{v}, M, s)$, indicando con esta notación la dependencia, además de con las variables r y t , con el parámetro instrumental ω y con los parámetros moleculares $\bar{v}$, M y s . Ya se ha visto que el peso molecular interviene combinado con el factor de flotación en el término $M(1 - \bar{v}\rho) = M_b$, que se denomina peso molecular flotante, y en términos de éste, $\bar{v}$ y ρ no intervienen, quedando la dependencia de la señal en la forma $z(r, t; \omega, M_b, s)$.

La variabilidad de M y de s (que dependerá a su vez de M) será el aspecto primordial (además de $\bar{v}$) en sistemas heterogéneos. El sistema polidiserso estará compuesto por una distribución, discreta o continua, de componentes (k), variando de uno a otro tanto el peso molecular (M_k) como el coeficiente de sedimentación (s_k), pudiendo ser el factor de flotación $(1 - \bar{v}_k\rho)$ igual o diferente, según los casos. Como se apreciará más adelante, una manera de eliminar la dependencia separada, con M_k por un lado y $(1 - \bar{v}_k\rho)$ por otro, es utilizar como variable combinada el peso molecular flotante $M_{b,k} = M(1 - \bar{v}_k\rho)$. Si es un sistema paucidisperso, la distribución es realmente discreta, estando formada por una serie de componentes 1, 2, ... $k, \dots n_c$. Si se trata de una distribución continua, estaría caracterizada por una cierta función de distribución en número $N(M; p_1, p_2, \dots)$ o en peso $W(M; p_1, p_2, \dots)$, donde p_1, p_2 , etc son, como se ha comentado anteriormente, parámetros característicos de la distribución relacionados con la probabilidad. La relación entre las dos distribuciones es $W(M; \dots) = \text{const} \times M \times N(M; \dots)$ donde la constante será una u otra según las funciones hayan sido normalizadas.

En la práctica, las muestras con polidispersidad continua se suelen discretizar, suponiéndolas comprendidas entre un mínimo y un máximo, elegidos con el único criterio de que abarquen de manera prácticamente completa el rango de la distribución, y dividiendo ese rango en un número bastante elevado de intervalos, M_k , de manera que los cálculos relacionados con polidispersidad se pueden hacer, como para las muestras paucidispersas, en términos de fracciones en peso o en número según lo indicado en la sección V.1.

En la sección II.4 ya se indicaba que cuando se tiene un sistema heterogéneo, con diversos tipos de partículas, la señal registrada en la ultracentrífuga era una suma de contribuciones de cada uno de esos tipos, dependiente de su concentración y cómo ésta influye en la señal. Quedaba esto reflejado en la ecuación II.14, que ahora se re-escribe como

$$z(r, t; \omega) = \sum_{k=1}^{n_c} \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} c(r, t, \omega, \bar{v}_k, M_k, s_k) \quad (\text{V.18})$$

para expresar la dependencia en los diversos parámetros propios de cada especie, k .

V.4. Predicción de perfiles de sedimentación. Consideraciones generales

Dado que es cierta señal óptica, pero no la concentración, lo que se detecta, hay que tener en cuenta que cada componente de un sistema heterogéneo contribuye a la señal con una relación señal/concentración diferente. La señal inicial correspondiente a la distribución uniforme a lo largo de la célula de los componentes de la muestra antes de comenzar la centrifugación ($t = 0$), se calcula como la superposición de las contribuciones correspondientes a cada uno de los componentes,

$$z_0 = \sum_{k=1}^{n_c} z_{0,k} \quad (\text{V.19})$$

donde, como ya se ha establecido en la ecuación II.13,

$$z_{0,k} = \frac{q_k c_{0,k}}{M_k^{\alpha_k}} \quad (\text{V.20})$$

y se puede definir, como se ha hecho hasta ahora para la fracción en número o en peso, una fracción contribuida por cada componente a la señal inicial:

$$y_k = \frac{z_{0,k}}{z_0} = \frac{q_k c_{0,k} / M_k^{\alpha_k}}{\sum_{k=1}^{n_c} q_k c_{0,k} / M_k^{\alpha_k}} \quad (\text{V.21})$$

tal que $\sum_{k=1}^{n_c} y_k = 1$, de manera que uno de los y_k no es independiente, sino que está determinado por todos los demás. El valor y_k es una fracción de cierta “concentración efectiva”, entendiendo por tal la concentración, sea ésta en peso o en número de moles, multiplicada por la constante q_k .

Nótese que si las constantes q_k de todos los componentes son idénticas, como en el caso de una mezcla de componentes oligo- o poliméricos con la misma unidad repetitiva (no ocurriría así para una mezcla de dos proteínas, o proteína con ADN, etc), entonces y_k coincide con la fracción en peso si la señal es proporcional a la concentración másica,

$$y_k = \frac{c_{0,k}}{\sum_{k=1}^{n_c} c_{0,k}} = w_k \quad (\alpha_k = 0) \quad (\text{V.22})$$

o con la fracción en número si la señal es proporcional a la concentración molar,

$$y_k = \frac{c_{0,k} / M_k}{\sum_{k=1}^{n_c} c_{0,k} / M_k} = x_k \quad (\alpha_k = 1) \quad (\text{V.23})$$

Para el planteamiento de un cálculo de perfiles de sedimentación con n_c componentes, se necesitarían n_c datos iniciales:

- Bien, la señal inicial global, z_0 , y todas menos una, las fracciones y_k , $k = 1, \dots, n_c - 1$, de lo cual se pueden obtener las contribuciones a la señal inicial correspondiente a cada componente, $z_{0,k}$, $k = 1, \dots, n_c$.
- O bien, partir directamente de dichas contribuciones $z_{0,k}$, $k = 1, \dots, n_c$.

Considérese ahora el caso en el que la predicción se realiza en términos de funciones, F , como en el caso de la ecuación de Lamm, ecuación II.12 o II.13, o cualquier otro procedimiento numérico que involucre una expresión del tipo:

$$c_k(r, t) = c_0 F(r, t; s_k, D_k, \omega, r_m, \dots) \quad (\text{V.24})$$

donde

$$F(r, t; s_k, D_k, \omega, r_m, \dots) = \frac{c_k(r, t)}{c_0} \quad (\text{V.25})$$

es una función, explícita o numérica, de las características de la especie sedimentante, s_k , D_k , de las características instrumentales ω , r_m , y quizás de otros datos instrumentales. En el caso de la ecuación de Faxén, se tendría

$$F(r, t; s_k, D_k, \omega, r_m, \dots) = \left[\frac{e^{-2s_k\omega^2 t}}{2} \right] \left[1 - \Phi \left(\frac{r_m[s_k\omega^2 t + \ln r_m - \ln r]}{2\sqrt{D_k}t} \right) \right] \quad (\text{V.26})$$

En otros casos, F se obtendrá por otros métodos: solución numérica de la ecuación de Lamm según ciertos autores, simulación browniana en este trabajo, etc. Dado que el cociente $c_k(r, t)/c_0$ es el mismo tanto si las concentraciones son másicas como molares, F coincide con el coeficiente de valores de la señal,

$$\frac{z_k(r, t)}{z_0} = F(r, t; s_k, D_k, \omega, r_m, \dots) \quad (\text{V.27})$$

Así, las ecuaciones expresadas para concentración se transforman, por el mero cambio de c por z , en ecuaciones para la señal.

V.5. Sobre el número de partículas en simulaciones brownianas

V.5.1. Elección del número de partículas

Una particularidad de las simulaciones de dinámica browniana de un sistema multicomponente estriba en cómo elegir el número de partículas $N_{part,k}$ a emplear en la simulación para cada especie, del total de N_{part} partículas. Ya se ha indicado que dicho número, con tal de que sea suficientemente grande (se sugería $N_{part} = 10^5$ para una especie individual), es bastante irrelevante, incidiendo únicamente en la incertidumbre o error estadístico del número partículas de la especie k que se encuentran en el intervalo de posición i en el instante de tiempo j , $n_k(i, j)$, y por consiguiente, en el correspondiente valor de la concentración de la especie k , $c_k(r_i, t_j)$. Podría elegirse el mismo número $N_{part,k}$ para todas las especies, pero esto parece un criterio inapropiado, ya que originaría incertidumbres similares para la distribución numérica de cada especie, esto es para $n_k(i, j)$, cuando la contribución de cada una a la señal global $z(r_i, t_j)$, es decir $z_k(r_i, t_j)$, va a ser diferente. Es por ello conveniente diseñar un procedimiento de elección de $N_{part,k}$ que tenga en cuenta tales distintas influencias.

V.5. SOBRE EL NÚMERO DE PARTÍCULAS EN SIMULACIONES BROWNIANAS

Como cuestión previa, se puede fijar el número total de partículas

$$N_{part} = \sum_{k=1}^{n_c} N_{part,k} \quad (V.28)$$

a un valor determinado, por ejemplo $N_{part} = 10^5$, dándose por otra parte la relación obvia (para cualquier instante t_j):

$$N_{part,k} = \sum_i n_k(i, j) \quad (V.29)$$

El error o ruido estadístico (absoluto) de los números de partículas $n_k(i, j)$, como se ha podido apreciar en los ejemplos anteriores, no depende apreciablemente de la posición (i) o del instante (j). La estadística de este error $e(n_k)$ es la propia de un ruido gaussiano, verificándose la típica proporcionalidad del error con el tamaño de la muestra

$$e(n_k) = \frac{E}{\sqrt{N_{part,k}}} \quad (V.30)$$

donde la constante E es la misma para los distintos tipos de partículas k . La concentración (para un intervalo de posición e instante determinados) se obtiene a partir del número de partículas a partir de la ecuación IV.16, si se tiene en cuenta la dilución radial, o bien mediante la ecuación IV.9 si no se considerase la dilución radial. Se va a elegir ésta última para el presente propósito por ser más simple y porque ya sabemos el escaso efecto de la dilución radial. Se reescribe entonces la ecuación IV.9 en la siguiente forma (por simplicidad se omite la dependencia obvia de z_k , c_k , y n_k con la posición y el tiempo),

$$c_k \pm e(c_k) = c_{0,k} \frac{(r_b - r_m)}{\chi} \frac{1}{N_{part,k}} [n_k \pm e(n_k)] \quad (V.31)$$

Si se tiene en cuenta la relación de la concentración de cada especie con la señal, ecuación II.13, incluyendo los errores, la ecuación anterior puede escribirse como:

$$z_k \pm e(z_k) = \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} [c_k \pm e(c_k)] \quad (V.32)$$

Esto conduce a:

$$z_k \pm e(z_k) = \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} c_{0,k} \frac{(r_b - r_m)}{\chi} \frac{1}{N_{part,k}} \left[n_k \pm \frac{E}{\sqrt{N_{part,k}}} \right] \quad (V.33)$$

Por tanto,

$$z_k = \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} c_{0,k} \frac{(r_b - r_m)}{\chi} \frac{1}{N_{part,k}} n_k \quad (\text{V.34})$$

y

$$e(z_k) = \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} c_{0,k} \frac{(r_b - r_m)}{\chi} \quad (\text{V.35})$$

De manera que el error de la señal total, $z = \sum_{k=1}^{n_c} z_k$, será $e(z) = \sum_{k=1}^{n_c} e(z_k)$ (el error absoluto de la suma es la suma de los errores absolutos), es decir

$$e(z) = \sum_{k=1}^{n_c} \frac{q_k}{M_k^{\alpha_k}} c_{0,k} \frac{(r_b - r_m)}{\chi} \frac{E}{\sqrt{N_{part,k}}} \quad (\text{V.36})$$

Se introduce ahora una fracción en número referida al número de partículas simuladas:

$$\phi_k = N_{part,k} / \sum_{k=1}^{n_c} N_{part,k} = N_{part,k} / N_{part} \quad (\text{V.37})$$

de manera que

$$\sum_{k=1}^{n_c} \phi_k = 1 \quad (\text{V.38})$$

De lo anterior se deduce:

$$e(z) = \frac{(r_b - r_m)E}{\chi \sqrt{N_{part}}} \sum_{k=1}^{n_c} \frac{c_{0,k}(q_k/M_k^{\alpha_k})}{\sqrt{\phi_k}} \propto \sum_{k=1}^{n_c} \frac{z_{0,k}}{\sqrt{\phi_k}} \quad (\text{V.39})$$

Otra línea de razonamiento, más simplificada, que conduce al mismo resultado es la siguiente. En la simulación del reparto en las posiciones de las partículas simuladas, el valor que debiera salir, n_k , lleva asociado un error, $e(n_k)$: $n_k \pm e(n_k)$. El error relativo es inversamente proporcional a la raíz del número de partículas, $e(n_k)/n_k \propto 1/\sqrt{N_{part,k}}$. Como la contribución de una especie a la señal es directamente proporcional al número de partículas de esa especie, se tiene

$$\frac{e(n_k)}{n_k} = \frac{e(z_{0,k})}{z_{0,k}} \propto \frac{1}{\sqrt{N_{part,k}}} \quad (\text{V.40})$$

de donde

$$e(z_{0,k}) \propto \frac{z_{0,k}}{\sqrt{N_{part,k}}} \quad (\text{V.41})$$

El error global en z_0 sería la suma de estos errores para cada componente, por tanto

$$e(z) \propto \sum_{k=1}^{n_c} \frac{z_{0,k}}{\sqrt{\phi_k}} \quad (\text{V.42})$$

que es de la misma forma que la ecuación V.39.

Una función de las variables ϕ_k como la ecuación V.39, con la condición de normalización de la ecuación V.38, se minimiza por el método de multiplicadores de Lagrange obteniéndose como resultado que los valores óptimos satisfacen

$$\phi_k = \frac{z_{0,k}^{2/3}}{\sum_{k=1}^{n_c} z_{0,k}^{2/3}} = \frac{y_k^{2/3}}{\sum_{k=1}^{n_c} y_k^{2/3}} \quad (\text{V.43})$$

Con estos ϕ_k se hará el reparto entre las distintas especies del total de partículas simuladas.

V.5.2. Relación entre el número de partículas y la señal

Como resultado primario de la simulación browniana, se tiene, para cada instante de tiempo t_j considerado, una distribución, sobre los intervalos de posición r_i , de las $N_{part,k}$ partículas simuladas para cada especie, es decir, se tiene una colección de valores $n_k(i, j)$. Sobre la base de que la contribución a la señal de una especie y el número de partículas de esa especie son proporcionales, en una franja situada a una distancia r_i , de pequeña anchura χ , la relación de la señal a tiempo t_j respecto a señal a tiempo $t = 0$, que es el valor uniforme $z_{0,k}$, debe ser igual a la relación entre los números de partículas en esa franja para t y para $t = 0$:

$$\frac{z_k(r_i, t_j)}{z_{0,k}} = \frac{n_k(i, j)}{n_k(i, 0)} \quad (\text{V.44})$$

Como a $t = 0$ todas las partículas están distribuidas uniformemente, la relación entre el número de partículas de la especie k en la franja i , $n_{i,0}$, y el total de ellas, $N_{part,k}$, es igual a la relación entre el volumen de la franja y el volumen total de la célula (pues la concentración en ella es uniforme):

$$\frac{n_k(i, 0)}{N_{part,k}} = \frac{h\phi r\chi}{h\phi(r_b^2 - r_m^2)/2} = \frac{2r\chi}{r_b^2 - r_m^2} \quad (\text{V.45})$$

Combinando ambas relaciones se obtiene

$$z_k(r_i, t_j) = \left[\frac{z_{0,k}}{N_{part,k}} \frac{r_b^2 - r_m^2}{2r\chi} \right] n_k(i, j) \quad (\text{V.46})$$

siendo el término

$$\left[\frac{z_{0,k}}{N_{part,k}} \frac{r_b^2 - r_m^2}{2r\chi} \right] \quad (V.47)$$

el que permite transformar el número de partículas de la especie k en cada posición y tiempo en valores de la señal.

Nótese que en este razonamiento se ha considerado la dilución radial. Si ésta fuese ignorada, el término sería

$$\left[\frac{z_{0,k}}{N_{part,k}} \frac{r_b - r_m}{\chi} \right] \quad (V.48)$$

V.6. Ejemplos de muestras paucidisersas

V.6.1. Sistema bicomponente de proteínas: lisozima y fibrinógeno

Como primer ejemplo para la simulación se elige una muestra paucidisersa formada por dos componentes (proteínas) con valores muy distintos para el peso molecular y el coeficiente de sedimentación: lisozima y fibrinógeno. Tal y como se indica en la Tabla 12 del capítulo 5 del libro de Van Holde [36], la lisozima tiene un valor del peso molecular de 1.44×10^4 Da y un coeficiente de sedimentación, s , de 1.91 S. El fibrinógeno tiene valores más altos para estas mismas propiedades, peso molecular 33.0×10^4 Da y coeficiente de sedimentación $s = 7.9$ S. Sin embargo, dichas proteínas tienen un volumen específico parcial similar, siendo el valor que se toma para realizar las simulaciones de $0.705 \text{ cm}^3/\text{g}$ (para lisozima $\bar{v} = 0.703 \text{ cm}^3/\text{g}$ y para fibrinógeno $\bar{v} = 0.706 \text{ cm}^3/\text{g}$). Teniendo en cuenta los valores de los coeficientes de difusión y sedimentación mencionados para la lisozima y fibrinógeno, así como los valores de r_b (7.2 cm), r_m (5.8 cm) y tiempo de duración del experimento (15 h), se realiza la simulación para un valor de la velocidad angular, $\omega = 40\,000 \text{ rpm}$, típica de un experimento de velocidad. Por simplificar, se supone que se realizan las medidas con detección de interferencia, siendo entonces la contribución de cada especie proporcional a su masa ($\alpha_k = 0$), y que el índice de refracción diferencial dn/dc es similar (pues lo es para muchas proteínas), por lo que las constantes q_k también son idénticas. Como el valor adoptado unicamente implica la escala del eje de ordenadas en los perfiles $z(r, t)$ se toma $q_1 = q_2 = 1$, de manera que z coincida con la concentración total de proteína. El número total de moléculas utilizado en esta simulación fue $N_{part} = 10^5$, repartidas entre las dos especies de acuerdo con la ecuación V.48 siendo y_k en este caso la fracción en peso, de acuerdo con la ecuación V.22. Los perfiles de con-

centración correspondientes a los resultados mediante la simulación pueden observarse en la Figura V.1.

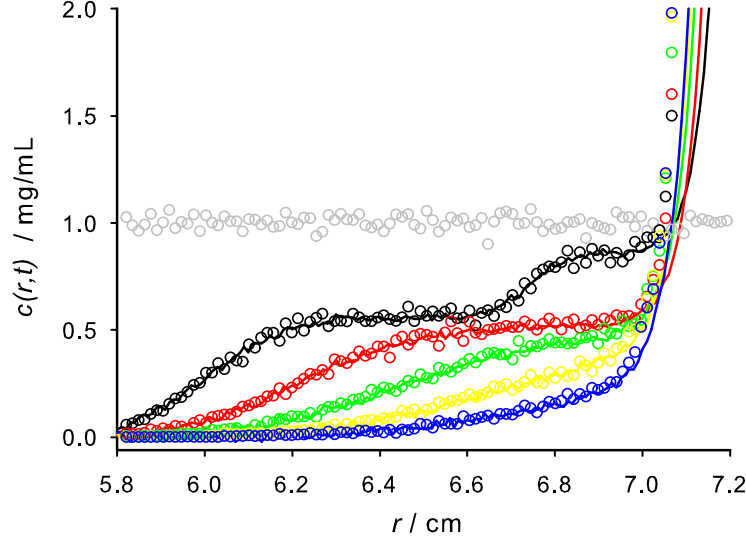


Figura V.1: Perfil de concentración de la muestra paucidispersa formada por lisozima y fibrinógeno con $r_m = 5.8$ cm, $t_{run} = 54\,000$ s y velocidad angular $\omega = 40\,000$ rpm. Los perfiles están realizados para los tiempos 0 s (gris), 10 800 s (negro), 21 600 s (rojo), 32 400 s (verde), 43 200 s (amarillo) y 54 000 s (azul). Pueden observarse los resultados de las simulaciones con $N_{steps} = 50$ (círculos abiertos) junto con los perfiles predichos por SEDFIT (líneas finas). La fracción en peso de la lisozima es 0.6 y la del fibrinógeno 0.4.

Los perfiles de concentración mostrados en la Figura V.1 tienen forma de escalón, sobre todo a tiempos altos, pudiéndose distinguir claramente las partes que corresponden a cada una de las dos especies presentes en la muestra. Dicha forma se debe a la importante diferencia que existe entre los coeficientes de sedimentación de ambas moléculas. Se recuerda que la lisozima tiene un coeficiente de sedimentación de 1.91 S mientras que el del fibrinógeno es de 7.9 S. Así, la parte superior del escalón se corresponde con el fibrinógeno. Dicha proteína, debido a su mayor coeficiente de sedimentación, consigue llegar al fondo de la célula (sedimenta) mucho antes que la lisozima, traduciéndose esto en una mayor separación entre las curvas $z(r, t)$ para tiempos consecutivos. Este efecto se hace más intenso para tiempos largos, ya que todo el fibrinógeno de la muestra ha sedimentado mientras que la lisozima todavía no.

Para finalizar se comparan los resultados obtenidos de las simulaciones de experimentos de velocidad de sedimentación realizadas con **SIMUSED** con los calculados con el software **SEDFIT** [27]. Al igual que en el caso de muestras monodispersas, el objetivo de esta comparación es la determinación de lo precisos que son los resultados obtenidos con nuestro programa.

Como se muestra en la Figura V.1, los perfiles procedentes de nuestras simulaciones tanto de velocidad como de equilibrio y los predichos por **SEDFIT** son superponibles, lo que indica que, al menos en la capacidad predictiva, nuestro programa es equivalente al conocido **SEDFIT**.

V.6.2. Sistema tricomponente de fragmentos cortos de ADN.

En este apartado se van a considerar sistemas de moléculas cuya conformación puede asemejarse a una varilla rígida. Este modelo puede considerarse una simplificación del modelo vermiforme, el cual se explicará detalladamente en la siguiente sección. Como ejemplos pueden citarse, complejos moleculares como el virus del mosaico del tabaco [119] o pequeños fragmentos de ADN [120]. Se considera que estas moléculas tienen una conformación rígida, alargada y rectilínea adaptándose así al modelo de cilindro, incluido en las metodologías desarrolladas previamente por el Grupo de Investigación e implementadas en el conjunto de programas **HYDRO**. Las moléculas que se adaptan a este modelo quedan totalmente descritas por dos parámetros, d y M_L , a partir de los cuales, y utilizando la metodología **HYDRO**, se pueden obtener los valores de los coeficientes de sedimentación necesarios para simular los perfiles de concentración de un experimento de AUC. Concretamente, se muestran aquí simulaciones de experimentos de velocidad de un sistema tricomponente formado por tres fragmentos cortos (menos de 100 pares de bases) de ADN. La conformación de cada uno de estos fragmentos puede asemejarse a una varilla rígida. Los parámetros del modelo cilíndrico que se han usado son: $d = 2.3$ nm y $M_L = 1950$ Da/nm. La Figura V.2 ilustra un ejemplo de los perfiles de concentración predichos por **SIMUSED** para el sistema indicado.

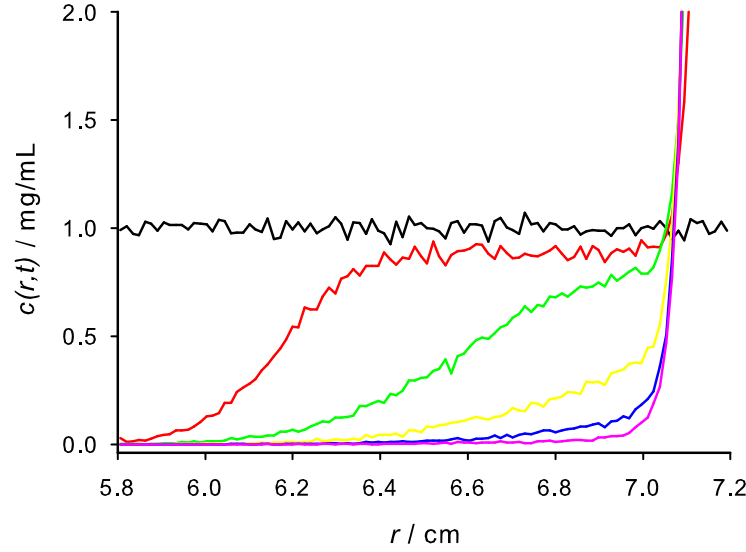


Figura V.2: Perfiles de concentración obtenidos para una muestra paucidisepa de tres componentes: ADN de 20 pares de bases (fracción en peso 0.30), de 40 (fracción en peso 0.40) y de 60 (fracción en peso 0.30) con $N_{part} = 100\,000$, $r_m = 5.8$ cm, $t_{run} = 54\,000$ s y velocidad angular $\omega = 40\,000$ rpm. Los perfiles, de izquierda a derecha, corresponden a tiempos entre 0 a 54 000 s en intervalos de 5400 s.

V.7. Ejemplos de muestras polidispersas

V.7.1. Polímero sintético (PEO) con una relación s-M potencial

En este caso, se escoge como ejemplo para realizar las simulaciones una muestra polidispersa de óxido de polietileno (PEO). El tipo de distribución elegida para generar los valores de M_k para un rango de pesos moleculares suficientemente elevados del tipo potencial, es una distribución log-normal del tipo de la ecuación V.9, y la ecuación que permite relacionar s_i con M_k es $s = K_s M^{a_s}$. Como se ha indicado en la sección IV.4, para este polímero $K_s = 6.14 \times 10^{-3}$ y $a_s = 0.47$, y el valor del volumen específico parcial es $0.83 \text{ cm}^3/\text{g}$ [113].

Teniendo en cuenta el valor de las variables comentadas así como los valores de r_b (7.2 cm), r_m (5.8 cm) y tiempo de duración ($t_{run} = 54\,000$ s) se realiza la simulación para un valor típico de velocidad de sedimentación en la velocidad angular, $\omega = 40\,000$ rpm. Tratándose de un homopolímero, la señal es proporcional a la concentración de las unida-

des monoméricas. La contribución a la señal de todas las cadenas de cierto peso molecular M_k es proporcional al número de monómeros incorporados en ellas, y proporcional por tanto a su concentración másica, c_k , con lo cual según la ecuación V.20 se está de nuevo en el caso $\alpha_k = 0$, y q_k es el mismo para todos ellos. El número total de moléculas utilizado en esta simulación fue $N_{part} = 10^5$ repartidas entre las sucesivas fracciones de acuerdo con la ecuación V.48. Los perfiles de concentración correspondientes a los resultados mediante la simulación pueden observarse en la Figura V.3.

Observando la Figura anterior se infiere que existen diferencias entre los tres perfiles de concentración que se han obtenido variando parámetros de la curva de distribución del peso molecular que se suministra al programa desarrollado para realizar las simulaciones (ecuación V.9), que son M_m (valor de máxima probabilidad, en peso) y σ (anchura de la curva de distribución). El propósito de las simulaciones de estos “perfiles ficticios” es observar cómo se modifican los perfiles al cambiar los valores de esos parámetros. Para realizar la simulación de la que se obtienen como resultados los perfiles del caso B se ha aumentado el valor del $\ln M_m$. Se observa que, en las Figuras V.3B y V.3C se alcanza antes el fondo que en la Figura V.3A, es decir, las muestras B y C sedimentan antes que la A debido a que esta última muestra posee un peso molecular menor que las otras dos. La anchura de las curvas se mantiene prácticamente invariable en los casos A y B ya que σ , que es la magnitud que mide dicha anchura, es la misma, mientras que en la curva C los perfiles son más horizontales (sobre todo a tiempos altos) debido a la menor polidispersidad (menor valor para σ).

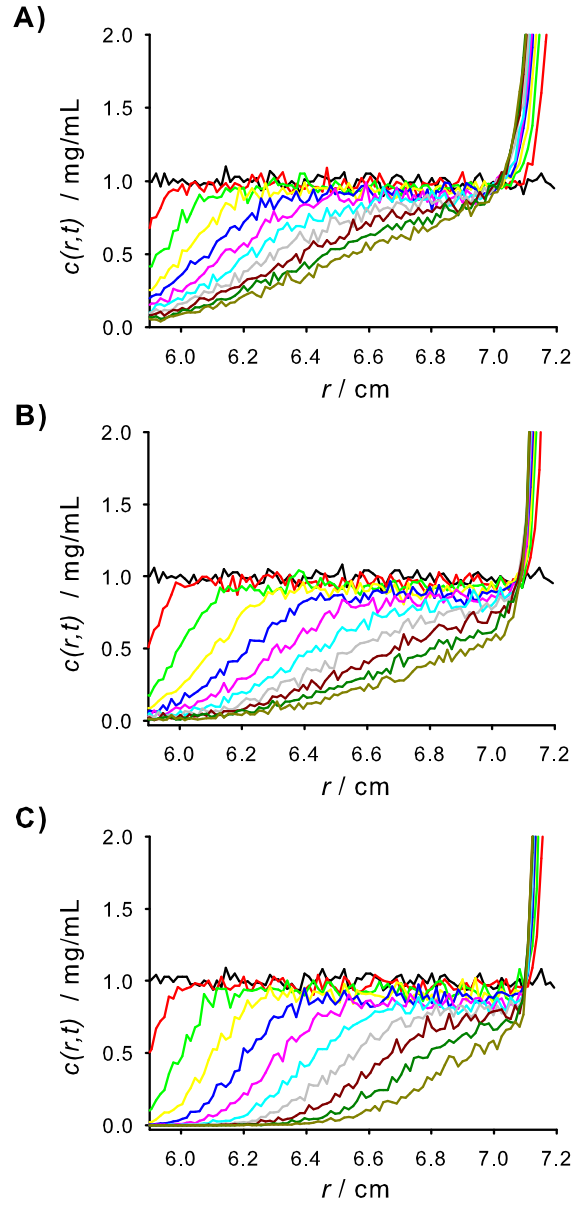


Figura V.3: Perfiles de concentración para tres muestras de PEO con $r_m = 5.8$ cm, $t_{run} = 54\,000$ s y velocidad angular $\omega = 40\,000$ rpm. Los perfiles están realizados para tiempos que van (de derecha a izquierda) desde 0 a $54\,000$ s en intervalos de $5\,400$ s. Los valores de K_s y a_s son 6.14×10^{-3} y 0.47 , respectivamente. El número de intervalos elegidos para la distribución de peso molecular es 21, siendo el valor más pequeño $8\,000$ Da y el mayor $500\,000$ Da, siendo la escala logarítmica. A) $\ln(M_m = 59\,900) = 11$, $\sigma = 0.8$; B) $\ln(M_m = 162\,700) = 12$, $\sigma = 0.8$; C) $\ln(M_m = 162\,700) = 12$, $\sigma = 0.1$.

V.7.2. Cadenas de ADN vermiforme

Por último, se realizaron simulaciones de experimentos de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de moléculas sedimentantes que se adaptan al modelo de cadena vermiforme. Dicho modelo cubre desde varillas rígidas a cadenas totalmente flexibles.

Las propiedades de algunos polímeros sintéticos así como ciertas macromoléculas biológicas quedan bien descritas mediante el modelo de cadena vermiforme [121]. Según la terminología estándar, el modelo de cadena vermiforme se utiliza para representar “una macromolécula hipotéticamente lineal compuesta por una cadena infinitamente delgada con curvatura constante, siendo la dirección de la curvatura aleatoria en cualquier dirección”. El modelo describe todo el espectro de cadenas con diferentes grados de rigidez, desde varillas rígidas a cadenas totalmente flexibles, y se usa particularmente para representar cadenas rígidas. En la literatura algunas veces se refieren a esta cadena como cadena de Porod-Kratky [122]. Un ejemplo típico de molécula vermiforme es la doble hélice de ADN. Asimismo, también representa de manera adecuada a otros biopolímeros como polisacáridos. Todo ello demuestra la importante aplicabilidad de este modelo.

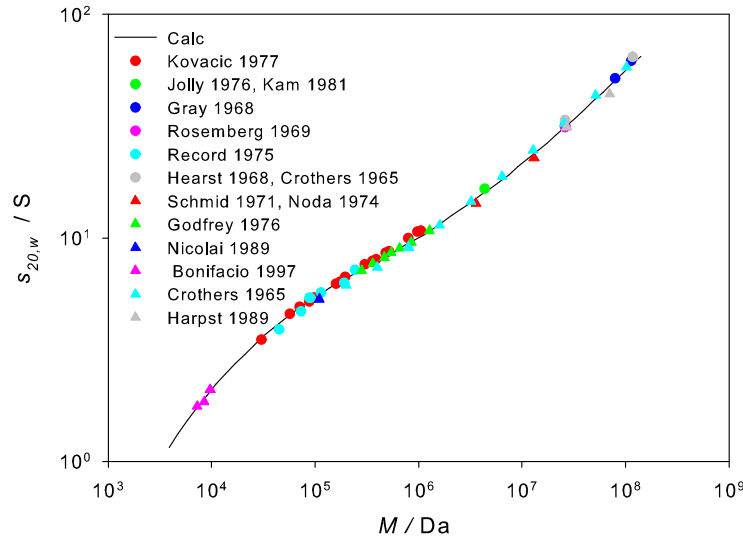


Figura V.4: Representación de los valores calculados y experimentales de la sedimentación de la molécula de ADN con $a = 56$ nm, $d = 2.3$ nm y $M_L = 1\,950$ Da/nm frente al peso molecular. Las referencias completas de los datos experimentales se encuentran en [103].

En un trabajo previo [103], el Grupo ha desarrollado una metodología para determinar las propiedades en disolución, entre ellas el coeficiente de sedimentación, de macromoléculas vermiformes de un cierto peso molecular, en términos de los valores de los tres parámetros del modelo: longitud de persistencia (a), diámetro hidrodinámico (d), y masa por unidad de longitud (M_L) (ver Figura V.4). Así, el coeficiente de sedimentación de cada una de las fracciones de la muestra, s_i , puede considerarse como una función, S , del peso molecular M_i , con esos tres parámetros:

$$s_i = S(M_i; a, M_L, d) \quad (\text{V.49})$$

La rutina para evaluar esta función ya fue construida en el mencionado estudio realizado por el Grupo de Investigación sobre macromoléculas vermiformes.

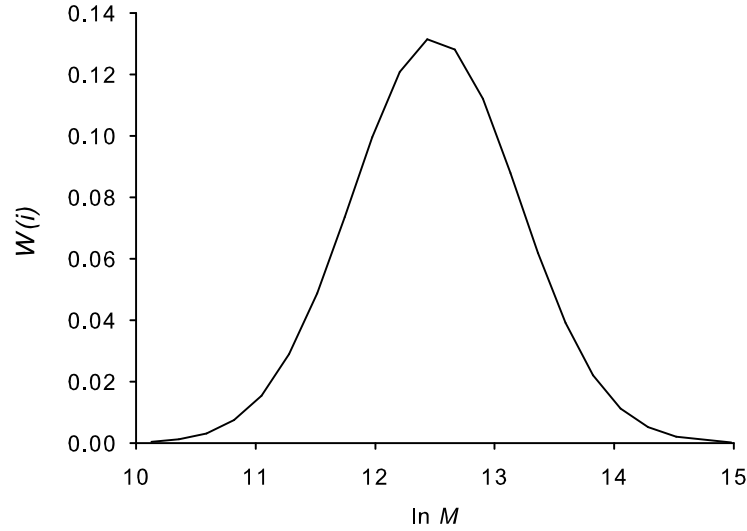


Figura V.5: Distribución log-normal que viene descrita por una ecuación del tipo V.9 utilizando como parámetros: $\ln M_m = 12.5$ y $\sigma = 0.7$.

Considerando que s_i no es realmente una variable sino una función de M_i , en lugar de $c(r, t; \omega; M_i, s_i)$ se puede poner $c(r, t; \omega; a, M_L, d; M_i)$, y escribir la forma general del perfil de concentración como la suma sobre todas las especies

$$c(r, t; \omega; W; a, M_L, d) \equiv c(r, t; \omega; p_1, p_2, \dots; a, M_L, d) = \sum w_i c(r, t; \omega; a, M_L, d; M_i) \quad (\text{V.50})$$

En resumen, la predicción de los perfiles de sedimentación de macromoléculas vermiformes polidispersas requiere:

- Información sobre la distribución de pesos moleculares. Bien la serie de valores (w_i, M_i) directamente, o bien calculada mediante una función W , con los parámetros $p_1, p_2, \dots$
- Parámetros del modelo vermiforme, a , M_L , y d , y la mencionada rutina de cálculo de s .
- La rutina para calcular el perfil $c(r, t; \omega; M_i, s_i)$ mediante dinámica browniana desarrollada en este trabajo.

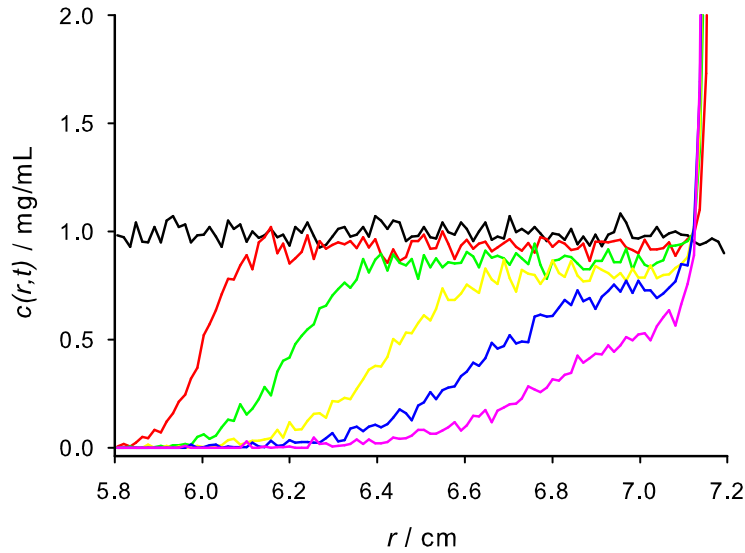


Figura V.6: Perfiles de concentración obtenidos mediante simulación de dinámica browniana de una muestra de ADN con $N_{part} = 100\,000$, $r_m = 5.8$ cm, $t_{run} = 54\,000$ s y velocidad angular $\omega = 20\,000$ rpm. Los perfiles, de izquierda a derecha, se corresponden a tiempos entre 0 a 54 000 s en intervalos de 5400 s. Los parámetros del modelo vermiforme son: $a = 56$ nm, $d = 2.3$ nm y $M_L = 1950$ Da/nm. El número de intervalos elegidos para la distribución es 21, siendo el valor más pequeño 25 000 y el mayor 3 200 000 Da, siendo la escala logarítmica. Los parámetros de la distribución log-normal utilizados son: $\ln M_m = 12.5$ y $\sigma = 0.7$.

Tal y como se ha comentando anteriormente, el mejor ejemplo de la aplicabilidad del modelo vermiforme es la doble hélice de ADN. Por este motivo, esta molécula es la elegida

para mostrar los resultados procedentes de nuestras simulaciones de dinámica browniana que implementan dicho modelo. El tipo de distribución elegida para generar los valores de M_i es una distribución log-normal del tipo de la ecuación V.9. La distribución elegida se muestra en la Figura V.5. Los parámetros del modelo vermiforme para la molécula de ADN son, como se menciona en [103], $a = 56 \text{ nm}$, $d = 2.3 \text{ nm}$ y $M_L = 1\,950 \text{ Da/nm}$. Utilizando estos parámetros, la relación $s - M$ para ADN es la que se muestra en la Figura V.4, tomada de un trabajo del Grupo de Investigación [103].

La Figura V.6 muestra perfiles de concentración para cadenas largas de ADN que adoptan el modelo vermiforme.

Capítulo VI

El problema inverso

VI.1. Generalidades

Como se ha indicado en capítulos anteriores, el objetivo de las medidas de ultracentrifugación analítica es obtener información sobre la composición (pesos moleculares, M , coeficientes de sedimentación, s), y las características moleculares (conformación, flexibilidad, relaciones s - M , etc) de la muestra sedimentante.

En las secciones anteriores de esta Tesis se ha descrito cómo predecir perfiles de sedimentación, esto es, el valor de la señal óptica z en cada posición radial de la celda r y en cada instante de tiempo t : $z(r, t)$. El objetivo es, sin embargo, el problema inverso: obtener información a partir de los perfiles $z(r, t)$. Ya se ha visto cómo, en casos muy sencillos como el de una única especie, se puede hacer algo en este sentido: determinar el coeficiente de sedimentación, s , por velocidad de sedimentación a partir del avance del frente sedimentante en una muestra monodispersa, o determinar el peso molecular M mediante los perfiles en equilibrio de sedimentación. Pero hay situaciones más complicadas, como puede ser la polidispersidad, o el análisis del efecto de la difusión, en los que se desearía obtener más información que un simple valor de s , y estas situaciones requieren métodos más complejos.

Como continuación del desarrollo de un método original para la predicción de $z(r, t)$, se emprendió el desarrollo de métodos de análisis basados en la simulación de dinámica browniana expuesta en IV.1, lo cual se presenta en este Capítulo.

VI.2. Planteamiento

De un experimento de ultracentrifugación analítica (o de cada una de las celdas que se pueden montar en el rotor y monitorizar en un experimento), resultan una serie de *scans* o perfiles de sedimentación, dados por valores de la señal para diversas posiciones radiales en una serie de instantes, $z_{exp}^{(e)}(r_i, t_j)$. El superíndice e hace referencia a los diversos experimentos que se van a analizar conjuntamente. El ajuste de los datos experimentales se hace, como es habitual, por un procedimiento de mínimos cuadrados, en el que se minimiza el valor cuadrático de la diferencia entre esos valores experimentales, $z_{exp}^{(e)}(r_i, t_j)$, y los calculados, $z_{cal}^{(e)}(r_i, t_j)$, debidamente normalizada sobre el conjunto de datos, cuyo número viene determinado por el número de valores de r y de t , N_r y N_t respectivamente, que son tenidos en cuenta en el ajuste. De este modo, el número total de datos para el ajuste será $N_r N_t$ y la función a minimizar para un experimento determinado definido por el superíndice (e) , se puede escribir

$$[\Delta^{(e)}(p_1, p_2 \dots)]^2 = \frac{1}{N_t N_r} \sum_{j=1}^{N_t} \sum_{i=1}^{N_r} [z_{cal}^{(e)}(r_i, t_j; p_1, p_2 \dots) - z_{exp}^{(e)}(r_i, t_j)]^2 / [z_0^{(e)}]^2 \quad (\text{VI.1})$$

Nótese que la desviación cuadrática media se hace relativa a un valor de referencia característico del experimento considerado: el valor de la señal inicial uniforme $z_0^{(e)}$. Nótese también que el valor de la señal calculada $z_{cal}^{(e)}(r_i, t_j; p_1, p_2 \dots)$ depende de los valores que tomen los parámetros $p_1, p_2, \dots$ que caracterizan la muestra (coeficiente de sedimentación, peso molecular, etc); el objetivo del ajuste es, por tanto, obtener el conjunto de valores de esos parámetros que minimizan la función desviación cuadrática media, $[\Delta^{(e)}(p_1, p_2 \dots)]^2$. El valor $\Delta^{(e)} = \sqrt{[\Delta^{(e)}]^2}$ puede considerarse como un error relativo en el ajuste de ese experimento.

Como en nuestro procedimiento se pueden analizar conjuntamente varios experimentos, se ha de considerar una desviación cuadrática global, Δ^2 , que se formula en términos de unos pesos estadísticos, G_e , que se dan a cada experimento en el ajuste:

$$[\Delta(p_1, p_2 \dots)]^2 = \frac{1}{N_e} \sum_{e=1}^{N_e} G_e [\Delta^{(e)}(p_1, p_2 \dots)]^2 \quad (\text{VI.2})$$

donde N_e es el número de experimentos considerados en el ajuste y los pesos estadísticos están normalizados a la unidad, $\sum_{e=1}^{N_e} G_e = 1$. El valor $100\Delta = 100\sqrt{\Delta^2}$ puede considerarse

como un error relativo (en tanto por ciento) correspondiente al ajuste global de todos los experimentos.

La desviación cuadrática Δ^2 es, por tanto, una función de un conjunto de parámetros $p_1, p_2, \dots$ correspondientes a propiedades de la muestra, que son comunes a todos los experimentos y que se especificarán según los casos. El cálculo de los perfiles de sedimentación para cierto conjunto de valores de los parámetros, es decir, el cálculo de $z_{cal}^{(e)}(r_i, t_j; p_1, p_2 \dots)$, se realiza con el mismo procedimiento que emplea el programa **SIMUSED**, según se ha explicado en los capítulos anteriores. El problema ahora se centra en encontrar el mínimo de una función $\Delta^2(p_1, p_2 \dots)$ cuyas variables son los parámetros.

VI.3. Método de ajuste y minimización

Se trata, pues, de un complicado problema de minimización, de una función no lineal, no explícita, y con un número de variables que puede ser bastante considerable, con características diferentes según se trate de una muestra paucidispersa o de polidispersidad continua. Para abordarlo se ha elegido el método conocido como **SIMPLEX** [68], ya mencionado al tratar con **SEDFIT**. En concreto, se utiliza la subrutina **AMOEB**A tomada de Numerical Recipes [123], que implementa un famoso algoritmo diseñado por Nelder y Mead [124]. El método se inicializa dando una estimación inicial de cada parámetro, $p_i^{(0)}$ ($i = 1, 2, \dots$) donde el superíndice (0) indica estimación inicial, así como la anchura del rango de valores en el que se realizará la exploración de mínimos, λ_i . Como los diversos parámetros tendrán diferentes órdenes de magnitud, una elección conveniente es $\lambda_i = \lambda p_i^{(0)}$, donde λ es una constante, la misma para todos ellos (se ha encontrado que valores de λ en el rango 0.5 – 0.1 son adecuados). La subrutina trata, en sucesivas iteraciones, de efectuar nuevas estimaciones de $p_1, p_2, \dots$ que reduzcan el valor de $\Delta^2(p_1, p_2 \dots)$. Aunque obvio, es de notar que en cada iteración ha de realizarse un cálculo de $z_{cal}(r_i, t_j; p_1, p_2 \dots)$, equivalente a una ejecución completa del programa de simulación **SIMUSED**. Las iteraciones de **AMOEB**A se detienen cuando, tras cierto número de iteraciones sucesivas, Δ^2 apenas se reduce (reducción inferior a cierta tolerancia que es la diferencia relativa, en “tanto por uno”, en Δ^2). Es necesario indicar que este método presenta apreciables inconvenientes, tales como un procedimiento muy simplista de búsqueda, poca eficacia en dirigirse hacia el mínimo, y la posibilidad de detenerse en un mínimo local que puede ser muy lejano del

mínimo absoluto que se desea encontrar. Por contra, la ventaja es su gran generalidad y su gran insensibilidad a la elección de los valores iniciales de los parámetros, $p_i^{(0)}$.

En el caso de una muestra paucidispersa con n_c componentes, el conjunto de parámetros lo forman el coeficiente de sedimentación de cada componente k , s_k , el peso molecular de cada componente k , M_k , y la contribución fraccional a la señal inicial de cada componente k , $y_k = z_k/z_0$. Así, el número de parámetros a determinar, o variables de la función Δ^2 , es $3n_c - 1$ ya que uno de los y_k es determinado por el resto de ellos dado que $\sum_k y_k = 1$.

En el caso de la muestra polidispersa, $p_1, p_2, \dots$ será el conjunto de los parámetros que determinan la función de distribución de pesos moleculares, junto con los parámetros que intervienen en la relación s - M .

VI.4. Programa ANASED

Con base en todo lo anterior, se ha desarrollado un programa de ordenador, **ANASED**, para el análisis de los perfiles de sedimentación. El programa admite dos variantes, una para sistemas multicomponentes paucidispersos, y otra para sistemas con polidispersidad continua. Se adjunta al programa un manual de usuario con información completa sobre su uso, por lo se describirán aquí solamente los datos más importantes requeridos por el programa (otros de menor relevancia se indican en el manual).

En primer lugar, el programa requiere que se le indique:

- Número de experimentos a analizar (o, más habitualmente, número de células en un experimento con múltiples células).

A continuación, para cada célula o experimento, un bloque de datos que contiene:

- Peso estadístico de ese experimento en el ajuste, G_e .
- Velocidad angular del rotor en ese experimento, ω .
- Posiciones del menisco y fondo de la célula, r_m y r_b .
- El rango de valores de r que se utilizarán en el análisis, r_{min} y r_{max} (lógicamente, el primero igual, o habitualmente superior, a r_m , y el segundo igual, o habitualmente inferior, a r_b).

- El rango de valores de tiempo de los *scans* que se incluirán en el análisis, t_{min} y t_{max} (siendo éste último, lógicamente, igual o inferior a la duración del experimento, t_{run}).

(Nótese que estos rangos determinarán los valores de r y t , y por tanto, el número total de puntos incluido en el ajuste, $N_r N_t$).

- El valor inicial de la señal uniforme en toda la célula (absorbancia o número de franjas).

A continuación se indican los datos para el cálculo de perfiles:

- Número total de partículas a emplear en la simulación browniana, N_{part} .
- Semilla de números aleatorios para dicha simulación.

Sigue un bloque de datos a emplear en el ajuste por la subrutina AMOEBA:

- Número máximo de iteraciones (ITERMAX).
- Tolerancia para detener las iteraciones (TOL).
- Factor que define el rango de valores de los parámetros a explorar, λ .

A continuación, un indicador del modo de análisis, según el tipo de muestra:

- 1 - Sistema paucidiserso , 2 - sistema polidiserso.

El siguiente bloque de datos depende del modo de análisis. Para muestras paucidisersas:

- Número de componentes, n_c .
- Para cada componente, k , un subbloque con tres valores correspondientes a estimaciones iniciales de: 1) el peso molecular flotante, $M_{b,k}^{(0)}$, 2) el coeficiente de sedimentación $s_k^{(0)}$, y 3) la fracción de contribución a la señal $y_k^{(0)} = z_{0,k}^{(0)}/z_0$. (El superíndice (0) indica estimación inicial).

Para muestras polidisersas:

- Rango de valores M_{min} y M_{max} , elegidos de manera que con seguridad queden entre ellos los M que componen la muestra.

- Tipo de distribución de pesos moleculares, y parámetros de la misma. Por ejemplo: tipo 1: distribución de Schulz, parámetros Z e y_m ; tipo 2, distribución log-normal, parámetros $\log M_m$ y σ ; etc.
- Tipo de relación s - M , y sus parámetros. Por ejemplo, tipo 1: relación potencial, $s = K_s M^{a_s}$, parámetros K_s y a_s ; tipo 2: varilla cilíndrica, parámetros M_L y d ; tipo 3: cadena vermiforme, parámetros M_L , d y a ; etc.

ANASED produce un informe con los valores de los parámetros obtenidos en el ajuste, junto a información sobre el mismo tal como el número de iteraciones que ha realizado, ITER, y las desviaciones cuadráticas en la señal ajustada, Δ^2 . Además, se ha incorporado en el programa una llamada a la herramienta gráfica GNUPLOT [111], como ya se hizo en el programa SIMUSED, que permite visualizar inmediatamente un gráfico para cada experimento, con los valores de $z_{cal}^{(e)}(r, t)$ superpuestos a los valores de $z_{exp}^{(e)}(r, t)$, representados frente a r para un cierto conjunto de valores de t (*scans*), así como las diferencias (residuales). La calidad de los gráficos y la capacidad de controlarlos es reducida con GNUPLOT, por lo que nuestro programa también produce un archivo con todos estos valores para que puedan ser post-procesados o graficados mediante utilidades más avanzadas como SigmaPlot.

VI.5. Resultados. I. Sistemas paucidispersos, con datos experimentales “sintéticos”

Se realizaron una serie de ensayos del programa ANASED sobre perfiles “sintéticos” previamente generados con el programa SIMUSED. Todos esos perfiles “sintéticos” están realizados con la siguiente serie de datos comunes:

- Disolvente agua a $T = 20^\circ\text{C}$, $\rho = 1.0 \text{ g/cm}^3$.
- Posiciones de menisco y fondo de célula: $r_m = 5.80 \text{ cm}$, $r_b = 7.20 \text{ cm}$.
- Ángulo del sector de la célula: $\phi = 3^\circ$.
- Número de intervalos en los que se discretizan las posiciones y el tiempo: $N_r = 50$, $N_t = 50$.

- Número de partículas empleadas en la simulación de los perfiles: $N_{part} = 10^7$, de manera que la señal simulada tenga un ruido bastante bajo, como es típico en modalidad de interferencia.
- Señal total inicial uniforme en la muestra: $z_0 = 1.5$ (unidades arbitrarias).

El protocolo de ajuste consiste en una serie de pruebas sucesivas en las que se va aumentando el número de componentes. En los ajustes, se ignoran las zonas más próximas al menisco y al fondo de la célula, tomando $r_{min} = 6.0$ cm, y $r_{max} = 7.0$ cm. El número de partículas empleadas en las simulaciones llevadas a cabo por **ANASED** para realizar los ajustes fueron $N_{part} = 10^5$ o $N_{part} = 10^6$, de forma que se pueda evaluar la influencia de N_{part} en la precisión de los resultados.

VI.5.1. Ajuste monocomponente

Se describe, en primer lugar, cómo realizar un análisis monocomponente. Como norma general se toma, sea cual sea la muestra, una estimación inicial $s_1^{(0)} = 10$ S y $M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5$. Es conveniente advertir que para obtener resultados con sentido bajo unas condiciones de ajuste poco severas (por ejemplo, cuando se impone una tolerancia TOL mayor que 0.1) puede ser necesario utilizar valores iniciales de $M_{b,1}^{(0)}$ más ajustados a la realidad que 1.0×10^5 . Como resultado, **ANASED** produce unos valores ajustados finales s_1 y $M_{b,1}$. Se juzga el grado de bondad del ajuste según el valor de 100Δ y a la vista del gráfico.

VI.5.1.a. Lisozima

Como datos de partida de una muestra monodispersa típica, se consideraron los procedentes de simular la sedimentación de lisozima ($s_1 = 1.91$ S, y $M_{b,1} = 4250$ Da, valores tomados del libro de Van Holde [4]) mediante **SIMUSED** en dos condiciones experimentales: 1) régimen de velocidad, con velocidad angular $\omega = 40\,000$ rpm, y duración $t_{run} = 8$ h, y 2) régimen de aproximación al equilibrio, con $\omega = 10\,000$ rpm, y duración $t_{run} = 180$ h. Cuando se realiza el ajuste teniendo en cuenta ambos experimentos conjuntamente, lo que se designará con la nomenclatura (v+e), se asignan los pesos estadísticos, G_e , 0.6 y 0.4 para las condiciones 1 y 2, respectivamente. Se hace notar que la lisozima es suficientemente pequeña como para que en los experimentos de velocidad sea notable el efecto de la difusión, y por tanto la posibilidad de detectar en ellos el peso molecular.

experim.	N_{part}	TOL	ITER	s_1 / S	$M_{b,1} / Da$	$\Delta^2 \times 10^{-4}$	100Δ (%)
EX				1.91	4250		
v+e	10^6	0.3	42	1.92	4291	0.55	0.74
	10^6	0.2	44	1.91	4299	0.53	0.73
	10^6	0.1	48	1.91	4239	0.43	0.66
	10^6	0.02	92	1.91	4224	0.46	0.68
	10^5	0.3	36	1.88	4195	4.48	2.12
	10^5	0.1	38	1.91	4233	4.47	2.11
	10^5	0.02	46	1.91	4284	3.89	1.97
v	10^5	0.3	37	1.88	4482	4.4	2.1
	10^5	0.05	49	1.905	4216	3.85	1.96
e	$10^5, 10^6$ (+)	0.3	12	21.0	4812	76	8.7
	10^5	0.1	43	1.87	4235	4.7	2.17
	10^5	0.05	43	1.87	4235	4.7	2.17
	10^6	0.1	47	1.91	4236	0.48	0.69

Tabla VI.1: Resultados del ajuste de los datos experimentales simulados para lisozi-ma. EX: valores exactos (correspondientes a los datos experimentales simulados). v: análisis del experimento de velocidad; e: análisis del experimento de aproximación al equilibrio; v+e: análisis conjunto de ambos experimentos. (+)Prácticamente resultados iguales con ambos valores. En todos los casos anteriores utilizan como estimaciones iniciales $M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^4$, lo que es necesario para obtener valores razonables cuando $TOL > 0.1$,

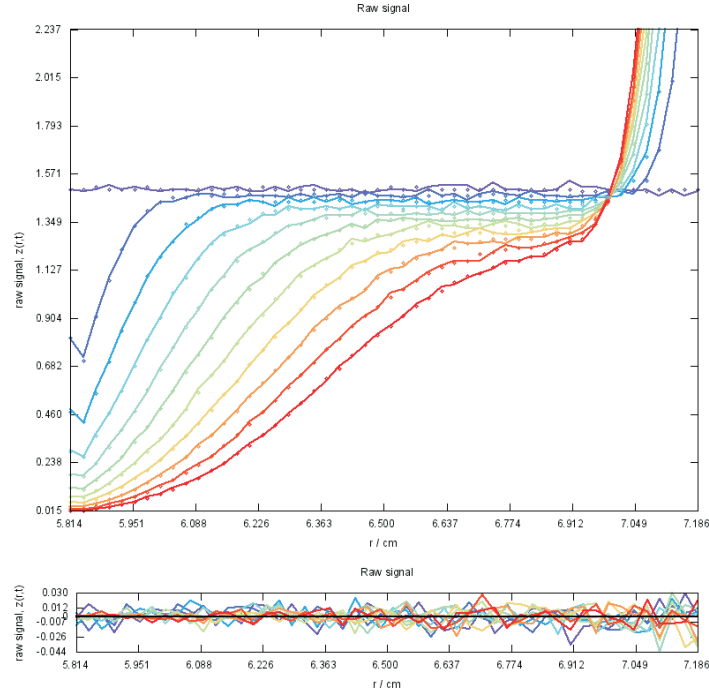
En primer lugar se realizaron ajustes conjuntos de los dos experimentos: velocidad y aproximación al equilibrio. Con un número de partículas para los cálculos de ajuste $N_{part} = 10^6$, se observa que la elección del factor λ para AMOEBA es bastante crítico, obteniéndose ajustes correctos con $\lambda = 0.5$. A su vez, con $N_{part} = 10^6$ y $\lambda = 0.5$ se observan buenos resultados con valores de TOL entre 0.3 y 0.02, obteniéndose para todos los casos resultados muy parecidos, como se indica en la Tabla VI.1. Para valores de λ superiores o inferiores (se han probado los valores 1.0 y 0.1) el método de ajuste diverge hacia un mínimo local muy alejado del mínimo absoluto.

Es de gran utilidad poder realizar los ajustes con un N_{part} tan bajo como sea posible, ya que el tiempo requerido para efectuar una evaluación de $z_{cal}^{(e)}(r_i, t_j; p_1, p_2 \dots)$ es proporcional

a éste. Se repiten los ajustes con $N_{part}=10^5$, con los resultados indicados en la Tabla VI.1. El resultado para s_1 es tan bueno como el obtenido utilizando $N_{part}=10^6$, y para $M_{b,1}$ se obtiene con una desviación inferior al 4 %.

Posteriormente, también se realizaron ajustes por separado de los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio, con los resultados de la Tabla VI.1. Con $N_{part}=10^6$, se obtienen resultados plenamente aceptables para velocidad. Con $N_{part}=10^5$, los resultados son correctos para velocidad, mientras que la aproximación al equilibrio da un $M_{b,1}$ correcto pero un valor de s_1 impreciso cuando TOL no es suficientemente bajo, reflejando el hecho de que en equilibrio s tiene mucha menor influencia que en velocidad. En las Figuras VI.1 y VI.2 se presentan los gráficos que produce **ANASED** inmediatamente mediante **GNU PLOT** y a posteriori mediante **SigmaPlot**.

A)



B)

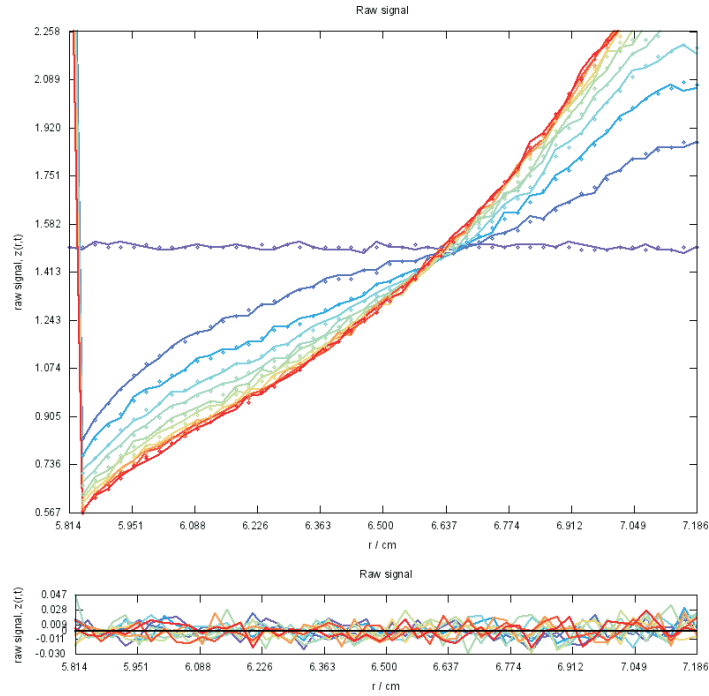


Figura VI.1: Gráficos producidos durante la ejecución de ANASED mediante GNUPLOT para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio (11 scans equiespaciados entre $t = 0$ y t_{run}) de lisozima. $N_{part} = 10^6$, $\lambda = 0.5$, $TOL = 0.1$.

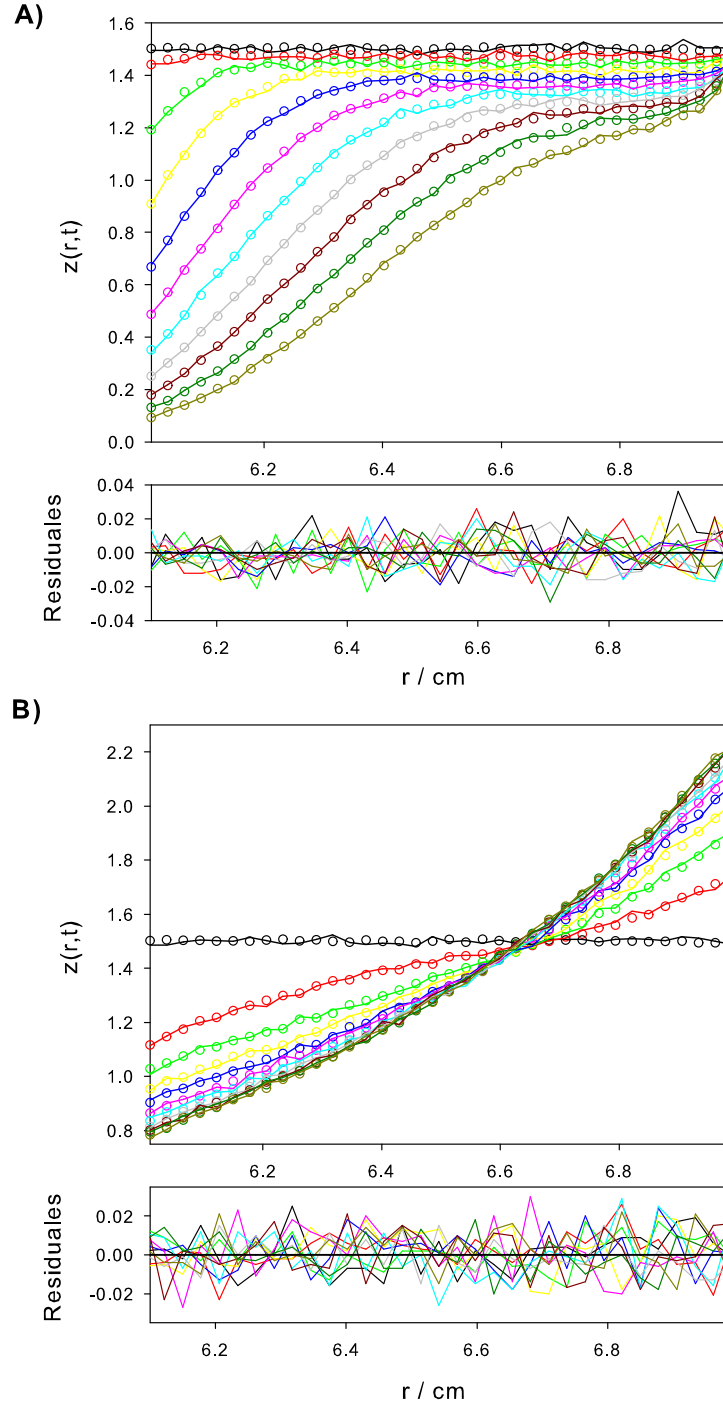


Figura VI.2: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio (11 scans equiespaciados entre $t=0$ y t_{run}) de lisozima. $N_{part} = 10^6$, $\lambda = 0.5$, TOL = 0.1.

VI.5.1.b. ADN de ColE1

Como una segunda prueba de muestra monodispersa, con características muy diferentes a las de lisozima, se considera el ADN del plásmido bacteriano ColE1, para el cual $s_1 = 16.6$ S, $M_1 = 4.34 \times 10^6$ Da y $\bar{v}_1 = 0.55 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ [125, 126], con lo cual el peso molecular flotante es $M_{b,1} = 1.95 \times 10^6$. Se consideran dos experimentos en regímenes de alta velocidad y baja velocidad (que ahora no es de aproximación al equilibrio), caracterizados por $\omega = 20\,000$ rpm y $t_{run} = 8$ h el primero, y $\omega = 3\,000$ rpm y $t_{run} = 240$ h el segundo, y con pesos estadísticos 0.6 y 0.4 respectivamente para los análisis conjuntos.

experim.	N_{part}	TOL	ITER	s_1 / S	$M_{b,1} \times 10^{-6}$ / Da	$\Delta^2 \times 10^{-4}$	100Δ (%)
EX				16.6	1.95		
v+e	10^5	0.1	35	16.6	2.18	2.7	1.6
	10^5	0.1	42	16.6	1.94	2.9	1.7
	10^5	0.1	40	16.6	1.97	2.9	1.7
	10^5	0.1	87	16.6	2.01	2.3	1.5
	10^5	0.05	318	16.6	1.95	1.6	1.5
v	10^5	0.1	35	16.6	2.10	2.8	1.6
	10^5	0.05	51	16.6	2.01	1.7	1.3
e	10^5	0.1	39	16.6	1.88	3.0	1.7
	10^5	0.05	46	16.6	2.04	2.0	1.4

Tabla VI.2: Resultados del ajuste de los datos experimentales simulados para ADN de ColE1. EX: valores exactos (correspondientes a los datos experimentales simulados). v: análisis del experimento de alta velocidad; e: análisis del experimento de baja velocidad; v+e: análisis conjunto de ambos experimentos. Las líneas con valores iguales de N_{part} y TOL corresponden a repeticiones del ensayo variando la semilla de los números aleatorios.

Se comienza con el menor valor para N_{part} , $N_{part} = 10^5$. De nuevo $\lambda = 0.5$ funciona correctamente, con tal de que TOL sea 0.1 o inferior. Todos los análisis, tanto el de los dos experimentos conjuntamente como el de cada uno por separado reproducen exactamente el valor de s_1 , y proporcionan valores de $M_{b,1}$ que difieren algo según las condiciones (por ejemplo, variando la semilla de los números aleatorios), pero que no se apartan más de un 10 % del valor exacto, según se aprecia en la Tabla VI.2. Aumentar a $N_{part} = 10^6$ apenas tiene efecto en los resultados. En la Figura VI.3 se muestra el resultado final

de los ajustes: s_1 y $M_{b,1}$. Hay que notar que el experimento de baja velocidad no es realmente un experimento de equilibrio. Se aprecia la diferencia comparando los perfiles del experimento de velocidad lenta de lisozima, Figura VI.2, con el presente, Figura VI.3. Además, es notorio que en el experimento de alta velocidad se obtiene un valor correcto del peso molecular, lo cual es destacable tratándose de una macromolécula de gran tamaño.

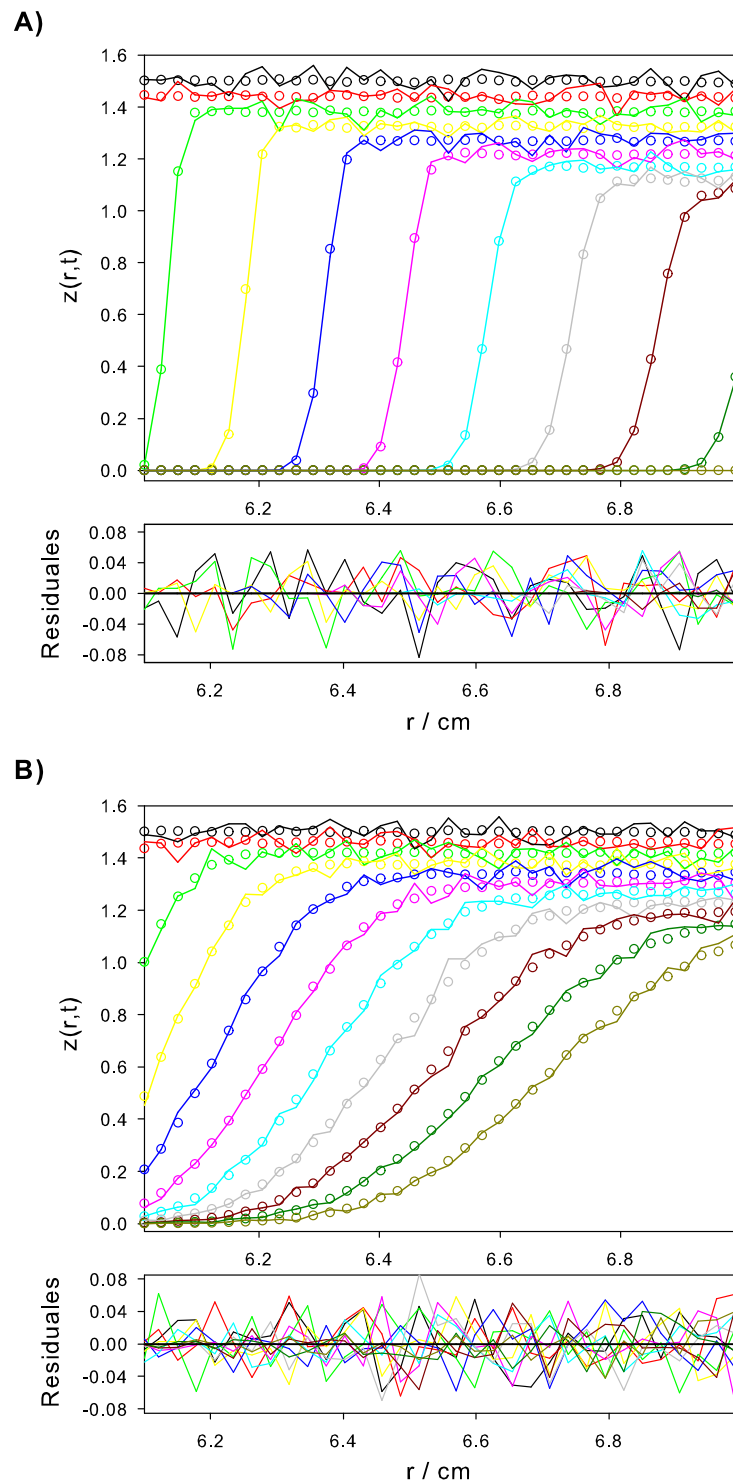


Figura VI.3: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot, para los experimentos de velocidad rápida y lenta de ADN de ColE1 (11 scans equiespaciados entre $t=0$ y t_{run}). $N_{part} = 10^5$, $\lambda = 0.5$, $TOL = 0.1$.

VI.5.2. Ajuste bicomponente

Al aumentar los parámetros que se han de ajustar de 2, en el caso monocomponente, a 5 ($3n_c - 1 = 3 \times 2 - 1$), en el caso bicomponente, un aspecto delicado es la elección de las estimaciones iniciales de los parámetros. Para ello, se ha desarrollado un protocolo sencillo y general:

- Se realiza en primer lugar un análisis monocomponente, tomando de nuevo las estimaciones iniciales ya establecidas $s_1^{(0)} = 10$ S y $M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5$ Da. **ANASED** produce, entonces, ciertos valores ajustados $s_1^{(1)}$ y $M_{b,1}^{(1)}$.
- A continuación se procede a realizar el ajuste bicomponente, que se inicializa con valores de los parámetros para uno y otro componente que sean la mitad y el doble de los obtenidos en la primera fase, esto es, $s_1^{(0)} = s_1^{(1)}/2$, $M_{b,1}^{(0)} = M_{b,1}^{(1)}/2$, $s_2^{(0)} = 2s_1^{(1)}$ y $M_{b,2}^{(0)} = 2M_{b,1}^{(1)}$, y fracciones de señal iniciales iguales para ambos, $y_1^{(0)} = y_2^{(0)} = 0.5$. Con esas estimaciones se lanza el análisis, del que resultan los valores finales ajustados para los dos componentes s_k , $M_{b,k}$ e y_k , $k = 1, 2$.

VI.5.2.a. Lisozima y fibrinógeno

Se puso a prueba este protocolo, en primer lugar, con un sistema bicomponente compuesto por dos especies con valores de s y M_b bien diferenciados, tomando para ello los valores de lisozima y fibrinógeno, como en el caso que ya se utilizó para ilustrar los cálculos de **SIMUSED**: $s_1 = 1.91$ S, $M_{b,1} = 4\,250$ Da y contribución a la señal inicial $y_1 = 0.6$ (equivalente a $z_{0,1} = 0.9$) para lisozima, y $s_2 = 7.9$ S, $M_{b,2} = 97\,350$ Da y contribución a la señal inicial $y_2 = 0.4$ (equivalente a $z_{0,2} = 0.6$) para fibrinógeno (valores de s y M tomados del libro de Van Holde [4]). Se consideran dos experimentos: uno en régimen de velocidad, con velocidad angular $\omega = 40\,000$ rpm, y duración $t_{run} = 15$ h, y otro en régimen de aproximación al equilibrio, con $\omega = 3\,000$ rpm, y duración $t_{run} = 300$ h. En el ajuste se toman $N_{part} = 10^6$, y se asignan pesos estadísticos $G_1 = 0.6$ para velocidad y $G_2 = 0.4$ para aproximación al equilibrio.

El ajuste monocomponente previo dio como resultado $s_1^{(1)} = 3.74$ S y $M_{b,1}^{(1)} = 4\,263$ Da. Con el criterio de doble y mitad se tomaron como estimaciones para el ajuste bicomponente $s_1^{(0)} = 1.87$ S, $M_{b,1}^{(0)} = 2\,131$ Da, $s_2^{(0)} = 7.58$ S, $M_{b,2}^{(0)} = 8\,530$ Da, con $y_1^{(0)} = y_2^{(0)} = 0.5$. Con estos valores iniciales se realizó el ajuste, haciendo varias ejecuciones de **ANASED**, variando únicamente la semilla de los números aleatorios, de manera que se puede apreciar

		s_1 / S (error %)	$M_{b,1} \times 10^{-4} / Da$ (error %)	s_2 / S (error %)	$M_{b,2} \times 10^{-4} / Da$ (error %)	y_1 (error %)	100Δ (%)	ITER
EX		1.91	0.425	7.90	97.3	0.60		
v+e	A	1.98 (+4)	0.469 (+10)	7.89(-0.1)	99.7(+2)	0.61 (+2)	2.0	69
	B	1.72 (-10)	0.395 (-7)	7.89(-0.1)	96.8(-0.5)	0.59 (-2)	2.1	74
	C	1.80 (-6)	0.422 (-0.7)	7.79(-1)	99.6(+2)	0.59 (-2)	2.0	66
	D	1.87 (-2)	0.373 (-12)	7.88(-0.3)	83.0(-15)	0.59 (-2)	2.2	57
	E	1.87 (-2)	0.427 (+0.5)	7.89(-0.1)	97.2(-0.1)	0.60 (0)	2.0	62
	M $\pm$ D	1.85 $\pm$ 0.10	0.42 $\pm$ 0.04	7.87 $\pm$ 0.04	95 $\pm$ 7	0.596 $\pm$ 0.009		

Tabla VI.3: Resultados del ajuste de los datos experimentales simulados para una muestra de lisozima y fibrinógeno. EX: valores exactos (correspondientes a los datos experimentales simulados). v+e: análisis conjunto de ambos experimentos. A, B, C, D y E, repeticiones del ajuste con distintas semillas para la generación de números aleatorios. M, D: media y desviación estándar de los valores obtenidos.

la incertidumbre en los resultados ajustados. En la Tabla VI.3 se recogen los resultados finales obtenidos para los dos componentes: s_1 , $M_{b,1}$, y_1 , s_2 , y $M_{b,2}$. Puede apreciarse que, salvo en algún resultado de los pesos moleculares, los errores son bastante pequeños. Los valores medios resultantes del conjunto de cinco ajustes independientes, dentro del rango de la desviación estándar, concuerdan con los exactos; particularmente buenos resultan los coeficientes de sedimentación, mientras que los pesos moleculares presentan errores inferiores al 10 %. En la Figura VI.4 se representan los resultados del ajuste conjunto de los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio.

También se probó a analizar separadamente los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio. Como siempre, partiendo de la estimación inicial monocomponente y luego con la táctica de doble/mitad para el bicomponente. Los resultados se muestran en la Tabla VI.4.

Se obtuvieron valores de 100Δ similares a los del ajuste conjunto con un número de iteraciones parecido. Sin embargo, los valores de los parámetros son, en bastantes casos, diferentes a aquéllos. Los resultados de ajustar solo velocidad de sedimentación son adecuados para los dos s_k y para el M_b del componente pequeño, $M_{b,1}$, encontrándose desviaciones apreciables para el del componente grande, $M_{b,2}$. Esto es coherente con la bien conocida circunstancia de que en experimentos de velocidad hay información adecuada para estimar los pesos moleculares solamente cuando éstos son suficientemente bajos. En cuanto a los ajustes de aproximación al equilibrio, los resultados son frustrantes.

VI.5. RESULTADOS. I. SISTEMAS PAUCIDISPERSOS, CON DATOS EXPERIMENTALES “SINTÉTICOS”

Las condiciones apropiadas para realizar experimentos de equilibrio (ω y t_{run}) son muy dependientes del peso molecular, por lo que las empleadas en este ensayo como intermedias resultan inadecuadas para ambos.

De todo este análisis se puede concluir que el ajuste conjunto de unos datos de velocidad junto a otros de aproximación al equilibrio da resultados correctos y siempre mejores que los de analizar solamente velocidad o solamente equilibrio.

		s_1 / S (error %)	$M_{b,1} \times 10^{-4} / \text{Da}$ (error %)	s_2 / S (error %)	$M_{b,2} \times 10^{-4} / \text{Da}$ (error %)	y_1 (error %)
EX		1.91	0.425	7.90	97.3	0.60
v	A	1.89 (-1)	0.434 (+2)	7.90(0)	94.5(-3)	0.60 (0)
	B	1.84 (-4)	0.461 (+8)	7.94(+0.5)	90.8(-7)	0.59 (-2)
	C	1.78 (-7)	0.430 (+1)	7.88(-0.3)	54.6(-44)	0.59 (-2)
	D	1.80 (-6)	0.403 (-5)	7.85(-0.6)	57.6(-41)	0.59 (-2)
	E	1.83 (-4)	0.401 (-6)	7.87(-0.4)	77.0(-21)	0.59 (-2)
	M±D	1.83±0.04	0.43±0.02	7.89±0.03	70±20	0.592±0.004
e	A	2.19 (+15)	0.358 (-16)	6.4(-19)	91.8(-6)	0.51 (-15)
	B	2.02 (+6)	0.286 (-33)	5.9(-25)	82.6(-15)	0.47 (-22)
	C	2.01 (+5)	0.344 (-19)	6.4(-19)	82.9(-15)	0.49 (-18)
	D	1.49 (-22)	0.307 (-28)	6.9(-13)	98.1(+0.8)	0.54 (-10)
	E	2.03 (+6)	0.306 (-28)	5.9(-25)	77.2(-21)	0.47 (-22)
	M±D	1.95±0.27	0.32±0.03	6.3±0.4	87±8	0.50±0.03

Tabla VI.4: Resultados del ajuste de los datos experimentales simulados para una muestra de lisozima y fibrinógeno. EX: valores exactos (correspondientes a los datos experimentales simulados). v: análisis del experimento de velocidad; e: análisis del experimento de aproximación al equilibrio. A, B, C, D y E, repeticiones del ajuste con distintas semillas para la generación de números aleatorios. M, D: media y desviación estándar de los valores obtenidos.

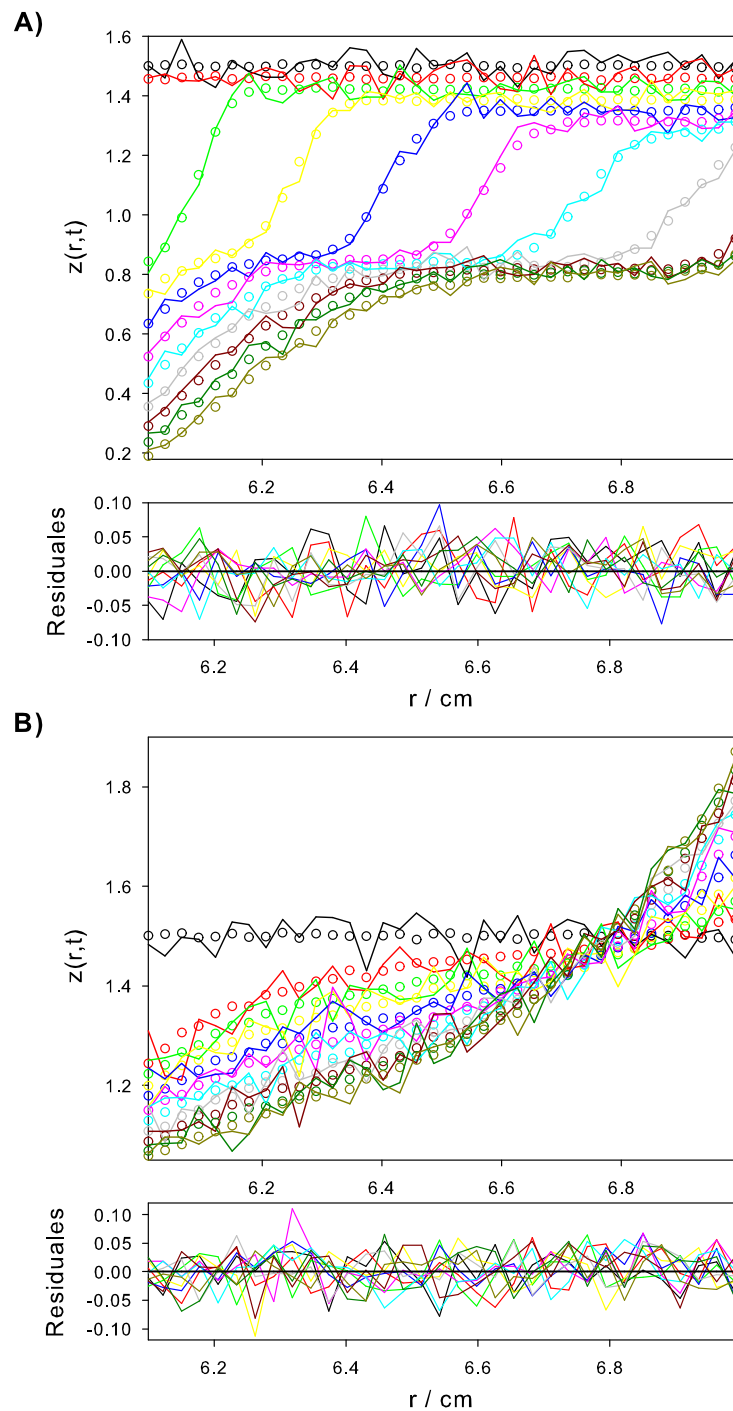


Figura VI.4: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot, para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio de una muestra con lisozima y fibrinógeno (11 scans equiespaciados entre $t = 0$ y t_{run}). $N_{part} = 10^6$, $\lambda = 0.5$, $TOL = 0.1$.

VI.5.2.b. Aldolasa y ADN

A continuación se prueba un sistema bicomponente formado por dos especies diferentes pero cuyos coeficientes de sedimentación son muy parecidos y cuyos pesos moleculares, aunque numéricamente bastante distintos, son ambos moderados. En estas condiciones es de esperar, en velocidad, un único frente sedimentante con una anchura producto de la superposición de los frentes de ambas especies, cada uno de ellos apreciablemente ensanchados por su difusión. Los componentes son una proteína, la aldolasa, y un fragmento monodisperso de ADN:

- Aldolasa: $M_1 = 156\,000$ Da, $\bar{v}_1 = 0.735\text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, $M_{b,1} = 41\,340$ Da, $s_1 = 7.40$ S [5]. Contribución a la señal inicial $y_1 = 0.5$ (equivalente a $z_{0,1} = 0.75$).
- ADN: fragmento monodisperso de 600 pares de bases, uno de los varios obtenidos por corte enzimático del ADN de bacteriófago PM2 [127], $M_2 = 391\,000$ Da, $\bar{v}_2 = 0.550\text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, $M_{b,2} = 176\,000$ Da, $s_2 = 7.89$ S [5]. Contribución a la señal inicial, $y_2 = 0.5$ (equivalente a $z_{0,2} = 0.75$).

Se insiste en que, mientras que los valores de s difieren en escasamente un 7%, los valores de M_b son uno más de cuatro veces mayor que el otro.

El protocolo de simulación de datos experimentales ($\omega = 40\,000$ rpm y $t_{run} = 5$ h para velocidad, y $\omega = 3\,000$ rpm y $t_{run} = 300$ h para aproximación al equilibrio), así como el de ajuste-análisis seguidos en este caso son los mismos que en el de lisozima y fibrinógeno, por lo que no se menciona ningún detalle repetitivo. Como resultado final del ajuste se obtienen dos parejas $(s_k, M_{b,k})$, asignándose la de mayor M_b ($M_{b,2}$) al ADN. El número de iteraciones es algo más elevado que en el caso anterior, aunque siempre por debajo de 100, y 100Δ es aproximadamente 3%.

Los ajustes conjuntos de velocidad y aproximación al equilibrio rinden unos resultados excelentes, como se puede apreciar en la Tabla VI.5 (se dan los valores de media y desviación, omitiendo los cinco ajustes independientes individuales). En la Figura VI.5 se muestra la comparación de resultados experimentales y calculados. Se han realizado un par de casos de ajuste de velocidad solo y de aproximación al equilibrio solo, cuyos valores individuales están contenidos en la Tabla VI.5. Como era de esperar, los ajustes de velocidad dan unos valores de s_k muy próximos y similares para ambas especies, pero los valores de $M_{b,k}$ están muy desviados. Los ajustes de aproximación al equilibrio muestran la existencia de dos especies de pesos moleculares bastante diferentes, con una

estimación bastante defectuosa del mayor, $M_{b,2}$, y con valores aberrantes para el resto de los parámetros. Queda de manifiesto la gran ventaja que ofrece nuestro procedimiento de analizar conjuntamente datos de más de un experimento en condiciones diferentes de sedimentación, puesto que un simple análisis de un experimento en régimen de velocidad no permitiría la determinación de los pesos moleculares.

		s_1 / S (error %)	$M_{b,1} \times 10^{-5} / \text{Da}$ (error %)	s_2, S (error %)	$M_{b,2} \times 10^{-5} / \text{Da}$ (error %)	y_1 (error %)
EX		7.40	0.413	7.89	1.76	0.50
*v+e	M±D	7.6±0.3	0.42±0.04	7.7±0.2	1.71±0.19	0.52±0.04
v	A	7.90 (+7)	0.74 (+79)	7.43(-6)	0.85(-52)	0.57 (+14)
	B	7.46(+0.8)	0.61 (+48)	7.83(+1)	0.99(-44)	0.44 (-12)
e	A	15.3 (+107)	0.88 (+113)	4.16(-47)	1.86(+6)	0.62 (+24)
	B	15.2 (+105)	0.99 (+140)	3.8(-52)	2.16(+23)	0.39 (-22)

Tabla VI.5: Resultados del ajuste de los datos experimentales simulados para una muestra de aldolasa y ADN. (*)v: análisis del experimento de velocidad; e: análisis del experimento de aproximación al equilibrio; v+e: análisis conjunto de ambos experimentos. A y B, repeticiones del ajuste con distintas semillas para la generación de números aleatorios. M, D: media y desviación estándar de los valores obtenidos (después de repetir el ajuste con cinco semillas distintas).

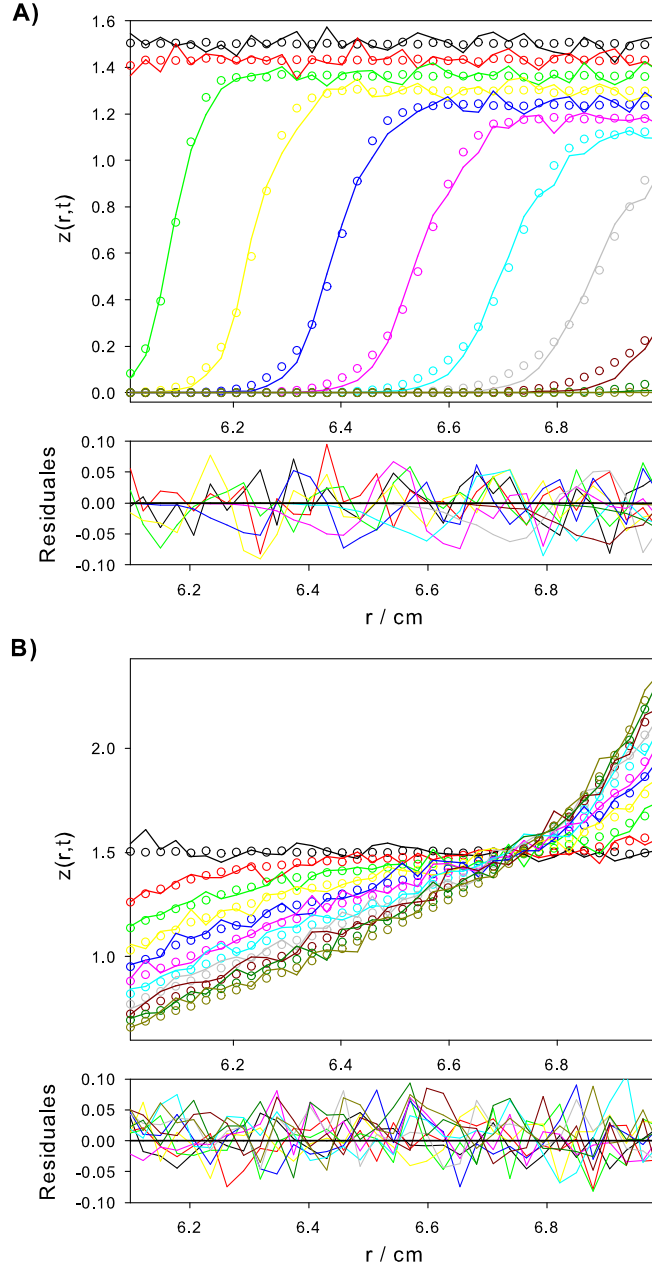


Figura VI.5: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot, para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio de una muestra de aldolasa y ADN (11 scans equiespaciados entre $t=0$ y t_{run}). $N_{part}=10^6$, $\lambda=0.5$, $TOL=0.1$.

VI.5.3. Ajuste tricomponente

Al aumentar a 3 el número de componentes, el número de parámetros a determinar es $3n_c - 1 = 3 \times 3 - 1 = 8$. Se trata de un número de variables bastante alto para un procedimiento de minimización como SIMPLEX, particularmente si no se dispone de estimaciones iniciales bastante acertadas. No obstante, se ha intentado el desarrollo de un protocolo general: se siguen los pasos ya explicados para el análisis de un bicomponente, partiendo de un ajuste monocomponente iniciado con las estimaciones $s_1^{(0)} = 10$ S y $M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5$, hasta concluir un análisis bicomponente que rinde valores del ajuste $s_1^{(2)}$, $M_{b,1}^{(2)}$, $y_1^{(2)}$, $s_2^{(2)}$ y $M_{b,2}^{(2)}$.

Para asignar valores a las estimaciones iniciales de s y M_b en el ajuste tricomponente se va a utilizar un procedimiento logarítmico. Así, para el caso de M_b , se evalúa la separación entre el menor y el mayor $\log M_{b,k}^{(2)}$ obtenido tras el ajuste bicomponente: $\delta_{M_b} = |\log M_{b,1}^{(2)} - \log M_{b,2}^{(2)}|/2$. El mayor valor de $\log M_{b,k}^{(2)}$ se reemplaza por un valor incrementado en δ_{M_b} , y el menor $\log M_{b,k}^{(2)}$ se sustituye por un valor aminorado en δ_{M_b} . Para el tercer componente, el valor estimado de $\log M_b$ será el valor medio entre $\log M_{b,1}^{(2)}$ y $\log M_{b,2}^{(2)}$. Con ese procedimiento tendremos las siguientes estimaciones iniciales para los logaritmos de los pesos moleculares flotantes de las tres especies del sistema tricomponente: $\log M_1^{(0)} = \log M_{b,1}^{(2)} - \delta_{M_b}$, $\log M_2^{(0)} = \log M_{b,2}^{(2)} + \delta_{M_b}$, y $\log M_3^{(0)} = (\log M_{b,1}^{(2)} + \log M_{b,2}^{(2)})/2$; los valores considerados para $M_1^{(0)}$, $M_2^{(0)}$ y $M_3^{(0)}$ serán los correspondientes antilogaritmos. Para el coeficiente de sedimentación se hace una operación análoga, también en escala logarítmica, $\log s$. En cuanto a las estimaciones para las fracciones de contribución a la señal inicial, $y_k^{(0)}$, se toman las tres iguales a $1/3$.

VI.5.3.a. Tres proteínas

Pese a las dificultades previstas, se ha llevado a cabo con éxito el ajuste de tres componentes para un caso constituido por tres proteínas: lisozima, fibrinógeno (sobre las que ya se ha presentado el análisis bicomponente), y una proteína con valores intermedios de s y M , albúmina de suero bovino, BSA. Los valores de s y M de lisozima y fibrinógeno utilizados para realizar las simulaciones con SIMUSED están tomadas del libro de Van Holde [4], mientras que los valores para la BSA se obtienen del libro de Serdyuk [5]. Se consideran dos experimentos, con $\omega = 40\,000$ rpm y $t_{run} = 6$ h uno (velocidad), y $\omega = 5\,000$ rpm y $t_{run} = 360$ h el otro (aproximación al equilibrio) y se realiza un análisis conjunto de

VI.5. RESULTADOS. I. SISTEMAS PAUCIDISPERSOS, CON DATOS EXPERIMENTALES “SINTÉTICOS”

ambos tipos de experimentos. En la Tabla VI.6 se recopilan los datos de estas proteínas utilizados en el experimento simulado con **SIMUSED**.

Componente	1	2	3
Coef. Sedim., s_k / S	1.91	7.9	4.5
Peso molec., M_k / Da	14 400	330 000	66 300
Vol. spec., $\bar{v}_k$ / cm ³ /g	0.705	0.705	0.735
Peso molec. flotante, $M_{b,k}$ / Da	4 248	97 350	17 570
Contrib. señal ini., $z_{0,k}$	0.6	0.4	0.5
Exponente, α_k	0	0	0

Tabla VI.6: Datos de lisozima, fibrinógeno y BSA utilizados para simular los experimentos de ultracentrifugación analítica con el programa **SIMUSED**.

Los resultados de los ajustes monocomponente y bicomponente se muestran en la Tabla VI.7.

La Tabla VI.8 recoge los resultados finales del ajuste tricomponente donde puede verse que dicho ajuste recupera con bastante exactitud los parámetros moleculares originales. Por otro lado, la Figura VI.6 ilustra la comparación entre los resultados ajustados y reales mostrando un acuerdo excelente. Cabe mencionar, no obstante, que el resultado del ajuste es sensible a los valores de los parámetros iniciales. Así, en algunas pruebas realizadas se ha dado la circunstancia de que, tras el ajuste bicomponente, a la proteína con mayor s le correspondía un menor valor de M_b , lo cual no es propio de proteínas globulares. Esto puede ser debido a que se está ajustando a un modelo bicomponente un sistema que en realidad es tricomponente. A pesar de ello, siguiendo el esquema previsto para el ajuste final tricomponente, se obtuvieron valores de s y M_b aceptables.

Componente	1	2
Coef. Sedim estimado, $s_k^{(0)} / S$	10.0	
Coef. Sedim resultante, $s_k^{(1)} / S$	3.843	
Peso molec. flot. estimado, $M_{b,k}^{(0)} / \text{Da}$	100 000	
Peso molec. flot. resultante, $M_{b,k}^{(1)} / \text{Da}$	15 939	
Fracc. señal ini. estimado, $y_k^{(0)}$	1.0	
Fracc. señal resultante, $y_k^{(1)}$	1.0	
ITER	24	
Diferencia típica en $z(r, t)$, 100Δ (%)	12.7	
Coef. Sedim estimado, $s_k^{(0)} / S$	1.922	7.686
Coef. Sedim resultante, $s_k^{(2)} / S$	2.583	7.083
Peso molec. flot. estimado, $M_{b,k}^{(0)} / \text{Da}$	7 970	31 878
Peso molec. flot. resultante, $M_{b,k}^{(2)} / \text{Da}$	5 117	68 950
Fracc. señal ini. estimado, $y_k^{(0)}$	0.5	0.5
Fracc. señal ini. resultante, $y_k^{(2)}$	0.616	0.384
ITER	65	
Diferencia típica en $z(r, t) / 100\Delta$ (%)	2.9	

Tabla VI.7: Resultados del ajuste mono y bicomponente de los datos experimentales simulados para una muestra de lisozima, fibrinógeno y BSA.

Componente	1	2	3
Coef. Sedim estimado, $s_k^{(0)} / S$	1.56	11.729	4.227
Coef. Sedim resultante, s_k / S (%error)	1.85 (-3 %)	7.87 (-0.4 %)	4.39 (-2 %)
Peso molec. flot. estimado, $M_{b,k}^{(0)} / \text{Da}$	1 394	253 101	18 783
Peso molec. flot. resultante, $M_{b,k} / \text{Da}$ (%error)	4 291 (+1 %)	97 078 (-0.3 %)	16 351 (-7 %)
Fracc. señal ini. estimado, $y_k^{(0)}$	0.333	0.333	0.334
Fracc. señal ini. resultante, y_k (%error)	0.378 (-6 %)	0.274 (+1 %)	0.349 (+6 %)
ITER	224		
Diferencia típica en $z(r, t)$, 100Δ (%)	0.7		

Tabla VI.8: Resultados del ajuste tricomponente de los datos experimentales simulados para una muestra de lisozima, fibrinógeno y BSA .

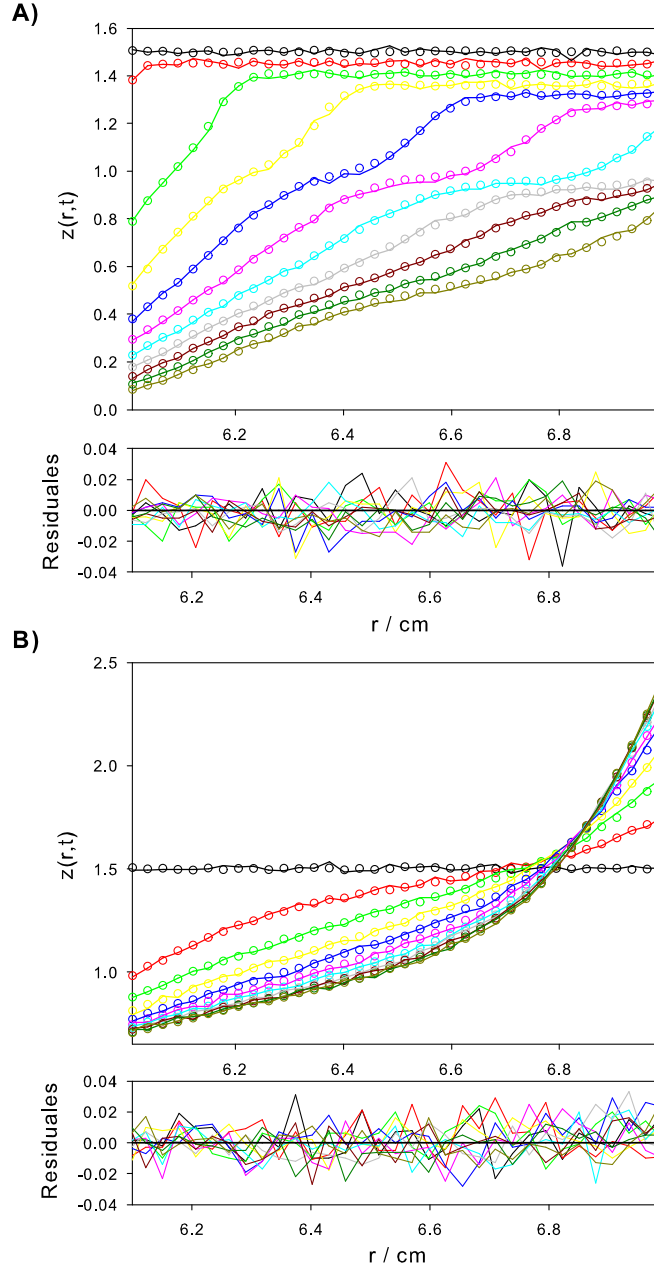


Figura VI.6: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot, para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio de una muestra de lisozima, fibrinógeno y BSA (11 scans equiespaciados entre $t=0$ y t_{run}). $N_{part} = 10^6$, $\lambda = 0.5$, $TOL = 0.1$.

VI.6. Resultados. II. Sistemas polidispersos, con datos experimentales “sintéticos”

Lo indicado al comienzo de la sección VI.5 para sistemas monodispersos es aplicable también aquí salvo que se especifique lo contrario. Además, se supone conocido el volumen específico parcial $\bar{v}$, independiente de M , de manera que se pueden manejar los pesos moleculares directamente en vez de los pesos moleculares flotantes.

Diversas pruebas que se han realizado indican que la elección de los valores iniciales es, si cabe, más crítica de lo que ya era para los sistemas paucidispersos. Por ello, como en el caso anterior, se ha tratado de diseñar un protocolo genérico, en todo lo posible independiente de las características de la muestra. La primera fase del protocolo consiste en analizar los datos de sedimentación como si de un sistema paucidisperso se tratase. Así, se realiza un primer ajuste monocomponente, como antes con estimaciones iniciales fijas $s_1^{(0)} = 10$ S y $M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5$, que suministra unos valores ajustados $s_1^{(1)}$ y $M_{b,1}^{(1)}$. Estos valores se podrían considerar como ciertos valores intermedios, representativos de las distribuciones de s y M_b . Tratando de ampliar la información se procede, a continuación, a un análisis bicomponente, con estimaciones iniciales igual que antes, basadas en el criterio de doble/mitad. Con ello se obtienen valores $s_k^{(2)}$, $M_{b,k}^{(2)}$, $y_k^{(2)}$, $k = 1, 2$. La pareja de valores $M_{b,1}^{(2)}$ y $M_{b,2}^{(2)}$ puede ser utilizada o bien para obtener la pareja de pesos moleculares $M_1^{(2)}$ y $M_2^{(2)}$ (puesto que $\bar{v}$ es conocido), o bien para obtener valores promedio del peso molecular flotante, $\bar{M}_{b,w}$ y $\bar{M}_{b,n}$ (promedios en peso y número respectivamente). Tanto a partir de $M_1^{(2)}$ y $M_2^{(2)}$ como de $\bar{M}_{b,w}$ y $\bar{M}_{b,n}$ (conocido $\bar{v}$) se pueden obtener los pesos moleculares promedio en peso y en número de la muestra, $\bar{M}_w$ y $\bar{M}_n$ respectivamente, y, por tanto, el índice de polidispersidad. Si, como será habitual en los sistemas polidispersos, la fracción de señal es igual a la fracción en peso, w_k ($\alpha_k = 0$), el peso molecular promedio en peso, de acuerdo con la ecuación V.2, se obtendría como

$$\bar{M}_w = y_1^{(2)} M_1^{(2)} + y_2^{(2)} M_2^{(2)} \quad (\text{VI.3})$$

y, análogamente, el peso molecular flotante promedio en peso

$$\bar{M}_{b,w} = y_1^{(2)} M_{b,1}^{(2)} + y_2^{(2)} M_{b,2}^{(2)} \quad (\text{VI.4})$$

También se pueden evaluar los correspondientes promedios en número según la ecuación V.3,

$$\bar{M}_n = [y_1^{(2)}/M_1^{(2)} + y_2^{(2)}/M_2^{(2)}]^{-1} \quad (\text{VI.5})$$

y

$$\bar{M}_{b,n} = [y_1^{(2)}/M_{b,1}^{(2)} + y_2^{(2)}/M_{b,2}^{(2)}]^{-1} \quad (\text{VI.6})$$

La combinación de $\bar{M}_w$ y $\bar{M}_n$ nos proporciona un índice de polidispersidad, $IP = \bar{M}_w/\bar{M}_n$ (ecuación V.4). Esta información puede ser útil para hacer estimaciones iniciales de los parámetros de la distribución de M con la que se vaya a trabajar. Asimismo, el disponer de dos parejas de valores (s, M) puede ser útil para estimar parámetros de la relación s – M que se quiere ajustar. A continuación se ilustrarán ejemplos de la utilidad de toda esta información.

VI.6.1. Distribución de M log-normal y relación $s = K_s M^{a_s}$

Como ejemplo significativo de ajuste para un sistema polidisperso, se usa, como ya se hizo en la sección V.7.1, el ejemplo del PEO, con una distribución log-normal de peso molecular y una relación s – M de tipo potencial. Los datos experimentales sintéticos de $z(r, t)$ se simulan como allí se indicó, con los datos $\ln \bar{M}_w = 11.0$, $\sigma = 0.8$, $K_s = 6.14 \times 10^{-3}$ y $a_s = 0.47$. Se consideran un experimento de velocidad, con $\omega = 40\,000$ rpm y $t_{run} = 15$ h, y uno de aproximación al equilibrio, con $\omega = 10\,000$ rpm y $t_{run} = 360$ h, registrándose en cada uno de ellos 51 *scans* y 50 posiciones radiales.

Siguiendo el protocolo que se ha propuesto, se realiza el análisis bicomponente con los resultados inicial y final en cada una de las dos fases que se indican a continuación:

- 1.- Análisis monocomponente:

$$s_1^{(0)} = 10 \text{ S} , M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5.$$

$$s_1^{(1)} = 1.12 \text{ S} , M_{b,1}^{(1)} = 1.01 \times 10^4.$$

- 2.- Análisis bicomponente:

$$s_1^{(0)} = 0.56 \text{ S} , M_{b,1}^{(0)} = 0.50 \times 10^4 , y_1^{(0)} = 0.5,$$

$$s_2^{(0)} = 2.24 \text{ S} , M_{b,2}^{(0)} = 2.02 \times 10^4 , y_2^{(0)} = 0.5.$$

$$s_1^{(2)} = 0.75 \text{ S} , M_{b,1}^{(2)} = 0.47 \times 10^4 , y_1^{(2)} = 0.486,$$

$$s_2^{(2)} = 1.47 \text{ S} , M_{b,2}^{(2)} = 1.93 \times 10^4 , y_2^{(2)} = 0.514.$$

El resultado final del ajuste bicomponente es bastante bueno, con $\Delta^2 = 6.0 \times 10^{-4}$, $100\sqrt{\Delta} = 2.5\%$.

Con los valores resultantes, se obtienen los promedios (flotantes) en peso y en número, $\bar{M}_{b,w} = 1.22 \times 10^4$ y $\bar{M}_{b,n} = 0.765 \times 10^4$ y, utilizando el valor del volumen específico parcial del PEO, $\bar{v} = 0.83 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, los pesos moleculares promedio quedan $\bar{M}_w = 7.15 \times 10^4$ y $\bar{M}_n = 4.50 \times 10^4$, con $IP = \bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.59$. En una muestra con polidispersidad continua regida por una distribución log-normal, los parámetros que determinan ésta son $\ln \bar{M}_w$ y la varianza σ de $\ln M$, estando ésta última relacionada con el índice de polidispersidad mediante la ecuación V.12, según la cual

$$\sigma = \sqrt{\ln(\bar{M}_w/\bar{M}_n)} \quad (\text{VI.7})$$

Como se anticipó en la sección anterior, la idea subyacente en nuestra estrategia es usar la conexión entre los valores estimados *grosso modo* con un modelo no realista (bi-diperso para una muestra polidispersa), pero que se atiene a criterios generales y no aberrantes, y los valores del modelo concreto. Por ello, se usan los valores de $\bar{M}_w$ y $\bar{M}_n$ obtenidos del ajuste bi-componente para calcular $\ln \bar{M}_w = 11.2$ y $\sigma = 0.68$. Análogamente, se emplean los dos pares de valores s y M resultantes del análisis (M obtenido a partir del valor flotante y $\bar{v}$), que son $s_1^{(2)} = 0.75$, $M_1^{(2)} = 2.76 \times 10^4$ y $s_2^{(2)} = 1.47$, $M_2^{(2)} = 11.4 \times 10^4$, para obtener $K_s = 6.4 \times 10^{-3}$ y $a_s = 0.47$. De esta manera, se tiene un conjunto de estimaciones para el análisis de un sistema propiamente polidisperso. El transcurso del ajuste nos indica, desde la primera iteración de AMOEBA, que estos valores dan un ajuste notablemente bueno (conociendo los correctos lo ratificamos). Con valores iniciales muy próximos a los exactos, es conveniente disminuir el factor λ en AMOEBA, para que en las primeras iteraciones el algoritmo no se escape de la proximidad del mínimo. Con 45 iteraciones se alcanzan resultados finales que están recopilados, junto a los previos, en la Tabla VI.9.

Como puede apreciarse, la estrategia genérica ha conseguido reproducir de manera prácticamente exacta los parámetros reales, con los que fueron originados los datos experimentales sintéticos. Aun sin perder de vista que es uno de los casos más sencillos de un sistema polidisperso, el éxito del protocolo es completo. Pese a la sencillez del caso, el tipo de la distribución de M y el tipo de relación s – M son muy habituales, por lo que cabe esperar que dicho éxito se pueda producir con muchos otros sistemas similares.

Caso	$\ln M$	σ	$K_s \times 10^3$	a_s	100Δ
Exacto	11.0	0.80	6.14	0.47	0.6 %
Estimación	11.2	0.68	6.40	0.47	5.2 %
Resultado	11.0	0.72	6.42	0.47	1.0 %

Tabla VI.9: Resultados del ajuste a un modelo con “distribución log-normal de M y relación $s = K_s M^{a_s}$ ” de los datos experimentales simulados para una muestra polidispersa de PEO.

En la Figura VI.7 se presenta la comparación de los valores originales de $z(r, t)$ con los calculados utilizando los parámetros resultantes del ajuste mostrados en la tercera fila de la Tabla VI.9.

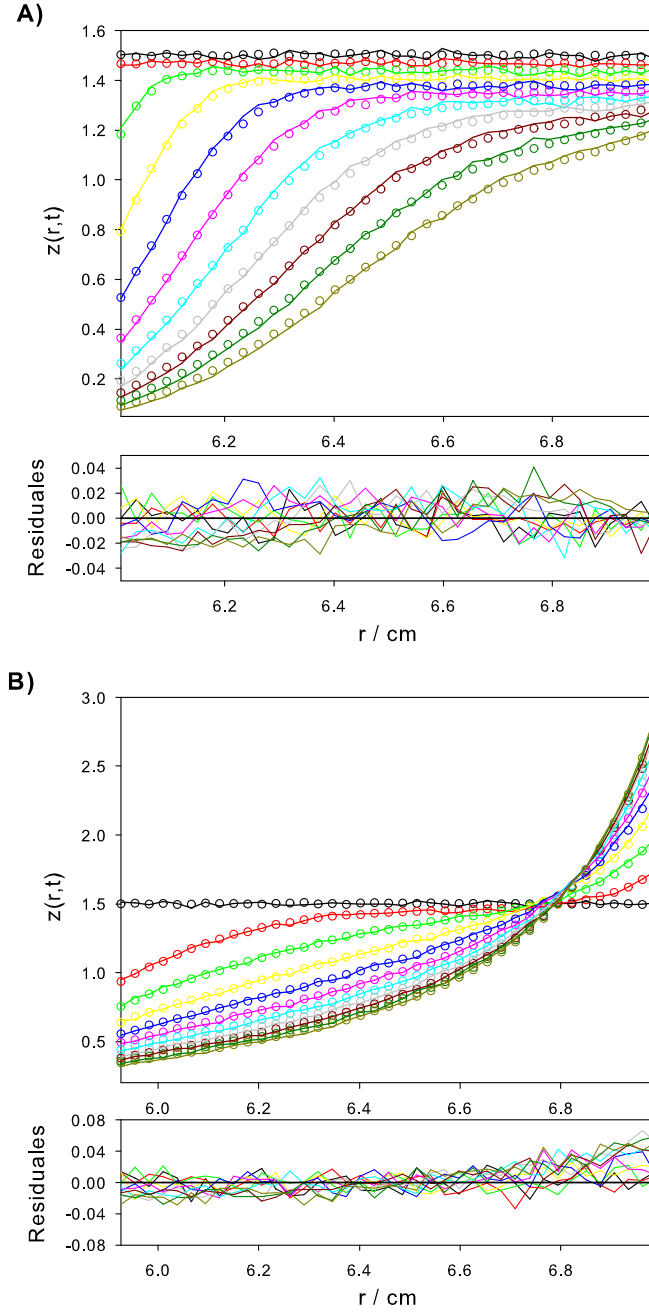


Figura VI.7: Gráficos producidos tras la ejecución de ANASED mediante SigmaPlot, para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio de una muestra de PEO (11 scans equiespaciados entre $t = 0$ y t_{run}). $N_{part} = 10^6$, $\lambda = 0.5$, $TOL = 0.1$.

VI.6.2. Distribución de M log-normal y conformación vermiforme

Como ya se indicó en la sección V.7.2, el modelo vermiforme tiene una amplia aplicabilidad, y su relación s – M es mucho más compleja que la mera relación potencial antes considerada. Según se ha explicado en dicha sección, los parámetros estructurales de este modelo son la masa por unidad de longitud, M_L , la longitud de persistencia a , y el diámetro hidrodinámico, d . Para la simulación de los datos experimentales se usan los parámetros del ADN allí indicados, $M_L = 1950 \text{ Da/nm}$, $a = 56 \text{ nm}$, $d = 2.3 \text{ nm}$, $\bar{v} = 0.55 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ y, como allí, se supone una muestra polidispera con distribución log-normal de $\ln M_w = 12.5$ ($M_w = 2.68 \times 10^5$) y $\sigma = 0.70$, tomando para la distribución de M 21 valores equiespaciados logarítmicamente entre $M_1 = 2.5 \times 10^4$ y $M_2 = 3.3 \times 10^6$. Se consideran un experimento de velocidad, con $\omega = 20\,000 \text{ rpm}$ y $t_{run} = 15 \text{ h}$, y uno de aproximación al equilibrio, con $\omega = 5\,000 \text{ rpm}$ y $t_{run} = 240 \text{ h}$, registrándose en cada uno de ellos 51 *scans* y 50 posiciones radiales.

Con los datos así generados se sigue la misma fase previa del protocolo descrito anteriormente, consistente en el análisis mono- y bi-componente:

■ 1.- Análisis monocomponente:

$$s_1^{(0)} = 10 \text{ S} , M_{b,1}^{(0)} = 1.0 \times 10^5 .$$

$$s_1^{(1)} = 7.16 \text{ S} , M_{b,1}^{(1)} = 1.246 \times 10^5 .$$

■ 2.- Análisis bicomponente:

$$s_1^{(0)} = 3.58 \text{ S} , M_{b,1}^{(0)} = 0.623 \times 10^5 , y_1^{(0)} = 0.5 ,$$

$$s_2^{(0)} = 14.32 \text{ S} , M_{b,2}^{(0)} = 2.452 \times 10^5 , y_2^{(0)} = 0.5 .$$

$$s_1^{(2)} = 5.91 \text{ S} , M_{b,1}^{(2)} = 0.676 \times 10^5 , y_1^{(2)} = 0.506 ,$$

$$s_2^{(2)} = 8.27 \text{ S} , M_{b,2}^{(2)} = 2.205 \times 10^5 , y_2^{(2)} = 0.494 .$$

La calidad del análisis bicomponente es sorprendentemente buena: $\Delta^2 = 4.4 \times 10^{-4}$, $100\sqrt{\Delta} = 2.1 \%$. Es oportuno intercalar el comentario respecto a la ambigüedad, pocas veces reconocida, de ajustar datos de experimentos de sedimentación en casos complejos: puede haber modelos de composición diferentes al real que den ajustes bastante buenos.

Siguiendo con el protocolo de usar $s_k^{(2)}$, $M_{b,k}^{(2)}$ y $y_k^{(2)}$ ($k=1,2$) junto con $\bar{v}$ para la estimación del ajuste posterior al sistema polidisperso, se procederá como en el caso

anterior, obteniendo $M_{b,1}^{(2)} = 0.676 \times 10^5$, $M_2^{(b,2)} = 2.20 \times 10^5$, $M_1^{(2)} = 1.50 \times 10^5$, $M_2^{(2)} = 4.90 \times 10^5$, $\bar{M}_w = 3.17 \times 10^5$, $\ln \bar{M}_w = 12.6$, $\bar{M}_n = 2.28 \times 10^5$, $IP = \bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.39$, y $\sigma = 0.57$.

En cuanto a las estimaciones iniciales necesarias para M_L , a , y d , se ha ideado un procedimiento que se aplicaría a cualquier caso vermiformes. Se basa, como en el caso anterior, en los dos pares de valores (s, M) resultantes del análisis bi-componente que en este caso son $(5.91, 1.50 \times 10^5)$ y $(8.27, 4.90 \times 10^5)$ junto con la utilización de nuestro programa **MultiHydFit** [21, 103], diseñado para ajustar los parámetros del modelo vermiforme con series de valores propiedad – peso molecular para diversas propiedades y diversas muestras por propiedad. No obstante, el programa también admite una sola propiedad s , y dos parejas (s, M) . Los resultados del ajuste son $M_L = 2240 \text{ Da/nm}$, $a = 58 \text{ nm}$ y $d = 3.5 \text{ nm}$. Del ajuste con **MultiHydFit** de tan solo un par de puntos no cabría esperar resultados precisos, pero nos encontramos el satisfactorio hallazgo de estimaciones que son muy próximas a las exactas (excepto en el caso de d , debido a la conocida insensibilidad de las propiedades hidrodinámicas al diámetro del filamento vermiforme. Todo ello ratifica la eficacia, ya demostrada en casos anteriores, de los ajustes preliminares bi-componente.

Así, se dispone de un conjunto completo de datos de partida para el ajuste con **ANASED**. Aun antes del ajuste, comparándolos con los exactos (Tabla VI.10) se aprecia su muy aceptable concordancia con los reales. Debido precisamente a ser tan próximos, se ha de tener cuidado con las condiciones impuestas para el ajuste: un valor algo elevado del factor λ puede hacer que en las primeras iteraciones los parámetros se alejen, llegando a resultados peores que las estimaciones iniciales. Además, la tolerancia debe ser bastante baja para que se efectúen numerosas iteraciones y N_{part} elevado (con $N_{part} = 10^5$ se obtiene una baja precisión que oculta el refinamiento que se pretende conseguir). Por ello, las condiciones de ajuste final se modificaron a $\lambda = 0.05$, $TOL = 0.20$ y $N_{part} = 10^6$. Se obtienen así los resultados mostrados en la tercera fila de la Tabla VI.10, con un error típico en la señal inferior al 1 %. La calidad de los ajustes queda también de manifiesto en la Figura VI.8.

Los resultados son excelentes para $\ln M$ y a , buenos para M_L (error en torno al 10 %), aceptables para σ , y desviados para d (aunque la discrepancia tiene poca importancia, por lo antes comentado). Cabe notar que aunque los resultados recobrados en el ajuste se desvían algo de los exactos, el error en la señal es casi el mismo. Esto es consecuencia de que la desviación de un parámetro puede quedar, dentro de las fluctuaciones estadísticas, compensada por la desviación en otro, dando casi idéntica Δ . Haría falta mucha precisión en los datos de partida y una gran capacidad del algoritmo de ajuste, bastante mejor

VI.6. RESULTADOS. II. SISTEMAS POLIDISPERSOS, CON DATOS EXPERIMENTALES “SINTÉTICOS”

Caso	$\ln M$	σ	$M_L / \text{Da/nm}$	a / nm	d / nm	100Δ
Exacto	12.5	0.70	1950	56	2.2	0.6 %
Estim. inicial	12.6	0.57	2240	58	3.5	2.1 %
Resultado	12.6	0.59	2250	59	3.5	0.9 %

Tabla VI.10: Resultados del ajuste a un modelo con “distribución log-normal de M y conformación vermiforme” de los datos experimentales simulados para una muestra polidispersa de ADN vermiforme.

que la del SIMPLEX o AMOEBA, para conseguir refinar estos resultados. No obstante, teniendo en mente que las propiedades más importantes en el análisis son el peso molecular medio del ADN así como su masa por unidad de longitud y su longitud de persistencia, se ve que para ellas nuestro método ha resultado exitoso.

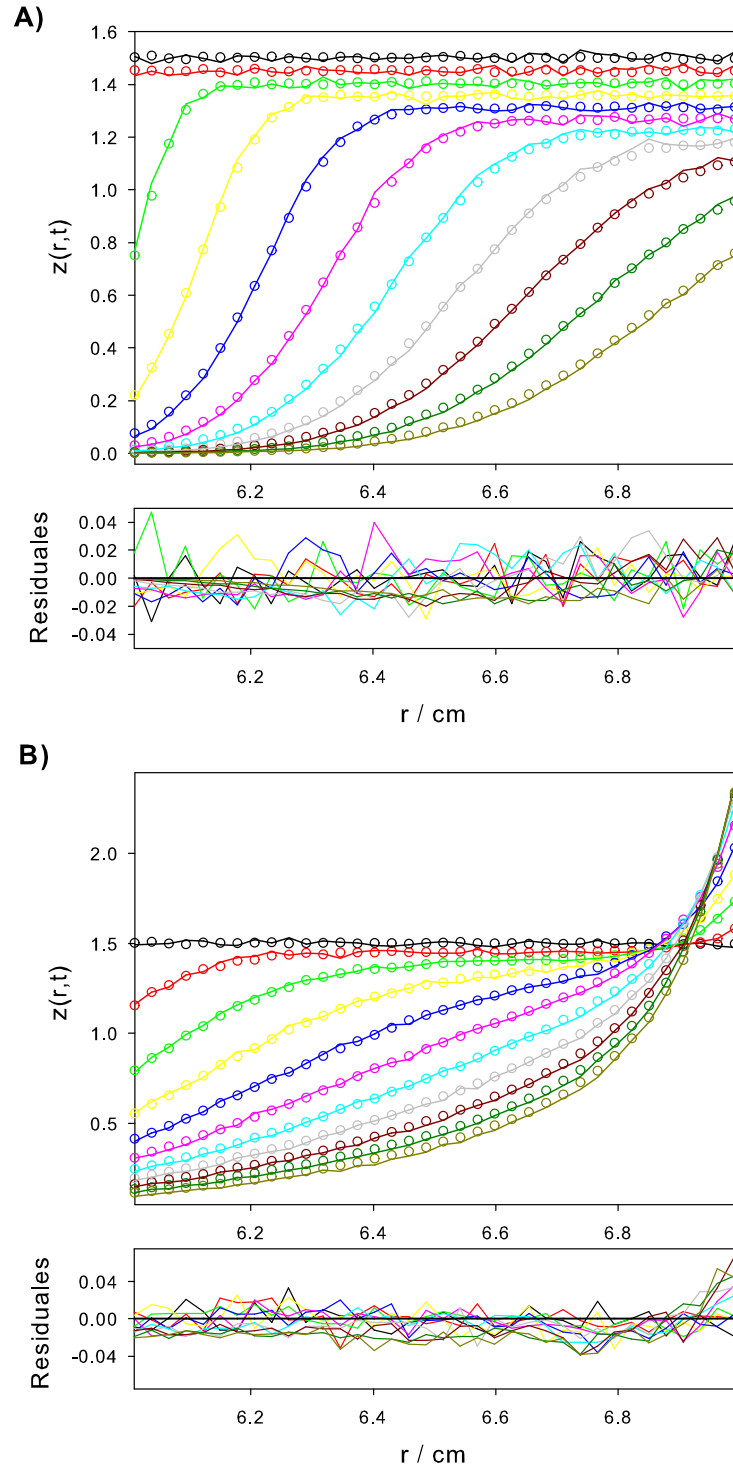


Figura VI.8: Gráficos producidos tras la ejecución de **ANASED** mediante **SigmaPlot**, para los experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio de una muestra de ADN vermiforme (11 scans equiespaciados entre $t=0$ y t_{run}). $N_{part}=10^6$, $\lambda=0.05$, $\text{TOL}=0.2$.

VI.7. ANASED vs. SEDFIT

Como ya se ha comentado los programas **SEDFIT** y **SEDPHAT** son dos herramientas muy potentes para el análisis de experimentos de ultracentrifugación analítica. De hecho, se han elegido para el análisis de los experimentos recogidos en el Capítulo III y para verificar el correcto funcionamiento del programa generador de perfiles de AUC **SIMUSED**. No obstante, se ha decidido desarrollar la herramienta de análisis **ANASED** con la intención de subsanar ciertas carencias de ambos programas y de poner a disposición de la comunidad científica otra alternativa para el análisis de experimentos de AUC.

SEDFIT y **SEDPHAT** presentan al usuario una gran variedad de modos de ajuste, cada uno con una manera de manejar parámetros y variables. Esto, a la vez que versátiles, los torna engorrosos, ya que el usuario ha de tener en cuenta o anticipar muchos detalles de su sistema. En cambio, el programa **ANASED** pretende, desde la sencillez, dotar al usuario de una herramienta que simplifique la toma de decisiones pero sea igualmente eficaz a la hora de determinar los parámetros que son de mayor interés en primera instancia para el usuario de ultracentrífuga: el coeficiente de sedimentación y el peso molecular. Así, el usuario obtiene de forma bastante directa los valores numéricos de esas dos propiedades moleculares. Por otro lado, **ANASED** permite el análisis conjunto de muchos experimentos de velocidad (incluyendo aproximación al equilibrio); es decir, es capaz de utilizar un número indefinido de experimentos de AUC de un determinado sistema realizados a diferentes valores de velocidad angular, ω , con el objeto de obtener los parámetros moleculares que mejor los ajustan, con lo que se mejora la incertidumbre en los valores del coeficiente de sedimentación y del peso molecular. Esta es una característica de la que carece **SEDFIT**.

Un inconveniente de **SEDFIT** y **SEDPHAT** es que asignan el mismo valor de volumen específico parcial a todas las posibles especies sedimentantes del sistema paucidisperso que se está analizando, lo cual, aparte de poco realista, introduce error en la determinación de los pesos moleculares. **ANASED**, en cambio, permite al usuario asignar, de forma independiente, un valor de volumen específico a cada posible especie sedimentante. El análisis que realiza **ANASED** es del tipo que **SEDFIT** denomina “modelo de especies no interactuantes” (ver Capítulo II, sección II.12), en donde, para un sistema paucidisperso, el usuario impone de antemano el número de especies que se van a utilizar para ajustar los perfiles de sedimentación y, en el caso de **ANASED**, se permite asignar a cada una un valor del volumen específico parcial.

Por último, y quizás lo más significativo, es que **ANASED** es capaz de gestionar adecuadamente sistemas polidispersos, problema para el que no están capacitados **SEDFIT** y **SEDPHAT**. Esa es una de las mayores fortalezas de **ANASED** respecto a otros programas de análisis y el objetivo principal para el que fue concebido, objetivo que se ha logrado parcialmente durante el desarrollo de esta Tesis, pero que aún es necesario ampliar y consolidar.

Capítulo VII

Conclusiones

1. Se ha puesto a punto la técnica de ultracentrifugación analítica comprobando que los procedimientos utilizados en la realización de los experimentos son los correctos. Para ello se realizaron experimentos de ultracentrifugación analítica (para distintos tipos de macromoléculas bien conocidas: a) proteínas como la lisozima, ejemplo de muestra monodispersa, y la seroalbúmina (albúmina de suero bovino) y la ovoalbúmina (albúmina de la clara de huevo), ejemplos de muestras paucidispersas, b) polisacáridos y polímeros sintéticos como el carragenano, la pectina y el dextrano, ejemplos de muestras polidispersas, y c) poliestireno sulfonato de sodio, ejemplo de polielectrolito flexible polidisperso. El análisis de estos sistemas con los programas SEDFIT y DCDT+ (desarrollados por otros grupos de investigación) ha permitido la elección del procedimiento de análisis adecuado para cada tipo de sistema concreto. Para las proteínas se concluye que el modelo de distribución continua $c(s)$ de SEDFIT es adecuado, mientras que para el análisis de polisacáridos y polímeros sintéticos se puso de manifiesto que resulta de más utilidad, debido principalmente a la polidispersidad de la muestra, el modelo $ls-g^*(s)$ contenido en SEDFIT y el método diferencial utilizado por DCDT+.
2. Se utilizó la ultracentrifugación analítica para estudiar tres proteínas aisladas recientemente por grupos de investigación con los que se colabora:
 - Se ha realizado el estudio de la oligomerización de la proteína histidina fosfotransportadora procedente de la bacteria *Bacillus sphaericus*. Del estudio de AUC no se puede confirmar la presencia de oligómeros debido a la baja concen-

tración de muestra disponible pero con el apoyo de DLS se puede concluir la existencia de una proteína de 1.7 nm de radio hidrodinámico que es compatible con una proteína globular ligeramente elongada, de 10 kDa de peso.

- La proteína rabfilina-3 se ha estudiado mediante velocidad y equilibrio de sedimentación. De los experimentos de velocidad de sedimentación se puede concluir que existe una especie con un valor medio de $s_{20,w}$ de 3.29 ± 0.06 S y un peso molecular aparente de $40\,000 \pm 2\,000$ Da, siendo este valor ligeramente mayor que el obtenido a partir de la secuencia ($M = 36\,383$ Da) y por espectrometría de masas ($M = 36\,401$ Da) pero que está dentro del rango esperable para experimentos de este tipo. Del experimento de equilibrio de sedimentación se obtiene una especie con un valor del peso molecular $M = 44\,368$ Da, que coincide en gran medida con el obtenido mediante los experimentos de velocidad.
 - Se ha realizado el estudio de la conformación y estado de oligomerización de la proteína CarH de la bacteria *Thermus thermophilus* en presencia y ausencia del ligando AdoB₁₂, en condiciones de luz y de oscuridad. De dicho estudio se pueden extraer tres conclusiones. La primera de ellas es que en presencia de luz, la proteína TtCarH muestra la misma conformación y estado de oligomerización (son monómeros) tanto en ausencia como en presencia de AdoB₁₂. La segunda es que la proteína TtCarH es un tetrámero en presencia de AdoB₁₂ cuando no está expuesta a la luz azul. Y la última es que la unión de TtCarH a un fragmento de ADN en la oscuridad tiene lugar en su estado tetramérico.
3. Se ha desarrollado un método computacional para la predicción teórica de los perfiles de sedimentación de muestras homogéneas y heterogéneas implementado en el programa **SIMUSED**. En nuestro método, el fenómeno de sedimentación es tratado con el siguiente enfoque: las moléculas de soluto son partículas que se mueven bajo el efecto simultáneo de (a) una fuerza centrífuga, determinista, y (b) un movimiento browniano independiente del anterior y superponible con él, responsable de la difusión de las partículas.
 4. Con objeto de comprobar el funcionamiento del programa **SIMUSED** en la predicción de perfiles de sedimentación en el caso de muestras homogéneas, se han realizado simulaciones de experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación de cuatro

especies que abarcan un amplio rango de coeficientes de sedimentación y difusión: ciclodextrina (proteína pequeña), lisozima (proteína globular), PEO (polímero moderadamente largo y flexible) y muestra muy larga y rígida de ADN de bacteriofago T7. Los resultados de estas simulaciones se han comparado con predicciones obtenidas con el conocido programa **SEDFIT** que utiliza la resolución numérica de la ecuación de Lamm para ello, obteniéndose un excelente acuerdo. Además, se han analizado con **SEDFIT** los perfiles simulados con **SIMUSED**, recuperándose los parámetros de las simulaciones. De todo ello se concluye que la capacidad predictiva de nuestro algoritmo browniano es buena para un amplio rango de la relación sedimentación-difusión y masa molecular.

5. Con objeto de comprobar el funcionamiento del programa **SIMUSED** en la predicción de perfiles de sedimentación en el caso de muestras heterogéneas, se han realizado simulaciones de muestras tanto paucidispersas (compuestas por unos pocos componentes bien diferenciados) como polidispersas (compuestas por una distribución continua de pesos moleculares). En el caso de muestras paucidispersas, se ha verificado el adecuado comportamiento de **SIMUSED** para dos sistemas distintos: sistema bicomponente de proteínas (lisozima y fibrinógeno) y sistema tricomponente de fragmentos cortos de ADN. Los perfiles de la muestra paucidispersa de lisozima y fibrinógeno se evaluaron mediante comparación con las predicciones de **SEDFIT** obteniéndose muy buen acuerdo. Como ejemplos de muestras polidispersas se han realizado simulaciones de dos sistemas: PEO y una cadena larga de ADN (ejemplo de modelo vermiforme). Esto último ha sido posible debido a que se han introducido en **SIMUSED** metodologías desarrolladas previamente por el Grupo de Investigación para determinar propiedades en disolución de moléculas descritas mediante el modelo vermiforme.
6. Con base en nuestro algoritmo de simulación de dinámica browniana y en algoritmos de ajuste minimocuadrático y multiparamétrico de la literatura (algoritmos tipo **SIMPLEX**), se ha desarrollado un método para el análisis de perfiles de señal, esto es, para la determinación de parámetros moleculares a partir de los datos de un experimento de ultracentrifugación analítica. Este método se ha implementado en el programa **ANASED**. El programa admite dos variantes, una para sistemas multicomponente paucidispersos (que genera información sobre pesos moleculares, M , y coeficientes de sedimentación, s), y otra para sistemas con polidispersidad continua

(que genera información sobre relaciones s - M , y los parámetros de la distribución del peso molecular).

7. Para verificar el buen comportamiento de **ANASED** se han analizado datos generados mediante **SIMUSED** de experimentos de velocidad y de aproximación al equilibrio, tanto por separado como de manera conjunta, con el objetivo de recuperar los parámetros de la simulación, y se ha desarrollado un protocolo sencillo y eficaz para la elección de las estimaciones iniciales tanto para el caso de muestras paucidespersas como polidispersas. Los sistemas estudiados fueron los siguientes: a) sistemas monocomponente (tanto lisozima como ADN de ColE1), b) muestra paucidispersa de dos componentes con valores de coeficiente de sedimentación y peso molecular bien diferenciados (lisozima y fibrinógeno), c) muestra paucidispersas de dos componentes de coeficientes de sedimentación muy parecidos y de pesos moleculares moderados (ADN y aldolasa), d) muestra paucidispersa de tres componentes (lisozima y fibrinógeno y BSA), y e) muestras polidispersas (tanto óxido de polietileno como ADN vermiforme). En todos los casos, el programa **ANASED** proporciona valores del coeficiente de sedimentación y del peso molecular bastante buenos. Para los sistemas monocomponente y bicomponente los errores en los valores de s y M obtenidos mediante el análisis conjunto de experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio son menores del 10%. En el caso del sistema tricomponente, a pesar de que este sistema presenta mayor complejidad debido al mayor número de parámetros ajustables, el resultado sigue siendo muy bueno. En cuanto a los sistemas polidispersos, para el óxido de polietileno se han conseguido obtener todos los parámetros originales de la distribución mientras que para el ADN vermiforme se ha tenido éxito en la obtención de las propiedades más importantes, longitud de persistencia y masa por unidad de longitud, pero no así en el diámetro hidrodinámico. En todos los casos se concluye que el análisis conjunto de experimentos de velocidad y aproximación al equilibrio proporciona mejores resultados que la utilización de un solo tipo de experimento.
8. El programa **ANASED** es una alternativa a los programas basados en la resolución de la ecuación de Lamm como **SEDFIT**, presentando las siguientes características:

- Permite al usuario una fácil elección de los parámetros iniciales.

-
- Permite al usuario realizar el análisis conjunto de un número indefinido de experimentos de AUC de un determinado sistema realizados a diferentes valores de ω , con el objeto de obtener los parámetros moleculares que mejor los ajustan.
 - Permite al usuario asignar un valor de volumen específico parcial a cada posible especie sedimentante.
 - Gestiona adecuadamente sistemas polidispersos.
9. Se han conseguido paralelizar los dos programas desarrollados (SIMUSED Y ANASED), lo que produce un incremento de la velocidad de cálculo que se traduce en una notable reducción de los tiempos de simulación y análisis.

Referencias

- [1] P.W. Atkins and J. de Paula. *Química Física*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2008.
- [2] S.F. Sun. *Physical Chemistry of Macromolecules, 2nd Edition*. John Wiley and Sons, New Jersey, 2004.
- [3] P.C. Hiemenz and T.P. Lodge. *Polymer Chemistry, 2nd Edition*. CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [4] K.E. van Holde, W. Johnson, and P. Ho. *Principles of Physical Biochemistry, 2nd Edition*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J., 1998.
- [5] I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, and J. Zaccai. *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function*. Cambridge University Press, New York, 2007.
- [6] S.E. Harding and A.J. Rowe, editors. *Hydrodynamic Properties of Macromolecular Assemblies*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
- [7] S.E. Harding, A.J. Rowe, and J.C. Horton, editors. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.
- [8] D.J. Scott, S.E. Harding, and A.J. Rowe. *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.
- [9] H. Cölfen. Analytical Ultracentrifugation. *Macromol. Biosci.*, 10:687–688, 2010.
- [10] A.S. Solovyova. Preface: 17th International Symposium on Analytical Ultracentrifugation and Hydrodynamics. *Eur. Biophys. J.*, 39:345–346, 2010.

- [11] W. Mächtle and L. Börger. *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [12] P. Schuck. Editorial for the special issue of Methods: Modern Analytical Ultracentrifugation. *Methods*, 54:1–3, 2011.
- [13] G. Roberts, editor. *Encyclopedia of Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin, 2013.
- [14] J. García de la Torre. Hydrodynamic properties of macromolecular assemblies. In S.E. Harding and A.J. Rowe, editors, *Dynamic Properties of Macromolecular Assemblies*, pages 3–31. Eds. The Royal Society of Chemistry, 1989.
- [15] J.J. Freire and J. García de la Torre. Sedimentation coefficients of flexible polymer chains. In J.C. Horton S.E. Harding, A.J. Rowe, editor, *Analytical Centrifugation in Polymer Science and Biochemistry*, pages 346–359. Eds. The Royal Society of Chemistry, 1992.
- [16] J. García de la Torre. Sedimentation coefficients of complex biological particles. In S.E. Harding, A.J. Rowe, and J.C. Horton, editors, *Analytical Centrifugation in Polymer Science and Biochemistry*, pages 333–345. Eds. The Royal Society of Chemistry, 1992.
- [17] J. García de la Torre, A. Ortega, and H. E. Pérez. Solution properties of flexible macromolecules. Theoretical and computational approaches. In D. J. Scott, S.E. Harding, and A. Rowe, editors, *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and methods*, pages 449–467. Royal Society of Chemistry, Oxford, 2005.
- [18] J. García de la Torre and A. Ortega. HYDRO Suite of computer programs for solution properties of rigid macromolecules. In *Encyclopedia of Biophysics*, pages 1002–1006. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2013.
- [19] D. Amorós, A. Ortega, S.E. Harding, and J. García de la Torre. Multi-scale calculation and global-fit analysis of hydrodynamic properties of biological macromolecules: determination of the overall conformation of antibody IgG molecules. *Eur. Biophys. J.*, 39:361–370, 2010.
- [20] J. García de la Torre, A. Ortega, D. Amorós, R. Rodríguez Schmidt, and J. G. Hernandez Cifre. Methods and tools for the prediction of hydrodynamic coefficients

- and other solution properties of flexible macromolecules in solution. A tutorial minireview. *Macromol. Biosci.*, 10:721–730, 2010.
- [21] A. Ortega, D. Amorós, and J. García de la Torre. Global fit and structure optimization of flexible and rigid macromolecules and nanoparticles from analytical ultracentrifugation and other dilute solution properties. *Methods*, 54:115–123, 2011.
 - [22] A.I. Díez, J.M. Ortiz Guerrero, A.Ortega, M. Elías-Arnanz, S. Padmanabhan, and J. García de la Torre. Analytical ultracentrifugation studies of oligomerization and DNA-binding of TtCarH, a *Thermus thermophilus* coenzyme B₁₂-based photosensory regulator. *Eur. Biophys. J.*, 42:463–476, 2013.
 - [23] R. Domenech, J.G. Hernández Cifre, J. Bacarizo, A.I. Díez, S. Martínez-Rodríguez, C.N. Cavassoto, J. García de la Torre, A. Cámara-Artigas, A. Velázquez, and J. L Neira. The histidine-phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus sphaericus* self-associates. *PLOS ONE*, 8:e69307, 2013.
 - [24] A. Ortega, R. Pamies, K. Zhu, A. L. Kjøniksen, B. Nyström, and J. García de la Torre. Characterization of low molecular mass thermosensitive diblock copolymers and their self-assembly by means of analytical ultracentrifugation. *Colloid Polym. Sci.*, 290:297–306, 2012.
 - [25] J.G. Hernández Cifre and J. García de la Torre. Ionic strength effect in polyelectrolyte dilute solutions within the Debye-Huckel approximation: Monte Carlo and Brownian dynamics simulations. *Polym. Bull.*, 71:2269–2285, 2014.
 - [26] F.G. Díaz Baños, A. Díez, J.G. Hernández Cifre, M.C. López Martínez, A.Ortega, and J. García de la Torre. Influence of ionic strength on the flexibility of alginate studied by size exclusion chromatography. *Carbohydr. Polym.*, 102:223–230, 2014.
 - [27] P. Schuck. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.*, 78:1606–1619, 2000.
 - [28] P. Schuck. Sedimentation patterns of rapidly reversible protein interactions. *Biophys. J.*, 98:2005–2013, 2010.

- [29] P. Schuck. Diffusion of the reaction boundary of rapidly interacting macromolecules in sedimentation velocity. *Biophys. J.*, 98:2741–2751, 2010.
- [30] J. Vistica, J. Dam, A. Balbo, E. Yikilmaz, R.A. Mariuzza, T.A. Rouault, and P. Schuck. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. *Anal. Biochem.*, 326:234–256, 2004.
- [31] <http://www.analyticalultracentrifugation.com/lammeqsolutions.htm>.
- [32] J.M. Claverie, H. Dreux, and R. Cohen. Sedimentation of generalized systems of interacting particles. I. Solution of systems of complete Lamm equations. *Biopolymers*, 14:1685–1700, 1975.
- [33] A.I. Díez, A. Ortega, and J. García de la Torre. Brownian dynamics simulation of analytical ultracentrifugation experiments. *BMC Biophys.*, 54:6, 2011.
- [34] G. Ralston. *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*. Beckman Instruments, Inc, Fullerton, California, 1993.
- [35] J. Lebowitz, M.S. Lewis, and P. Schuck. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci.*, 11:2067–2079, 2002.
- [36] K.E. Van Holde. *Bioquímica Física*. Alhambra, Madrid, 1979.
- [37] D. Freifelder. *Physical Biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1976.
- [38] S.E. Harding. Challenges for the modern analytical ultracentrifuge analysis of polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 340:811–826, 2005.
- [39] http://www.analyticalultracentrifugation.com/systematic_noise_analysis.htm.
- [40] http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/experimental_protocols.htm.
- [41] *Instructions For Use. An-50 Ti and An-60 Ti Analytical Rotor, Cells, and Counterbalance. For Use in Beckman Coulter Analytical XL-A and XL-I Instruments*. Beckman Coulter, Inc., 2011.

- [42] W.F. Stafford. Methods for obtaining sedimentation coefficient distributions. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, pages 360–393. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.
- [43] J.J. Müller. Prediction of the rotational diffusion behavior of biopolymers on the basis of their solution or crystal structure. *Biopolymers*, 31:149–160, 1991.
- [44] O. Lamm. Die differentialgleichung der ultrazentrifugierung. *Ark. Mat. Astr. Fys.*, 21B:1–4, 1929.
- [45] M.D. Lechner. Determination of molecular weight averages and molecular weight distributions from sedimentation equilibrium. In *Analytical ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, pages 295–310. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.
- [46] S.E. Harding and P. Schuck. A brief introduction to the analytical ultracentrifugation of proteins for beginners. In *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*, pages 1–25. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.
- [47] P. Schuck. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.*, 320:104–124, 2003.
- [48] C.A. Brautigam. Using Lamm-Equation modeling of sedimentation velocity data to determine the kinetic and thermodynamic properties of macromolecular interactions. *Methods*, 54:4–15, 2011.
- [49] http://en.wikipedia.org/wiki/lamm_equation.
- [50] H. Faxén. Über eine differentialgleichung aus der physikalischen chemie. *Arkiv. Mat. Astron. Fysik*, 21 B:1–6, 1929.
- [51] H. Fujita. *Mathematical Theory of Sedimentation Analysis*. Academic Press, New York, 1962.
- [52] F. Perrin. Mouvement brownian d’un ellipsoïde. I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *J. Phys. Radium*., 5:497–511, 1934.
- [53] F. Perrin. Mouvement Brownien d’un ellipsoïde. II. Rotation libre et depolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales. *J. Phys. Radium*, 7:1–11, 1936.

- [54] J. García de la Torre, M.L. Huertas, and B. Carrasco. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structures. *Biophys. J.*, 78:719–730, 2000.
- [55] M. Bastos, V. Castro, G. Mrevlishvili, and J. Teixeira. Hydration of ds-DNA and ss-DNA by neutron quasielastic scattering. *Biophys. J.*, 86:3822–3827, 2004.
- [56] J. García de la Torre, S. Navarro, M.C. López Martínez, F.G. Díaz, and J.J. López Cascales. HYDRO: a computer software for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys. J.*, 67:530–531, 1994.
- [57] J. García de la Torre, G. Del Río Echenique, and A. Ortega. Improved calculation of rotational diffusion and intrinsic viscosity of bead models for macromolecules and nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 111:955–961, 2007.
- [58] A. Ortega, D. Amorós, and J. García de la Torre. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys. J.*, 101:892–898, 2011.
- [59] J. García de la Torre and B. Carrasco. Hydrodynamic properties of rigid macromolecules composed of ellipsoidal and cylindrical subunits. *Biopolymers*, 63:163–167, 2002.
- [60] J. García de la Torre, H.E. Pérez Sánchez, A. Ortega, J.G. Hernández Cifre, M.X. Fernandes, F.G. Díaz Baños, and M.C. López Martínez. Calculation of the solution properties of flexible macromolecules: methods and applications. *Eur. Biophys. J.*, 32:477–486, 2003.
- [61] J. García de la Torre, A. Ortega, H.E. Pérez Sánchez, and J.G. Hernández Cifre. MULTIHIDRO and MONTEHYDRO: Conformational search and Monte Carlo calculation of solution properties of rigid and flexible macromolecular models. *Biophys. Chem.*, 116:121–128, 2005.
- [62] J. García de la Torre, J.G. Hernández Cifre, A. Ortega, R. Rodríguez Schmidt, M.X. Fernandes, H. E. Pérez Sánchez, and R. Pamies. SIMUFLEX : Algorithms and tools for simulation of the conformation and dynamics of flexible molecules and nanoparticles in solution. *J. Chem. Theor. Comput.*, 5:2606–2618, 2009.

- [63] http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedfit_help_model.htm.
- [64] http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedfit_help_cs.htm.
- [65] P. Schuck and P. Rossmanith. Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers*, 54:328–341, 2000.
- [66] http://www.analyticalultracentrifugation.com/lsgofs_distribution.htm.
- [67] http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedfit_help_ls-gs.htm.
- [68] J.C. Nash. The (Dantzig) simplex method for linear programming. *Computing in Science and Engineering*, 2:29–31, 2000.
- [69] <http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>.
- [70] <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/default.htm>.
- [71] T. M. Laue, B. D. Shah, T. M. Ridgeway, and S. L. Pelletier. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, pages 90–125. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1992.
- [72] M.A. Llorente and A. Horta. *Técnicas de Caracterización de Polímeros*. UNED, Madrid, 1991.
- [73] S.W. Provencher. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput. Phys. Commun.*, 27:229–242, 1982.
- [74] W.F. Stafford. Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal. Biochem.*, 203:295–301, 1992.
- [75] J.D. Harvey, R. Geddes, and P.R. Wills. Conformational studies of BSA using laser light scattering. *Biopolymers*, 18:2249–2260, 1979.
- [76] P. G. Squire, P. Maser, and C. T. O’Konsk. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry*, 7:4261–4272, 1968.

- [77] H. A. McKenzie, M. B. Smith, and R. G. Wake. The denaturation of proteins. I Sedimentation, diffusion, optical rotation, viscosity and gelation in urea solutions of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, 69:222–239, 1963.
- [78] M. L. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carrasco, J. García de la Torre, and A.U. Acuña. The conformation of serum albumin in solution. A combined phosphorescence depolarization - hydrodynamic modeling study. *Biophys. J.*, 80:2422–2430, 2001.
- [79] P. A. Charlwood. Partial specific volumes of proteins in relation to composition and environment. *Methods Cell Biol.*, 79:776–781, 1956.
- [80] H. P. Erickson. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11:32–51, 2009.
- [81] S. E. Harding, K. Day, R. Dhami, and P.M. Lowe. Further observations on the size, shape and hydration of kappa-carrageenan in dilute solution. *Carbohydr. Polym.*, 32:81–87, 1997.
- [82] D. Sloodmaekers, M. Mandel, and H. Reynaers. Dynamic light scattering by κ - and λ - carrageenan solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 13:17–25, 1991.
- [83] G. A. Morris, T.J. Foster, and S. E. Harding. A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydr. Polym.*, 48:361–367, 2002.
- [84] G. A. Morris, J. García de la Torre, A. Ortega, J. Castile, A. Smith, and S. E. Harding. Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*, 22:1435–1442, 2008.
- [85] M.D. Lechner and D.G. Steinmeier. *Sedimentation coefficients, diffusion coefficients, partial specific volumes, frictional ratios, and second virial coefficients of polymers in solution*. J. Wiley & Sons, New York, 3rd edition, 1989.
- [86] A. Ortega and J. García de la Torre. Equivalent radii and ratios of radii from solution properties as indicators of macromolecular conformation, shape, and flexibility. *Biomacromolecules*, 8:2464–2475, 2007.

- [87] P.M. Budd. Sedimentation behaviour in dilute solutions of a polyelectrolyte. *Polymer*, 26:1519–1522, 1985.
- [88] G.M. Pavlov, A.S. Gubarev, I.I. Gavrilova, and E.F. Panarin. Conformation of sodium poly(styrene-4-sulfonate) macromolecules in solutions with different ionic strength. *Polymer Science, Ser. A*, 53:1003–1011, 2011.
- [89] M. Fakuda. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol. Life Sci.*, 65:2801–2813, 2008.
- [90] M. Fakuda. Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic*, 14:949–963, 2013.
- [91] G. Baldini, A.M. Martelli, G. Tabellini, C. Horn, K. Machaca, and P. Narducci. Rabphilin localizes with the cell actin cytoskeleton and stimulates association of granules with F-actin cross-linked by α -actinin. *J. Biol. Chem.*, 280:34974–34984, 2005.
- [92] T. Tsuboi and M. Fukuda. The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 280:39253–39259, 2005.
- [93] F. Deak, O.H. Shin, J. Tang, P.Hanson, J. Ubach, R. Jahn, J. Rizo, E.T. Kavalali, and T.C. Südhof. Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *EMBO J.*, 25:2856–2866, 2006.
- [94] T. Ohya, T. Sasaki, M. Kato, and Y. Takai. Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *J. Biol. Chem.*, 273:613–617, 1998.
- [95] C. Ostermeier and A.T. Brunger. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96:363–374, 1999.
- [96] M. Biadene, P. Montaville, G.M. Sheldrick, and S. Becker. Structure of the C2A domain of rabphilin-3A. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 62:793–799, 2006.
- [97] J. Ubach, J. García, M.P. Nittler, T.C. Südhof, and J. Rizo. Structure of the Janus-faced C2B domain of rabphilin. *Nat. Cell Biol.*, 1:106–112, 1999.

- [98] M. Miyazaki, H. Shirataki, H. Kohno, K. Kaibuchi, A. Tsugita, and Y. Takai. Identification as β -adducin of a protein interacting with rabphilin-3A in the presence of Ca^{2+} and phosphatidylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205:460–466, 1994.
- [99] Y. Zhang, Z. Luan, A. Liu, and G. Hu. The scaffolding protein CASK mediates the interaction between rabphilin3a and β -neurexins. *FEBS Lett.*, 497:99–102, 2001.
- [100] A. Willshaw, K. Grant, J. Yan, N. Rockliffe, S. Ambavarapu, G. Burdyga, A. Varro, S.Fukuoka, and D. Gawler. Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett.*, 559:13–21, 2004.
- [101] J.M. Ortiz-Guerrero, M.C. Polanco, F.J. Murillo, S. Padmanabhan, and M. Elías-Arnanz. Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 108:7565–7570, 2011.
- [102] M.C. Perez-Marín, S. Padmanabhan, M.C. Polanco, F.J. Murillo, and M. Elías-Arnanz. Vitamin B12 partners the CarH repressor to downregulate a photoinducible promoter in *myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.*, 67:804–819, 2008.
- [103] D. Amorós, A. Ortega, and J. García de la Torre. Hydrodynamic properties of wormlike macromolecules: Monte Carlo simulation and global analysis of experimental data. *Macromolecules*, 44:5788–5797, 2011.
- [104] M.C. López Martínez and J. García de la Torre. Transport properties of rigid, symmetric oligomeric subunit structures composed of prolate ellipsoidal subunits. *Biophys. Chem.*, 18:268–279, 1983.
- [105] B. Carrasco, S.E. Harding, and J. García de la Torre. Bead modelling using HYDRO and SOLPRO of the conformation of multisubunit proteins: sunflower and rape-seed 11S globulins. *Biophys. Chem.*, 74:127–133, 1998.
- [106] B. Carrasco, J. García de la Torre, and S.E. Harding. Models for multisubunits conformation of oil-seed globulins. *Biochem. Soc. Trans.*, 26:721–725, 1998.
- [107] J. García de la Torre and B. Carrasco. Intrinsic viscosity and rotational diffusion of bead models for rigid particles. *Eur. Biophys. J.*, 27:549–557, 1998.

- [108] A. Ortega, D. Amorós, and J. García de la Torre. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys. J.*, 101:892–898, 2011.
- [109] A. Ortega and J. García de la Torre. Hydrodynamic properties of rodlike and disklike particles in dilute solution. *J. Chem. Phys.*, 119:9914–9919, 2003.
- [110] P.H. Brown and P. Schuck. A new adaptive grid-size algorithm for the simulation of sedimentation velocity profiles in analytical ultracentrifugation. *Comp. Phys. Comm.*, 178:105–120, 2008.
- [111] <http://www.gnuplot.info/>.
- [112] <http://leonardo.inf.um.es/macromol/programs/visualbeads3/visualbeads3.pdf>.
- [113] Z. Luo and G. Zhang. Scaling for sedimentation and diffusion of poly(ethylene glycol) in water. *J. Phys. Chem.*, 113:12462–12465, 2009.
- [114] G.M Pavlov, E.K. Korneeva, N.A. Smolina, and U.S. Shubert. Hydrodynamic properties of cyclodextrin molecules in dilute solutions. *Eur. Biophys. J.*, 39:371–379, 2010.
- [115] D. Crothers and B. Zimm. Viscosity and sedimentation of DNA from bacteriophages T2 and T7 and relation to molecular weight. *J. Mol. Biol.*, 12:525–536, 1965.
- [116] A. Horta. *Macromoléculas*, volume 1. UNED, Madrid, 1982.
- [117] A. Horta and M.A. Pastoriza. The molecular weight distribution of polymer samples. *J. Chem. Ed.*, 84:1217–1221, 2007.
- [118] Y. Shin-ya, T. Yoshizawa, K.J. Hong, M.Y. Lee, and T. Kajiuchi. Log-normal distribution for a description of the molecular weight distribution of n-acetylated chitosans depolymerized with hydrolytic enzyme. *Polymer International*, 52:838–842, 2003.
- [119] D.I. Svergun. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys. J.*, 76:2879–2886, 1999.

- [120] J. García de la Torre. Dynamics of segmentally flexible biological macromolecules. *Eur. Biophys. J.*, 23:307–322, 1994.
- [121] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.*, 68:1106–1122, 1949.
- [122] A. D. McNaught and A. Wilkinson. *Compendium of Chemical Terminology. The Gold Book, Second Edition*. Blackwell Science, London, 1997.
- [123] W. H. Press, S.A. Teukolski, W. T. Vetterling, and B.P. Flannery. *Numerical Recipes in Fortran 77. The Art of Scientific Computing. Second Edition*. Cambridge University Press, 2006.
- [124] J.A. Nelder and R. Mead. A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7:308–313, 1965.
- [125] D. Jolly and H. Eisenberg. Photon correlation spectroscopy, total intensity light-scattering with laser radiation, and hydrodynamic studies of a well fractionated DNA sample. *Biopolymers*, 15:61–95, 1976.
- [126] Z. Kam, N. Borochoy, and H. Eisenberg. Dependence of laser light scattering of DNA on NaCl concentration. *Biopolymers*, 20:2671–2690, 1981.
- [127] R.T. Kovacic and K.E. Van Holde. Sedimentation of homogeneous double stranded DNA molecules. *Biochemistry*, 16:1490–1498, 1977.