SESIONES CIENTÍFICAS

Sesión científica conmemorativa del Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina y en Química

Juan Ramón Lacadena Calero

Coordinador de la sesión.
Sesión celebrada el 12 de diciembre de 2013.

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

"El Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina: control genético del tráfico celular"

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

"Del tráfico de membrana a la comunicación neuronal y las enfermedades mentales"

Dr. José Antonio Esteban García

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC/UAM)

"Nobel de Química 2013: Combinación de métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica para entender y predecir procesos químicos complejos"

Dra. Beatriz de Pascual Teresa

El Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina: control genético del tráfico celular

Juan-Ramón Lacadena Ladero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 394-397.

EL PREMIO NOBEL EN FISIOLOGÍA O MEDICINA

El 7 de octubre de 2013, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel en Fisiología o Medicina conjuntamente a James E. Rothman (1950, USA, Yale University), Randy W. Schekman (1948, USA, University of California, Berkeley) y Thomas C. Südhof (1955, Alemania, Stanford University) "por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células".

Como señalaba el comunicado de prensa del Instituto Karolinska, el buen funcionamiento de las células depende de conseguir que las moléculas correctas estén en el lugar adecuado en el momento apropiado, teniendo en cuenta que algunas de tales moléculas son exportadas fuera de las células mientras que otras tienen que estar en lugares específicos de la propia célula.

Si fuéramos capaces de introducirnos físicamente en el interior de una célula nos quedaríamos maravillados al visualizar todos los procesos moleculares que ocurren en ella a gran velocidad y con total precisión. Pensemos, por ejemplo, en la replicación del ADN, la transcripción y síntesis del ARN mensajero, la síntesis de proteínas en la maquinaria ribosómica. También nos asombraría ver cómo las moléculas sintetizadas en la célula (enzimas, hormonas, neurotransmisores, citokinas, etc.) son transportadas en vesículas a lugares específicos (orgánulos) de la propia célula o liberadas al exterior de la misma en el momento justo.

En los comentarios escritos para explicar en qué han consistido las investigaciones de los tres científicos galardonados se ha repetido el ejemplo de un gran puerto en el que hay que distribuir ingentes cantidades de mercancías para que lleguen al destino correcto en el tiempo preciso, para lo cual se requiere un sistema de reparto adecuado que genera un denso tráfico interior que tiene que estar perfectamente regulado. Pues bien, volviendo al terreno biológico, las moléculas son empaquetadas en vesículas minúsculas recubiertas con membranas para su transporte a los diferentes lugares específicos de la célula o para ser exportadas al exterior de la misma.

Las investigaciones premiadas se refieren a tres aspectos diferentes, pero a la vez complementarios, de la cuestión global: 1) la existencia de una regulación genética que controla el tráfico de las vesículas (Schekman): 2) la existencia de complejos proteicos que permiten a las vesículas anclarse en el lugar preciso y fusionarse con las membranas celulares o intracelulares (Rothman); y 3) la existencia de un mecanismo molecular dependiente del calcio en la transmisión entre células nerviosas (Südhof).

De las tres investigaciones premiadas yo solamente me siento legitimado para hacer un breve comentario sobre la aportación de Randy W. Schekman quien descubrió los genes que codifican para las proteínas que son los reguladores clave del tráfico de vesículas en levaduras, controlando el transporte tanto a los diferentes compartimentos internos celulares (del retículo endoplásmico al aparato de Golgi) como a la superficie celular. Interesado por cómo las células organizan su sistema de transporte, Scheckman decidió iniciar en los años setenta un estudio genético utilizando como sistema modelo mutantes de levadura sensibles a la temperatura (1). Posteriormente identificó 23 grupos de complementación implicados en los sucesos post-traduccionales de la ruta secretora de la levadura (2) y estableció el orden de los sucesos que ocurrían en el patrón secretor de las células de levadura (3). En un estudio posterior, Scheckman y colaboradores caracterizaron morfológicamente y genéticamente las mutaciones en siete genes SEC demostrando que pueden jugar un papel en la formación o en la fusión de vesículas intermedias en el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi (4).

Es interesante hacer constar que las investigaciones realizadas en células de mamíferos por Rothman (5,6), con quien ha compartido el galardón Nobel, sobre los complejos proteicos que permiten a las vesículas fusionarse con sus dianas en las membranas asegurando que las moléculas que las vesículas transportan (moléculas-cargo, moléculas-mercancía) sean liberadas en el lugar preciso han demostrado que incluyen proteínas semejantes a las descritas por Scheckman codificadas por genes homólogos. Es decir, se trata de procesos del sistema de transporte celular conservados en la evolución.

Aunque la investigación de los galardonados con el Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina pertenece al campo de la Biología y la Fisiología Celular –de hecho, es la tercera vez desde que George Palade, Albert Claude y Christian de Duve obtuvieron el Premio Nobel en 1974 y GünterBlobel en 1999 en que este campo científico es galardonado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina– sin embargo en el caso del Dr. Scheckman me he permitido incluirlo también en el campo de la Genética por la metodología genética clásica que ha utilizado para seleccionar los mutantes de levadura que han constituido su material de trabajo imprescindible para llevar a cabo sus estudios citológicos. Confirma criterio el

mismo hecho de que el Dr. Schekman eligiera como título de su Nobel Lecture "Genes and proteins that organize the secretory pathway" (7 diciembre 2013).

Termino este breve comentario actualizando los datos numéricos que año tras año vengo ofreciendo: hoy, en 2013, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 41 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 90 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 41premios considerados, 32 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 8 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 90científicos galardonados, 71 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 18 de Química y 1 de la Paz. Finalmente, me gustaría destacar que en lo que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en trece ocasiones: en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, "por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular"), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, "por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada"), 2004 (Axel y Buck, "por sus descubrimientos de receptores olorosos y la organización del sistema olfativo"), 2006 (Fire y Mello, "por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena"), 2006 (Kornberg, "por sus estudios de la base molecular de la trancripcióneucariótica"), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, "por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias"), 2008 (zurHausen, "por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical"; Barré-Sinoussi y Montagnier, "por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana"), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP"), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, "por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa"), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, "por los estudios de la estructura y función del ribosoma"), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann "por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata"; y a Ralph M. Steinman "por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa", 2012 a John B. Gurdon y ShinyaYamanaka "por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes" y en 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof "por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células", demostrando que existe un control genético de la maquinaria que controla el tráfico de vesículas en el interior y al exterior de las células.

Con mucho mayor conocimiento que yo, el Dr. José Antonio Esteban García glosará los trabajos de los tres científicos galardonados con el Premio Nobel 2013 en Fisiología o Medicina.

EL PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2013

El 9 de octubre de 2013, la Real Academia de Ciencias de Suecia en Estocolmo acordó conceder el Premio Nobel 2013 en Química conjuntamente a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel "por el desarrollo de modelos computacionales para sistemas químicos complejos".

Como decía la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, los químicos usaban bolas y bastones de plástico para crear modelos de moléculas. Hoy, el modelado se realiza en computadores. En los años setenta, Martin Karplus, Michael Levitt y AriehWarshel pusieron los fundamentos de los poderosos programas de computación que se usan actualmente para comprender y predecir procesos químicos complejos. El acierto de los galardonados con el Premio Nobel ha sido poner a trabajar juntas la física newtoniana clásica y la física cuántica cuando antes había que decidirse por una u otra, cada una con sus fortalezas y debilidades.

Así como en la presentación del Premio Nobel en Fisiología o Medicina me he sentido mínimamente legitimado para hacer un brevísimo comentario sobre la investigación de uno de los galardonados, no es este el caso de las investigaciones premiadas con el Premio Nobel en Química, por lo que cedo el testigo a la Profesora Beatriz de Pascual-Teresa Fernández que glosará las investigaciones de los tres científicos galardonados.

REFERENCIAS

(1) Novick, P.; Scheckman, R.W. 1979. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae. ProcNacAcadSci*, 76:1858-1862.

(2) Novick, P.; Field, C.; Scheckman, R.W. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21:205-215.

(3) Novick, P.; Ferro, S.; Scheckman, R.W. 1981. Order of events in the yeast secretory pathways.*Cell*, 25:461-469.

(4) Kaiser, C.A.; Scheckman, R. 1990. Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*, 61:723-733.

(5) Balch, W.E.; Dunphy, W.G.; Braell, W.A.; Rothman, J.E. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, 39:405-416.

(6) Sollner, T.; Whiteheart, W.; Brunner, M.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Tempst, P.; Rothman, J.E. 1993. SNAP receptor implicated in vesicletargeting and fusión. *Nature*, 362:318-324.

Del tráfico de membrana a la comunicación neuronal y las enfermedades mentales

José Antonio Esteban García

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 398-407.

El Premio Nobel de Fisiología o Medicina del año 2013 ha estado dedicado a un problema biológico fundamental: ¿cómo se transportan y distribuyen las distintas sustancias y cargamentos en el interior de la célula? ¿y cómo se dirigen las sustancias destinadas a ser liberadas al exterior de la célula? Todas las células contienen un complejo sistema de transporte interno, con carreteras primarias y secundarias, con señales de parada y de avance, con estaciones de servicio y de reparación. La existencia de este sistema de transporte es conocida ya desde los trabajos pioneros de George Palade en los años 1960 (Premio Nobel en 1974), pero sólo en los últimos 20 años se ha conseguido un conocimiento razonablemente completo de su organización y regulación interna, en gran medida gracias a las investigaciones de Randy Sheckman, James Rothman y Thomas Südhof, galardonados este año con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina.

Antes de entrar en más detalle sobre estas investigaciones, incluyo aquí unas pequeñas notas biográficas. Randy Sheckman nació en 1948, en Minnesota, EEUU, y realizó casi todo su trabajo en la Universidad de California, en Berkeley, donde en la actualidad es Profesor en el Departamento de Biología Molecular y Celular. Curiosamente, Randy Scheckman tiene una relación de parentesco científico con el Premio Nobel español Severo Ochoa, ya que realizó su tesis doctoral bajo la supervisión de Arthur Kornberg, en la Universidad de Stanford (EEUU), quien a su vez trabajó con Severo Ochoa en la Universidad de Nueva York (Arthur Kornberg y Severo Ochoa recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Medicina o Fisiología el año 1959). Por tanto, Randy Scheckman puede considerarse el "nieto científico" de Severo Ochoa. James Rothman nació en 1950, en Massachusetts, EEUU, e inició sus investigaciones relacionadas con este Premio Nobel en la Universidad de Stanford, precisamente en el departamento en el que unos años antes Randy Scheckman realizaba su tesis doctoral. James Rothman también ha trabajado en la Universidad de Princeton, en el Instituto de Cáncer Memorial Sloan-Kettering y en la Universidad de Columbia. En la actualidad, es Profesor y Catedrático del departamento de Biología Celular de la Universidad de Yale. Thomas Südhof nació en Göttingen, Alemania en 1955. Es por tanto el único investigador no estadounidense de los tres galardonados con este premio. Realizó su tesis doctoral y obtuvo el título de doctor en medicina por la Universidad de

Göttingen. A continuación se trasladó a la Universidad de Texas Southwestern, en EEUU, donde realizó la mayor parte de su trabajo de investigación. En la actualidad es Profesor en el Departamento de Fisiología Molecular y Celular en la Universidad de Stanford.

Desde un punto de vista más anecdótico, Thomas Südhof ha tenido una conexión muy reciente y directa con la universidad española, y en concreto, con el autor de estas líneas. Ello se debe a la celebración de un congreso sobre transporte de membrana en las neuronas, que tuvo lugar del 7 al 9 de octubre del 2013 en Baeza (Jaén), auspiciado por la Universidad Internacional de Andalucía (UNIA) y organizado por Juan Lerma (Instituto de Neurociencia de Alicante), Thomas Schwarz (Harvard Medical School) y yo mismo. Este congreso se había organizado casi con un año de antelación, y Thomas Südhof era uno de los ponentes invitados. La feliz coincidencia fue que el día que Thomas Südhof llegaba a España (desde los Estados Unidos) para participar en este congreso, se le comunicaba la concesión del Premio Nobel. El Instituto Karolinska tiene por costumbre anunciar el resultado a los galardonados por teléfono. En este caso la llamada tuvo lugar mientras Thomas Südhof conducía, en un coche alquilado, desde el aeropuerto de Barajas en Madrid a la sede del congreso en Baeza. Cuando Thomas Südhof atendió la llamada, después de la incredulidad inicial, tuvo que pedir a su interlocutor que esperara un momento mientras detenía el coche, ya que se encontraba "conduciendo por algún lugar en medio de España". La conversación telefónica completa, junto con su transcripción al español, puede seguirse en http://www.youtube.com/watch?v=8cZnznOAZMY. Es realmente un testimonio de la naturalidad y sorpresa con que Thomas Südhof recibió la noticia.

Unas pocas horas más tarde, Thomas Südhof llegaba a Baeza. Para aquel momento nosotros ya sabíamos de la concesión del Premio Nobel, y esperábamos con impaciencia su llegada, junto con los primeros periodistas que empezaban a

agruparse en la sede del congreso. Después de una rápida ducha en el hotel,

Thomas Südhof se reunió con nosotros y atendió a los periodistas, tanto locales como nacionales, que a duras penas habían tenido tiempo para enterarse de la noticia y preparar la entrevista. A pesar de lo improvisado de la situación, todo transcurrió en un ambiente relajado y cordial. Thomas Südhof se prestó siempre de buen ánimo y con una sonrisa a las sucesivas entrevistas y sesiones fotográficas que le fueron pidiendo (conviene recordar que había pasado la noche anterior volando desde California a Madrid, para luego conducir durante tres horas por su cuenta hasta Baeza). Quizá un ejemplo más del buen talante y profesionalidad de Thomas Südhof fue que, concluidas la ronda de entrevistas; nos dispusimos a continuar con el programa científico del congreso… ¡en el que él era el próximo ponente! En efecto, Thomas Südhof entró en la sala de conferencias, donde fue recibido con aplausos y el público en pie. Tras los agradecimientos de rigor, tuvo lugar su conferencia, en la que nos presentó los últimos trabajos que están realizando en el laboratorio, sobre los cuales hablaré un poco más adelante. En conclusión, esta feliz coincidencia, además de crear un poco de revuelo en la tranquila ciudad de Baeza, sirvió para resaltar la importancia del tema de investigación que nos ocupa, y para que los estudiantes (y profesores) tuvieran la oportunidad de conocer y charlar con un Premio Nobel "de carne y hueso".

Como mencionaba al comienzo, el Premio Nobel de este año reconoce las investigaciones de Randy Sheckman, James Rothman y Thomas Südhof sobre el sistema de transporte en el interior de la célula. Cada célula es una pequeña fábrica que produce y exporta moléculas, ya sean señales químicas para la comunicación nerviosa, o enzimas degradativas en las células que rodean el tubo digestivo. Estas moléculas (o cargamentos) se empaquetan en pequeños compartimentos de membrana llamados vesículas, que son luego transportados por el interior de la célula de una manera exquisitamente dirigida para llegar al lugar correcto en el momento adecuado. El trabajo de estos tres investigadores ha contribuido a elucidar en gran medida cómo este sistema de transporte se organiza y regula en el interior de la célula. Un aspecto interesante de sus investigaciones es que fueron fundamentalmente de índole básica, es decir, no estaban necesariamente encaminadas u orientadas a resolver o tratar una enfermedad o problema social determinado. Por supuesto, como comentaré al final, sus resultados han resultado de gran utilidad para comprender, y en parte aliviar, múltiples enfermedades. Pero es importante resaltar, en estos tiempos de recortes presupuestarios, que la investigación básica siempre encuentra aplicaciones prácticas, muchas veces inesperadas, aunque generalmente a largo plazo. A continuación paso a reseñar brevemente algunos aspectos destacados de la investigación llevada a cabo por estos investigadores.

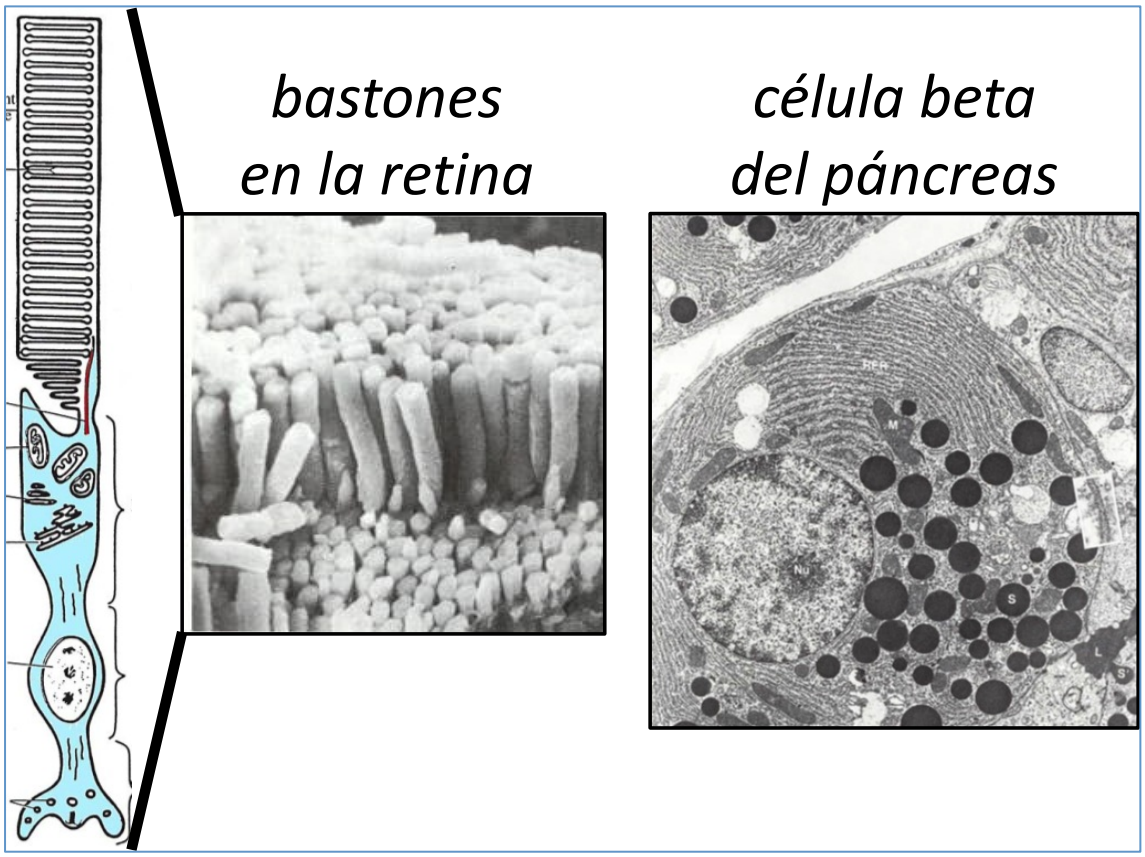
La aproximación de Randy Sheckman fue fundamentalmente genética. La hipótesis básica es que si queremos entender el sistema de transporte de

membrana en la célula, necesitamos conocer los genes que lo gobiernan. Y para abordar este problema, utilizó un organismo cuya manipulación genética es relativamente sencilla, como es la levadura cervecera o *Saccharomycescerevisiae*. Randy Sheckman estudió multitud de mutantes de levadura en los que el sistema de transporte era defectuoso. Utilizando técnicas de bioquímica y microscopía, observó cómo en algunas cepas de levadura se producían "atascos" en el tráfico intracelular, con lo que determinados cargamentos no llegaba al lugar adecuado. A continuación, empleando estrategias de genética clásica, clasificó las cepas mutantes y aisló los genes cuya mutación producía los defectos de transporte. De esta forma fue capaz de generar un mapa anatómico y funcional, en el que distintos genes controlan pasos específicos en el transporte de membrana entre distintos compartimentos en el interior de la célula. Esta cartografía diseñada sobre la célula de levadura es esencialmente la que se utiliza hoy en día para entender el funcionamiento interno de células tan dispares como las neuronas o las células secretoras de insulina en el páncreas.

El trabajo de James Rothman consistió fundamentalmente en la disección bioquímica del proceso de fusión de membrana. La liberación de moléculas al exterior de la célula (como es el caso de los neurotransmisores en las neuronas o las hormonas en las células de las glándulas endocrinas) requiere que las vesículas que las contienen se fusionen con la membrana exterior de la célula, produciendo el volcado de su contenido. También para el transporte intracelular, distintas vesículas tienen que fusionarse con otras membranas internas, para transferir su contenido de un compartimento a otro. Este transporte es extremadamente específico, para evitar la mezcla de cargamentos en los compartimentos incorrectos y el caos intracelular. James Rothman descubrió una serie de proteínas que se anclan específicamente en distintas vesículas o en la superficie de la célula, y fuerzan la fusión de las membranas en los sitios adecuados. Para ello utilizó células de mamífero, sobre las que empleó técnicas de fraccionamiento y purificación de distintos compartimentos de membrana. De esta forma, por primera vez, se identificaron componentes de la maquinaria molecular que ejecuta el transporte y la fusión de las membranas. Quizá uno de los resultados más interesantes fue comprobar que algunas de las proteínas encontradas con estos estudios bioquímicos con células de mamífero eran las mismas que se codificaban por los genes que había encontrado Randy Sheckman con sus estudios en levadura. Esta coincidencia revela y refuerza la conservación evolutiva de estos mecanismos como procesos fundamentales en el funcionamiento de todas las células eucariotas.

Precisamente el trabajo de Thomas Südhof está encaminado a entender estos mecanismos en una de las células más evolucionadas y especializadas que se conocen, como son las neuronas en el cerebro. Aquí el proceso que se estudió fue la

liberación de neurotransmisor, que permite la comunicación de una neurona a otra. Todos los requerimientos de regulación y especificidad de la fusión de membranas, están llevados al máximo en el caso de la comunicación neuronal. Así, las vesículas que contienen los neurotransmisores pueden permanecer inmóviles, ancladas durante horas o días en las terminales nerviosas, conocidas como sinapsis. Luego, cuando llega el estímulo nervioso (potencial de acción), la fusión de la vesícula con la membrana sináptica se dispara a gran velocidad, en tiempos inferiores a un milisegundo. Esta precisión y rapidez son fundamentales para la comunicación nerviosa, y son la base del funcionamiento cerebral, desde la percepción de estímulos del exterior, hasta la ejecución de complicados movimientos o los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Curiosamente, cuando Thomas Südhof comenzó estos estudios, en los años 1990, se desconocía prácticamente en su totalidad la maquinaria molecular de las vesículas de neurotransmisor. Y aunque era de esperar que parte de esta maquinaria fuera común y compartida con la que opera en otros tipos celulares para la fusión de membranas, parecía obvio que tenía que haber adaptaciones y especializaciones que "acoplaran" esta maquinaria a los estímulos nerviosos. Antes del comienzo de estas investigaciones ya se conocía que un factor fundamental en este acoplamiento son los iones de calcio (Ca^{2+}). La llegada del potencial de acción a la terminal sináptica provoca la entrada de Ca^{2+} a través de unos canales iónicos específicos, y esta acumulación de Ca^{2+} es necesaria para la liberación del neurotransmisor. Una de las contribuciones fundamentales del laboratorio de Thomas Südhof ha sido la identificación de una serie de proteínas en las vesículas de neurotransmisor que unen Ca^{2+} y actúan como sensores que detectan la llegada del potencial de acción y disparan con gran rapidez la fusión de membrana. De esta forma ha sido posible entender la exquisita precisión temporal de la comunicación nerviosa. Además, estas investigaciones supusieron un cambio conceptual, al descubrir que la fusión de membrana podía ocurrir de forma regulada, en respuesta a estímulos determinados. Ahora se sabe que este no es sólo el caso de las neuronas, sino también el de la mayor parte de las células endocrinas, del sistema inmune y otros tipos celulares.



En conclusión, los estudios distinguidos con el Premio Nobel de Medicina de este año nos han llevado en dos direcciones complementarias. Por un lado, nos han permitido entender los mecanismos básicos del transporte intracelular de membrana, que operan en todas las células eucariotas y son fundamentales para su organización interna y correcto funcionamiento. Por otro lado, nos han ofrecido un ejemplo de cómo estos mecanismos pueden adaptarse a los requerimientos específicos de distintos tipos celulares, como es el caso de la liberación de neurotransmisor en las neuronas. De hecho, la mayoría de las investigaciones actuales en este campo se concentra en entender las distintas especializaciones y mecanismos de regulación del transporte de membrana en distintos tejidos y tipos celulares. Algunas de estas adaptaciones son realmente notables. Por ejemplo, las células fotorreceptoras en la retina, conos y bastones (arriba a la izquierda), están tremendamente polarizadas. En su segmento externo forman unos discos de membrana donde se concentra la proteína sensible a la luz, la rodopsina. La mayor parte de la energía de esta célula se destina a la formación de estos discos de membrana y al empaquetamiento de la rodopsina, en concentraciones casi cristalinas, en su interior. Además, esta especialización está sometida a una continua renovación, al irse perdiendo los discos de membrana más externos y ser sustituidos por discos más internos que se van desplazando hacia el exterior. Otro ejemplo notable son las células productoras de insulina en el páncreas (células beta). Estas células son auténticas factorías, en las que casi la totalidad de su

sistema de transporte de membrana está destinado a la síntesis, empaquetamiento, procesamiento y liberación de insulina. De hecho, gran parte de su contenido celular está ocupado por los gránulos de secreción (arriba a la derecha).

Dada la importancia del sistema de transporte de membrana para los distintos tipos celulares, no es sorprendente que su alteración dé lugar a una gran variedad de enfermedades. De hecho, es gracias al conocimiento de este sistema que hemos podido entender la base genética y molecular de múltiples enfermedades en humanos. A continuación menciono sólo unos pocos ejemplos para poner de relieve la variedad de patologías que pueden producirse.

Tejidos estructurales como los huesos o cartílagos están basados en la producción de una compleja matriz extracelular, que es la que da consistencia al tejido. En su mayor parte, esta matriz está compuesta por proteínas altamente modificadas que son producidas por osteoblastos y condrocitos (células generadoras de hueso y cartílago, respectivamente). Estas proteínas tienen que ser empaquetadas y secretadas al medio exterior utilizando esencialmente los mismos mecanismos de transporte descritos anteriormente. Cuando estos mecanismos fallan, la formación de huesos y cartílagos es defectuosa, lo que da lugar a graves malformaciones durante el desarrollo. Es el caso, por ejemplo, de mutaciones en la proteína *GMAP-210*, que se encarga de organizar el aparato secretor y anclarlo al citoesqueleto de los condrocitos. Al fallar el aparato secretor, se produce la acumulación intracelular de una proteína de la matriz del cartílago, el perlecan, lo que impide la correcta formación del cartílago (acondrogénesis tipo IA).

Otro órgano que depende en gran medida de los sistemas de tráfico intracelular es el riñón. Aquí se produce una intensa actividad de filtración e intercambio de sustancias, que depende de la correcta localización de multitud de proteínas que actúan como transportadores moleculares. En el caso del *síndrome de Lowe*, se encuentra mutada la proteína *OCRL1*. Esta proteína se encarga del metabolismo de unos lípidos de membrana específicos, los fosfoinosítidos, cuya correcta localización es fundamental para la organización del sistema de transporte intracelular. La falta de esta proteína da lugar a alteraciones oculares, cerebrales y renales, que constituyen el síndrome de Lowe (de ahí el nombre de la proteína, *OCRL*).

Finalmente, un órgano que depende críticamente del transporte de membranas, como mencionaba anteriormente, es el cerebro, debido a los requerimientos de la comunicación neuronal. Hay multitud de enfermedades mentales debidas, directamente o indirectamente, a defectos en el proceso de transporte intracelular de membrana. Por ejemplo, mutaciones en la proteína *Rab39b* da lugar a una acumulación defectuosa de vesículas de neurotransmisor en

la terminal sináptica, lo que conduce a una forma de retraso mental asociada al cromosoma X. Las disfunciones pueden ser más sutiles. Por ejemplo, la proteína *Rab7a* se encarga de dirigir cargamentos para su degradación en el interior de la célula, en un orgánulo especializado llamado lisosoma. Cuando esta proteína está mutada se produce una acumulación de "basura intracelular" que no puede eliminarse, lo que acaba desencadenando la degeneración neuronal. Es el caso de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth tipo 2B (la neuropatía Charcot-Marie-Tooth es muy compleja, con más de 60 genes asociados). Pero no todas las alteraciones cerebrales se deben a defectos en el funcionamiento de las neuronas. Por ejemplo, en la transmisión nerviosa, el neurotransmisor es liberado y se une a receptores específicos en la neurona adyacente. A continuación, es importante eliminar el exceso de neurotransmisor con gran rapidez, para terminar la transmisión y permitir que la neurona se prepare para el siguiente estímulo. Además, un exceso de neurotransmisor en el medio extracelular puede dar lugar a una excitación excesiva de la neurona, en un proceso conocido como excitotoxicidad. Pues bien, la eliminación del exceso de neurotransmisor se lleva a cabo por otro tipo celular, los astrocitos, que se encuentran en gran proximidad a la terminal sináptica. Estas células presentan en su membrana unos transportadores que se encargan de captar el neurotransmisor y transportarlo al interior de la célula. Es por tanto muy importante que estos transportadores específicos se encuentre localizados correctamente en la membrana del astrocito. Cuando esto no ocurre, puede dar lugar a distintas formas de epilepsia, y finalmente, a la muerte neuronal.

Este es sólo un pequeño "muestrario" de las enfermedades humanas que pueden producirse cuando el sofisticado tráfico intracelular se encuentra alterado. Como decía, esta información nos ha ayudado notablemente a entender mejor estas enfermedades. Pero ¿ha sido esto útil para el diseño de nuevos tratamientos para estas enfermedades? Sí, sin duda ha sido útil, pero hay que reconocer que lo ha sido fundamentalmente para aliviar o paliar los síntomas de estas enfermedades, más que para corregir sus causas. Esto es así porque en gran manera nuestro conocimiento es todavía demasiado incompleto, y sobre todo, porque carecemos de herramientas lo bastante finas como revertir los procesos moleculares defectuosos que originan estas enfermedades. Aun así, el progreso es continuo, y hay múltiples terapias en fase experimental para el tratamiento de alguna de estas enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick se debe a la acumulación intracelular de distintos lípidos de membrana, como la esfingomielina, fundamentalmente en los lisosomas. Esto se debe a deficiencias en la enzima que degrada la esfingomielina, la esfingomielinasa. Basado en este conocimiento, se están ensayando dos tipos de terapias moleculares. Por un lado, se intenta prevenir la acumulación excesiva de esfingomielina reduciendo su producción. Para ello se están utilizando inhibidores específicos de las enzimas que regulan su síntesis. Por otro lado, se está intentado recuperar la capacidad de

degradar esfingomielina por la célula, utilizando activadores de enzimas alternativas.

Otro ejemplo importante es el de la fibrosis quística. Esta enfermedad se debe a mutaciones en un canal de cloruro que se encuentra en la membrana de las células que recubren los alveolos pulmonares. Cuando este canal no está presente, se producen alteraciones osmóticas en estas células que dan lugar a una secreción excesiva de mucosidad. Además de problemas respiratorios crónicos, esta condición produce graves peligros de infección pulmonar, que pueden llegar a ser mortales. En múltiples casos de esta enfermedad, las mutaciones en el canal de cloruro no eliminan completamente la proteína, sino que producen defectos en su plegamiento molecular, lo cual provoca su retención en compartimentos intracelulares. El plegamiento de proteínas de membrana en el interior de la célula es un proceso muy complejo, que viene asistido por múltiples proteínas conocidas como "chaperonas moleculares". Por tanto, para el tratamiento de esta enfermedad, se están ensayando distintas aproximaciones farmacológicas que mejoren en cierta medida el plegamiento molecular, y por tanto, conseguir que una mayor proporción de canales mutados lleguen a la superficie celular y lleven allí a cabo sus labores de transporte iónico.

Otros casos notables son las enfermedades debidas a acumulaciones o agregados proteicos, como son la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson, que acaban produciendo la muerte neuronal. En estos casos se están ensayando distintas aproximaciones para "disolver" estos agregados, con la esperanza de que así se recupere el normal funcionamiento de las neuronas afectadas. Sin embargo, estas estrategias no carecen de riesgos. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, los agregados son conocidos como placas de amiloide, y están producidas por la agregación extracelular de un pequeño péptido (péptido beta-amiloide) debido a la excesiva secreción por parte de las neuronas. En un principio se consideró que el principal agente patológico eran las placas de amiloide, y por tanto, la estrategia consistía en su disgregación. Sin embargo, ahora sabemos que el agente tóxico fundamental es el propio péptido, antes de formar agregados. Este péptido altera el correcto funcionamiento de la sinapsis, dando lugar a problemas de memoria mucho antes del comienzo de la muerte neuronal. De hecho, se ha comprobado en modelos animales que la disolución de las placas de amiloide produce la movilización de grandes cantidades del péptido amiloide, con el consiguiente empeoramiento de la función cognitiva. Sirva esto como ejemplo de la importancia del conocimiento de los mecanismos básicos de una enfermedad para el correcto diseño correcto de posibles intervenciones terapéuticas.

Por tanto, como decía, el conocimiento de los mecanismos de transporte de membrana en la célula ha abierto múltiples avenidas terapéuticas para el

tratamiento de enfermedades. Sin embargo, hay que reconocer que la mayoría se encuentran todavía en fases tempranas de desarrollo. No por ello hemos de minimizar las aplicaciones prácticas de este conocimiento. En la mayor parte de los casos estamos hablando de resultados científicos generados en los últimos 10 años, y por tanto creo que podemos ser optimistas acerca de las aplicaciones clínicas que en un futuro próximo estarán basadas en este conocimiento. Estoy seguro de que esto servirá de gran regocijo para investigadores básicos como Randy Schekman, James Rothman y Thomas Südhof, que difícilmente podrían haber imaginado, al comienzo de sus investigaciones, la gran relevancia que acabaría teniendo su trabajo para la salud humana.

Nobel de Química 2013: combinación de métodos de mecánica molecular y mecánica cuántica para entender y predecir procesos químicos complejos

Beatriz de Pascual-Teresa

Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU.

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 408-432.

RESUMEN

La Real Academia Sueca de Ciencias ha decidido otorgar el Premio Nobel de Química 2013 al investigador austríaco Martin Karplus, Profesor de la Universidad de Strasbourg, Francia y Profesor Emérito de la Universidad de Harvard, USA, al sudafricano Michael Levitt, Profesor de la Universidad de Stanford, USA, y al israelí AriehWarshel, Profesor de la Universidad del Sur de California, USA, por "el desarrollo de modelos multiescala para sistemas químicos complejos". Los trabajos galardonados con el Premio Nobel de Química de este año se centran en el desarrollo de métodos que utilizan tanto la mecánica molecular como la mecánica cuántica. Sin embargo, a pesar del impresionante avance en software y hardware, el estudio de sistemas complejos, con un elevado número de átomos, como es el caso de las biomoléculas, presenta bastantes dificultades. Para poder llevar a cabo el modelado de las reacciones enzimáticas y otras procesos biomoleculares que implican cambios en la estructura electrónica, tales como formación y ruptura de enlaces covalentes o transferencia de carga, la utilización combinada de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM/MM) se ha convertido en el método de elección, siguiendo una idea inicialmente formulada por los investigadores premiados este año.

Palabras clave: Mecánica Molecular; Dinámica Molecular; Mecánica Cuántica; QM/MM; Reactividad Química

ABSTRACT

Nobel Prize in Chemistry 2013: combination of molecular mechanics and quantum mechanics for understanding and predicting complex chemical processes

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2013 to Austrian researcher Martin Karplus, Professor of the Université de Strasbourg, France and Emeritus Professor at Harvard University, USA, to Southafrican Michael Levitt, Professor at Stanford University, USA, and Israeli AriehWarshel, Professor at University of Southern California, USA "for the

development of multiscale models for complex chemical systems". The work awarded with the Nobel Prize in Chemistry this year focuses on the development of methods that use both molecular mechanics and quantum mechanics. However, despite the impressive advances in software and hardware, the study of complex systems with a large number of atoms, such as biomolecules, is quite challenging. To carry out modeling of enzymatic reactions and other biomolecular processes involving changes in electronic structure, such as formation and breaking of covalent bonds or charge-transfer processes, the combined use of quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) has become the method of choice , following an idea originally formulated by this year's awarded researchers.

Keywords: Molecular Mechanics; Molecular Dynamics; Quantum Mechanics; QM/MM; Chemical Reactivity.

1. INTRODUCCIÓN

La química y la bioquímica se han desarrollado muy rápidamente en los últimos 50 años. En la primera mitad de este periodo ha sido especialmente llamativo el desarrollo de la determinación estructural de macromoléculas, primero a través de la cristalografía de rayos X y después con el desarrollo de los métodos de resonancia magnética nuclear. Ambas metodologías han sido galardonadas con premios nobel en química. Sin embargo, la estrategia menos conocida es la aplicación de métodos computacionales para analizar el patrón de difracción de rayos X, los acoplamientos spin-spin obtenidos a partir de un experimento de RMN, la energía de un estado de transición, la reactividad de una enzima, etc. En estas situaciones no existe suficiente información experimental que permite determinar la estructura del sistema. La teoría es un complemento necesario para experimentar.

Los ordenadores y los modelos teóricos se han convertido en herramientas esenciales para el químico experimental. Como resalta la Real Academia de Ciencias de Suecia, "hoy en día el ordenador es tan importante para un químico como un tubo de ensayo". Estos modelos informáticos se han convertido en uno de los avances más cruciales para la química del siglo XXI.

Los trabajos galardonados con el Premio Nobel de Química de este año se centran en el desarrollo de métodos que utilizan tanto la mecánica molecular como la mecánica cuántica. Sin embargo, a pesar del impresionante avance en software y hardware, el estudio de sistemas complejos, con un elevado número de átomos, como es el caso de las enzimas, presenta bastantes dificultades. Para poder llevar a cabo el modelado de las reacciones enzimáticas y otras procesos biomoleculares que implican cambios en la estructura electrónica, tales como formación y ruptura de enlaces covalentes o transferencia de carga, la utilización combinada de

mecánica cuántica y mecánica molecular (QM / MM) se han convertido en el método de elección, siguiendo una idea fue inicialmente formulada por los investigadores premiados este año. El elemento básico de esta idea consiste en la siguiente aproximación: el sistema en estudio se divide en dos partes, la parte reactiva y el entorno. La parte reactiva, asociada a los procesos de formación y ruptura de enlaces químicos, se trata mediante métodos mecánico cuánticos, QM, mientras que para el entorno (disolvente o resto de la proteína), que constituye la parte que consumiría mayores recursos computacionales, se aprovecha la eficiencia computacional de la mecánica clásica. Debido a que las dos regiones en general interaccionan fuertemente, no es posible escribir la energía total de todo el sistema simplemente como la suma de las energías de los subsistemas. Los términos de acoplamiento tienen que ser considerados, y es necesario tomar precauciones en el límite entre los subsistemas, especialmente si la frontera de separación corta a través de enlaces covalentes.

La química computacional nació con los primeros ordenadores, a mediados del siglo XX, aplicando los conceptos de la mecánica cuántica para caracterizar moléculas sencillas. Los cálculos de este tipo requieren mucho tiempo de cálculo y ordenadores potentes, lo que hace que aun hoy su ámbito de aplicación sea generalmente el estudio detallado de moléculas pequeñas (el sustrato de una enzima, un fármaco, etc.). Esta limitación se debe a la elevada precisión de los métodos cuánticos, que consideran todos los átomos presentes en las moléculas, pero que además describen de forma explícita el comportamiento de los electrones.

El primer paso para poder aplicar la química computacional al estudio de procesos biológicos vino a través de una simplificación: describir las moléculas únicamente a nivel atómico, sin tener en cuenta los electrones. Nacía así la mecánica molecular a finales de los años sesenta, en el grupo del fallecido Lifson, en el WeizmannInstitute de Israel, donde AriehWarshel estaba haciendo su tesis doctoral y adonde Michael Levitt llegó como estudiante predoctoral. Dos jovencísimos investigadores que escribieron el primer programa de mecánica molecular al inicio de la década de los setenta, con el que pocos años después realizarían la primera simulación computacional de una proteína. Finalmente podían describirse algunas propiedades de proteínas o ácidos nucleicos, como su movilidad en condiciones fisiológicas, la dinámica molecular.

Sin embargo, quedaba por resolver el problema de los sistemas complejos, como la reactividad o la asociación entre moléculas (reconocimiento molecular) y aquí vino la principal contribución de los galardonados. Cuando AriehWarshel hizo su estancia posdoctoral en la Universidad de Harvard con Martin Karplus a principios de los años 70, utilizaron un nivel de detalle mayor para el centro reactivo, mientras el entorno donde sucede la reacción, típicamente una proteína

catalítica o enzima, era descrito de forma más aproximada. Nacía así la simulación multiescala, o hermanamiento de las diferentes escalas de descripción molecular como pueden ser la química cuántica y la mecánica molecular.

A mitad de los 70, Warshel y Levitt extendieron esta aproximación a sistemas moleculares más grandes, como la acción de un inhibidor de la tripsina pancreática y a la formación del ión carbonio en el sitio activo de la lisozima. (1)

Esta metodología ha sido posteriormente utilizada con éxito para estudiar los procesos complejos no sólo en química orgánica y bioquímica, sino también en catálisis heterogénea, cálculos de valores de pKa, propiedades redox, predicción de propiedades espectroscópicas. Pero lo más importante es que ha abierto una cooperación fructífera entre los químicos experimentales y teóricos, permitiendo solucionar problemas que hace unos años no podrían ser abordados con detalle y han contribuido de forma especialmente importante en muchos campos, entre otros el del diseño de fármacos.

2. MECANICA CUANTICA

La química cuántica aborda la dinámica y distribución de electrones en un sistema molecular, en forma de función de onda molecular,Y. Esta, se relaciona con la energía del sistema mediante la ecuación de Schrödinger, que si consideramos su formulación independiente del tiempo, toma la forma de la siguiente ecuación diferencial:

$$H\psi_{(r)} = E\psi_{(r)} \qquad 1)$$

H es un operador (llamado Hamiltoniano) asociado a la energía cinética y potencial de núcleos y electrones. Esta ecuación es una "ecuación de valores propios" (*eigenvalue*), debido a que el operador *H*, actuando sobre la funciónY, produce un múltiplo de la función, en este caso, multiplicada por el valor de la energía, *E*, correspondiente al estado descrito por la función de onda. La resolución de esta ecuación nos llevará a varias soluciones posibles, correspondientes a estados estacionarios de la molécula, cada uno caracterizado por una determinada función de onda Y con un valor de E asociado a ella. La solución que obtiene el menor valor de energía corresponde al estado basal (*groundstate*). La obtención de soluciones de esta ecuación, salvo para casos muy sencillos, es compleja, y requiere la introducción de una serie de aproximaciones:

- Aproximación de Born-Openheimer: asume que el movimiento de los núcleos se puede desacoplar del movimiento de los electrones, debido a la pequeña masa de estos respecto a los núcleos.
- Descripción de los orbitales atómicos mediante un determinante de

Slater (para cumplir el principio de exclusión de Pauli).

- Aproximación de Roothaan, en la que cada orbital molecular monoelectrónicof se construye de acuerdo con la aproximación LCAO (*Linear Combination of AtomicOrbitals*), como una combinación lineal de N orbitales atómicos (c), también llamados funciones de base:

$$\psi_{(r)} = \phi_1(r_1)\phi_2(r_2).....\phi_n(r_n) \qquad 2)$$

en el que cada orbital molecular monoelectrónicof se expresa, de acuerdo con la aproximación LCAO (*Linear Combination of AtomicOrbitals*), como una combinación lineal de N orbitales atómicos (c), también llamados funciones de base:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^{N} c_{\mu i}\chi_\mu \qquad 3)$$

A su vez, cada función de base se puede expresar de forma análoga como una combinación lineal de una serie de funciones matemáticas de tipo gaussiano. La calidad de la aproximación dependerá del conjunto de funciones utilizado para dichas combinaciones lineales (*basis set*). Actualmente es frecuente utilizar una función de base 6-31G* para calcular propiedades de moléculas orgánicas pequeñas (tipo fármaco). 6-31G* indica que se utilizan seis funciones gaussianas para representar los orbitales atómicos internos, mientras que los externos -capa de valencia- se representan mediante tres funciones para la parte "contraída" y una para la parte "difusa", más una función de polarización para átomos pesados (indicada mediante el asterisco *), que representa el efecto de los orbitales tipo *d*. Existen, no obstante, otras funciones de base menos costosas, que se pueden utilizar para la búsqueda de la geometría óptima, como son las bases STO-3G ó 3-21G.

Debido a que cada electrón se halla bajo el campo eléctrico del resto, cada orbital molecular monoelectrónico dependerá de los demás, con lo que la búsqueda del mejor conjunto de coeficientes se hará de forma iterativa. Esta aproximación recibe el nombre de campo autocoherente (*Self-Consistent Field, SCF*). Dentro de los métodos que utilizan cálculos SCF cabe destacar el método Hartree-Fock (HF), que es el de mayor difusión en el diseño de fármacos. Las ecuaciones de Hartree-Fock buscan la función de onda que produzca el mínimo de energía de un sistema molecular, es decir, imponen la condición de que la energía sea cero (¶E=0) sujeta a su vez a la condición de que los orbitales moleculares sean ortonormales (teorema variacional).

Todos estos métodos, debido a que consideran toda la estructura atómica y no introducen parámetros empíricos en la resolución de la ecuación de

Schrödinger, se denominan métodos *ab initio*. En cuanto a los programas con los que se realizan cálculos químico-cuánticos *ab initio*, entre los más comunes están el paquete GAUSSIAN(2) y GAMESS.(3)

Cuando se introducen parámetros ajustados empíricamente que sustituyen alguna de las integrales de los métodos ab initio, pero aún consideramos la estructura electrónica de la molécula, nos hallamos ante los denominados métodos semiempíricos. Estos métodos omiten los cálculos relativos a los electrones de capa interna (*core*) que se tratan como si formasen parte del núcleo, y se centran únicamente en los electrones de capas de valencia, partiendo de la base de que son estos electrones los responsables de la reactividad y de la mayoría de las propiedades moleculares. No obstante, no existen parámetros válidos para todos los sistemas moleculares, lo cual hace aconsejar prudencia en su utilización. Se han desarrollado multitud de métodos semiempíricos, entre los cuales destacan, por lo común de su utilización en el campo del diseño de fármacos, MNDO(4) o AM1.(5)

De la función de onda se pueden derivar multitud de descriptores moleculares, que pueden ser utilizados en la caracterización de moléculas. Entre estos cabe citar:

- Potencial electrostático molecular (MEP): Esta propiedad es de gran interés en el modelado molecular ya que describe las características electrónicas de las moléculas y se puede utilizar en el análisis y predicción de interacciones moleculares.

- Entalpía de formación (DHf): derivada del cálculo de la energía, da cuenta de la estabilidad de un compuesto. Puede ser calculada en distintos entornos (agua, solventes orgánicos, etc...) en los métodos que consideran medios distintos del vacío.

- Momento dipolar (m): es una magnitud vectorial relacionada con la asimetría de la distribución de carga de un compuesto; da una idea de su polaridad.

- Energía de los orbitales moleculares: tienen especial interés la del orbital ocupado de mayor energía (HOMO, *highestoccupied molecular orbital*) y la del desocupado de menor energía (LUMO, *lowestunnoccupied molecular orbital*). Ambos están implicados en interacciones intermoleculares de transferencia de carga.

- Cargas puntuales: Los electrones de valencia de las moléculas no están fijados a un átomo en particular y se pueden mover alrededor de la molécula como un conjunto. Debido a que los electrones suelen estar más tiempo en las proximidades de los átomos electronegativos que en la de los electropositivos, esta distribución electrónica no es uniforme y tiene como resultado que unas regiones

de las moléculas posean una densidad de carga positiva y otras partes una densidad de carga negativa. La carga puntual es una estimación del promedio de carga de cada átomo que se deriva del número de electrones presentes a su alrededor.

Haciendo referencia a los avances en el área de la química computacional, Martin Karplus, en un artículo autobiográfico publicado en 2006(6), menciona:

"Ahora, pueden ser calculadas apretando un botón de un programa, como el ampliamente utilizado Gaussian. El alto nivel de cálculos ab initio que se utilizan hoy en día de forma rutinaria posee el inconveniente de que aunque los resultados sean exactos, la visión que se tenía con las aproximaciones anteriores simplificadas, se pierden con frecuencia en la complejidad del cálculo"

2.1. Aplicaciones de la química cuántica:

2.1.1. Reacción de fotoisomerización del retinal para la excitación visual.

Un ejemplo de utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos, fue el realizado por Barry Honig, bajo la dirección de Martin Karplus, el cual consideró que era un sistema biológico en el que los efectos cuánticos eran suficientemente interesantes y que podría ser tratado con los medios disponibles en ese momento. Además, contaba en su grupo de investigación con la persona preparada para realizar ese tipo de cálculos.

Mediante este estudio, fueron capaces de predecir que la conformación más estable era 12-s-cis. Este trabajo, a pesar de ser un trabajo teórico y no sin ciertas dificultades, fue finalmente publicado en la revista Nature(7).

Unos meses más tarde, se resolvió la estructura de rayos-x, prácticamente coincidente con los estudios teóricos(8).

2.1.2. Desarrollo de anticuerpos catalíticos

Existen miles de ejemplos de la utilización de estos métodos, sin embargo he seleccionado una estrategia que supuso, en los años 90, una nueva aproximación en la búsqueda de anticuerpos catalíticos para catalizar diferentes reacciones orgánicas.

Los anticuerpos catalíticos se presentan como una herramienta con un futuro prometedor en campos como la síntesis química, la farmacología e incluso la medicina, gracias, entre otras cosas al gran progreso de las técnicas de generación de anticuerpos monoclonales. En ellos se combina la excepcional capacidad del sistema inmune para generar grandes colecciones de moléculas con gran afinidad por las moléculas que las inducen -antígenos-, con el poder catalítico de las enzimas. La principal complejidad que presenta el desarrollo de esta técnica está en el diseño de haptenos -pequeñas moléculas inmunogénicas- que han de ser análogos de los estados de transición de las reacciones químicas que deseamos

catalizar. Los estudios en el campo de la elucidación de los complejos enzima-sustrato en los estados de transición aportan, sin embargo, datos esenciales para el desarrollo de este campo de investigación(9).

Una de las reacciones que ofrece un especial atractivo para el desarrollo de esta estrategia es la reacción de Diels-Alder. Los anticuerpos, con sus sitios de unión específicos y quirales, deberían de ser catalizadores ideales para controlar por completo esta reacción de cicloadición.

La reacción de Diels-Alder seleccionada para este trabajo, es aquella en la que se hace reaccionar el *trans*-1-*N*-acilamino-1,3-butadieno con la *N,N*-dimetilacrilamida. Los productos de esta reacción pertenecen a una familia de compuestos útiles en la síntesis de alcaloides.

En ausencia de catalizador se obtiene a 110º en tolueno una mezcla endo/exo 66:34. En presencia de catalizador se obtiene una mezcla 85:15. Ambas reacciones son totalmente regioselectivas obteniéndose únicamente los regioisómerosorto.

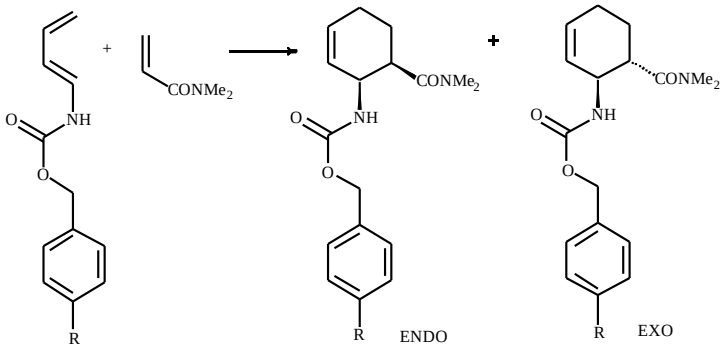


Figura 1.- Reacción Diels-Alder seleccionada.

La idea era obtener dos "diles-alderasas" capaces de catalizar la reacción para obtener tanto el producto de cicloadición favorecido endo o, lo que era más complicado el cicloaducto desfavorecido exo. Para ello era necesario diseñar un hapteno, análogo estable del estado de transición, que permitiese la obtención de los dos anticuerpos (Figura 2).

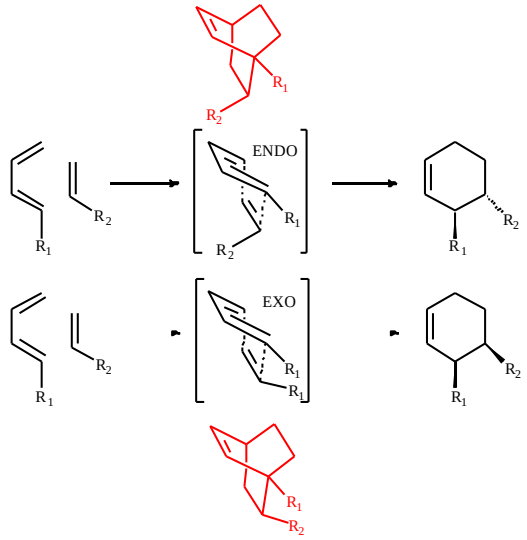
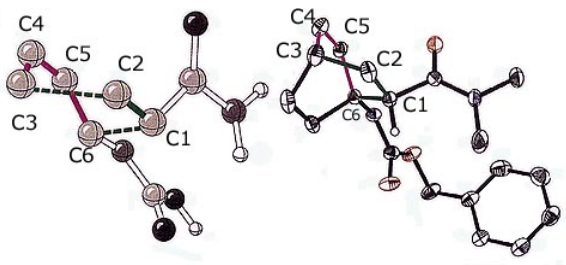


Figura 2.-Haptenos diseñados para obtener el producto "endo" y "exo" de la reacción Diels-Alder por similitud con el estado de transición.

Con el fin de llevar a cabo el diseño racional de los haptenos, se localizaron los correspondientes estados de transición, para poder obtener datos estereoelectrónicos de la reacción que se deseaba catalizar. Se utilizó el método *ab initio* y el nivel de cálculo RHF/3-21G para localizar los estados de transición en un sistema modelo constituido por acrilamida y el ácido *N*-(1-butadienil) carbámico. Previamente se realizó un estudio conformacional de los reactivos. Se localizaron los cuatro estados de transición correspondientes a los cuatro estereo (endo/exo)- y regioisómeros (orto/meta) (orto endo, orto exo, meta endo y meta exo) y como era de esperar predicen una mayor estabilidad para los estados de transición endo.

A partir de estos estudios se diseñó el correspondiente hapteno teniendo en cuenta que este debería mimetizar algunas de las características importantes del estado de transición. El anticuerpo generado mediante la administración del hapteno diseñado ha de ser capaz de reconocer y estabilizar sólo uno de los cuatro posibles estados de transición. Los haptenos fueron sintetizados y cristalizados y su estructura cristalina fue comparada con la estructura calculada del estado de transición correspondiente, observándose una similitud estructural apreciable. (Figura 3)

La utilización de estos haptenos así diseñados permitió el desarrollo de los anticuerpos capaces de catalizar esta reacción y obtener de forma selectiva no solo el producto de adición favorecida, producto endo, sino también el producto desfavorecida, producto exo(10).



C3-C4-C5-C6: 1.1º C3-C4-C5-C6: 0.7º

C2-C3: 2.35 Å C2-C3: 1.55 Å

C6-C1: 2.05 Å C6-C1: 1.55 Å

Figura 3.- Comparación entre las geometrías del estado de transición de la orto-endo (izquierda) con la estructura cristalina del hapteno diseñado para mimetizarlo (derecha).

Años más tarde el estudio de Xu(11) de 1999 constituyó un nuevo avance en la ampliación del campo de utilidad de los anticuerpos catalíticos. Utilizando técnicas de rayos X y computacionales avanzadas pudieron estudiar la evolución de la complementariedad –ya que la unión antígeno-anticuerpo no es algo estático, sino dinámico- entre las moléculas, y extraer conclusiones acerca de cómo debe ser el hapteno que genere el anticuerpo que catalice, por ejemplo, cicloadiciones tipo Diels-Alder. (Figura 4, código pdb=1c1e)

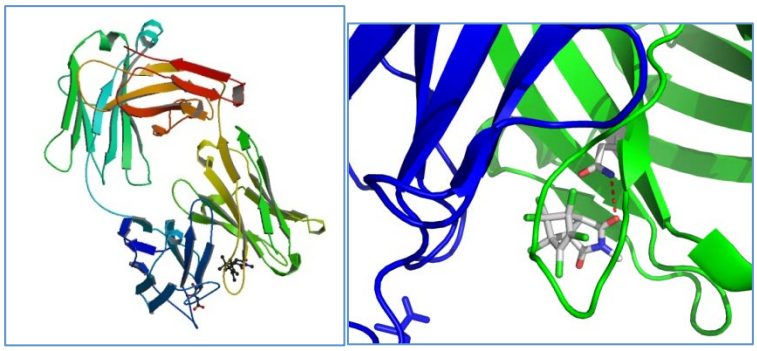


Figura4.- Estructura cristalina de la Diels-Alderasa en complejo con un hapteno.

Quizá aquello que se afirmaba en 1996 sobre el diseño de haptenos "es todavía más un arte que una ciencia"(12) se ha quedado ya obsoleto, derivando hacia lo que puede ser el empujón definitivo al avance decidido en este campo del conocimiento.

Además, estos estudios iniciales, sobre los anticuerpos catalíticos han derivado hacia un campo apasionante como son las theozymes (*theoreticalenzymes*), permitiendo diseñar de forma teórica la enzima necesaria para catalizar un determinado proceso(13).

3. MECÁNICA MOLECULAR

Las técnicas de mecánica molecular se basan en un modelo simplificado de las moléculas, entendidas como un sistema clásico de masas (los núcleos atómicos)

conectadas por unos resortes (los enlaces formados por los electrones) que verifican la ley de elasticidad de Hooke. Frecuentemente esta simplificación es a menudo comparada como un sistema de bolas y muelles. Esta analogía responde a las siguientes características: cada bola encierra las propiedades de un átomo, propiedades que dependen en realidad de su distribución electrónica. En la mecánica molecular, en lugar de calcular la función de onda en cada sistema, se estima el valor de las propiedades derivadas de esta a través de una serie de parámetros. La primera consideración es definir un conjunto de tipos de átomos, cada uno de los cuales viene determinado no sólo por el elemento a que se refiere (oxígeno, carbono...) sino por los diferentes estados en que este se puede encontrar en un sistema molecular (carbono con hibridación sp^2, carbono con hibridación sp^3...).

Una vez definido el conjunto de átomos, el efecto de la distribución electrónica se puede aproximar a través de la inclusión de una serie de cargas parciales (*partialcharges*) para cada átomo. Estas cargas se habrán de definir para cada molécula con la que se trabaja, puesto que dependen no solo del tipo de átomo sino del entorno molecular. El método de cálculo de carga parcial varía desde aproximaciones topológicas, como las cargas de Gasteiger-Marsili,(14) a métodos teóricamente más exactos, como el *restrainedelectrostaticpotentialfitting* (RESP)(15) empleado para definir las cargas parciales mediante un ajuste que pretende reproducir lo mejor posible la distribución del potencial electrostático molecular, calculada ab initio con una base 6-31G*. Existen otros métodos intermedios, como por ejemplo los basados en el análisis de Mulliken de la distribución electrónica sobre el hamiltoniano AM1. Es común el empleo de los métodos de cálculo de cargas rápidos (Gasteiger, AM1) en los estudios de docking, mientras que procedimientos más elaborados como el RESP se reservan para estudios de dinámica molecular o para el cálculo de energía libre de unión. Las cargas parciales son necesarias para calcular interacciones de tipo electrostático que se dan entre dos átomos *i* y *j* que no están enlazados, a través del término de interacción culómbica:

$$V_{el(i,j)} = -\frac{1}{4\pi\varepsilon}\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \qquad 4)$$

siendo *q* la carga parcial de cada átomo, *r* la distancia que los separa y e la constante dieléctrica del medio, que representa la oposición del entorno (agua y proteína) a la interacción entre ambas cargas. El valor de esta constante es de e = 80 para el agua, mientras que los valores típicos de proteínas son mucho menores (entre 2 y 5). Sin embargo, pueden existir microentornos proteicos más polares donde el valor de *e* se incremente. Se puede afirmar que el uso de esta constante pretende incorporar todos aquellos efectos que no han sido explícitamente

considerados en el modelo (como el solvente acuoso o la membrana celular), tomando valor unidad cuando todos estos efectos se consideran de manera explícita. La optimización de su valor en cálculos referidos a proteínas es motivo de continuas revisiones. Una aproximación generalizada es asignar valores de e dependientes de la distancia r_{ij}.

Es necesario tener en cuenta los términos de repulsión y atracción de la función de van der Waals, la cual evalúa la interacción no electrostática entre pares de átomos no enlazados. Estos términos vienen representados por las constantes *A* y *B*.

$$V_{vdW(i,j)} = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} \qquad 5)$$

Estos valores se obtienen empíricamente para cada tipo de átomo interaccionando consigo mismo (A_{ij} y B_{ij}). Los valores para cada par *ij* se obtienen mediante la media geométrica $A_{ij} = \sqrt{A_{ij} \cdot A_{jj}}$ (y de manera análoga para B). La formulación de la ecuación 5 recibe el nombre de potencial de Lennard-Jones aunque existen otras formas alternativas de formular la función de van der Waals, basándose en variaciones en el valor de los exponentes de los términos r_{ij}.

Los términos electrostático (V_{el}) y de van der Waals (V_{vdW}) se calculan para cada par de átomos no enlazados que se encuentren a una distancia r menor que una distancia de corte $r_{cut\text{-}off}$. Esta aproximación se utiliza para ahorrar tiempo de cálculo, ya que si no, habría que evaluar N^2 interacciones (siendo N el número de átomos del sistema). Es posible evaluar la interacción electrostática cuando $r > r_{cut\text{-}off}$ en un tiempo razonable de tiempo, como por ejemplo mediante el método *local reactionfield*.(16)

Se asume que los enlaces entre átomos son flexibles alrededor de unas distancias de equilibrio (r_0), de forma que pueden vibrar como lo hace un muelle. Esta vibración se representa mediante un potencial harmónico cuadrático del tipo:

$$V_{enlace} = k_r (r - r_o)^2 \qquad 6)$$

Este potencial cumple estrictamente la ley de Hooke. k_r es una constante de fuerza definida para cada par de tipos de átomo (*ij*) que puedan estar enlazados, y r_0 la distancia de equilibrio del enlace *ij*.

De forma análoga, el ángulo q que forma cada par de enlaces contiguo también puede variar alrededor de un valor de equilibrio q_0, siendo la constante de fuerza k_q:

$$V_{ángulo} = k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

7)

Los ángulos torsionales f (que definen la rotación sobre los enlaces) varían de forma distinta, ya que dicha rotación ha de pasar una barrera periódica. Por tanto, su variación se modela a través de una función periódica del tipo:

$$V_{torsión} = \frac{1}{2} k_n (1 + \cos(n\phi - \gamma)) \qquad 8)$$

siendo k_n la barrera de rotación, n la periodicidad (número de veces que aparece la barrera en un giro completo) y g la fase (la localización de la primera barrera).

Adicionalmente se pueden modelar los enlaces de hidrógeno de forma específica, a través de un potencial análogo al de Lennard-Jones con modificaciones de los parámetros. Esta consideración explícita de los enlaces de hidrógeno aparecía en la primera versión del campo de fuerzas del programa AMBER,(17), por ejemplo. En otros programas, su efecto ya está incluido indirectamente en los términos electrostático y de van der Waals. También hay que considerar los llamados ángulos torsionales impropios, que se refieren a la planaridad de un sistema de cuatro átomos en los cuales uno de ellos, en posición central, está enlazado a los otros tres (por ejemplo en anillos tipo naftaleno). Estos pueden ser modelados de forma análoga a los ángulos torsionales a través de potenciales periódicos, como sucede en CHARMM,(18) GROMOS(19) y AMBER(17) o bien a través de potenciales harmónicos. Por último, existe la posibilidad de simplificar la representación molecular mediante los modelos *unitedatom*, que no consideran explícitamente los hidrógenos no polares, de forma que sus características (masa, carga) se añaden al átomo al que estén unidos(20). Esta aproximación se usa en los programas GROMOS, GRID y AutoDock.

El sumatorio de los términos formulados en las ecuaciones anteriores da lugar a la expresión de la energía potencial de un sistema molecular:

$$V_{pot} = \sum_{enlace} V_{enlace} + \sum_{ángulos} V_{angulo} + \sum_{torsionales} V_{torsion} + \sum_{r<r_{cut-off}} (V_{el} + V_{vdW}) \qquad 9)$$

El modo de formular cada uno de los términos comentados anteriormente, el método de obtención de cargas parciales y parámetros Lennard-Jones, el número de tipos de átomos (*atomtypes*) y el conjunto de parámetros (constantes *k* y valores de equilibrio en cada ecuación) constituye lo que se denomina un campo de fuerzas de mecánica molecular (*force-field*).

Existen numerosos *campos de fuerza* como MM2, Amber, POLS, CVFF, GROMOS o CHARMM, entre otros. Sin embargo, mencionaremos de forma especial CHARMM porque la contribución de los galardonados al desarrollo de este

programa ha sido fundamental. Los trabajos conducentes al desarrollo de este campo de fuerzas, están basados en uno inicialmente desarrollado por Lifson y AriehWarhsel, denominado ConsistentForceFielc (CFF), que incluía interacciones no enlazantes.(21) También fueron fundamentales los trabajos pioneros de Michael Levitt en el cálculo de energías de proteínas, (22) así como los trabajos de Harold Scheraga.(23)

Inicialmente se le dio el nombre de **HARMM** (**HAR**vard**M**acromolecular **M**echanics), sin embargo, debido a que su significado en inglés no resultaba muy atractivo, se introdujo el término Chemistry, resultando con el nombre con el que actualmente se conoce **CHARMM** (**C**hemistry**HAR**vard**M**acromolecular **M**echanics)(18).

3.1. Dinámica Molecular

En la dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD) se generan las conformaciones sucesivas del sistema integrando las leyes de Newton del movimiento. El resultado es una trayectoria en la que las posiciones y las velocidades de los átomos del sistema varían a lo largo del tiempo de simulación. La trayectoria del sistema se obtiene resolviendo la segunda derivada de la Segunda Ley de Newton. $F=ma$:

$$\frac{d^2xi}{dt^2} = \frac{F_{xi}}{m_i} \tag{10}$$

Esta describe el movimiento de un átomo de masa m_i a lo largo de las coordenadas (x_i) con una fuerza determinada (F_i) que viene dada por el campo de fuerzas, y un tiempo t. En el punto inicial de la dinámica, la energía total del sistema es la suma de las energías cinética y potencial para las coordenadas (x_0) y velocidades (v_0) iniciales:

$$E_{tot} = E_{pot}(x_0) + E_k(v_0) \tag{11}$$

Este es un método determinista ya que el resultado final es dependiente de la posición inicial de los átomos del sistema (de ahí la recomendación de partir de varias conformaciones iniciales para comprobar que los resultados convergen, así como la necesidad de realizar una minimización previa para evitar que haya gradientes de energía muy grandes que distorsionen el comportamiento del sistema).

La evolución del sistema a lo largo del tiempo se obtendrá mediante integración numérica. Esta integración se realizará en fracciones de tiempo

separadas por el valor de dt. La fuerza total de cada partícula en el tiempo *t* (que se asume que es constante) se calcula como la suma vectorial de las interacciones con los demás átomos y se determina mediante la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas:

$$F = {}^{-\partial E_{pot}}\!/_{\partial x} \qquad 10)$$

A partir de las fuerzas se puede determinar la aceleración de los átomos de modo que, conociendo sus posiciones y velocidades a tiempo *t*, podemos calcular sus posiciones y velocidades en la siguiente fracción de tiempo, *t*+*dt*.

Este proceso se repite sucesivamente para generar la trayectoria completa para todos los átomos del sistema.

Los algoritmos empleados en MD para generar las trayectorias asumen que las propiedades de estas se pueden aproximar mediante series de Taylor:

$$\begin{aligned} x_i(t+\partial t) &= x_i(t) + \partial t v_i(t) + {}^1\!/_2\, \partial t^2 a_i(t) + \ldots \\ v_i(t+\partial t) &= v_i(t) + \partial t a_i(t) + {}^1\!/_2\, \partial t^2 b_i(t) + \ldots \\ a_i(t+\partial t) &= a_i(t) + \partial t b_i(t) + {}^1\!/_2\, \partial t^2 c_i(t) + \ldots \end{aligned} \qquad 11)$$

donde *v* es la velocidad (primera derivada de las posiciones con respecto al tiempo), *a* es la aceleración (segunda derivada), *c* es la tercera derivada, etc.

Estas ecuaciones se integran mediante el algoritmo de Verlet(24), que usa las posiciones y aceleraciones a tiempo *t* y las posiciones en la etapa previa, *x*(*t*-*dt*), para calcular las nuevas posiciones a *t*+d*t*, *x*(*t*+d).

El tiempo de integración dt elegido es de vital importancia ya que si es demasiado pequeño la trayectoria apenas cubrirá una parte de todo el espacio conformacional, mientras que si es demasiado grande puede provocar inestabilidades debidas a solapamientos energéticos entre átomos. Los movimientos de mayor frecuencia son aquellos que corresponden a la vibración de los enlaces con hidrógenos. Se sabe que estas vibraciones ocurren en la escala del femtosegundo (fs) y su inclusión en el cálculo no haría más que añadir una carga computacional extra innecesaria ya que no influyen en el movimiento global del

sistema. Es por ello que se suele fijar la longitud de los enlaces covalentes a sus valores de equilibrio mediante el algoritmo SHAKE(25). De esta forma se aumenta el tiempo de integración a 2 fs y se acelera la velocidad del cálculo.

La dinámica molecular permite, entre otras aplicaciones dentro del campo de la química:

- Predecir estructuras y propiedades de proteínas que se diferencian sólo en unos pocos aminoácidos.
- Refinar un modelo resuelto por homología.
- Estudiar la estabilidad de una proteína frente a variaciones de pH, temperatura o disolvente.
- Estudiar cambios conformacionales asociados con las propiedades catalíticas de una enzima (estabilización de un estado de transición).
- Estudiar las aperturas y cierres de sitios activos de biomoléculas.
- Estudiar la estabilidad del modo de unión de un ligando a una proteína.
- Estudiar selectividad y afinidad de un ligando por una proteína.

3.2. La primera dinámica molecular de una biomolécula

Si las aplicaciones de la química cuántica son numerosísimas, el uso de la mecánica molecular es quizás aún mayor en todos los campos de la química.

Una vez más los galardonados fueron pioneros en la utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos. Así, seleccionaron la BPTI (Inhibidor de la tripsina pancrática bovina) para llevar a cabo la que se considera la primera simulación de dinámica molecular de una biomolécula.

Seleccionaron esta proteína por ser de pequeño tamaño, poseer una estabilidad relativa bastante razonable y porque se disponía en ese momento de una estructura cristalina con buena resolución (1.5 A), disponible(26).

Esta dinámica duró tan sólo 9.2 ps, sin embargo fue fundamental para reemplazar la visión generalizada de las proteínas como estructuras rígidas(27).

4. QM/MM

Para el modelado de reacciones enzimáticas y otros procesos biomoleculares que involucran cambios en la estructura electrónica, como ruptura y formación de enlaces, transferencia de carga o excitación electrónica, la metodología mixta QM/MM se ha convertido en el método de elección.

El trabajo pionero en esta área se debe a Warshel y Levitt.(1) En este trabajo, los investigadores presentaban por primera vez la combinación de ambos métodos para describir la formación de un intermedio de tipo ión carbonio en el sitio activo de la lisozima.

Esta técnica permite combinar potenciales de la mecánica cuántica (QM) y de la mecánica molecular (MM) en un potencial híbrido QM/MM.

Permite combinar la simplicidad y velocidad del tratamiento MM con el potencial de la QM que permite el estudio de la formación y ruptura de enlaces, así como la inclusión de la polarización electrónica debida al medio. Este tipo de aproximación nos va a permitir el estudio de reacciones químicas en el seno de grandes sistemas ya que las regiones del sistema implicados en la reacción se analizan mediante una función QM mientras que el potencial de los demás átomos del sistema se examina por cálculos clásicos de MM en los que las interacciones atómicas están regidas por el campo de fuerzas.

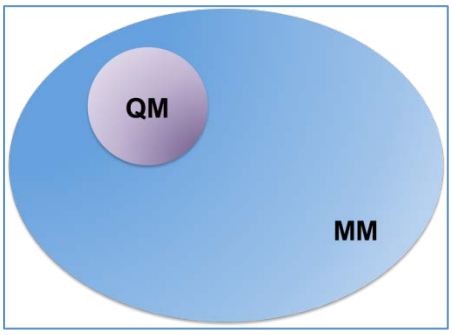


Figura 5. Representación de la división de un sistema molecular en zona QM y zona MM.

La energía total (Etot) para este tipo de sistemas se puede escribir de la siguiente forma:

$$E_{tot} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM\,/\,MM}$$

donde E_{QM} y E_{MM} corresponden a la energía de aquellas partes del sistema tratadas exclusivamente con mecánica cuántica y mecánica molecular, respectivamente. Mientras que $E_{QM/MM}$ es la energía de interacción entre las partes mecánicocuánticas y mecánico-moleculares.

Los átomos de la región QM se representan como electrones y núcleos. El Hamiltoniano asociado a esta región, en la aproximación de Born-Oppenheimer.

$$H_{QM} = -\frac{1}{2}\sum_{i}\nabla_i^2 + \sum_{ij}\frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i\alpha}\frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_{\alpha\beta}\frac{Z_\alpha Z_\beta}{R_{\alpha\beta}}$$

donde *i* y *j* representan las coordenadas electrónicas, α y β las coordenadas nucleares, *r* la distancia electrón-electrón o electrón-núcleo, *R* las distancia núcleo-núcleo, ∇ es el operador de energía cinética electrónica y Z es la carga nuclear.

La zona MM contiene el resto de los átomos del sistema. Estos se describen clásicamente, y sus interacciones se determinan mediante funciones de energía potencial empíricas, de modo que dichos átomos no pueden estar implicados en procesos de formación o ruptura de enlaces, ni de transferencia de carga. La energía de la región MM depende inicialmente de las posiciones de los átomos o centros tratados mediante mecánica molecular, si ignoramos la polarización de este subsistema:

$E_{MM}=E_{enlace} + E_{no\ enlace}$

$E_{enlace}= E_{enlaces} + E_{ángulos} + E_{diedros}$

$E_{no\ enlace}= E_{electrostática} + E_{van\ del\ Waals}$

Por último, el término $E_{QM/MM}$ describe cómo interaccionan los átomos QM con los centros MM. El Hamiltoniano, en unidades atómicas, viene dado por la siguiente ecuación

$$H_{QM/MM} = -\sum_{iM} \frac{q_M}{r_{iM}} + \sum_{\alpha M} \frac{Z_\alpha q_M}{R_{\alpha M}} + \sum \left\{ \frac{A_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{B_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{6}} \right\}$$

donde los subíndices *i,j* hacen referencia a los electrones de los átomos QM, los subíndices α a los núcleos de los átomos QM y los subíndices M a los átomos MM. El primer término de la ecuación representa las interacciones electrostáticas entre los átomos MM y los electrones de los átomos QM. El segundo término representa las interacciones electrostáticas entre los átomos MM y los núcleos de los átomos QM, y el tercer término describe interacciones de van der Waals entre centros QM y MM. Los dos últimos términos de esta ecuación no incluyen coordenadas electrónicas, de modo que pueden ser calculados y sumados directamente a la energía total. Sin embargo, el primer término sí que incluye coordenadas electrónicas por lo que debe tratarse en el procedimiento autoconsistente.

Se han implementado distintos métodos con el fin de estudiar un sistema mediante QM/MM. Estos difieren entre sí (i) por el nivel de teoría utilizado para la mecánica cuántica (semiempírico, *ab initio*, enlace de valencia o funcional de densidad), (ii) por el modelo de mecánica molecular empleado o (iii) por el modo de representar el disolvente (disolvente explícito o modelo simplificado).

Un punto importante, y que también constituye una diferencia entre métodos QM/MM, es el modo de tratar la unión entre las dos regiones. En general,

es preferible cortar enlaces no polares (como enlaces sencillos C–C) que cortar enlaces insaturados o polares.

La partición del sistema en subsistemas QM y MM resulta especialmente problemática cuando la división tiene lugar, necesariamente, a través de la ruptura de un enlace covalente entre ambos subsistemas (Figura 6). En estos casos hay que recurrir a algún tipo de aproximación que permita satisfacer las valencias de los átomos cuánticos que definen el enlace entre la región cuántica y la región clásica por donde se producirá la división.

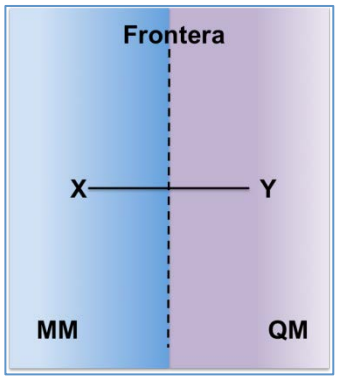


Figura 6. Representación esquemática de la división de un sistema molecular en subsistemas en los métodos QM/MM cuando la frontera corta necesariamente un enlace covalente.

Actualmente existen varias aproximaciones para resolver este problema. En una primera aproximación, se establece un orbital híbrido sp^2 que contiene un electrón a lo largo de la región QM/MM(1).

La opción más popular es, probablemente, el uso de átomos de unión "link atoms": en este métodos se saturan las valencias de los átomos QM pertenecientes al enlace fluctuante con un átomo QM más, normalmente hidrógeno, convenientemente parametrizado, que asegura la conservación de la valencia. Este átomo se describe a nivel QM y es invisible para los átomos MM, porque no se tienen en cuenta las interacciones entre el átomo de unión y los átomos del subsistema clásico(28).

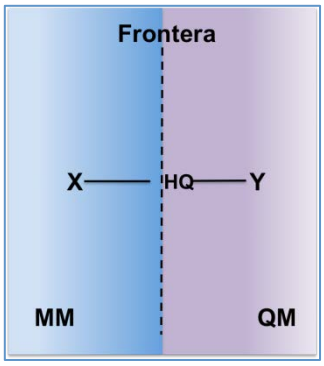


Figura 7.- Representacion esquemática de la aproximación del "link atom" para el tratamiento de los átomos frontera en los métodos QM/MM.

Otro método es el denominado LSCF (Local Self consisten Field), basado en el formalismo del campo local auto-consistente, donde los enlaces QM/MM frontera son descritos mediantes orbitales de enlace localizados. Estos orbitales, llamados orbitales congelados, son excluidos del cálculo SCF y se encuentran definidos por sus coeficientes de hibridación y por su población electrónica. Estos dos parámetros son determinados mediante cálculos QM sobre sistemas pequeños y se supone que estos resultados son transferibles a los sistemas de interés. Este método es más ajustado desde el punto de vista teórico, pero más complejo de implementar.

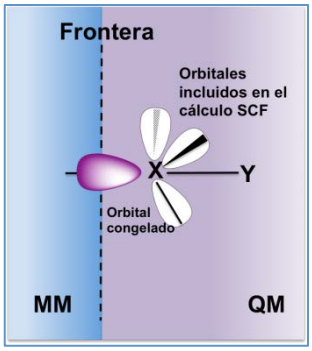


Figura 8.- Representación esquemática de la aproximación LSCF para los átomos frontera en los métodos QM/MM.

El método GHO (GeneralizedHybrid Orbital), hace uso del orbital atómico híbrido, similar al método anterior LSCF, pero en este caso los orbitales pueden dividirse en orbitales auxiliares y orbitales activos. Estos últimos se optimizan junto con el resto de orbitales de la región QM en el cálculo SCF, mientras que la unión entre el átomo frontera y la región MM se define mediante los campos de fuerza MM. A diferencia del método LSCF, el método GHO no necesita de un proceso de parametrización cada vez que se estudia un nuevo sistema.

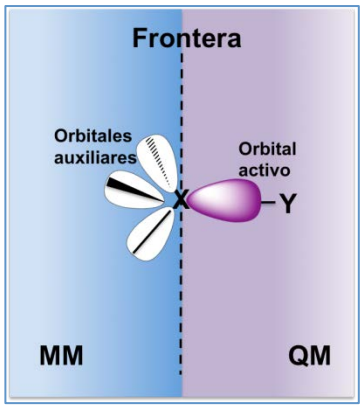


Figura 9.- Representación esquemática de la aproximación GHO para los átomos frontera.

En general se recomienda que, en el caso de ser necesario, la partición entre el sistema QM y MM esté lo más alejada posible de los átomos implicados directamente en la reacción. De esta manera se evita que las aproximaciones utilizadas en las metodologías influyan sobre el resultado final.

Existen numerosos programas que permiten realizar este tipo de cálculos, uno de los más utilizados es el programa **ONIOM** (**O**urown**N**-Layered**I**ntegrated molecular **O**rbital and molecular **M**echanics), que en su nombre hace alusión precisamente a la construcción en capas, como la cebolla. El desarrollo de las primeras versiones de este programa se debe a un Español, Feliu Masera, que la Academia Sueca de Ciencias menciona en su comunicado tras la concesión del Premio Nobel de este año(29).

4.1. La primera simulación QM/MM aplicada a una enzima

Una vez más los galardonados fueron pioneros en la utilización de esta metodología para el estudio de sistemas biológicos. Consideraron que el estudio detallado del mecanismo de una reacción enzimática era un problema importante.

Seleccionaron para este primer estudio la lisozima, una conocida enzima, sobre la que se habían realizado ya numerosos estudios sobre su posible mecanismo de reacción(30) y había diversas estructuras tridimensionales del complejo entre la lisozima y un inhibidor tri-N-acetyl glucosamina (*tri*-NAG) y en el modelo de hexa-NAG, sustrato natural dentro del sitio activo de la enzima(31).

En concreto estudiaron la estabilidad del ion carbonio intermedio formado en la ruptura por la lisozima de un enlace glucosídico. Se encontró que la estabilización electrostática constituía un factor importante que podría justificar el incremento en la velocidad de la reacción que conduce a la formación de este intermedio. Los factores estéricos, tales como la tensión del sustrato al unirse a la lisozima, no parecen contribuir significativamente.

El método descrito en este trabajo considera todo el sistema enzima-sustrato. La energía y la distribución de carga de los átomos directamente involucrados en la reacción se evaluaron mediante química cuántica, mientras que la superficie de energía potencial del resto del sistema, incluyendo el disolvente se evaluó con métodos clásicos. Un detalle importante del método es que el tratamiento del efecto dieléctrico debido tanto a los átomos de la proteína, como al disolvente (agua). Su modelo dieléctrico se basó en un cálculo directo del campo electrostático debido a los dipolos inducidos al polarizar los átomos de la proteína y los dipolos inducidos al orientar las moléculas de agua del entorno(1).

4.2. Otras aplicaciones de QM/MM

Durante mucho tiempo los cálculos QM/MM estuvieron dominados por el estudio de reactividad enzimática. Sin lugar a duda este es uno de los principales campos de aplicación, pero no sólo la formación y ruptura de enlaces requiere QM/MM, sino también otros procesos asociados a reorganización de la estructura electrónica. Por ejemplo las propiedades espectroscópicas.

Refinamiento de estructuras.

Una aplicación especialmente interesante es su combinación con datos experimentales como el refinamiento de la estructura. Una técnica prometedora utilizada por primera vez por Ryde y colaboradores(32) aplica el método QM/MM para refinar los datos estructurales a partir de un solo cristal de difracción de rayos X(33) , RMN(34) o EXAFS(35). La idea básica es usar un QM/MM, en lugar de sólo MM, y el modelo obtenido se refina teniendo en cuenta los datos experimentales. Esta aplicación alivia el problema que surge con la fiabilidad de los datos experimentales alrededor del sitio activo, porque los métodos MM han sido cuidadosamente desarrollados para describir las proteínas, pero son menos fiables para los sustratos o cofactores.

Reactividad

Las reacciones enzimáticas han sido el objetivo principal de los métodos QM/MM.

Dentro de la gran variedad de sistemas estudiados uno de los más representativos es el de la corismatomutasa.

La corismatomutasa es una enzima que cataliza la transposición de Claisen de corismato a prefenato (Figura 10), un paso clave en la vía del ácido siquímico que da lugar a la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, hongos y bacterias. Esta reacción constituye un raro ejemplo de una reacción pericíclica en un sistema biológico y ha sido el objeto de numerosos estudios teóricos.

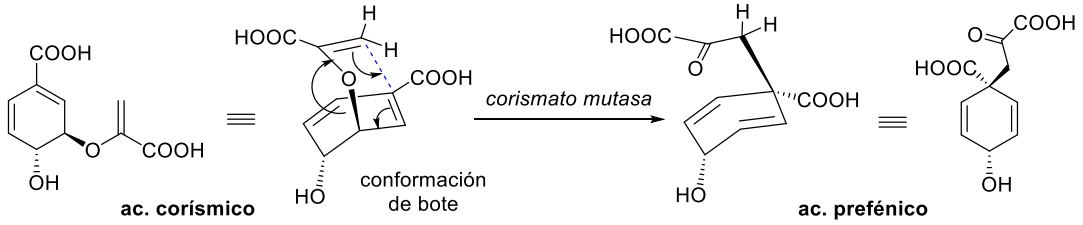


Figura 10.-Reordenamiento de claisen de ácido corísmico a prefénico por medio de la corismatomutasa.

Lyne, Mulholland y Richards publicaron en 1995 el primer estudio QM/MM (AM1/CHARMM) de la corismatomutasa(36). Optimizaron la estructura del reactivo y el perfil de la reacción e identificaron residuos esenciales dentro del sitio activo de la enzima. Observaron que el complejo enzima sustrato está distorsionado comparado con los cálculos previos en fase gaseosa, pareciéndose más al estado de transición, de forma que un residuo de arginina y otro de glutámico estabilizan esta disposición. Llegaron a la conclusión de que la estabilización electrostática del estado de transición es la contribución más importante al proceso de catálisis, en este caso.

Un gran número de estudios posteriores,(37) incluyendo trabajos de Warshel,(38) utilizando diferentes métodos y aproximaciones de cálculo han permitido confirmar esta primera hipótesis.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo he pretendido resumir los hallazgos más importantes que han conducido a la concesión del Premio Nobel de Química en 2013, al haber sido pioneros el desarrollo y utilización de diversos métodos computacionales basados tanto en la mecánica cuántica, como en la mecánica clásica con el fin de desvelar, al nivel de detalle atómico, numerosos misterios acerca de cómo funcionan las biomoléculas y sobre todo por haber sido los primeros en combinar ambos métodos permitiendo un estudio más detallado y preciso de estos procesos químicos complejos.

Recomiendo al lector la lectura detallada del artículo autobiográfico escrito por uno de los galardonados, Martin Karplus (6), titulado "Spinach on the Ceiling: A theoreticalChemist'sReturntoBiology", donde describe las experiencias que le condujeron desde la química y la física de nuevo a su "primer amor", la biología y en el que describe algunas de las contribuciones realizadas durante su trayectoria investigadora. En esta trayectoria sus trabajos se cruzan con frecuencia con los de los otros investigadores galardonados con el Premio Nobel de este año.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Warshel, A., and 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.
2. Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. F., G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, , T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.
3. Schmidt, M. W., Baldridge, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., Jensen, J. H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S., Windus, T. L., Dupuis, M., and Montgomery Jr, J. A. (1993) General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comp. Chem.* 14: 1347-1363.
4. Dewar, M. J. S., and Thiel, W. (1977) Ground states of molecules. 39. MNDO results for molecules containing hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 4907-4917.
5. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., and Stewart, J. J. P. (1985) Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 3902-3909.
6. Karplus, M. (2006) Spinach on the Ceiling: A theoretical Chemist's Return to Biology. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35: 1-47.

7. Honig, B., and Karplus, M. (1971) Implications of torsional potential of retinal isomers for visual excitation. *Nature*. 229: 558-560.
8. Gilardi, R., Karle, I., Karle, J., and Sperling, W. (1971) Crystal structure of visual chromophores, 11-cis and all-trans retinal. *Nature*. 232: 187.
9. González, D., García, M. A., and de Pascual-Teresa, B. (2000) Anticuerpos Catalíticos: Aplicaciones Químicas y Farmacológicas. . *Industria Farmacéutica*. Noviembre-Diciembre: 111-120.
10. Gouverneur, V. E., Houk, K. N., de Pascual-Teresa, B., Beno, B., Janda, K. D., and Lerner, R. A. (1993) Control of the Exo-pathway and Endo-pathway of the Diels-Alder Reaction by Antibody Catalysis. *Science*. 262: 204-208.
11. Xu, J., Deng, Q., Chen, J., Houk, K. N., Bartek, J., Hilvert, D., and Wilson, I. (1999) Evolution of shape complementarity and catalytic efficiency from a primordial antibody template. *Science*. 286: 2345 - 2348.
12. Kirby, A. J. (1996) The potential of catalytic antibodies. *Acta Chem. Scand.* 50: 203-210.
13. Kiss, G., Olcum, N., Moretti, R., Baker, D., and Houk, K. (2013) Computational Enzyme Design. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52: 5700-5725.
14. Gasteiger, J., and Marsili, M. (1978) A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* 19: 3181-3184.
15. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* 97: 10269-10280.
16. Lee, F. S., and Warshel, A. (1992) A local reaction field method for fast evaluation of long-range electrostatic interactions in molecular simulations. *J. Phys. Chem.* 97: 3100-3107.
17. Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comp. Chem.* 26: 1668-1688.
18. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 4: 187-217.
19. Hermans, J., Berendsen, H. J. C., van Gusteren, W. F., and Postma, J. P. M. (1984) A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers*. 23: 1513-1518.
20. Kini, R. M., and Evans, H. J. (1992) Comparison of protein models minimized by the all-atom and united-atom models in the AMBER force field: correlation of RMS deviation with the crystallographic R factor and size. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 10: 265-279.
21. Lifson, S., and Warshel, A. (1969) Consistent force field for calculations of conformations vibrational spectra and enthalpies of cycloalkanes and n-alkane molecules. *J. Chem. Phys.* 49: 116-129.
22. Levitt, M., and Lifson, S. (1969) Refinemento fo Protein Conformations Using a Macromolecular Energy Minimization Procedure. *J. Mol. Biol.* 46: 269-&.
23. Scheraga, H. (1968) Calculations of the conformations of small molecules. *Adv. Phys. Org. Chem.*: 103-184.
24. Schiff, D., and Verlet, L. (1967) Gound State of Liquid Helium-4 and Helium-3. *Physical Review*. 160: 208-&.
25. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a system with Constraints-Molecular-Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23: 327-341.
26. *Buscar*. (1975). *Acta crystallographica B*. 31: 238-250.
27. McCammon, J., Gelin, B., and Karplus, M. (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature*. 267: 585-590.
28. Senn, H. M., and Thiel, W. (2009) QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 1198-1229.
29. Maseras, F., and Morokuma, K. (1995) IMOMM - A new integrated ab initio + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states. . *J. Comp. Chem.* 16: 1170-1179.
30. Levitt, M. (1974) energy Refinement of Hen Egg-White Lysozyme. *J. Mol. Biol.* 82: 393-420.
31. Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. (1967) Crystallographic Studies of Activity of Hen Ege-White Lysozyme. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*. 167: 378-+.

32. Ryde, U., Olsen, L., and Nilsson, K. (2002) Quantum chemical geometry optimizations in proteins using crystallographic raw data. *J. Comp. Chem.* 23: 1058-1070.
33. Rulısek, L., and Ryde, U. (2006) Structure of reduced and oxidized manganese superoxide dismutase: a combined computational and experimental approach. *Journal of Physical Chemistry B*. 110: 11511-11518.
34. Hsiao, Y.-W., Drakenberg, T., and 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. . *J. Biomol. NMR*. 31: 97-114.
35. Hsiao, Y.-W., and Ryde, U. (2006) Interpretation of EXAFS spectra for sitting-atop complexes with the help of computational methods. *Inorganica Chimica Acta*. 359: 1081-1092.
36. Lyne, P. D., Mulholland, A. J., and Richards, W. G. (1995) Insights into Chorismate Mutase Catalysis from Combined QM/MM Simulations of the Enzyme Reaction *J. Am. Chem. Soc.* 117
37. Claeyssens, F., Ranaghan, K. E., Manby, F. R., Harvey, J. N., and Mulholland, A. J. (2005) Multiple high-level QM/MM reaction paths demonstrate transition-state stabilization in chorismate mutase: correlation of barrier height with transition-state stabilization. *Chem. Commun.*: 5068-5070.
38. Strajbl, M., Shurki, A., Kato, M., and Warshel, A. (2003) Apparent NAC effect in chorismate mutase reflects electrostatic transition state stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 10228-10237.