



REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Estructura y dinámica de las proteínas
Los modelos multiescala aplicados a biomoléculas

DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. DR.

D. Francisco Tomás Vert

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

ILMO. SR. DR.

D. Juan Viña Ribes

Leídos el 23 de febrero de 2016

VALENCIA

Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana
Avda. Blasco Ibáñez, 15 (Facultad de Medicina)
Tels. 963 864 150 y 963 864 653. Fax 963 864 173
46010 VALENCIA

Depósito Legal: V. 34 - 2016

Artes Gráficas Soler, S. L. • www.graficas-soler.com

Sumario

Discurso de recepción del académico electo, Excmo. Sr. Dr. D. Francisco Tomás Vert. <i>Estructura y dinámica de las proteínas. Los modelos multiescala aplicados a biomoléculas</i>	7
Agradecimientos	9
1. El plegamiento de las proteínas	13
1.1 Introducción	13
1.2 El proceso del plegamiento	14
1.3 El plegamiento anómalo de las proteínas. Algunas patologías derivadas	16
2. La determinación de la estructura de las proteínas	18
3. Métodos de cálculo teóricos en grandes moléculas	22
3.1 Mecánica Cuántica de sistemas polielectrónicos	22
3.2 Modelos multiescala para sistemas químicos complejos	
3.2.1 Introducción	24
3.2.2 Métodos QM/MM	29
3.2.2.1 Los métodos mecano-cuánticos (QM) para sistemas poliatómicos	29
3.2.2.2 La expresión de la energía potencial molecular en el marco de la Mecánica Molecular	32
3.2.2.3 La expresión de la energía total en los métodos multiescala	34
4. Técnicas de optimización y simulación en QM/MM	37
4.1 Simulación y Dinámica Molecular	40
4.2 Simulación del plegamiento de las proteínas	42
4.3 Consideraciones finales	44
5. Algunos estudios en Bioquímica Computacional	45
5.1 Estudios pioneros	46
5.1.1 Simulaciones sobre la lisozima	46
5.1.2 Inhibidor de la tripsina en el páncreas Bovino (BPTI)	48

5.1.3. El papel del agua de solvatación	50
5.2 Simulaciones de movimientos moleculares	51
5.2.1. Acción de la enzima adenilato-kinasa	52
5.2.2. RNA Polimerasa II.	53
5.2.3. Kinesinas	53
5.2.4 Ribosomas	55
5.2.5 La F_0F_1 -ATPS	56
5.2.6 Modelado computacional de anticuerpos	57
5.3 Perspectivas de futuro	58
6. Conclusión	59
Referencias bibliográficas	61
Discurso de contestación del académico numerario Ilmo. Sr. Dr. D. Juan Viña Ribes	73

DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO

ILMO. SR. DR.

D. Francisco Tomás Vert

Estructura y dinámica de las proteínas
Los modelos multiescala aplicados a biomoléculas

EXCMO. SR. PRESIDENTE,
EXCMOS. E ILMOS. SRS. ACADÉMICOS,
EXCMAS. E ILMAS. SRAS. ACADÉMICAS,
DISTINGUIDOS COLEGAS,
SEÑORAS Y SEÑORES:

EN ESTE MOMENTO y al presentarme a ustedes, son dos los sentimientos que me embargan. En primer lugar, un profundo respeto; respeto ante una institución como la Real Academia de Medicina y Ciencias Afines de la Comunidad Valenciana, que durante casi doscientos años, ha sido, diré mejor, es, el crisol que ha acogido y acoge a destacados estudiosos, investigadores, pero sobre todo profesionales de la práctica médica en nuestro ámbito territorial contribuyendo así a difundir sus saberes entre todos y propiciando además su reconocimiento social. Respeto por tanto ante la Institución, pero especialmente ante las académicas y los académicos cuya dilatada labor profesional y dedicación a la Academia me plantean retos que, en todo caso, serán difíciles de superar.

Junto al respeto, me embarga en este momento una enorme gratitud a cuantos han contribuido a promover mi candidatura y posteriormente a propiciar mi elección. En primer lugar haré mención de los Académicos la Doctora María Luz Terrada Ferrandis, y los Doctores José Luis Moreno Frígols y Javier Hernández Haba, quienes presentaron mi candidatura como académico. La Doctora Terrada es reconocida como una de las mayores autoridades en Documentación Médica y Científica, en toda Europa con una amplia dedicación a la docencia y siendo autora de un elevado número de publicaciones sobre esta materia. Ha sido Catedrática Numeraria de Documentación Médica en la Universidad de Valencia. El Doctor Moreno, especialista en Radiofarmacia, con una significativa producción científica en el campo de la inmunorradiometría, y la radiofarmacología. Ha

sido Catedrático numerario de Fisicoquímica Aplicada de la Universidad de Valencia. El Doctor Hernández, microbiólogo de prestigio, realiza su investigación principalmente sobre microbiología de los alimentos, y ha desplegado una intensa labor formativa en ese campo junto a una muy estimable producción científica. Es Catedrático Numerario de la Universidad Politécnica de Valencia. Es para mí un honor haber sido presentado por tan distinguidos académicos y por ello tendrán mi gratitud por siempre.

También quiero expresar mi profunda gratitud a las académicas y académicos, a todos ellos, quienes con una tremenda generosidad valoraron mis limitados méritos y me aceptaron en esta Academia con su elección. Son para mí, un estímulo, un ejemplo y un reto que informarán mi vida en esta Institución.

Mi agradecimiento también, junto con mi reconocimiento a quienes integran la Junta Directiva de la Academia, que tan dignamente preside el Doctor Antonio Llobart Bosch, cuyo prestigio médico y científico es emblemático, fruto de profundos conocimientos médicos, pero también de una gran inquietud intelectual. En todos ellos, he encontrado apoyo, consejo, e incluso ánimos para abordar esta empresa que hoy culmina, y un afecto que no desearía perder.

De un modo especial quiero expresar mi gratitud al Doctor Juan Viña Ribes por haber aceptado pronunciar el discurso de recepción a esta Academia. El Doctor Viña reúne en su persona un prestigio que traspasa nuestras fronteras, prestigio como médico y como gran investigador en aspectos fundamentales de las ciencias de la vida. Persona, además que se preocupa por impulsar la existencia en nuestra casa de infraestructuras de investigación de propósito general. Prueba de ello son sus doce años como Director General de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia origen del actual INCLIVA. Me siento profundamente honrado por ser presentado por una persona tan significada, por un científico tan relevante que además me distingue con su amistad.

El sillón de la Academia para el que he sido propuesto fue ocupado anteriormente por el Excelentísimo Doctor Don Vicente Dualde Pérez desde 1976. Nacido en Villarreal en 1923, Doctor en Veterinaria y posteriormente licenciado en Ciencias Biológicas, el Doctor Dualde supo conjugar una extraordinaria dedicación a la docencia, con el ejercicio de su profesión de veterinario en muy diversos ambientes. Su docencia se distribuyó entre los Institutos de Enseñanza Media “Benlliure” y “San Vicente Ferrer” de Valencia como Catedrático Numerario de Ciencias Naturales, y la Universidad en los primeros años de la puesta en marcha de los estudios de Biología de la Universidad de Valencia. Autor de libros y monografías es autor de numerosas publicaciones científicas sobre Hematología animal e Historia de la Veterinaria. De estas últimas cabe resaltar las que se refieren a la profesión de “albéitar” en el Reino de Valencia a lo largo de la historia. Doctor Dualde, maestro, profesor y científico, descanse en paz.

Al reflexionar sobre aquellos que nos han precedido como académicos, quisiera recordar también a la persona del Doctor Adolfo Benages que no hace mucho nos dejó. Adolfo Benages fue un académico cuyos méritos profesionales son conocidos por la mayoría de nosotros y aquí no me extenderé. Le recordaré como la gran persona que era, amigo de sus amigos que eran muchos, amigo de sus enfermos, un gran médico. Estudiamos el bachillerato en el mismo Colegio, durante los mismos años, y finalmente tuve la suerte de que fuese mi médico hasta que prematuramente nos dejó.

La actividad de la Academia de Medicina se despliega sobre el territorio de la Comunidad Valenciana pero su sede se ubica en este edificio de la Facultad de Medicina, una de las Facultades más antiguas de la Universidad de Valencia a la que pertenece desde su fundación. En esta Facultad fue donde por primera vez en mi carrera docente asumí la plena responsabilidad de una asignatura. Fue en los cursos 1969-70 y 1970-71 donde tuve a mi cargo las enseñanzas de la asignatura de Química Médica en un nuevo plan de estudios que se implantó entonces y cuya vida fue ciertamente efímera.

Tal vez porque en esos años también inicié mi vida familiar diré que entonces fui feliz porque nunca tuve un colectivo de alumnos tan motivado, tan atento y ... tan numeroso. En la Facultad de Medicina conocí además a muchos Profesores como los Doctores Carbonell, García Conde, Llombart, López Piñero, Smith, Viña, Valdés y tantos otros que aunque inmersos en una visión jerárquica de la Universidad de entonces se preocupaban por desarrollar escuelas y por motivar la vocación médica y científica de los estudiantes de Medicina.

Mi relación con la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia no termina aquí, sino que en el transcurso del tiempo y a medida que fui adquiriendo responsabilidades de gobierno en la Universidad he podido contribuir a hacer posibles iniciativas y proyectos promovidos desde la Facultad de Medicina para desarrollar mejores estructuras que permitieran una enseñanza mejor y una investigación de calidad en una institución de fuerte arraigo en nuestra sociedad.

Quisiera referirme finalmente a la propia definición de la Real Academia de Medicina, pero también de Ciencias Afines. Ciencias Afines, no solamente por el hecho de que la Ciencia no conoce fronteras y mucho menos en la actualidad donde el conocimiento es poliédrico y se desarrolla sobre multitud de aspectos y de ramas de la Ciencia. El enorme progreso alcanzado por la Medicina en este siglo no se entendería sin las aportaciones de ciencias como la Química la Física o la Biología, pero creo entender y así lo asumiré como académico que la definición de la Academia confiere un papel central a la Medicina que es la que reclama a las otras ciencias su aporte para poder afrontar los problemas que afectan a la vida y la salud de los seres humanos.

Porque es justo que en una época de progreso científico y tecnológico reivindicemos para la Medicina su carácter de Ciencia, en su metodología y en su concepción y así lo hagamos valer. Pero ello no nos debe hacer olvidar esa otra faceta que reclama el carácter de Arte, como parece recordarnos con insistencia la estatua que corona la entrada a este noble edificio. Arte que va mucho más allá de la pura estética y que se plasma en el cuidado con el que el médico atiende al ser humano que sufre.

Estructura y dinámica de las proteínas

Los modelos multiescala aplicados a biomoléculas

“... Y ¿dudarás acaso cuánto importa considerar la mezcla de los átomos, su posición y mutuos movimientos?...
Tito Lucrecio : “De Rerum Natura”

1. EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEINAS

1.1. Introducción

La función de las proteínas celulares depende de su estructura tridimensional que se ha configurado mediante los plegamientos de las cadenas polipeptídicas que las integran, fruto de la transcripción del Genoma nuclear o mitocondrial. La estructura funcional tridimensional de una proteína es consecuencia exclusivamente de la cadena polipeptídica que la forma (Anfinsen, 1973). El proceso del plegamiento de una cadena polipeptídica puede entenderse como la paulatina adquisición de las interacciones no enlazadas entre los aminoácidos que la integran tal y como se dan en la proteína nativa.

La información que describe la estructura tridimensional está implícita en la propia cadena proteínica, en la composición y la ordenación de los aminoácidos que la integran. Las proteínas que se dan en la naturaleza, obviamente adquirirán su conformación nativa cuando se forman en el entorno biológico correcto.

Ahora bien, cómo se consigue una estructura determinada de una proteína en una célula viva que cumpla una función explícita, puesto que estadísticamente para una cadena polipeptídica dada pueden concebirse un número enorme de conformaciones posibles y de acuerdo con la paradoja de Levinthal (Levinthal, 1968) una búsqueda aleatoria de la conformación final podría suponer millones de años.

Las proteínas deben alcanzar su estructura terciaria plegada “correcta” antes de que puedan desarrollar adecuadamente su función en el lugar adecuado de la célula. Dicho de otro modo la estructura correcta será aquella que posibilite el ejercicio de la función específica. Teniendo en cuenta la paradoja de Levinthal, parece obvio que las proteínas no pueden “explorar” todas las posibles combinaciones de interacción para alcanzar su conformación nativa. Sin embargo, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que las cadenas polipeptídicas de una proteína pueden seguir diferentes maneras de alcanzar la misma conformación nativa, o lo que es lo mismo no existe un orden preestablecido para ir fijando las diferentes interacciones entre los diferentes aminoácidos (Dinner y col. 2000).

1.2. El proceso del plegamiento

Diríase que la naturaleza no invierte “su” tiempo en búsquedas aleatorias, de hecho utiliza un conjunto de “reglas” bioquímicas y ha generado algunos compuestos asistentes que facilitan los procesos de plegado y que se conocen con el nombre de chaperonas moleculares (Ellis, 1990 y 2001) y también determinadas proteasas. Las chaperonas se han definido como las proteínas que contribuyen al ensamblaje no covalente de otras estructuras polipeptídicas *in vivo*, sin ser componentes de esas estructuras que ensamblan (Ellis, 1993). Estas chaperonas dirigen el plegamiento de las proteínas buscando una conformación que implique un mínimo de energía libre. Es evidente que dado el elevado número de grados de libertad que posee una cadena polipeptídica, existirán muy diversos mínimos conformaciona-

les en la superficie de energía potencial de la cadena. La selección de ellos se producirá mediante la acción de las chaperonas que dirigirán a la maquinaria de síntesis hacia el mínimo global de energía libre, que en los procesos *en vivo* conducirán a la proteína nativa (Dill, 1985). Las chaperonas buscan en las cadenas polipeptídicas parcialmente plegadas la existencia de aminoácidos hidrofóbicos que en una proteína “correctamente” plegada quedarán recluidos en el núcleo de la misma.

La energía libre de una proteína dependerá de su conformación que será el resultado de considerar junto con la estructura del esqueleto polipeptídico las interacciones no covalentes entre los residuos de los aminoácidos que la integran. Por esta razón, pequeñas modificaciones en la cadena de aminoácidos podrán alterar la superficie de energía libre molecular que derivará hacia nuevos mínimos locales de energía y en casos extremos hacia un nuevo mínimo global de energía que significará una nueva configuración diferente a la proteína nativa inicial, invalidando así la función inicial de la misma, llegando en algunos casos a propiciar la agregación proteínica. En esta competencia por retomar la conformación nativa frente a otras que pudieran plantearse juegan un papel crucial las chaperonas moleculares, las interacciones con otras proteínas, o bien exponiendo los residuos hidrofóbicos al entorno de solvatación, lo que implica precisamente elevar la energía libre, lo que posibilita la búsqueda de un nuevo mecanismo de plegado hacia la estructura nativa (Bross y Gregersen 2003, Gregersen y col. 2006). Se han descrito incluso chaperonas capaces de desplegar proteínas o recuperar proteínas agregadas (Maurizi 2001).

Cabría preguntarse si es la estructura tridimensional de una proteína la que determina su función en un ser vivo, o si ha sido la necesidad de desarrollar una función la que ha motivado la búsqueda de una estructura proteínica que la haga posible. En todo caso esta disyuntiva plasmada en el libro de la evolución ha ido siendo resuelta a lo largo de la historia del universo de forma pragmática.

1.3. El plegamiento anómalo de las proteínas. Algunas patologías derivadas

La anomalía en los plegamientos de las proteínas se establece por referencia a los plegamientos que se dan en las formas nativas de éstas que posibilitan su función. Puede deberse a modificaciones genéticas adquiridas o heredadas, o bien a factores ambientales, que producen alteraciones en la cadena de aminoácidos que concluyen en proteínas con plegamientos anómalos, lo que puede derivar en consecuencias no deseables incluso patológicas.

El plegamiento anómalo de las proteínas se produce con cierta frecuencia en las células vivas. En las células sanas, las proteínas mal plegadas se eliminan por diferentes mecanismos o sistemas de control de la calidad de las proteínas conocidos como PQC (Bross y col. 2003). Estos sistemas han evolucionado de manera que supervisan el plegamiento, impiden la agregación, y eliminan las cadenas polipeptídicas dañadas o mal plegadas antes de que puedan producir los efectos no deseables. Esencialmente los PQC constan de chaperonas moleculares junto a proteasas y otros factores intracelulares. De este modo, las tareas fundamentales de los sistemas PQC serán la producción y el mantenimiento de las proteínas funcionalmente correctas, su renovación, y la eliminación de proteínas dañadas o aberrantes.

Normalmente los sistemas PQC pueden eliminar los productos defectuosos debidos a la translación desde los ribosomas, o bien proteínas aberrantes producidas por modificaciones genéticas, o por daños producidos por acciones químicas como las que provoca la presencia de especies reactivas del oxígeno (Dunlop y col. 2002). Las perturbaciones de todo tipo que afecten a los sistemas PQC, podrán desencadenar las patologías motivadas por el plegamiento anómalo de las proteínas.

En células de cierta edad o de pacientes con diversas enfermedades genéticas, la capacidad de los sistemas PQC puede verse superada con el resultado de que se acumulen esas proteínas erróneas en los diversos tejidos incluso produciendo agregaciones, con la consecuente

alteración del funcionamiento celular y su correspondiente patología. Estos diversos factores dan origen a un gran número de enfermedades que, si bien son diferentes, como los desarreglos metabólicos innatos o las enfermedades neurodegenerativas por ejemplo, pueden considerarse en ambos como enfermedades derivadas del plegado proteínico anómalo o más comúnmente conocidas como enfermedades conformacionales, que cabe pensar tendrán mecanismos patológicos y eventualmente tratamientos semejantes. Si bien cabría reunir las en dos grandes grupos: el de aquellas que se producirían por la pérdida de la función necesaria a causa de la deformación de la proteína que la hace inútil, como sucede con muchos desórdenes metabólicos, y que suelen ser hereditarias; y el de las que se producen por la aparición de nuevas funciones derivadas de la acumulación de proteínas anómalas que pueden ser tóxicas o producir acumulaciones de péptidos no deseados en las células.

En la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, una forma humana de la llamada enfermedad de las vacas locas, el cerebro de una persona se deteriora produciéndose huecos que dan lugar a un progreso rápido de la demencia. Tras esta enfermedad se encuentran los priones, que son proteínas con plegamiento anómalo que inducen a las proteínas de su entorno a que se plieguen también de manera anómala, y se acumulen en los tejidos. Se ha podido demostrar que este tipo de proteínas patológicas que se autopropagan causan también algunos otros desórdenes cerebrales como los producidos por el kuru en Papua Nueva Guinea.

Estas enfermedades se relacionan con desórdenes cuya característica principal es la acumulación dentro o fuera de las células de agregados proteicos, al igual que se produce en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Carrell y col. 1997 y 2002 y Crowther 2002). En esencia la patología de este tipo de enfermedades se debe a la incapacidad de las células para degradar las proteínas defectuosas o mal plegadas, formándose agregados de polímeros u oligómeros citotóxicos. La patología de este tipo de enfermedades surge por el daño celular asociado con el proceso de agregación, que da origen a nuevas funciones en la célula. Junto a las patologías asociadas directamente con el

plegamiento anómalo, las enfermedades conformacionales pueden desarrollar manifestaciones patológicas específicas de las proteínas plegadas anómalamente, que son determinantes en el desarrollo de ciertas enfermedades, como es el caso de algunos desórdenes metabólicos producidos por la acumulación de componentes en las células, como sustratos para enzimas o ligandos de receptores u otras sustancias. En resumen, la patología de las enfermedades conformacionales, vendrá asociada bien a los efectos negativos producidos por la proteína anómalamente plegada, entre los que está la agregación, o bien por la acumulación de productos tóxicos.

Este tipo de enfermedades tienen una etiología multifactorial, implicando componentes genéticos así como fisiológicos o incluso ambientales. Así enfermedades como las de Alzheimer, Parkinson y Huntington están consideradas como desórdenes monogénicos clásicos, otras como ciertas cardiomiopatías (Burch, 1999) son enfermedades hereditarias dominantes. Otras, en fin como la fibrosis quística (Riordan y col. 1999) o la fenilcetonuria (Waters 2000) son ejemplos de desórdenes autosomales recesivos.

Lo expresado anteriormente no es sino una muestra de la importancia que tiene la conformación de las proteínas en el desarrollo correcto de la función de las mismas en las células de los seres vivos. No el objetivo de esta exposición explorar esas patologías enunciadas u otras semejantes, antes bien, desde mi formación química, desearía profundizar un poco en aquello que esta ciencia viene aportando al conocimiento de la estructura tridimensional de las proteínas y a la dinámica de los procesos químicos en los que intervienen en las células de los seres vivos.

2. LA DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Desde el trabajo seminal de Pauling y Corey (Pauling y Corey 1951) sobre la estructura de las cadenas polipeptídicas hasta el día de hoy

son multitud los trabajos que se han publicado acerca de la estructura tridimensional de las proteínas y su función, trabajos que han tenido como objeto de estudio un amplísimo abanico de estas moléculas. El extraordinario número de proteínas existentes en las células de un ser vivo, y las correspondientes funciones específicas de las mismas, han sido origen de trabajos experimentales y posteriormente teóricos, de los que luego hablaré, con la finalidad de determinar su estructura tridimensional y consiguientemente profundizar en su función.

En 1951 Pauling y Corey predijeron la existencia en las cadenas polipeptídicas de proteínas globulares de estructuras periódicas que nombraron como hélices alfa y hojas beta plegadas (*beta-sheet*) que se producen en muy diferentes proteínas, y que están sustentadas por un patrón regular de puentes de hidrógeno entre los grupos C=O y N-H de los enlaces peptídicos que se encuentran próximos en la cadena lineal. De este modo se introduce la importancia de las interacciones no covalentes en la definición de la estructura tridimensional de las proteínas, y muy especialmente de los enlaces por puentes de hidrógeno en las mismas.

Tuve la ocasión de conocer personalmente al Profesor Linus Pauling, premio Nobel de Química en 1954 y premio nobel de la Paz en 1962, a finales de la década de 1970 del pasado siglo con ocasión de un seminario que impartió en la Universidad Autónoma de Madrid, y pude apreciar junto a su enorme valía científica su excepcional calidad humana y su compromiso social que se tradujo en su incesante campaña no sólo contra las pruebas de armas nucleares, no sólo contra la difusión de estas armas, no sólo contra su uso, sino contra la guerra como medio de resolver los conflictos internacionales, tal y como se dijo en la ceremonia de concesión del premio Nobel de la paz. Compromisos como el de Linus Pauling se revelan más necesarios cada día.

Poco tiempo después, Watson y Crick descubrieron la estructura del ADN, la doble hélice, analizando datos de diversas fuentes (Watson

y Crick, 1953). Unos pocos años más tarde se hizo público el descubrimiento de la estructura tridimensional de la mioglobina aislada del músculo de ballena, por parte de Kendrew y colaboradores (Kendrew y col. 1960 y Kendrew 1961) haciendo uso de las técnicas de cristalografía de rayos X que había desarrollado Max Perutz, en el laboratorio de Cambridge, donde también se desarrolló el trabajo de Watson y Crick.

Estas técnicas experimentales hacían necesaria la cristalización de las sustancias, y en particular de las proteínas para que la difracción de los rayos X permitiera determinar las posiciones de los átomos. Ello como más adelante veremos representa un cierto inconveniente en el estudio de la función de las proteínas pues en esta juega un papel relevante su flexibilidad. No han transcurrido 60 años desde el trabajo de Kendrew cuando se han determinado más de cien mil estructuras moleculares que en el caso de las proteínas vienen recogidas en el Protein Data Bank (Berman y col. 2003), que pone al alcance de los investigadores la estructura tridimensional de un considerable número de proteínas. En el pasado mes de Octubre se recogían 112.722 estructuras macromoleculares biológicas en el PDB.

Entre ellas mencionaré la estructura cristalográfica de la enzima lisozima que cataliza la escisión de cadenas de polisacárido, obtenida por Phillips en 1966, a partir de la clara de huevo de gallina (Phillips 1967). A partir de ella modeliza el sustrato en el centro activo de la enzima y propone un mecanismo de reacción en el que el anillo de seis miembros del azúcar es distorsionado por la interacción estérica con ese centro activo, mecanismo que posteriormente hubo de revisarse como consecuencia de los resultados de los estudios de simulación.

Tanto la cristalografía de rayos X, como más recientemente el estudio de los acoplamientos espín-espín en resonancia magnética nuclear multidimensional han sido las técnicas experimentales mediante las que se han basado y se basan los análisis de la estructura de las proteínas. Los sistemas informáticos modernos que dirigen estas técni-

cas permiten además estimar de modo empírico la energía de la estructura mediante potenciales empíricos o teóricos que describen la interacción entre los átomos del sistema, lo que ha permitido refinar las estructuras obtenidas directamente de la experiencia.

La información obtenida por las técnicas cristalográficas se suele referir a estructuras rígidas para las proteínas, al difractar rayos X sobre cristales de las mismas. Pero cuando las moléculas se encuentran en un medio biológico, la rigidez se pierde, y es más cuando las proteínas realizan su función, como sería el caso concreto de las enzimas, su estructura experimenta modificaciones que en muchos casos sustentan su actividad, y que la distancian de la rigidez de un cristal.

Hoy día es más importante si cabe investigar sobre la función que sobre la estructura de las proteínas. En este contexto sabemos que es muy difícil abordar las cuestiones referentes a la función haciendo uso de técnicas experimentales. En algunos casos las técnicas de intercambio isotópico son de alguna ayuda, y más recientemente la espectroscopia de femtosegundos permite aproximarse a los estados de transición.

Pero rara vez llegan a conclusiones firmes en mecanismos de reacción que implican a procesos y sistemas complejos como son los que se dan en muchos procesos bioquímicos especialmente los enzimáticos; en ellos se producen reacciones químicas con ruptura o formación de enlaces que se desarrollan en una escala temporal. Esas técnicas antes mencionadas apenas aportan información en lo que se refiere a la caracterización y estudio de los estados de transición que son determinantes en la selección de mecanismos de reacción alternativos, y en la caracterización de la cinética de los procesos reactivos que se desarrollan en múltiples etapas.

Es en este punto, donde los métodos teóricos dirigidos al estudio y modelado de las moléculas se revelan como instrumentos valiosos para completar y en casos sustituir a las técnicas experimentales simulando estructuras o situaciones que están al alcance de la experimentación.

Así, por ejemplo, los estados de transición en las reacciones químicas no son accesibles experimentalmente. Sin embargo, si que se dispone de métodos teóricos que permiten su modelización y estudio.

El núcleo de mi discurso se concretará en este tipo de estudios, teniendo en cuenta que fueron motivo de la concesión del premio Nobel de Química de 2013 conjuntamente a los profesores Martin Karplus, Michael Levitt y Ariel Warshel “*por el desarrollo de modelos multiescala para sistemas químicos complejos*” como explícitamente dice el comunicado de la Fundación Nobel (Nobel 2013).

3. MÉTODOS DE CÁLCULO TEÓRICOS EN GRANDES MOLÉCULAS

3.1. Mecánica Cuántica de sistemas polieletrónicos

Las grandes moléculas biológicas, y las proteínas en particular, no son sino compuestos químicos, cuya dimensión implica un número considerable de átomos que puede llegar a alcanzar incluso a los centenares de miles. Cabría pensar que para determinar teóricamente sus propiedades moleculares, que resumiremos como su estructura y su función, podrían emplearse los métodos teóricos que la Química ha desarrollado.

Estos métodos teóricos, integrados en la ciencia conocida como Química Cuántica se fundamentan en la Mecánica Cuántica desarrollada en el primer tercio del siglo XX por todo un conjunto de genios entre los que destacaré a los Premios Nobel M. Planck, N. Bohr, De Broglie, H.W. Heisenberg y P. Dirac, entre otros, y que es la teoría científica que describe el comportamiento de la materia desde las moléculas hasta las más pequeñas de las partículas elementales.

En esencia, las moléculas, las proteínas lo son, son sistemas formados por los núcleos de los átomos que las componen, y los electrones que aportan esos mismos átomos. Son pues sistemas que formal-

mente pueden estudiarse completamente haciendo uso de la Teoría Cuántica. El mismo Dirac, con una visión ciertamente optimista, llega a decir (Dirac (1929)):

The underlying physical laws necessary for the mathematical theory of a large part of physics and the whole of chemistry are thus completely known, and the difficulty is only that the exact application of these laws leads to equations that are much too complicated to be soluble.

(“Las leyes físicas fundamentales necesarias para la teoría matemática de una gran parte de la Física y de la totalidad de la Química se conocen completamente, y la dificultad estriba en que la aplicación exacta de esas leyes conduce a ecuaciones que son demasiado complicadas para ser resolubles”)

Consciente de la dificultad expresada en su manifestación anterior, Dirac agrega no obstante:

It therefore becomes desirable that approximate practical methods of applying quantum mechanics should be developed, which can lead to an explanation of the main features of complex atomic systems without too much computation.

(“Por tanto es deseable que se desarrollen métodos aproximados prácticos que conduzcan a la explicación de las principales características de sistemas atómicos complejos sin demasiada computación” .)

Siguiendo la recomendación de Dirac, se han desarrollado, de entonces acá, multitud de métodos teóricos para resolver la estructura electrónica de átomos y moléculas con muy altos niveles de aproximación a las soluciones exactas de la ecuación de ondas para ellos. No es objeto de esta presentación hablar de ellos pues están ampliamente descritos en la literatura (LEVINE 1991, Szabo y col. 1989), simplemente diré que se basan en los desarrollos de la teoría de los Orbitales Moleculares (Roothaan 1951) en muy diferentes niveles de aproximación pero que esencialmente representan los orbitales moleculares como combinación lineal de orbitales atómicos. Unos se fundamentan en la Teoría del Campo Autoconsistente de Hartree-Fock, (SCF-MO) (Roothaan 1951) mientras que otros que se han desarro-

llado posteriormente están basados en la Teoría del Funcional de Densidad (DFT) (Parr y col. 1989).

Con diferentes niveles de rigor y en casos haciendo uso de aproximaciones, estos métodos han experimentado un gran desarrollo y en base a ellos se han escrito muy diversos programas de computadora como serían, por ejemplo, GAUSSIAN (Frisch y col. 2009), o Gamess (Gordon y col. 2005), de muy amplio uso en la comunidad científica. Dado el crecimiento exponencial de la capacidad y potencia de los computadores electrónicos, se han podido estudiar sistemas cada vez más complejos y de mayor tamaño, calculando estructuras moleculares, propiedades químicas de los átomos en las moléculas, reactividad, espectros electrónicos y un sinfín de propiedades de interés. Eso sí siempre y cuando estemos hablando de moléculas de decenas de átomos de dimensión y poco más. Con todo, el impulso dado a la Química por la Teoría de los Orbitales moleculares ha sido inmenso y ha permeado todas las ramas del conocimiento de esta ciencia.

No obstante, cuando estamos hablando de sistemas moleculares que pueden alcanzar y superar los centenares de miles de átomos, como son muchas proteínas, estos métodos, basados en la teoría de los orbitales moleculares resultan inaplicables, ni aún con las mejores computadoras existentes en la actualidad. Una molécula con N átomos y n electrones generaría sistemas de ecuaciones electrónicas de $3(N+n)$ dimensiones, en el contexto de la teoría de los orbitales moleculares, y qué decir de una molécula con centenares de miles de átomos. Pudiera parecer pues que la sentencia de Dirac no sería aplicable en estos casos de ningún modo a las proteínas.

3.2. Modelos multiescala para sistemas químicos complejos

3.2.1. Introducción

Las aportaciones científicas que han derivado en la concesión del premio Nobel a Martin Karplus, (Karplus 2013) Michael Levitt (Levitt

2013) y Ariel Warshel (Warshel 2013), tienen como objeto romper el nudo gordiano expresado en el capítulo anterior y seguir la segunda recomendación de Dirac, la de desarrollar métodos aproximados prácticos que conduzcan a la explicación de las principales características de sistemas complejos sin demasiada computación. Son muchos los investigadores que vienen aplicándose en esta línea de trabajo en la actualidad, con aportaciones tan significativas como las de los laureados con los premios Nobel de 2013 mencionados.

El problema de la estructura y función de las proteínas merece la pena ser abordado teóricamente, por la necesidad de afrontar multitud de problemas, y simular los procesos biológicos que se producen en las células que raras veces se pueden seguir. La cuestión se traslada ahora al diseño de métodos que hagan accesibles los cálculos teóricos.

Evidentemente habrán de formularse aproximaciones que en todo caso deben ser congruentes con la realidad de los sistemas a estudiar. En todas ellas siempre se tuvo presente el aforismo atribuido a Einstein y que recoge M. Karplus en su lección Nobel (Karplus 2013)

Everything should be made as simple as it can be, but not simpler

(Todo debe hacerse tan simple como se pueda, pero no más simple.)

Para comprender mejor el fundamento de los modelos desarrollados por Karplus, Levitt y Warshel y que se conocen bajo la denominación de Métodos Multiescala utilizaremos una enzima como sistema de referencia. Una enzima no es sino un catalizador que reduce la barrera de activación en la reacción de ruptura (o formación) de enlaces en medios biológicos. La mayor parte de las enzimas son proteínas adecuadamente plegadas que contienen uno o varios centros activos en los que se produce la reacción o reacciones. Estos centros activos están rodeados por la estructura plegada de la proteína, la cual a su vez está rodeada por las moléculas del disolvente, el agua en el caso de los medios celulares, lo que motivará que los grupos hidrófobos de los aminoácidos de la proteína se orienten preferentemente hacia el interior de la proteína plegada, huyendo, por así decirlo, de las moléculas polares de agua.

Para que pueda producirse la reacción enzimática, el sustrato debe situarse sobre el centro activo de la enzima, o abrirse paso hasta él modificando de algún modo la conformación de la proteína. A su vez, como la proteína plegada está rodeada por una distribución estadística de moléculas de agua, esta cobertura acuosa podrá verse afectada si se producen modificaciones estructurales de la proteína enzimática durante la reacción.

El sistema modelo para una reacción enzimática, podría desglosarse en tres partes: el centro activo, el resto de la proteína que lo envuelve y la esfera de solvatación formada por las moléculas de agua que la rodean (Figura 1.)

El centro activo (CA)

En él se produce la verdadera reacción química donde se rompen o forman enlaces del correspondiente sustrato, En la ruptura y formación de enlaces se ponen en juego importantes cantidades de energía. El sistema a estudiar allí estará formado por los aminoácidos de la cadena proteínica del centro catalítico, que allí se localizan, junto con otras moléculas (alguna molécula de agua por ejemplo) u otros reactivos y muy especialmente por el sustrato, o la parte del mismo, objeto de la reacción, y teniendo en cuenta la evolución temporal, los productos de la reacción. La química del proceso catalítico y la cantidad de energía que se intercambia en el mismo impone que el sistema centro activo-sustrato deba estudiarse con una metodología que estudie la reacción con un cierto rigor. Ello se traduce en el empleo de los métodos de la Química Cuántica (Quantum Mechanics = QM) lo que resulta ser factible al constar este centro activo de un número relativamente reducido de átomos, que no va más allá de unas decenas. De hecho en esos estudios se emplean métodos rigurosos dado el auge experimentado por la tecnología de computadoras en la actualidad.

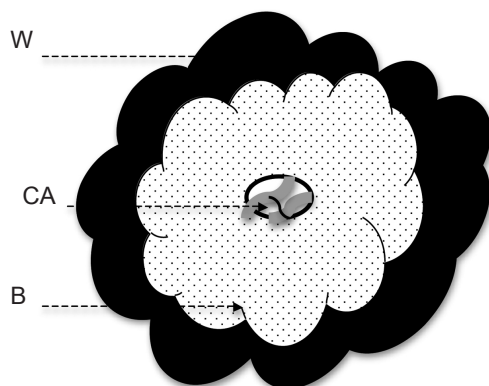


Figura 1.- Segmentación del espacio implicado en la acción enzimática. CA, Centro activo de la enzima donde se ubican además sustratos y productos. B Resto de la proteína que no interviene directamente en la reacción catalítica. W Caja de moléculas del disolvente que rodean el sistema. En la región CA se emplean métodos químicos cuánticos (QM). En la región B y en la W se emplean métodos de mecánica molecular (MM) y estadísticos. Entre las regiones CA y B no existe una separación nítida lo que se representa por el trazo de mayor grosor.

El conjunto de la proteína

Generalmente esta región del sistema, que integra la mayor parte de la proteína enzimática y puede alcanzar incluso centenares de miles de átomos, experimenta pocas modificaciones en el proceso catalítico, en ella no se forman o rompen enlaces y únicamente se producen pequeñas deformaciones de los mismos y de la estructura proteica de la enzima aprovechando la flexibilidad de la misma. El elevado número de átomos de esta parte del sistema hace que deba descartarse un estudio químico cuántico riguroso. Las metodologías que se utilizan para su estudio se basan en la consideración de que la estructura molecular está formada por átomos o grupos de átomos cuyos movimientos están limitados por simples leyes de la mecánica relacionadas con las distorsiones de enlaces o de los ángulos entre los mismos, descritos por potenciales empíricos. Ello se consigue con métodos de Mecánica Molecular (MM) basados en campos de fuerza (Force Field) altamente eficientes a los que me referiré.

La esfera de solvatación

La interacción entre las primeras capas de solvatación y el conjunto de la estructura proteínica se calcula mediante métodos de mecánica molecular con especial énfasis en la polarización a causa del carácter polar de la molécula de agua. Las sucesivas capas de solvatación son tenidas en cuenta por métodos estadísticos y su efecto es poco significativo en la cinética de la reacción catalítica enzimática, al contrario de lo que sucede en las reacciones aisladas. No obstante la esfera de solvatación condiciona de hecho los procesos de reestructuración de la molécula de proteína que pudieran producirse. Este efecto resulta ser significativo en los procesos de desnaturalización de las proteínas, por ejemplo.

En esencia, los métodos multiescala se basan en estudiar diferenciadamente cada parte, con metodologías apropiadas a la naturaleza de las mismas, y mediante procedimientos a los que posteriormente me referiré, expresar la interacción entre las partes, para alcanzar una comprensión global de la estructura de una enzima y de la reacción enzimática.

Realmente esta segmentación del espacio que contiene la enzima es muy útil en el estudio de las propiedades moleculares, pero debe ser considerado con cautela cuando se pretende estudiar una reacción enzimática en su integridad. Tal y como muestra la figura 1, en este esquema se supone que el sustrato ya se encuentra situado en el centro activo del sistema donde se va a producir su transformación, y ésta es una buena hipótesis si queremos analizar expresamente la reacción misma, donde se da a la proteína (B en la figura 1) un papel esencialmente protector del mencionado proceso reactivo. Los procedimientos de cálculo que hacen uso de metodologías de QM para el núcleo y de MM para la proteína se recogen en la literatura científica como cálculos QM/MM (Senn y col. 2009).

Ahora bien, para que el sustrato acceda al centro activo, o los productos de la reacción lo abandonen deberán existir canales de acceso por los cuales penetrar y salir o bien que la proteína de la cubierta “abra” esos caminos con las deformaciones o cambios de plegamiento necesarios.

Esos cambios, que se producen durante un tiempo determinado, son susceptibles de ser estudiados mediante técnicas de Dinámica Molecular (DM) que necesariamente habrán de acoplarse a los cálculos QM/MM que se emplean para el estudio de los diferentes fragmentos.

Este hecho es muy importante en la consideración global del proceso cinético. Frecuentemente las reacciones enzimáticas se desarrollan en escalas temporales medibles, en milisegundos, segundos, horas incluso; sin embargo, el paso reactivo donde se producen las transferencias electrónicas, la formación o ruptura de enlaces, a escala molecular transcurre en tiempos medibles en la escala de nanosegundos o incluso femtosegundos (10^{-15} s). En el análisis del proceso enzimático en su conjunto no habrá que considerar únicamente el que podíamos llamar el paso químico donde se produce la reacción, sino que necesariamente deberán analizarse las etapas de acceso de reactivos y salida de productos donde la estructura tridimensional de la proteína y su capacidad para desarrollar movimientos internos son a su vez esenciales en la descripción del fenómeno catalítico en su integridad.

Es en este sentido en el que se orienta la definición de los métodos multiescala que seguidamente analizaremos, para hacer posible el estudio de sistemas como el esquematizado en la figura 1, en los cuales se hace uso de una metodología segregada, diferente para cada una de las partes, y reuniendo los resultados de las partes con los algoritmos adecuados, en una solución global al problema teniendo en cuenta las interacciones entre esas partes que no se han tenido en cuenta en los cálculos realizados separadamente.

3.2.2. Métodos QM/MM

3.2.2.1. Los métodos mecano-cuánticos (QM) para sistemas poliatómicos

La consideración del sistema enzimático en tres niveles distintos no es sino una aproximación en sí misma para abordar su estudio pues

en la naturaleza no se da una separación nítida entre las tres regiones o dominios, separación que además sería diferente para cada enzima. Las propiedades o las transformaciones químicas que se producen en el centro activo, ciertamente influirán sobre las regiones de la proteína que la circundan, y a su vez las cadenas proteicas que circundan el centro activo también afectarán a éste, puesto que entre ambas regiones existen verdaderos enlaces químicos que en casos hacen presente la duda sobre si determinados átomos o grupos de átomos forman parte del centro activo o de la cubierta proteínica. Lo mismo cabría decir en la interfase entre el conjunto de la proteína y su esfera de solvatación, y en todo caso debemos tener siempre presente que los límites entre dos de estas regiones especialmente entre el centro activo y el resto de la proteína no están nítidamente definidos.

Por estas razones debe tenerse en cuenta que la energía del sistema no será pues la simple suma aritmética de la energía de cada uno de los tres subsistemas, como pudiera pensarse en una visión simplista de los métodos multiescala. Necesariamente deben ser tenidos en cuenta también los términos de acoplamiento entre las partes, especialmente entre el centro activo de la enzima y el global de la molécula. El cálculo de los términos de acoplamiento en las interfaces de las diferentes partes supone de hecho el reto más significativo de este tipo de metodologías.

Para los estudios en la región del centro activo se utilizan los métodos de cálculo que la Química Cuántica (QM) ha desarrollado en el campo de la teoría de los orbitales moleculares preferentemente. El cálculo teórico conduce al conocimiento de la energía de un sistema químico. Como consecuencia de ello, la minimización de la energía nos dará la estructura geométrica más estable de la molécula. También los cálculos teóricos permiten deducir propiedades químicas, como pueden ser las cargas eléctricas de los átomos o grupos de átomos, que forman la molécula, y por ende la reactividad de los mismos. Asimismo, y ello es muy importante en el estudio de los procesos enzimáticos, los cálculos QM permiten el análisis de los mecanismos de reacción incluyendo los estados de transición y las trayectorias de re-

acción, en el proceso en el que el sustrato es transformado en productos.

Estos métodos se basan mayoritariamente en la teoría de los orbitales moleculares cuyos fundamentos están ampliamente descritos en la literatura científica (Roothaan 1951), Levine 1991). Inicialmente se desarrollaron en el marco de la teoría del campo autoconsistente o de Hartree-Fock dentro de la aproximación de representar los orbitales moleculares como combinación lineal de orbitales atómicos (Roothaan 1951). En una gran parte de los cálculos multiescala los métodos QM deben formularse de manera que permitan realizar el tratamiento del campo autoconsistente (SCF: Self Consistent Field) sobre el centro activo, teniendo en cuenta además el campo eléctrico externo producido por las cargas y dipolos del entorno molecular de la proteína que le rodea; en el caso del modelo enzimático antes indicado, de las cargas del resto de la molécula proteínica contigua al centro activo, y que habrán sido obtenidas por los métodos de Mecánica Molecular que seguidamente veremos.

En la práctica una gran parte de los estudios que realizan cálculos QM/MM sobre biomoléculas hacen uso de la teoría del Funcional de Densidad (DFT) como método de cálculo mecanocuántico (Pople 1999, Parr 1989). Es éste un método ab-initio, o en casos semiempírico, que ofrece una ratio precisión/esfuerzo de cálculo muy favorable frente a los más rigurosos de Hartree-Fock, y cuyo código está implementado en muchos programas de cálculo científico como GAUSSIAN (Frisch y col.2009) GAMESS (Gordon y col. 2005) y otros muchos que permiten realizar cálculos QM/MM.

Para sistemas moleculares más complejos y especialmente en los cálculos de Dinámica Molecular, se ha venido haciendo uso de métodos de Química Cuántica (QM) semiempíricos entre los que cabe considerar el SCC-DFTB (Self Consistent Charge Density-Functional Tight-binding (Elstner 1998)), cuya utilización en estudios QM/MM sobre biomoléculas se viene realizando de manera creciente. (Cui y col. 2001 y Otte y col 2007).

El extraordinario progreso en las tecnologías de la computación ha permitido, por una parte, extender este tipo de estudios a sistemas cada vez más grandes, a la vez que ha hecho accesibles el uso de métodos post-Hartree-Fock mucho más rigurosos (Szabo y col. 1989). Estos últimos, sin embargo, con algunas aproximaciones han podido aplicarse a sistemas de varias decenas de átomos, si bien sólo en lo que se refiere al cálculo de la energía para una determinada configuración de geometría fija (Claeyssens y col. 2006 y Mata y col. 2008).

Con todo estas metodologías han permitido conocer las propiedades químicas y la reactividad de incontables moléculas, entre cuyas propiedades están la geometría molecular de mínima energía, las propiedades de los átomos que las integran, especialmente sus cargas eléctricas y su reactividad en reacciones químicas. Se han analizado mecanismos de reacción, caracterizando los estados de transición, y determinado la cinética de infinidad de reacciones químicas. La Química Cuántica es hoy una ciencia consolidada bien fundamentada teóricamente y desarrollada en múltiples sistemas de cálculo soportados por una tecnología informática en permanente desarrollo. Una parte importante de mis investigaciones se han desarrollado en este campo.

Como hemos dicho anteriormente, en la metodología multiescala propuesta por Lewitt, Warshell y Karplus que les condujo a recibir el galardón del premio Nobel en 2013, este tipo de métodos teóricos son los que se emplearán en la región correspondiente al centro activo de la enzima, tanto en el estudio molecular de esa región, es decir del fragmento de proteína inmediato al mismo y del sustrato ubicado sobre él, como la misma reacción enzimática.

3.2.2.2. La expresión de la energía potencial molecular en el marco de la Mecánica Molecular

En el modelo multiescala, para el estudio del bloque de la proteína excluido el centro activo se hace uso de metodologías de Mecánica Molecular (MM). La mecánica molecular surge de los trabajos pioneros de

Westheimer (Westheimer 1946) desarrollados posteriormente por Allinger y colaboradores (Allinger y col. 1965, 1967) que fueron los primeros investigadores que hicieron uso de los ordenadores electrónicos para optimizar la estructura de moléculas orgánicas, utilizando potenciales empíricos clásicos, a través de los conocidos como métodos de Mecánica Molecular en diferentes niveles de aproximación. Inicialmente estos métodos se utilizaron para sistemas de moléculas orgánicas de tamaño más bien reducido. En este marco la energía de una molécula se expresa como la suma de términos asociados a todos los enlaces, a los ángulos entre ellos para los que se proponen potenciales armónicos, a los ángulos diedros que se determinan entre los mismos, así como a las interacciones no enlazadas para las que se proponen expresiones tipo Lennard Jones o de Van der Waals, además de las interacciones electrostáticas asociadas a las regiones moleculares cargadas no enlazadas entre si. En la fórmula siguiente se explicitan de un modo simple las contribuciones de todos estos términos:

$$E_{MM} = \sum_{\text{enlaces}} k_d (d - d_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} k_\phi (\phi - \phi_0)^2 + \sum_{\text{diedros}} k_\theta [1 + \cos(n\theta + \delta)] + \sum_{\substack{\text{pares } AB \\ \text{no enlazados}}} \left\{ \epsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_A q_B}{r_{AB}} \right\}$$

En ella el símbolo d corresponde a las longitudes de los enlaces, ϕ representa al ángulo entre dos enlaces contiguos y θ representa el diedro de torsión que implica a tres enlaces contiguos. El subíndice₀ designa los valores de estas magnitudes en el equilibrio, mientras que n representa la multiplicidad de la torsión y δ la fase de ésta. Finalmente, r_{AB} , es la distancia que separa a dos átomos, A y B no enlazados y ϵ_{AB} y σ_{AB} son los parámetros de Lennard-Jones para esos pares de átomos cuyas cargas parciales son q_A y q_B respectivamente. κ_d , κ_ϕ , y κ_θ , son las constantes de fuerza asociadas a las deformaciones de la longitud de los

enlaces, de los ángulos entre ellos y de los ángulos de torsión o ángulos diedros, respectivamente. Estas constantes dependen del tipo de los enlaces y de la naturaleza de los átomos que se unen, por lo que para un único átomo pueden darse diversos valores.

Como puede apreciarse, los diferentes términos de la expresión 1 dependen de los parámetros geométricos que relacionan a los átomos de una molécula y de un conjunto de parámetros empíricos que suelen determinarse ajustando por métodos estadísticos las propiedades moleculares calculadas con las observadas experimentalmente. Más adelante, S.Lifson y Wharshell depuraron estos métodos de Mecánica Molecular mediante el desarrollo del método CFF (Self Consistent Force Field) (Lifson y col. 1968). Alternativamente se han desarrollado campos de fuerza cuyos parámetros se han determinado a partir de resultados obtenidos aplicando métodos mecanocuánticos. En la literatura científica puede encontrarse información sobre campos de fuerza más elaborados (Mckerell Jr. 2001 y 2004, Maple 1998 y Ponder y col. 2003).

Con las capacidades de cálculo hoy disponibles es posible realizar cálculos de MM con campos de fuerza como los descritos en sistemas de decenas o centenares de miles de átomos. Los códigos necesarios para realizar esos cálculos y la experiencia acumulada con el paso del tiempo han sido implementados en sistemas de cálculo como AMBER (Cornell y col. 1995, Duan y col. 2003), CHARMM (McKerell Jr. y col. 1998 y 2001), GROMOS (Van Gunsteren y col. 1998 y Scott y col. 1999), OPLS-AA (Jorgensen y col. 1996 y Kaminski y col. (2001) y muchos otros en los que se contienen campos de fuerza aptos para el estudio de biomoléculas

3.2.2.3. La expresión de la energía total en los métodos multiescala

Al considerar separadamente las dos regiones moleculares, el núcleo activo en el caso de las proteínas enzimáticas, que se estudia por mé-

todos QM, y el resto de la molécula (junto a la solvatación general) que se estudia por métodos MM, la imagen que tenemos de la molécula biológica es incompleta, pues en las regiones contiguas de ambas partes, se producen interacciones entre las mismas que se habrán de traducir en contribuciones a la energía que no han sido tenidas en cuenta al realizar los cálculos de ambas regiones por separado. Así, deberemos tener en cuenta el potencial creado por las cargas de la región del centro activo sobre la estructura del conjunto molecular, los enlaces químicos existentes entre ambas regiones, que se han segregado empíricamente, las interacciones no enlazantes entre átomos de una y otra región así como el potencial creado por las cargas del conjunto molecular sobre el núcleo central y viceversa, entre otros. Todas estas contribuciones deberán tenerse en cuenta en el hamiltoniano QM que se aplica en la zona central, y en la expresión de la energía potencial MM correspondiente al resto del sistema.

Para determinar el valor de la energía de acoplamiento entre ambas regiones se han diseñado diversas estrategias de cálculo. La primera de ellas parte de un esquema sencillo que permite determinar la energía de la molécula según el procedimiento siguiente que se desarrolla en tres pasos. En primer lugar se realiza un cálculo de Mecánica Molecular para el conjunto completo es decir toda la molécula, integrada por el centro activo más el resto de la proteína, que nos dará una energía que notaremos como E_{MM}^{n+m} . En un segundo paso se realiza el cálculo mecanocuántico (QM) de la región del núcleo, que nos proporciona la energía E_{QM}^n y en una tercera etapa, se realiza un cálculo de Mecánica molecular sobre la región del núcleo exclusivamente que nos conducirá a una energía E_{MM}^n . La expresión para la energía molecular sería pues:

$$E_{QM/MM}^{ts} = E_{QM}^n + E_{MM}^{n+m} - E_{MM}^n$$

Donde $E_{QM/MM}^{ts}$ expresa la energía total multiescala de la molécula (el supraíndice *s* se indica por el carácter sustractivo de la metodología), E_{QM}^n es la energía del núcleo de la molécula calculada por métodos

mecanocuánticos (QM), y E_{MM}^{n+m} expresa la energía de toda la molécula, centro activo más resto, calculada por métodos de Mecánica Molecular (MM).

Esta estrategia que se conoce como la estrategia sustractiva dado que conduce a una expresión de la energía que resultaría de calcular todo el sistema por metodología MM que es más sencilla, “cortar” la región del núcleo y calcular ésta por métodos de Química Cuántica (QM) No necesita introducir términos de acoplamiento, y su implementación en sistemas de cálculo es más sencilla. Tiene el inconveniente que hay que hacer uso de un campo de fuerza diferente para la región nuclear del utilizado para el resto de la molécula y plantea algunas inconsistencias al considerar las interacciones electrostáticas entre los átomos de las dos regiones. De este tipo es el método IMOMM (Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics) desarrollado por Morokuma y colaboradores (Maseras y col. 1995), que ido siendo mejorado con modificaciones y nuevas aportaciones (Humbel y col. 1996, Dapprich y col. 1999 y Vreven y col. 2006), y que se utiliza con profusión en muchas investigaciones.

Aun cuando la metodología sustractiva ha sido determinante en la consideración del sistema en su integridad, no permite la estimación de los términos de acoplamiento entre las dos regiones enzimáticas. Para abordar esta cuestión se han desarrollado metodologías aditivas, en las cuales expresamente se aborda el cálculo de los términos de acoplamiento entre las dos regiones, lo cual conduce a la siguiente expresión para la energía molecular.

$$E_{QM/MM}^{ta} = E_{QM}^n + E_{MM}^m + E_{QM/MM}^{n\leftrightarrow m}$$

Donde $E_{QM/MM}^a$ expresa la energía total multiescala de la molécula (el supraíndice a se indica por el carácter aditivo de la metodología) E_{QM}^n expresa la energía del centro activo calculada por métodos de Química Cuántica (QM), E_{MM}^m es la energía del resto de la molécula, sin el centro activo, calculada por métodos MM, y $E_{QM/MM}^{n\leftrightarrow m}$ expresa la energía de acoplamiento entre ambas regiones.

La mayoría de los esquemas de cálculo de la energía multiescala que se utilizan hoy en el cálculo biomolecular se desarrollan dentro de este esquema aditivo. Sus diferencias se centran en la expresión concreta del término de acoplamiento que deberán tener en cuenta necesariamente las interacciones electrostáticas, las de van der Waals, y los enlaces entre átomos de las regiones del núcleo y del resto de la proteína. De todas ellas, las interacciones electrostáticas son las más importantes, y las que han originado un mayor número de investigaciones con diferentes niveles de sofisticación (Bakowies y col 1996 y Antes y col. 1998).

En el caso de las contribuciones a los acoplamientos debidas a los enlaces covalentes entre átomos de las dos regiones se han desarrollado diferentes estrategias, la más sencilla de las cuales sería la de establecer los límites entre las dos regiones donde no existan esos enlaces. Ello raramente es posible, sin embargo, y ha determinado la necesidad de poner en marcha metodologías como la de los átomos ligados (*link atoms*) (Field y col. 1990 y Singh y col. 1986), que en esencia consisten en saturar la valencia que quedaría libre al considerar roto el enlace desde el núcleo hacia el resto de la molécula, por un átomo o grupo monovalente, mayoritariamente hidrógeno, y rehacer el cálculo mecanocuántico del núcleo con esta saturación. Esta metodología ha resultado ser de amplia aceptación en la comunidad científica.

Un extenso análisis de las diferentes contribuciones a los acoplamientos puede encontrarse en la literatura en revisiones como la de Senn y Thiel (Senn y Thiel (2009) donde se desarrolla ampliamente esta cuestión que aquí omitiremos por razón de brevedad.

4. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN Y SIMULACIÓN EN QM/MM

Los métodos que acabamos de describir se dirigen a calcular la energía o las propiedades de una molécula para una determinada estructura geométrica, pero precisamente la estructura geométrica de la configuración de mínima energía es la que en muchos casos habrá que localizar mediante el cálculo teórico. Esta configuración además

puede utilizarse como punto de partida para realizar optimizaciones de sistemas reactivos en los que intervenga, o para cálculos de Dinámica Molecular o técnicas de Montecarlo.

Una molécula formada por N átomos posee $M=3N-6$ grados de libertad, por lo que la representación de la energía en términos de sus coordenadas normales sería una hipersuperficie de M coordenadas independientes. En esa hipersuperficie existirán diferentes mínimos o pozos de energía potencial, cada uno de los cuales corresponderá a una conformación geométrica diferente, siendo la de mínima energía la configuración fundamental que se deberá corresponder con la geometría nativa de una proteína en su caso. En cada uno de esos mínimos las fuerzas sobre todos los átomos son cero estando el sistema en equilibrio. Los métodos de minimización de la energía (EM) conducirán a esas conformaciones de mínimos, mediante un número de pasos de cálculo hasta alcanzar la convergencia.

Realmente la Mecánica Cuántica demuestra que los átomos no están nunca en reposo en esas configuraciones de mínimo sino que están vibrando según los modos normales de vibración de la molécula entorno a esas posiciones de equilibrio aún en el nivel vibracional más bajo, con lo que se conoce como dinámica de modos normales (NMD). La rigidez es la gran ausente del mundo de las moléculas. Entre dos de esos mínimos contiguos existe una barrera de potencial que los separa que permite caracterizar un estado de transición (punto de silla) entre ambos. Este movimiento permanente de los átomos entorno a sus posiciones de equilibrio es el que determinará la necesidad de introducir las metodologías de la Dinámica Molecular en aquellos procesos en que se analice la evolución de los sistemas con el tiempo, y muy especialmente cuando se producen modificaciones conformacionales o reacciones químicas.

Para la localización de los puntos estacionarios sobre la superficie de energía potencial se hace un amplio uso de métodos que se conocen como cuasi newtonianos que se aplican haciendo uso de coordenadas internas moleculares (Monard y col. 2003, Schlegel 1995, 2003). En

esencia abordan la construcción de la matriz Hessiana de las segundas derivadas de la energía respecto de las coordenadas normales, para localizar los mínimos de energía o los máximos relativos en el caso de los estados de transición, o puntos de silla (TS). Este procedimiento es impracticable para grandes sistemas y sólo puede abordarse mediante una serie de simplificaciones que se describen ampliamente en la literatura.

En la optimización en el marco de las técnicas multiescala QM/MM la principal idea que se pone en juego es la de aplicar el fraccionamiento del sistema molecular en las dos regiones: el centro activo y el resto de la molécula.

Pueden llevarse a cabo dos optimizaciones separadamente; por una parte la optimización del centro activo, que se desarrollaría en lo que se conoce como macroiteraciones (Maseras y col. 1995) y que por la dimensión relativamente reducida puede hacerse con metodología de tipo casi newtoniana. Por otra parte, la de la región del entorno que permite el uso de metodologías de optimización más simples y adaptadas a dimensiones moleculares considerables dada la expresión de la función de la energía MM, y cuyo desarrollo se conoce como microiteraciones. Con esta división in mente, en la literatura se describen dos modos de alcanzar la convergencia al mínimo de energía. En primer lugar, la aproximación adiabática; en esencia consiste en que en cada macroiteración se relaja completamente el entorno molecular (Maseras y col. 1995, Ryde 1996).

En segundo lugar un esquema alternante en el que las optimizaciones del centro activo y del entorno se hacen separadamente pero en un modo alternante, manteniendo fijos los átomos del centro activo mientras se realiza la microiteración, y realizada ésta se fijan los átomos del entorno para realizar la macroiteración, hasta alcanzar la convergencia. Este método de optimización fue implementado pronto en el esquema de Cálculo IMOMM (Maseras y col. 1995), y de él se ha hecho un amplio uso en este campo científico.

La mayor dificultad de este procedimiento reside en la consideración de los términos de acoplamiento en las sucesivas iteraciones. Se han descrito trabajos que han hecho uso de este tipo de técnicas, incluyendo los términos electrostáticos. Citaré el de referencia (Prat-Resina y col. 2004) para el análisis de una reacción enzimática.

Precisamente, cuando se aplican las técnicas de análisis de caminos de reacción dentro del esquema multiescala QM/MM hay que hacer especial hincapié en la selección de las coordenadas internas que determinan la definición de este camino, y el perfil del mismo respecto de esas mismas coordenadas.

4.1. Simulación y Dinámica Molecular

Los métodos de dinámica molecular (MD) (Frenkel y Col. 2002) se fundamentan en simular el movimiento molecular sobre la hipersuperficie de energía potencial de manera que la conformación molecular se modifica siguiendo las fuerzas netas que dirigen a los átomos de la molécula hacia un mínimo local. En ese proceso, la energía potencial que se pierde en el proceso se transforma en energía cinética de los átomos que adquieren una velocidad que les puede permitir incluso superar barreras energéticas. Los métodos basados en la técnica de Montecarlo (MC) introducen la consideración de trayectorias aleatorias sobre la superficie para el estudio de los procesos de reacción y cambios conformacionales.

La aplicación de este tipo de métodos permiten superar una visión estática de la estructura de las proteínas y nos permiten a la vez que determinar las propiedades de las mismas considerar diversas conformaciones moleculares dentro del espacio de configuración a fin de calcular valores promedios estadísticos de propiedades del conjunto tales como diferencias de energía libre de solvatación, de reacción, o de activación del conjunto, e incluso refinar la estructura geométrica de las proteínas en medios biológicos y especialmente en forma solvatada, a diferencia de la estructura cristalográfica rígida. Del

mismo modo pueden analizarse procesos cinéticos en los que se producen cambios que implican la formación o ruptura de enlaces.

Así como la metodología QM/MM permitía obtener la energía del sistema y generar la conformación característica, la desarrollada por Némethy y Scheraga (Némethy G. y Scheraga H. A. Y col. 1965) con el apoyo de métodos de mecánica estadística como la MD o el de MC (Frenkel y Col. 2002) permite generar múltiples configuraciones con el adecuado peso estadístico, en principio.

La selección de las trayectorias que conducen a estados de transición hace uso de la técnica de muestreo de Montecarlo en el espacio de las trayectorias de reacción que conectan el pozo de energía de los reactivos con el de los productos, (Chandler D. 1998). Este procedimiento no requiere un conocimiento previo del camino de reacción o del estado de transición y ha sido aplicado al estudio de reacciones enzimáticas (Basner y col. 2005).

Todas estas metodologías deben hacer frente a un problema fundamental que es el que se deriva del elevado número de grados de libertad del conjunto de los átomos de una proteína de decenas o centenares de miles de átomos. Aún cuando los algoritmos que permiten optimizar geometrías moleculares se conocen, su aplicación práctica rigurosa, demandaría recursos informáticos y tiempos de cálculo desmesurados que no es posible disponer.

En segundo lugar, a diferencia de los estudios mecanocuánticos en moléculas pequeñas, para sistemas de reacciones enzimáticos, conocer el reactivo, el estado de transición y los productos no es suficiente. Como pusieron de manifiesto Warshel y colaboradores (Klähn y col. 2005), en los estudios de optimización QM/MM deben ser tenidos en cuenta diversos estados de transición entre diferentes mínimos que a su vez habrá que caracterizar. Se han desarrollado multitud de técnicas para seleccionar estas configuraciones. Citaré como ejemplo las descritas por Zhang y colaboradores (Zhang y col. 2003) que toman instantáneas de una trayectoria clásica de MD y las utilizan como estructuras de

prueba en cálculos QM/MM, o aquellas basadas en la aproximación de Car y Parinello (Car y col. 1985) que articulan estudios de Orbitales Moleculares junto a los de Dinámica molecular.

4.2. Simulación del plegamiento de las proteínas

La complejidad de estas dos cuestiones se resumiría en la que se conoce como la paradoja de Levinthal (Levinthal, 1968). Como ya comentamos en el primer capítulo esta paradoja plantea que encontrar la configuración nativa de una cadena polipeptídica de una proteína mediante la búsqueda aleatoria en su astronómicamente grande espacio de configuración implicaría un tiempo superior a la edad de la tierra. Por el contrario, en la naturaleza, una proteína se pliega a su estructura propia en escalas de tiempo comprendidas entre 10^{-6} y 1 segundos. Una vez más, la Naturaleza muestra ser mucho mas sabia que los seres humanos.

Las proteínas son moléculas que alcanzan a tener centenares de miles de átomos, Estas maquinarias moleculares constan de diferentes cadenas proteicas en las que existen partes que permanecen fijas y otras que se mueven en los procesos biológicos en los que intervienen. Si quisiéramos estudiarlas, por métodos de dinámica molecular a escala de sus átomos, sería imposible, pues, por ejemplo 100.000 átomos suponen cerca de 300.000 grados de libertad, y un estudio de dinámica molecular de 1 microsegundo de duración (a pasos de 1 femtosegundo) demandaría mil millones de iteraciones (Levitt 2013).

Estas cifras y datos parecieran plantear dificultades insuperables que incitaran a abandonar este tipo de estudios de dinámica molecular en biomoléculas. Sin embargo, desde un principio se comenzaron a desarrollar aproximaciones y modelos simplificados que hicieran factibles este tipo de estudios, a fin de aplicarlos a biomoléculas cada vez más complejas y que han dado respuesta a muchos problemas.

Inicialmente estas aproximaciones fueron bastante drásticas, en

parte a causa de las reducidas prestaciones de los ordenadores electrónicos de la época en que se formularon. Afortunadamente el desarrollo de estas aproximaciones ha ido en paralelo a la generación de sistemas de cálculo electrónico más y más potentes cada día, si bien sus hipótesis básicas se han mantenido permitiendo abordar cada vez sistemas más complejos.

En el estudio del plegamiento de las proteínas se realiza una exploración del espacio conformacional en busca de conformaciones de baja energía que no sean precisamente mínimos de energía locales. Trabajos pioneros como el desarrollado por Lewitt y Warshel en este sentido, se hicieron uso de lo que se conoce como aproximación de “grano grueso” (“*coarse grained*” CG) (Levitt y col. 1975). En esencia esta aproximación consiste en simplificar la cadena polipeptídica, de modo que los átomos de las cadenas laterales se consideren como un único centro de interacción en cada caso, y los átomos de la cadena principal como un segundo centro. A ello se unen estrategias simplificadores en el tratamiento de los ángulos de torsión. De este modo pueden obtenerse mínimos de energía locales en relativamente poco tiempo, y además, analizar el pozo de energía potencial en su entorno para poder predecir cómo salir del mismo para dirigirse a otra conformación con plegamientos diferentes, todo ello en un tiempo de cálculo razonable.

En sistemas muy complejos en los que existen varias cadenas proteínicas, este modo de actuar se extiende a considerar a los fragmentos de cadenas helicoidales como un único centro de interacción, como se viene haciendo en el modelo de difusión-colisión de plegamiento de las proteínas desarrollado por Weaver y Karplus (Karplus y col. 1976, 1974 y 1994), lo que indirectamente conduce a pensar que esos fragmentos se mantendrán invariables en los estudios de dinámica molecular. Estas simplificaciones deben basarse en evidencias experimentales que así lo justifiquen, como puedan ser estudios cristalográficos por ejemplo.

4.3. Consideraciones finales

La realización de cálculos sobre grandes sistemas, como las proteínas o las reacciones enzimáticas, dentro del esquema QM/MM hasta el día de hoy ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de programas de cálculo de la mayor funcionalidad. Ello se ha ido consiguiendo por una incorporación paulatina de nuevas rutinas de cálculo a sistemas de programas preexistentes a medida que se iban implementando nuevos algoritmos. Realmente ello ha ido produciéndose de un modo modular de manera que el mayor esfuerzo se ha dirigido hacia el diseño de las interfaces entre las estructuras troncales de los sistemas de cálculo y las nuevas incorporaciones de técnicas o procedimientos, manteniendo módulos de carácter general como puedan ser las técnicas de optimización o de Dinámica Molecular. De este modo resulta sencillo implementar interfaces a nuevos programas que pudieran diseñarse en los dominios de la QM o MM o cualesquiera otros. Un ejemplo de este tipo de implementación de este tipo de sistemas de cálculo lo constituye el "ChemShell" (Sherwood 2003, Metz y col. 2014).

Una línea de trabajo que paulatinamente va adquiriendo mayor importancia consiste en la aplicación de métodos QM/MM en conjunción con el análisis de datos estructurales experimentales. En esta línea cabe mencionar los trabajos pioneros de Ryde y colaboradores (Ryde y col. 2002 y 2003) que integran cálculos QM en el refinamiento de la estructura molecular frente a los datos experimentales. De este modo se contribuye a hacer frente al problema acerca de la fiabilidad de las estructuras experimentales de los centros activos en los procesos reactivos en que se ven implicados, y también a obtener una mejor descripción de sustratos, cofactores y productos que no forman parte de la proteína de la enzima. Este procedimiento se ha utilizado en el refinado de estructuras de difracción de rayos-X en monocristales (Ryde y col. 2002, Hersleth 2006) de RMN (Hsiao y col. 2005) y EXAFS (Hsiao y col.2006) con notable éxito.

Durante bastante tiempo las aplicaciones de las metodologías QM/MM a biomoléculas se dirigieron casi exclusivamente al estudio

de la reactividad enzimática. Sin perder de vista que este es el campo de una mayor aplicación de estas técnicas, se han venido aplicando también al estudio de propiedades como: a) las energías verticales de transición entre estados electrónicos (Espectros UV/Vis, absorción, emisión, o fluorescencia), b) propiedades de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, como desplazamientos químicos, y c) reactividad de estados excitados.

Más allá del estudio de sistemas formados por biomoléculas los métodos QM/MM o multiescala son apropiados para tratar otros muchos sistemas complejos en el campo de la Química. Serán aquellos en los que sea necesario modelizar un fenómeno químico localizado en un centro activo, del orden de unos cien átomos, sometido a la influencia de un entorno mucho mas grande. Lo descrito hasta ahora para la catálisis enzimática es transferible a otros muchos dominios de la Química. La catálisis en general, y los fenómenos superficiales, las grandes moléculas de síntesis, y las reacciones que se producen en las superficies surgen como nuevos campos en los que los métodos multiescala podrán aplicarse a la comprensión de los fenómenos que en ellos se producen.

En la actualidad se han venido realizando millares de simulaciones de dinámica molecular de biomoléculas por centenares de científicos. Sin ninguna duda nos encontramos en el umbral de una nueva era en la comprensión de los sistemas biológicos a escala molecular donde la teoría y la experimentación se dan la mano y se complementan.

5. ALGUNOS ESTUDIOS EN BIOQUÍMICA COMPUTACIONAL

Desde sus inicios a principios de la década de los años 70 del pasado siglo hasta el día de hoy el progreso de los métodos multiescala ha sido constante. Se han optimizado los potenciales que se utilizan en los estudios de Mecánica Molecular y Dinámica Molecular (Ponder 2003, Liljefors 2004). Se han mejorado sustancialmente los métodos Químico Cuánticos que permiten estudiar el centro activo de la mo-

lécua y los mecanismos de reacción enzimáticos con un rigor creciente, fortaleciendo de este modo la calidad de los resultados de las técnicas multiescala. De especial relevancia en este campo ha sido el importantísimo progreso de las técnicas informáticas. Por una parte el imparable desarrollo tecnológico de los sistemas de cálculo con procesadores cada vez más rápidos, con memorias de gran capacidad, y con arquitecturas de computadores que permiten la realización de numerosos procesos simultáneos. Ello ha permitido la escritura de sistemas de programas que permiten desarrollar de un modo completo las técnicas multiescala, ampliamente difundidos en la literatura científica y de un amplísimo uso en la comunidad científica, y a los que nos referimos en el capítulo anterior. En paralelo las técnicas experimentales de determinación estructural, como la difracción de Rayos X, y muy particularmente la Resonancia Magnética Nuclear también en gran expansión, permiten muchas veces apoyar o contrastar de los resultados de simulación.

En la actualidad se han realizado millares de simulaciones de dinámica molecular de biomoléculas por centenares de científicos. A título de ejemplo indicaré que según refieren Senn y Thiel (Senn y col. 2009) entre 2006 y 2007 solamente, se han publicado cerca de doscientos estudios implicando métodos QM/MM en Oxidoreductasas y proteínas de transporte electrónico, Transferasas, Hidrolasas, Lyasas, Isomerasas, Proteínas fotoactivas, así como Oligonucleótidos y aductos. En este capítulo final haré referencia a unos pocos estudios que muestran en un caso los orígenes de estas técnicas multiescala, y en otros casos el alcance de estas técnicas en la comprensión de los sistemas biológicos.

5.1. Estudios pioneros

5.1.1. Simulaciones sobre la lisozima

Uno de los primeros laboratorios del mundo donde se comenzaron a realizar estudios sobre simulaciones de estructuras tridimensionales

de polipéptidos fue el que dirigía el Profesor Shneior Lifson en el Weizmann Institute de Rehovot, Israel. Allí se desarrollaron las ideas básicas del campo de fuerzas consistente (Lifson y col. 1968) gracias a las aportaciones de A. Warshel y la posterior incorporación de M. Levitt. Sin duda alguna del laboratorio de Lifson surgen las primeras aportaciones en el modelado multiescala de macromoléculas complejas.

En 1969 se publicó la primera minimización teórica de la estructura de una proteína enzimática con todos sus átomos pesados, la lisozima (Levitt y col. 1969), tomando como punto de partida los datos de la estructura cristalográfica obtenidos por Phillips para la lisozima de la clara de huevo de gallina (Phillips 1967). Los datos cristalográficos de Phillips proporcionaron la geometría de partida para iniciar los estudios de minimización.

Posteriormente estas primeras aportaciones fueron mejorándose, permitiendo estudiar el plegamiento de la cadena proteínica de la lisozima utilizando procedimientos de “grano grueso” (CG) (Lewitt 1975 y 1976), e introduciendo cambios en los ángulos de torsión en el modo que lo hace Scheraga (Gibson y Scheraga 1967), lo cual permitió reducir el tiempo para el cálculo de la energía unas 100 veces respecto del cálculo no simplificado al haberse reducido unas 30 veces el número de grados de libertad. De este modo hicieron converger la energía hacia un mínimo local, a la vez que ajustaron el pozo de potencial entorno a ese mínimo para poder así determinar la energía necesaria para poder “salir” del mismo y poder pasar a otra conformación próxima, pero ligeramente diferente, interpretando de este modo los ligeros cambios conformacionales que determinan la flexibilidad de la proteína.

La utilización de la técnica CG y la calidad de sus resultados debe situarse en el momento histórico en que se realizaron estos estudios donde la disponibilidad de recursos informáticos y las prestaciones de los mismos eran escasos. No debemos olvidar que en las simulaciones de geometrías moleculares no existe la limitación que impone

la rigidez de las estructuras cristalinas, aproximándonos mejor a la flexibilidad de las proteínas en disolución y especialmente de las enzimas en medios biológicos.

La metodología multiescala utilizada en la simulación permitió también una mejor interpretación del mecanismo de acción de la lisozima sobre los azúcares. Así, Phillips planteó inicialmente un mecanismo en el que la estructura de la enzima originaría una distorsión del azúcar desde una estructura en silla a una semibote, como paso previo a la ruptura del enlace (Phillips 1967). Con sus cálculos multiescala Levitt demostró que la enzima era en sí misma demasiado “blanda” como para forzar esa deformación, demostrando además que la enzima, en el centro activo, lo que producía era una distorsión electrostática del sustrato (Levitt 1974). Posteriormente, Warshel y Levitt con la introducción de la metodología multiescala aplicando métodos de la mecánica cuántica (QM) sobre el centro reactivo de la enzima con el sustrato sobre él, confirmaron ese resultado y corroboraron cuantitativamente que es la deformación electrostática del sustrato por la enzima la determinante del mecanismo de reacción catalítica (Warshel y col 1976), quedando así acreditada la potencia de la metodología multiescala en el estudio de sistemas de un número de átomos importante y de los procesos que en ellos se producen, al analizar el sistema en su globalidad considerando todos los factores que intervienen en el proceso catalítico.

5.1.2. Inhibidor de la tripsina en el páncreas Bovino (BPTI)

En 1977 J. Andrew y colaboradores, entre los que se encontraba M. Karplus (McCammon y col. 1977) publicaron los primeros resultados obtenidos empleando la metodología de trayectorias clásicas sobre la proteína BPTI para analizar su flexibilidad. Esta proteína consta de 58 residuos y 458 pseudoátomos y su estructura cristalina de alta resolución se había determinado no hacía mucho (Deisenhofer y col. 1975).

Estos autores hicieron uso de una función de potencial desarrollada por Gelin, para una simulación de Dinámica Molecular del BPTI de 9.2 ps (1 ps = 10^{-12} s), poniendo de manifiesto que los movimientos internos confieren a la proteína un carácter fluido en contraposición a la rigidez de la estructura cristalográfica (Gelin y col. 1975). Aparecen así nuevas consideraciones a tener en cuenta acerca de las propiedades moleculares como resultado de los estudios de dinámica molecular. Así, por ejemplo, podemos vislumbrar cómo una enzima desarrolla movimientos internos que le permiten funcionar como un catalizador biológico, adaptando su conformación a una correcta situación del sustrato, cuando éste se sitúe sobre el centro activo.

Unos 10 años después ya con mayores y mejores instrumentos de cálculo, Lewitt y Sharon realizan una nueva simulación del BTPI, cuya novedad más importante fue la consideración de la molécula en el seno de una capa de moléculas de agua, introduciendo así el estudio de la influencia de la tercera esfera que configura el modelo multiescala de las proteínas (Levitt y col. 1988). Surge aquí una dificultad adicional pues han de hacerse compatibles los campos de fuerza utilizados en la proteína con los empleados para el agua. Si bien los resultados fueron semejantes a los obtenidos en ausencia de las moléculas de agua, la dinámica molecular puso en evidencia que los desplazamientos de los residuos eran menores y algo más lentos a causa de la fricción y reubicación de las moléculas de agua. Simultáneamente la introducción de este nuevo elemento en el sistema de cálculo ralentiza significativamente los cálculos en los procesos, tanto de optimización de la energía como en los de dinámica molecular.

Con todo, siendo el BTPI una de las moléculas pioneras sobre las que se desarrollaron estudios multiescala, todavía no se conoce un estudio completo de la simulación del proceso de plegamiento molecular en el cual la cadena lineal polipeptídica se pliega hacia su estructura nativa. Lewitt y Warshell hicieron un estudio muy simplificado de este problema., que es necesario actualizar (Levitt y col. 1975). En su trabajo, Smith resume el estado actual de análisis de esta problemática (Smith 2013).

5.1.3. El papel del agua de solvatación

La introducción de los potenciales debidos a la presencia de las moléculas de agua externas resulta ser determinante en muchos de los estudios de modificaciones estructurales. En un primer trabajo realizado en 1979 Roskky y colaboradores realizaron estudios de simulación del dipéptido de alanina contenido en una “caja” de moléculas de agua (Roskky y col. 1979). En estos estudios junto al potencial creado por el conjunto de la caja de moléculas de agua, constataron los efectos de proximidad que ponen de relieve las diferencias de comportamiento del agua entorno a grupos hidrófobos como los metilos, o a grupos polares como los enlaces carbonilos o NH presentes en los aminoácidos.

Particularmente importante resulta ser el potencial creado por el agua del entorno en muchos procesos, como es el caso de la desnaturalización de proteínas. En 1992 V.Dagget y M. Lewitt realizaron estudios sobre la desnaturalización de formas helicoidales de las proteínas (Dagget y col. 1992). Concretamente su estudio se centró en una hélice alfa de 13 residuos alanina. A temperatura ambiente la simulación en vacío mostró que la hélice alfa era estable. Si se introducía el potencial de las moléculas de agua del entorno, obtuvieron que la hélice alfa era estable a temperatura ambiente, pero a medida que se iba incrementando la temperatura la estructura se iba inestabilizando llegando a la desnaturalización. Los resultados de este trabajo teórico muestran la necesidad de tener en cuenta los potenciales del agua en los estudios en que se analicen modificaciones estructurales, sobre todo si se van a estudiar simulaciones o dinámicas a temperatura fisiológica.

La presencia del agua introduce nuevos elementos de reflexión sobre el origen de la catálisis enzimática. Así, Warshel lo relaciona con un efecto que él llama “preorganización electrostática” (Warshel 1978). En ausencia de catalizador y en medio acuoso, las reacciones químicas demandan un exceso de energía que se invierte en parte en la reorganización de las moléculas de agua entorno al estado de transición

lo que incrementa la barrera de activación, tal y como deduce de sus cálculos. Por contraposición, en la reacción enzimática, los grupos polares que estabilizan el estado de transición en la enzima adecuadamente plegada no tienen que modificar su configuración, y además la capa exterior de agua queda alejada del centro activo. El mismo autor (Warshel 2006) muestra con sus cálculos multiescala que en la escasa entidad de la energía electrostática de reorganización, ausente en la reacción enzimática, frente su importante valor en ausencia de la enzima, reside la potencia catalítica de las enzimas.

Más recientemente una simulación de 1 milisegundo realizada sobre el BTPI en 2010 por Shaw y colaboradores ha puesto de manifiesto que esta proteína es estable en esa escala de tiempo (Shaw 2010). Este resultado es muy importante pues pudiera haberse pensado que los cálculos teóricos aproximados y en especial la dinámica molecular pudieran derivar hacia una desnaturalización de la proteína, lo que no es así. De este modo podemos afirmar que estas metodologías son aplicables en una escala temporal en la que se producen muchos procesos biológicos.

5.2. Simulaciones de movimientos moleculares

La dimensión y características de los sistemas de cálculo que hoy existen, sistemas de multiprocesadores, grandes cantidades de memoria accesibles, incluso informática distribuida por todo el planeta, comienza a hacer posible el escalado en la complejidad de los problemas que es accesible abordar con las metodologías multiescala antes discutidas.

La estructura de las proteínas es de tal complejidad que, en muchos casos, podemos considerarlas como formadas por unidades o fragmentos que pueden considerarse cuasi rígidos en sí mismos, pero enlazados entre sí de tal modo que unos puedan moverse respecto de los otros. Particularmente es importante esta situación en muchos de las enzimas donde la presencia de un determinado sustrato puede

modificar la posición relativa de un fragmento respecto de los otros, explicando en cierto modo la actividad enzimática.

5.2.1. Acción de la enzima adenilato-kinasa

En su lección Nobel, Martin Karplus describe sus estudios de simulación basados en la Dinámica Molecular sobre la acción de la enzima adenilato-kinasa (Karplus 2013). La función de esta enzima consiste en la transferencia de un grupo fosfato de una molécula de difosfato de adenosina (ADP) a otra molécula de ADP produciendo como resultado trifosfato de adenosina (ATP) y monofosfato de adenosina. En ausencia de sustrato, los cálculos multiescala realizados para el conjunto de la enzima muestran una estructura en la que se distinguen claramente una parte nuclear y una parte por encima de aquella, unidas por enlaces que pueden actuar a modo de bisagra. Entre ambas existe un canal que permite el acceso del sustrato y la liberación de los productos de reacción.

Cuando se añaden dos moléculas de ATP, la dinámica molecular conduce a una forma en la que las “bisagras” cierran ese canal, quedando las dos moléculas de ATP atrapadas en el interior de la cavidad o cámara de reacción situadas de modo que la reacción de transferencia sea posible, lo cual puede comprobarse con los cálculos QM incluidos en los métodos multiescala. A su vez, al cerrarse la cavidad el sistema reactivo queda protegido de cualquier acción externa. Progresando la dinámica molecular en el tiempo se puede observar cómo la enzima vuelve a abrirse liberando los productos de la reacción y recuperando su estructura inicial. Al trabajo citado se acompaña una animación con el detalle de las etapas y los tiempos, donde se observa el comportamiento descrito por los cálculos de dinámica molecular.

En esta reacción enzimática y en otras muchas las técnicas de simulación muestran que la etapa determinante en la cinética de la reacción no es la propia reacción química como pudiera pensarse, para la cual el tiempo es muy pequeño, del orden de los femtosegundos, sino

que es precisamente la etapa de apertura de la enzima para liberar los productos la que resulta ser la etapa limitante de la cinética de la reacción (Henzler-Wildman 2007). El comportamiento descrito anteriormente podría asemejarse al de una máquina molecular con movilidad suficiente en sus partes como para captar un sustrato y transformarlo en productos de manera indefinida.

5.2.2. RNA Polimerasa II

Los estudios de simulación de este tipo de máquinas moleculares crecen de día a día. Comentaremos como otro ejemplo significativo el estudio realizado sobre la RNA Polimerasa II, por Silva y Colaboradores (Silva 2014). La RNA Polimerasa II funciona como una máquina que transcribe el DNA nuclear a una copia de RNA que se utilizará para dirigir la síntesis de proteínas. Cuando la enzima actúa, el objeto de estudio pasa a ser la propia enzima que contiene 10 cadenas de proteína, la plantilla de DNA y la cadena de RNA que se va formando sobre el centro activo. Ello supone un sistema de más de 426.000 átomos.

La simulación se realizó considerando que todo el sistema está contenido en el seno de un disolvente integrado por más de 122.000 moléculas de agua, haciendo uso del modelo MSM (Markov State Model) de Dinámica molecular (Chodera y col 2007). En este estudio se aprecia cómo una base de la plantilla del DNA se mueve sobre el puente de la hélice para que pueda ser reconocida por el trifosfato del nucleósido que se aproxima. La simulación, que se desarrolla en microsegundos, ha sido recogida en un video que se incluye como material suplementario en el trabajo referenciado, en el que se aprecian los movimientos de las diferentes partes implicadas en el proceso generados por la dinámica molecular.

5.2.3. Kinesinas

Particularmente interesantes son los estudios de Hwang, y colaboradores sobre las kinesinas, simulando, mediante técnicas de diná-

mica molecular el mecanismo por el cual estas sustancias transportan las vesículas a grandes distancias a lo largo del citoesqueleto microtubular de la célula (Hwang 2004, Khalil 2008). Omitiré los detalles de estos trabajos pero simplemente diré que han permitido comprender el mecanismo por el cual el dímero de kinesina, que lleva acoplada la correspondiente vesícula, se desplaza a lo largo del citoesqueleto. Las simulaciones se realizaron tomando como referencia para la simulación la estructura de rayos X del dímero de kinesina (Kozielski 1997).

Tal y como muestran los autores citados, el desplazamiento se asemejaría al movimiento de un paseante donde primero avanzaría una de las dos partes del dímero, que luego sería alcanzada por la segunda parte y así sucesivamente en una sucesión indefinida de pasos que propiciaría el movimiento. En este mecanismo por pasos, el papel del ATP (trifosfato de adenosina) es esencial, así como el de los productos de su hidrólisis ADP (difosfato de adenosina) y P (fosfato). Así cuando se une una molécula de ATP al fragmento trasero de kinesina, se produce el impulso hacia delante iniciando el paso. Y ello es así pues aprovechando la falta de rigidez de la kinesina la adición de la molécula de ATP sobre ella produce una modificación de ésta configurando una estructura rica en energía que, de acuerdo con la simulación, se comportaría como un muelle que impulsaría hacia delante la “pata” trasera, a la vez que se libera una molécula de ADP, dejando el sistema de tal modo que pueda reproducirse el proceso indefinidamente cuando se le adjunte una nueva molécula de ATP. Este movimiento descrito no corresponde a ninguna interpretación; no es otra cosa sino el resultado de la realización de cálculos de dinámica molecular sobre el sistema.

Los motores de kinesina son muy importantes en posibilitar la vida misma (Mandelkow 2002). Cuando por diversas causas, como mutaciones perjudiciales por ejemplo, las kinesinas no funcionan adecuadamente se inhiben la mitosis y como consecuencia la división celular. Su incidencia en la división celular hace a las kinesinas objetivo de estudio en la quimioterapia del cáncer. Del mismo modo las

kinesinas son esenciales en el transporte intracelular cuando hay que liberar materiales a diferentes distancias. Algunos investigadores han apuntado incluso que determinados virus han “aprendido” a acelerar su transporte en el interior de la célula uniéndose a kinesinas como si fuesen vesículas para así ser transportados a través de los microtúbulos celulares en cuestión de minutos, mientras que por simple difusión consumirían bastantes horas.

Me atrevería a calificar estos trabajos como un verdadero hito en los logros de la dinámica molecular en la interpretación del funcionamiento de la maquinaria molecular celular en sus diferentes facetas. Cabría hacer referencia a estudios similares realizados sobre otros “motores” como la Miosina V (Cecchini y col. 2008) y Ovchinnikov y col. 2010) o la ATP'asa (Pu y col. 2008), a cuyas publicaciones remitimos.

5.2.4. Ribosomas

Las técnicas de simulación de dinámica molecular se han extendido incluso al estudio de orgánulos celulares completos, como es el caso del estudio realizado por Jenelle Bray Junjie Zhang y M Lewitt (Levitt (2013)) sobre la dinámica de modos normales de un ribosoma completo. Se trata de un sistema de grandes dimensiones con 4500 nucleótidos en 7 cadenas de RNA y 6000 aminoácidos en 49 cadenas proteínicas. El estudio concierne al movimiento de baja frecuencia correspondiente a 538 grados de libertad, 6 para cada cadena más 202 grados de libertad internos (Ramakrishnan (2009) y Steitz (2009)).

Los grados de libertad internos que utilizan los autores se eligen de modo que cada cadena de proteína o de RNA se mueve como un cuerpo rígido. Los grados de libertad adicionales fueron elegidos de manera arbitraria considerando un ángulo de torsión adicional cada 50 aminoácidos o nucleótidos en cada una de las cadenas. Este estudio muestra los movimientos para los modos de frecuencias más bajas, de las diferentes cadenas entre sí, lo que permite explicar cómo

se mueve y cómo opera el ribosoma. Este estudio puso a su vez de manifiesto que los movimientos descritos eran muy similares tanto si se obtenía con métodos de todos los átomos o bien métodos de “grano grueso” CG con un centro de interacción por cada aminoácido o nucleótido, mucho menos costosos. En este último caso el estudio tenía una duración de entorno a un día en un ordenador personal, lo que abre un sinfín de posibilidades en la realización de estudios análogos sobre estructuras celulares.

5.2.5. La F_0F_1 -ATPS

La F_0F_1 -ATPS es un nanomotor que es ubicuo en todas las células vivas y donde se generan las moléculas de ATP esenciales para el mantenimiento de múltiples funciones celulares. Su estructura es ciertamente compleja lo que ha supuesto un reto a lo hora de generar un modelo molecular basado en la estructura, que conduzca a la interpretación racional del movimiento de las partes de la enzima, en conjunción con el flujo de protones a través de la membrana donde se inserta la enzima. Este flujo de protones se considera que es el responsable de los movimientos de las partes de la enzima que posibilitan la síntesis del ATP a partir del ADP que se producirá solamente para una determinada orientación relativa de ambas partes de la enzima. Mukerjee y Warshell haciendo uso de técnicas de modelización CG han simulado la energética del sistema F_0 -ATPase en el espacio definido por la coordenada que determina la rotación de una parte de la enzima y el transporte de protones hacia el interior del citoplasma (Mukherjee y col. (2012)).

El modelo simulado establece que el origen de la rotación molecular es debido preferentemente a la asimetría en la energética del recorrido de los protones relacionando de este modo la actividad del catalizador con la migración de los protones a través de la membrana y especialmente la relación de esta asimetría con la rotación molecular para facilitar el proceso de síntesis. Este estudio viene ampliamente

descrito en el trabajo de Mukerjee y col. (Mukherjee y col. (2012). En el se contienen fundamentos conceptuales que permitirán la exploración de las bases electrostáticas de sistemas químico-mecánicos, impulsados por movimientos de protones.

5.2.6. Modelado computacional de anticuerpos

Las técnicas de simulación se han empleado también en estrategias de lucha contra diversas enfermedades y particularmente en la lucha contra el cáncer. En algunas de ellas se pretendería diseñar un anticuerpo que se fijase sobre células cancerosas o sobre receptores naturales de las mismas. Estos anticuerpos se obtienen en el laboratorio, en algunos casos, inoculando ratones con moléculas o células diana a fin de que se generen los mismos. Desafortunadamente los anticuerpos así producidos no pueden ser utilizados en la terapia tumoral sobre los seres humanos dada la severa reacción inmunológica que producen.

La estrategia se basaría en tomar la secuencia proteínica del anticuerpo del ratón, como punto de partida, introduciendo luego las modificaciones necesarias en la misma para que mantenga su actividad fisiológica sin que por ello sea rechazada por el sistema inmunológico humano. Winter y colaboradores acometieron el trasplante de los fragmentos de anticuerpo de ratón efectivos contra los tumores sobre anticuerpos humanos (Jones y col. 1986). Los resultados obtenidos, aunque esperanzadores condujeron a anticuerpos “humanizados” que si bien no daban lugar a reacciones inmunológicas no eran tan potentes como mostraron ser los generados en los ratones.

En esa misma línea, C. Queen y colaboradores haciendo uso de técnicas de simulación como las descritas anteriormente, pudieron tomar decisiones sobre qué residuos deberían cambiarse sobre el anticuerpo original proveniente de ratones para hacerlo amigable al ser humano (Queen y col. 1989). Drogas anticancerosas como el Avastin y la Herceptina son fruto de estrategias de este tipo, pero no hay que

perder de vista que todavía deben transcurrir décadas para que la investigación básica genere una droga clínicamente útil, por no referirnos además a los elevadísimos costes implicados en alcanzar esos objetivos.

5.3. Perspectivas de futuro

La implementación de las metodologías multiescala en los programas y sistemas de cálculo que hoy existen, pareciera indicar que no existen límites para abordar y en su caso resolver cualquier problema que pueda plantearse en las ciencias biomédicas. Las simulaciones permiten acelerar las comprobaciones de hipótesis, lo cual solo será útil si los cálculos conducen a una predicción precisa de lo que probablemente mostrará una experiencia. Las técnicas de simulación descritas, obtienen sus mejores resultados cuando se aplican en concordancia con el trabajo experimental sobre los problemas objeto de estudio, lo que exige la coordinación entre experimentadores y teóricos. Ello es necesario y es posible en nuestro ámbito científico propio.

Existen amplias expectativas en el campo del diseño de mejores drogas que sean más específicas para terapéuticas sobre determinadas proteínas diana. También se dirigen muchos esfuerzos al análisis de la estructura de anticuerpos, su secuencia de aminoácidos y las consecuencias de modificar estos cuerpos afectando a su estructura de manera que los haga más efectivos en la destrucción de células cancerosas, por ejemplo.

En el bien entendido que las simulaciones no van a reemplazar a las experiencias, cada vez es más notorio en la literatura científica observar cómo investigadores experimentalistas comienzan a hacer uso de técnicas de simulación como complemento a sus estudios experimentales (Young y col. (2001)). Cada vez se estudian, mediante simulaciones, sistemas más y más complejos, como virus, orgánulos celulares, incluso células, para profundizar en los diferentes aspectos

de su funcionamiento. Incluso hay investigadores como Karplus que contemplarían en un futuro no muy lejano el funcionamiento del cerebro como objeto de estudio (Karplus (2013)).

El mismo Karplus formula la cautela de que las simulaciones tienen sus limitaciones al igual que los experimentos, y que cuando descubramos algo nuevo y excitante nos habremos de asegurar que no hemos cometido ningún fallo en lo que hemos hecho. No habrá que echar en saco roto esta enseñanza.

No ha sido mi propósito abrumarles con tecnicismos excesivos ni detalles computacionales abrumadores. Mi propósito ha sido el de exponer la potencialidad de estas técnicas de Química Teórica en el estudio de sistemas biológicos y de procesos bioquímicos lo que podríamos como Bioquímica Computacional. Resulta de todo punto imposible sintetizar en este corto espacio todo cuanto se ha realizado en este campo, en el que multitud de investigadores e investigadoras vienen desarrollando su callada labor solamente interrumpida por la concesión del premio Nobel de Química de 2013 a los doctores Karplus Levitt y Warshell.

6. CONCLUSIÓN

Al finalizar mi exposición, quisiera dedicar las últimas palabras de mi discurso a recordar a aquellas personas que estuvieron conmigo en el transcurso de mi vida académica y científica, que me ayudaron, que de algún modo han contribuido a ir formando mi personalidad y que han hecho posible mi comparecencia hoy ante ustedes en este estrado.

Recordaré en primer lugar a mi maestro, el Profesor José Ignacio Fernández Alonso quien me introdujo en el apasionante mundo de la ciencia. Pionero de la Química Cuántica en España, en estrecho contacto con la escuela de pensamiento de De Broglie en París, con la que nos puso en contacto a sus colaboradores. El trabajo de Tesis

Doctoral que me propuso podría considerarse como un anticipo de los métodos multiescala que les he comentado, al referirse al estudio de la estructura electrónica de hidrocarburos deslocalizados dentro de la aproximación π -electrónica que estudiaba separadamente los electrones π de los σ . De él aprendí ciencia, pero también supo despertar en mi inquietudes que dirigían hacia el compromiso institucional y social, y con su respeto hacia mí, me enseñó a respetar a los demás. En él cobra para mí todo su sentido la palabra maestro. Maestro que me enseñó Ciencia, pero que también me enseñó a aprender, y finalmente me enseñó a enseñar.

Con él quiero recordar a los profesores D. José Beltrán, Francisco Bosch, D. Joaquín Catalá, D. Agustín Escardino, D. Lorenzo Ferrer, D. Maximino Rodríguez y D. José María Viguera de quienes aprendí conocimientos e inquietudes de lo largo de mi Licenciatura en Química.

También quiero recordar aquí a quienes compartieron conmigo responsabilidades y saberes en el Departamento de Química Física en mis inicios como docente de esta Universidad de Valencia. los Profesores Rosario Domingo, Juan Palou y Peregrin Olcina.

Mi recuerdo más afectuoso para aquellos doctores y doctoras que se iniciaron conmigo en sus tareas investigadoras y que con su trabajo han conseguido formar parte de los cuerpos docentes de la Universidad. Una parte esencial de mi actividad investigadora no hubiera sido posible sin el esfuerzo de los doctores Josep María Aulló e Ignacio Nebot primero, a los que siguieron Armando Codoñer, Raúl Crespo, Piedad Medina, Manuela Merchan, Salvador Monzó, Amparo Olba, Enrique Ortí, Maria Carmen Piqueras, Josep Planelles, Alfredo Sánchez, Pedro Viruela, Rafael Viruela, José Sánchez, Francisco Vicente, e Isabel Zabala quienes han sabido ser más amigos que compañeros.

No puedo olvidar aquí a quienes compartieron conmigo responsabilidades, cargos y cargas y me prestaron su ayuda en los periodos que

desempeñé cargos de gobierno en la Universitat de València. Con ellos y ellas tengo contraída una deuda que dudo poder pagar algún día.

A todos cuantos he mencionado les dedico mi mejor recuerdo, mi amistad y mi más profundo agradecimiento por haber compartido una parte de su vida conmigo en la nave de la Ciencia y de la Universidad.

Llegado este momento deseo expresar mi gratitud y mi afecto a quienes han compartido conmigo toda su vida, y en quienes siempre he encontrado todo el apoyo y todo su cariño sin necesidad de pedírselo, mi esposa Beatriz y mis tres hijos, quienes me lo han dado todo.

Quiero dedicar un último recuerdo a mis padres quienes supieron inculcarme el rigor y el sentido de la responsabilidad, pero también el afecto y el respeto a los demás, y a quienes les hubiera complacido estar hoy aquí con nosotros.

Finalizo exposición agradeciendo de nuevo a los señores y señoras académicos por su generosidad al recibirme en esta venerable, pero vigorosa institución depositaria de saberes y de hacer servir esos saberes para beneficio de los hombres.

Y a todos ustedes les quedo muy agradecido por su atención.

He dicho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER N. L., MILLER M. A., CHOW L. W., FORD R. A. Y GRAHAM J. C. (1965). The Calculated Electronic Spectra and Structures of Some Cyclic Conjugated Hydrocarbons. *J. Amer. Chem. Soc.* 87: 3430-3435.
- ALLINGER N. L., MILLER M. A., VANCATLEDGE F. A. Y HIRSCH J. A. (1967). Conformational Analysis. LVII. The Calculation of the conformational structures of hydrocarbons by the Westheimer-Hendrickson-Wiberg method. *J. Amer. Chem. Soc.* 89: 4345-4357.

- ANFINSEN C B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- ANTES I. Y THIEL W. (1998). En *Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Methods (ACS Symp. Ser. Vol 712)* (Gao J. y Thompson M.A. Eds.), American Chemical Society, Washington, USA,: 50-65.
- BAKOWIES D. Y THIEL W. (1996). Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *J. Phys. Chem.*, 100 (25): 10580-1059.
- BASNER J. E. Y SCHWARTZ S. D. (2005). How Enzyme Dynamics Helps Catalyze a Reaction in Atomic Detail: A Transition Path Sampling Study. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (40): 13822-13831.
- BERMAN H., HENRICK K. Y NAKAMURA H. (2003) *Nature Structural & Molecular Biology*10: 980.
- BROSS P Y GREGERSEN N, eds. (2003). Protein misfolding and disease: Principles and protocols. *Methods in molecular biology*, Vol. 232. Human Press, Inc. Totowa, New Jersey, USA.
- BURCH, M. AND BLAIR, E. (1999). The inheritance of hypertrophic cardiomyopathy. *Pediatr. Cardiol.* 20: 313-316.
- CAR R. Y PARRINELLO M. (1985). Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory. *Phys. Rev. Lett.* 55: 2471-2474.
- CARRELL, R. W. AND LOMAS, D. A. (1997). Conformational disease. *Lancet* 350: 134-138.
- CARRELL, R. W., AND LOMAS, D. A. (2002). Alpha1-antitrypsin deficiency: a model for conformational diseases. *N. Engl. J. Med.* 346: 45-53.
- CECCHINI M., HOUDUSSE A., Y KARPLUS M. (2008). Allosteric Communication in Myosin V: From Small Conformational Changes to Large Directed Movements. *PLoS Computational Biology* 4, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000129.
- CHANDLER D. (1998). Barrier Crossing: Classical Theory of Rare but Important Events. *Classical and Quantum Dynamics in Condensed Phase Simulations* (Berne B. J., Ciccotti G. y Coker D. F. Eds.) World Scientific, Singapore. 51-66.
- CHODERA J. D, SINGHAL N., PANDE V. S., DILL K. A., W. C. SWOPE W. C. (2007). Automatic Discovery of Metastable States for the Construction of Markov

Models Of Macromolecular Conformational Dynamics. *J. Chemical Physics* 126:155101-155117.

CLAEYSSENS F., HARVEY J.N., MANBY F.R., MATA R. A., MULHOLLAND A. J., RANAGHAN K. E., SCHÜTZ M., THIEL S., THIEL W. Y WERNER H-J. (2006). High-Accuracy Computation of Reaction Barriers in Enzymes Volume *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45:6856-6859.

CORNELL W. D., CIEPLAK P., BAYLY CH. I., GOULD I. R., MERZ K. M., FERGUSON D. M., SPELLMEYER D. C., FOX T., CALDWELL J. W. Y KOLLMAN P.A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 5179-5197.

CROWTHER, D. C. (2002) Familial conformational diseases and dementias. *Hum. Mutat.* 20: 1-14.

CUI Q., ELSTNER M., KAXIRAS E., FRAUENHEIM T., Y KARPLUS M. (2001). A QM/MM Implementation of the Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding (SCC-DFTB) Method. *J. Phys. Chem. B*, 105 (2): 569-585.

DAGGET V. Y LEVITT M. (1992) Molecular Dynamics Simulation of Helix Denaturation, *J.Mol. Biol.*, 223: 1121-1138.

DAPPRICH S., KOMÁROMI I., BYUN K. S., MOROKUMA K., Y FRISCH M. J. (1999). A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM Vols.* 461-462: 1 - 21.

DEISENHOFER J. Y STEIGEMANN W. (1975). Crystallographic refinement of the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. B* 31: 238-250.

DINNER, A. R., SALI, A., SMITH, L. J., DOBSON, C. M., AND KARPLUS, M. (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 25: 331-339.

DILL K.A. (1985). Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* 4: 1501-09.

DIRAC P. A. M., (1929), Quantum Mechanics of Many-Electron Systems. *Proc. Royal Soc. of London, Series A* 123: 714-733.

DUAN Y., CHUN WU CH., CHOWDHURY S., LEE M. C., XIONG G., ZHANG W., YANG R., CIEPLAK P., LUO R., LEE J., CALDWELL J., WANG J. Y KOLLMAN P. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of

- proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 24 1999-2012.
- DUNLOP R.A, RODGERS K.J, DEAN R.T. (2002). Recent developments in the intracellular degradation of oxidized proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 894-906.
- ELLIS R.J. (1990). The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biol.* 1:1-9.
- ELLIS,R.J.(1993). The general concept of molecular chaperones. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 339: 257-261
- ELLIS R.J. (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:114-19.
- ELSTNER M., POREZAG D., JUNGNIKEL G., ELSNER J., HAUGK M., FRAUENHEIM T., SUHAI S. Y SEIFERT G. (1998). Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties. *Phys. Rev. B*58, 7260.
- FIELD M.J., BASH P. A., Y KARPLUS M. (1990). A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. *J. Comput.Chem.* 11, 700-733.
- FRENKEL D. Y SMIT B. (2002). *Understanding Molecular Simulation (Second Edition) From Algorithms to Applications*. Academic Press. San Diego. USA. ISBN: 978-0-12-267351-1.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; RO BB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. (2009) *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

- GELIN B. R. Y KARPLUS M. (1975) Sidechain torsional potentials and motion of amino acids in porteins: bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2002-2006.
- GIBSON, K. D. Y SCHERAGA. (1967). Minimization of Polypeptide Energy. I. Preliminary Structures of Bovine Pancre-atic Ribonuclease S-peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58: 420-427.
- GORDON M.S. Y SCHMIDT M.W. (2005) Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later, in. *Theory and Applications of Computational Chemistry: the first forty years* C. E.Dykstra, G. Frenking, K. S.Kim, G. E. Scuseria (editors), pp. 1167-1189 Elsevier, Amsterdam.
- GREGERSEN N., BROSS P., VANG S., AND CHRISTENSEN J. H (2006). Protein Misfolding and Human Disease. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 7:103-124.
- VAN GUNSTEREN W.F., DAURA X. Y MARK A.E. (1998). GROMOS Force Field. *Enciclopedia of Computational Chemistry, Vol 2* (Ed.: P. v. R. Schleyer). Wiley, Chichester: 1211-1216.
- HENZLER-WILDMAN K. A., THAI V., LEI M., OTT M., WOLF-WATZ M., FENN T., POZHARSKI E., WILSON M. A., PETSKO G. A., KARPLUS M., HÜBNER C. G., Y KERN D., (2007). Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature* 450: 838-844.
- HENZLER-WILDMAN K. A., LEI M., THAI V., KERNS J., KARPLUS M., Y KERN D., (2007) A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450: 913-916.
- HERSLETHH-P., RYDE U., RYDBERG P., GÖRBITZC. H. Y ANDERSSON K. K. (2006). Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (4): 460-476.
- HSIAO Y.-W., DRAKENBERG T., Y RYDE U. (2005). NMR structure determination of proteins supplemented by quantum chemical calculations: Detailed structure of the Ca²⁺ sites in the EGF₃₄ fragment of protein S. *Journal of Biomolecular NMR* 31 (2): 97-114.
- HSIAO Y.-W., TAO Y., SHOKES J. E., SCOTT R. A. Y RYDE U. (2006). EXAFS structure refinement supplemented by computational chemistry. *Phys. Rev. B* 74: 214101.

- HUMBEL S., SIEBER S. Y MOROKUMA K. (1996). The IMOMO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for *n*-butane conformation and SN2 reaction: RCl+Cl⁻. *J. Chem. Phys.* 105: 1959 - 1967.
- HWANG W., ZHANG S., KAMM R. D., Y KARPLUS M., (2004). Kinetic control of dimer structure formation in amyloid fibrillogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12916-12921.
- JONES, P. T., DEAR, P. H., FOOTE, J., NEUBERGER, M. S. Y WINTER G. (1986) Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody with those from a Mouse, *Nature* 321: 522-525.
- JORGENSEN W.L., MAXWELL D.S. Y TIRADO-RIVES J. (1996). Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 11225-11236.
- KAMINSKI G. A, FRIESNER R. A., TIRADO-RIVES J.Y JORGENSEN W. L. (2001), Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B*,105: 6474-6487.
- KARPLUS M. Y WEAVER D. L. (1976). Protein-folding dynamics. *Nature* 260: 404-406.
- KARPLUS M. Y WEAVER D. L. (1979). Diffusion-collision model for protein folding, *Biopolymers* 18: 1421-1437
- Karplus M. y Weaver D. L., (1994). Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Science* 3: 650-668.
- KARPLUS M. Nobel Lecture (2013). Development of Multiscale Models for Complex Chemical Systems From H+H2 to Biomolecules”. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/karplus-lecture.html.
- KENDREW J. C., DICKERSON R. E, STRANDBERG B. E., HART R. G., DAVIES D. R., PHILLIPS D. C. Y V. C. SHORE V. C. (1960). Structure of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å. Resolution., *Nature*, 185:422-427.
- KENDREW J. C. (1961) The Three Dimensional Structure of a Protei Molecule. *Scientific American*, 205 (6): 96-110.
- KHALIL A. S., APPELYARD D. C., LABNO A. K., GEORGES A., KARPLUS M.,

- BELCHER A. M., HWANG W. Y LANG M. J. (2008). Kinesin's cover-neck bundle folds forward to generate force. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 19247-19252.
- KLÄHN M., BRAUN-SAND S., ROSTA E., Y WARSHEL A. (2005). On Possible Pitfalls in ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Minimization Approaches for Studies of Enzymatic Reactions. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109(32): 15645-15650.
- KOZIELSKI F., SACK S., MARX A., THORMÄHLEN M., SCHÖNBRUNN E., BIOU V., A THOMPSON A., MANDELKOW E.-M. Y MANDELKOW E. (1997). The Crystal Structure of Dimeric Kinesin and Implications for Microtubule-Dependent Motility. *Cell* 91: 985-994.
- LEVINE, I. N. (1991). Quantum Chemistry 4th ed. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 07632 USA. ISBN 0-205-13010-0.
- LEVINTHAL C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 65:44-45.
- LEVITT M. Y LIFSON S. (1969). Refinement of Protein Conformations Using a Macromolecular Energy Minimization Procedure, *J. Mol. Biol.*, 46: 269-279.
- LEVITT M., (1974) On the Nature of the Binding of Hexa-N-Acetyl Glucosamine Substrate to Lysozyme. *Peptides, Polypeptides and Proteins*, (Blout E. R. Ed.) Wiley, New York, 19 99-113.
- LEVITT M. Y WARSHELA. (1975). Computer simulation of protein folding. *Nature* 253 (27 de Febrero de 1975), 694-69.
- LEVITT M. (1976). A Simplified Representation of Protein Conformations for Rapid Simulation of Protein Folding. *J. Mol. Biol.* 104: 59-107.
- LEVITT M. Y SHARON R., (1988). Accurate simulation of protein dynamics in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7557-7561.
- LEVITT M. (2013). Nobel Lecture: Birth and Future of Multiscale Modeling for Macromolecular Systems". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB-2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/levitt-lecture.html.
- LIFSON S. Y WARSHEL A. (1968). Consistent Force Field for Calculations of Conformations, Vibrational Spectra, and Enthalpies of Cycloalkane and *n*-Alkane Molecules, *J. Chem. Phys.* 49: 5116.

- LILJEFORS T., GUNDETOFTE K., NORRBY P.-O. Y PETTERSSON I. (2004). Molecular Mechanics and Comparison of Force Fields. *Computational medicinal chemistry for drug discovery* (Bultinck P., De Winter H., Langenaeker W. y Tollenaere J. P. Eds.) New York: Marcel Dekker,: 1-28.
- MANDELKOW E. Y MANDELKOW E. M., (2002). Kinesin motors and disease. *Trends in Cell Biology 12*: 585-591.
- MASERAS F. Y MOROKUMA K., (1995). IMOMM: A new integrated *ab initio* + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states. *J. Comput. Chem. 16*: 1170 - 1179.
- MAURIZI M. R. Y LI C. C. (2001). AAA proteins: in search of a common molecular basis: International meeting on cellular functions of AAA proteins. *EMBO Rep. 2*:980-85.
- MATA R.A., WERNER H-J., THIEL S. Y THIEL W. (2008). Toward accurate barriers for enzymatic reactions: QM/MM case study on *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Chem. Phys.128*: 025104.
- MAPLE, J. R. (1998). Force Fields: CFF. *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol 2* (Ed.: P. v. R. Schleyer). Wiley, Chichester: 1015-1024.
- MCCAMMON J. A., GELIN B. R., Y KARPLUS M. (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature 267*: 585-590.
- MCKERELL, JR. A. D., BASHFORD D., BELLOTT M., DUNBRACK, JR R.L., EVANSECK J. D., FIELD M. J., FISCHER S., GAO J., GUO H., HA S., JOSEPH-MCCARTHY D., KUCHNIR L., KUCZERA K., LAU F. T. K., MATTOS C., MICHNICK S., NGO T., NGUYEN D. T., PRODHOM B., REIHER W. E., ROUX B., SCHLENKRICH M., SMITH J. C., STOTE R., STRAUB J., WATANABE M., WIÓRKIEWICZ-KUCZERA J., YIN D. Y KARPLUS M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem B, 102*: 3586-3616.
- MCKERELL, JR. A. D. (2001). Atomistic Models and Force Fields. *Computational Biochemistry and Biophysics*. (Eds. Becker O.M., McKereell, Jr. A. D., Roux B. y Watanabe M.), Decker, New York, USA, pp 7-38.
- MCKERELL, JR. A. D. (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *J. Comput. Chem.,25*: 1584- 1604.
- METZS., KÄSTNERJ., SOKOLA. A., KEAL T. W. Y SHERWOOD P. (2014) ChemShell-a modular software package for QM/MM simulations. *Wiley*

- Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 4 (2): 101-110.
- MONARD G., PRAT-RESINA X., GONZÁLEZ-LAFONT A. Y LLUCH J. M. (2003). Determination of enzymatic reaction pathways using QM/MM methods. *Int. J. Quantum Chem.* 93: 229-244.
- MOORE DJ, WEST AB, DAWSON VL, DAWSON TM. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:57- 87.
- MUKHERJEE S. Y A. WARSHEL, (2012). Realistic simulations of the coupling between the protomotive force and the mechanical rotation of the F_0 -ATPase. *Proc. of the National Academy of Sci.* 109: 14786-14881.
- NÉMETHY G. Y SCHERAGA H. A. (1965). Theoretical determination of sterically allowed conformations of a polypeptide chain by a computer method. *Biopolymers* 3(2): 155-184.
- "The Nobel Prize in Chemistry 2013". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/.
- OTTE N, MIRJAM SCHOLTEN M., Y THIEL W. (2007). Looking at Self-Consistent-Charge Density Functional Tight Binding from a Semiempirical Perspective. *J. Phys. Chem. A*, 111 (26): 5751-5755.
- OVCHINNIKOV V., TROUT B. L., Y KARPLUS M., (2010). Mechanical Coupling in Myosin V: A Simulation Study. *J. Mol. Biol.* 395,:815- 833.
- PARR R.G. Y YANG W. (1989) Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press, Inc. New York, New York 10016 ,USA ISBN 0-19-509276-7
- PAULING L. Y COREY R.B. (1951). The Polypeptide-Chain Configuration in Hemoglobin and Other Globular Proteins. *Proc. of the National Academy of Sci. (PNAS)*. Washington DC 37: 282-285.
- PHILLIPS D.C. (1967). The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 57: 483-495.
- PONDER J. W., Y CASE D.A. (2003). Force Fields for Protein Simulations. *Protein Simulations (Adv. Protein Chem. Vol 66)* (E. Daggett V. Academic Press, San Diego, USA: 27-85.
- POPLE, J.A., (1999) Quantum chemical models (Nobel lecture), *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(13-14): 1894-1902.

- PRAT-RESINA X., BOFILL J. M., GONZÁLEZ-LAFONT A. Y LLUCH J. M. (2004). Geometry optimization and transition state search in enzymes: Different options in the microiterative method. *Int. J. Quantum Chem.* 98 (4).367-377.
- PU J. Y KARPLUS M., (2008). How subunit coupling produces the γ -subunit rotary motion in F_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1192-1197.
- ROOTHAAN, C. C. J. (1951). New Developments in Molecular Orbital Theory. *Reviews of Modern Physics* 23: 69-89.
- QUEEN C., SCHNEIDER W. P., SELICK H.E., PAYNE P. W., LANDOLFI N. F., DUNCAN J. F., AVDALOVIC A. M., LEVITT M., JUNGHANS R. P, Y WALDMANN T. A., (1989). A Humanized Antibody that Binds to the IL-2 Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033.
- RAMAKRISHNAN V. D. (2009). Nobel Lecture: Unraveling the Structure of the Ribosome. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/ramakrishnan_lecture.pdf.
- ROSSKY P. J., KARPLUS M Y A. RAHMAN A., (1979). A model for the simulation of an aqueous dipeptide solution. *Biopolymers* 18: 825- 854.
- ROSSKY P. J., Y KARPLUS M, (1979). Solvation. A molecular dynamics study of a dipeptide in water. *J. Am. Chem. Soc.* 101: 1913-1937.
- RIORDAN, J. R. (1999). Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1499-1504.
- RYDE U. (1996). The coordination of the catalytic zinc ion in alcohol dehydrogenase studied by combined quantum-chemical and molecular mechanics calculations. *J. Comput-Aided Mol. Des.* 10 (2): 153-164.
- RYDE U., OLSEN L. Y NILSSON K. (2002). Quantum chemical geometry optimizations in proteins using crystallographic raw data. *J. Comput. Chem.*, 23: 1058-1070.
- RYDE U. Y NILSSON K. (2003). Quantum Chemistry Can Locally Improve Protein Crystal Structures. *J. Am. Chem. Soc.*,125 (47): 14232-14233.
- SCHLEGEL H.B. (1995). Geometry Optimization on Potential Energy Surfaces. *Modern Electronic Structure Theory. (Adv. Ser. Phys. Chem. Vol 2/I)* (Yarkony D. R. Ed.).World Scientific. Singapore.: 459-500.

- SCHLEGEL H. B. (2003). Exploring potential energy surfaces for chemical reactions: An overview of some practical methods. *J. Comput. Chem.* 24 (12): 1514-1527.
- SCOTT W. R. P., HÜNENBERGER P. H., TIRONI I. G., MARK A. E., BILLETER S. R., FENNEN J., TORDA A. E., HUBER T., KRÜGER P., Y VAN GUNSTEREN, W. F. (1999). The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A*, 103:3596-3607.
- SENN, H. M. Y THIEL W. (2009). QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (7): 1198- 1229.
- SHAW D. E., MARAGAKIS P., LINDORFF-LARSEN K., PIANA S., DROR R. O., M. P. EASTWOOD, BANK J. A., JUMPER J. M., SALMON J. K., SHAN Y., Y WRIGGERS W. (2010). Atomic-Level Characterization of the Structural Dynamics of Proteins. *Science* 330: 341-346.
- SHERWOODP., DE VRIES A. H., GUESTM. F., SCHRECKENBACH G., RICHARD C. CATLOW A, FRENCHS. A., SOKOLA. A., BROMLEY S. T., THIELW. TURNER A. J., BILLETER S., TERSTEGEN F, THIELS., KENDRICKJ., ROGERS S. C., CASCIJ., WATSONM., KINGF., KARLSENE., SJØVOLL M., FAHMI A., SCHÄFER A. Y LENNARTZ C. (2003). QUASI: A general purpose implementation of the QM/MM approach and its application to problems in catalysis. *THEOCHEM* 632 (1-3): 1-28.
- SILVA D-A., WEISS D., PARDO F., DA L-T., LEVITT M., WANG D., HUANG X. (2014). Millisecond Dynamics of RNA Polymerase II Translocation at Atomic Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 7665-7670.
- SINGH U. CH. Y KOLLMAN P.A. (1986). A combined *ab initio* quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems: Applications to the CH₃Cl + Cl⁻ exchange reaction and gas phase protonation of polyethers. *J. Comput. Chem.* 7: 718-730.
- SMITH J. C. Y ROUX B., (2013) Eppure si muove. The 2013 Nobel Prize in Chemistry. *Structure* 21: 2102-2105.
- SZABO A., Y OSTLUND N.S., (1989). Modern Quantum Chemistry. Introduction to Advanced Electronic Structure Theory. First Ed. Revised. McGrail Inc. New York, USA. ISBN 0-486-69186-1.
- STEITZ T. S. (2009). Nobel Lecture: From the Structure and Function of the Ribosome to New Antibiotics. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/steitz_lecture.pdf.

- VREVEN T, BYUN K. S., KOMÁROMI I., DAPPRICH S., MONTGOMERY, JR. J. A., MOROKUMA K., Y FRISCH M. J. (2006). Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, 2 (3): 815-826.
- WATSON, J D Y CRICK F H C. (1953). Molecular Structure for Nucleic Acids, *Nature* 1953, 171, 737-738.
- WARSHEL A. Y LEVITT M. (1976). Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 103: 227- 249.
- WARSHEL, A., (1978). Energetics of Enzyme Catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 5250-5254.
- WARSHEL, A., SHARMA P. K., KATO M., XIANG Y., LIU H. Y OLSSON M.H.M. (2006) Electrostatic basis for enzyme catalysis, *Chem. Rev.*, 106(8): 3210-35.
- WARSHEL A. (2013). Multiscale Modeling Of Biological Functions: From Enzymes to Molecular Machines. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/warshel-lecture.html
- WATERS, P. J., PARNIAK, M. A., AKERMAN, B. R., AND SCRIVER, C. R. (2000). Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol. Genet. Metab.* 69: 101-110.
- WESTHEIMER F. H. Y MAYER J. E. (1946), *J. Chem. Phys.* 14: 733.
- YOUNG M. A., GONFLONI S., SUPERTI-FURGA G, ROUX B., Y KURIYAN J. (2001). Dynamic Coupling between the SH2 and SH3 Domains of c-Src and Hck Underlies Their Inactivation by C- Terminal Tyrosine Phosphorylation. *Cell* 105:115- 126
- ZHANG Y., KUA J., Y MCCAMMON J. A. (2003). Influence of Structural Fluctuation on Enzyme Reaction Energy Barriers in Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Studies. *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107(18): 4459-4463.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

ILMO. SR. DR.

D. Juan Viña Ribes

EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA,
ILMAS. SRAS. ACADÉMICAS E ILMOS SRS. ACADÉMICOS,
DIGNÍSIMAS AUTORIDADES UNIVERSITARIAS, SANITARIAS Y CIVILES,
ILMO. SR. D. FRANCISCO TOMÁS VERT, FAMILIARES Y AMIGOS,
SEÑORAS Y SEÑORES:

EL ACTO DE RECEPCIÓN de un nuevo Académico es uno de los momentos de mayor esplendor de nuestra corporación. El haber sido elegido por el Prof. Tomás y aceptado por el Presidente de la Academia y su Junta Directiva para contestar su discurso de entrada y darle la bienvenida supone para mí un reto y una gran satisfacción. Desde mi primera juventud siempre le oí a su maestro el Prof. Fernández Alonso, que fue uno de los científicos pioneros de la Química Cuántica en España, que tenía un discípulo llamado Paco Tomás que era brillante, inteligente, con gran vocación científica, con un gran compromiso social y con un gran futuro universitario por delante. Claramente D. José Ignacio acertó en todas sus predicciones.

Quiero destacar tres aspectos de la personalidad de nuestro nuevo académico: el docente, el científico y el del compromiso social y universitario. Cuenta Bertrand Russell que cuando ingreso en la Universidad de Cambridge los estudiantes inconformistas le dijeron que encontraría tres tipos de profesores llamados Don en Oxford y Cambridge: personajes de chiste; profesores técnicamente competentes, pero no interesantes; y un pequeño grupo de hombres a quién los jóvenes estudiantes admiraban de corazón y con entusiasmo (Russell, 1956). El Prof. Tomás pertenece a éste último grupo, como muy saben los estudiantes de medicina que tuvieron la suerte de tenerlo de pro-

fesor durante unos años. Nuestro nuevo Académico obtuvo la Licenciatura de Químicas con Premio Extraordinario en 1965, el doctorado en 1971 también con Premio Extraordinario y obtuvo la Cátedra de Química Física en 1982. Ha sido Director del Departamento de Química Física, del Centro de Informática, Decano de la Facultad de Químicas, Vicerrector y Rector de nuestra Universidad. Pero es digno de destacar que entre sus discípulos hay ocho Catedráticos y once Profesores Titulares de Universidad, además de un gran número de investigadores.

Su carrera científica la empezó como Becario de Iniciación a la investigación y posteriormente con la beca más prestigiosa en la España de la década de los sesenta del siglo pasado, que era la beca de la Fundación Juan March. Ha publicado más de ciento cincuenta artículos de su especialidad, y una gran mayoría en revistas que se encuentran en el primer cuartil en su área de especialización. Ha dirigido más de diecinueve tesis doctorales y toda esta labor ha sido reconocida con un número elevado de distinciones entre los que destacan el Doctorado “Honoris Causa” por la Universidad Nacional de San Luis (Argentina) en el 2010 y la Medalla de nuestra Universidad en el 2011.

En su discurso de entrada a la Academia el Prof. Tomás ha disertado sobre la estructura y dinámica de las proteínas que es un área de gran interés en la actualidad. Desde la década de los cincuenta del siglo pasado estudios bioquímicos y biofísicos nos han permitido conocer el comportamiento de las proteínas cuando están altamente purificadas, lo que ha facilitado realizar estudios *in vitro* que han esclarecido el comportamiento molecular de las mismas. Sin embargo, las proteínas en el mundo celular y tisular se encuentran rodeadas por muchas otras moléculas que pueden modificar su comportamiento (Foffi y cols 2013). Además, otro aspecto muy interesante del discurso del nuevo académico es poner de manifiesto la importancia del conocimiento detallado de las macromoléculas y de sus estructuras en las investigaciones biomédicas del siglo XXI, lo que pone de relieve la importancia de la biología de estructuras. El desarrollo de la criomicroscopía electrónica junto con el desarrollo de nuevos de-

tectores de electrones y una mejora sustancial del software, nos permite obtener estructuras a nivel casi atómico de ribosomas a partir de una cantidad pequeña de partículas (Bai y cols 2013; Brown y cols 2014). Esta nueva metodología está revolucionando la biología de complejos grandes y elimina la necesidad de usar cristalografía de rayos X. La nueva tecnología de criomicroscopía asociada a sistemas computacionales complejos necesita cantidades de muestra varias órdenes de magnitud menor que lo que se necesita con la vieja técnica de la cristalografía y permite esclarecer la heterogeneidad conformacional y bioquímica en una muestra, lo que hace que esta técnica sea ideal para estudiar complejos dinámicos. (Ramakrishnan 2014). No debemos de olvidar que la vida es una red muy compleja de macromoléculas a diferentes niveles de organización y que siempre está en estado dinámico.

Además de su excelente trabajo investigador a lo largo de los años es muy importante destacar la aportación del Prof. Tomás a la medicina valenciana en otros aspectos de la misma. Nuestro nuevo académico ha gestionado con gran acierto parte de los retos de modernización de la medicina valenciana. Su aportación a la remodelación de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad no hubiera sido posible sin su tesón, ayuda incondicional y visión de futuro. Su pasión por la investigación biomédica quedó demostrada con su apoyo a la creación de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico/ Instituto INCLIVA y con la cesión temporal por parte de la Universidad del solar para la construcción del edificio central de la Fundación. Por último, durante su periodo como Rector nuestra Academia tuvo por fin una sede definitiva.

Pero sobre todo quiero destacar su compromiso cívico más allá de las creencias personales cuando salió en defensa de nuestra Facultad de Medicina. Esto se puso de manifiesto cuando una persona relevante de la sociedad del momento nos acusó veladamente de acciones inaceptables. Este exceso verbal lo combatió con elegancia, serenidad y pulcritud en un artículo publicado en un periódico influyente en el mundo de lengua hispana (Tomás, F. 2007). En él destacó que generaciones y generaciones de médicos formados en la Universidad de Valencia han de-

dicado su vida a la salvación de vidas humanas con esfuerzo, sabiduría y respeto durante más de quinientos años. También ha luchado por la calidad de la docencia y por la investigación científica, en una época donde algunas de las sociedades más avanzadas han iniciado un proceso de retirada económica del mundo de la enseñanza y la investigación básica por parte del Estado. Un proceso que ha determinado también en paralelo la secundarización de las universidades (Ordine, 2015). La importancia que tiene la financiación pública y que con tanto tesón ha luchado nuestro nuevo académico durante años es un tema de gran actualidad; ya que ha merecido una editorial de la revista *Nature Medicine* (2015) con el sugerente título: “Dejemos que la investigación florezca”.

Para acabar quiero traer a colación unas ideas expuestas por el gran pedagogo francés Alain, que relata George Steiner en su libro *Leciones de los maestros*. Se cuenta, que este gran profesor en una memorable clase en el Liceo Enrique IV en el París de 1928 ante un centenar de alumnos y de oyentes procedentes de la Sorbona escribió en la pizarra: “La felicidad es un deber” y “La ley más hermosa de nuestra especie es que lo que no se admira se olvida”. Prof. Tomás te admiramos porque de una forma completamente desinteresada, al dedicar parte de tu tiempo a la organización universitaria, nos hiciste la vida fácil a todos para poder realizar nuestro trabajo de forma eficiente. Además, nos facilitaste ser más felices al poder hacer lo que más nos gusta, que es ser parte del mundo de la docencia universitaria, de la asistencia sanitaria y de la investigación básica, clínica y traslacional. Por lo tanto, Prof. Tomás nunca te olvidaremos.

Muchas gracias por su atención.

Bibliografía

Bai XC, Fernández IS, McMulla G, & Scheres SH. (2013) Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *Elife*2,e00461.

- Brown A, Amunts A, Bai XC, Sugimoto Y, Edwards PC, Murshudov G, Scheres SH, Ramakrishnan V. (2014) *Science*.346:718-722.
- Editorial. (2015) Let research blossom. *Nat. Med* 21: 539.
- Foffi G., Pastore A., Piazza F., & Temusssi P.A. (2013) Macromolecular crowding: chemistry and physics meet biology. *Phys. Biol.* 10:1-5.
- Ordine N. (2013) La utilidad de lo inútil. pp 77-78. *Acantilado Quaderns Crema, SAU. Barcelona.*
- Ramakrishnan, V (2014). The ribosome emerges from a black box. *Cell* 159:979-984.
- Russell B. (1956) *Portraits from Memory and Others Essays*. Editor: George Allen & Unwin Ltd. London. *Retratos de memoria y otros ensayos*. pp 65-71. (1976) Alianza Editorial, S.A. Madrid.
- Steiner G. (2003) *Lecciones de los maestros*. pp 104-106. Ediciones Siruela. Madrid.
- Tomás F. (2007) *Nosotros enseñamos a sanar*. *El PAÍS*. 3 de Marzo 2007.

