



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

T E S I S D O C T O R A L

INTERACCIONES ELÉCTRICAS EN MACROMOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO

Diego Vallejo

Esta tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizada en el Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (CONICET-UNLP-CIC) bajo la dirección del Dr. J. Raúl Grigera.

El presente trabajo fue financiado parcialmente mediante el sistema de Becas, otorgadas en concurso por los siguientes organismos:

- 1) la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC),
- 2) el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, (CONICET) y cuando faltó el dinero,
- 3) por mí mismo. Esto comprendió tanto la provisión de recursos monetarios para proveer a la manutención de mi familia, así como de tiempo de CPU.

Agradecimientos

No podía ser de otro modo. No existe la creación en soledad: nadie envía si nadie recibe.

Mi esposa, **Gabriela Pennini**, tiene mucho que ver con lo que me falta y con lo que me sobra. Ella debe ser mencionada en primer lugar. Y a veces en último también.

A Marcelo Costabel porque él tuvo un rol clave tanto en la decisión de terminar mi tesis como en el tema y en el proceso que lo hizo posible. Esto es ser Co-Director. Hay injusticias, y hay dolores que no mellan el espíritu ni la alegría de la gente que vale la pena.

A Augusto Melgarejo porque se puede construir una nueva historia, y se puede creer en ella.

A Fernando Vericat por los consejos atinados, las discusiones sobre temas técnicos, y la generosidad.

A Gabriel Fabricius porque la obsesión a pesar de tener su lado malo (para uno mismo sobre todo) también educa y rinde sus frutos.

A Eitel Peltzer por el tiempo de CPU y el apoyo moral.

A Eduardo Howard por las largas conversaciones sin tiempo, las visitas, la navegación, y las ayudas biológicas.

A Manuel Carlevaro porque nadie más que él podría hacer ese aporte sustancioso que pone cálido el ambiente.

A Danilo Renzi por que el trabajo cotidiano nos coloca en otra dimensión.

A Luis Pugnali por su inteligencia y su decisión.

A Susana Kalko quien me contó cómo había que hacer para leer un paper de biología estructural y fue muy generosa con esto de los péptidos... y además canta hermosamente!

A Rosa Vicente que resuelve en forma contundente los problemas.

A Dolores Solís porque de sus manos salieron obras maestras.

A Mónica Seglie y Silvia Fasano las chicas de sistemas del Iflysib, porque ponen garra todos los días, por el mismo precio.

A Víctor Kuz el niño explorador siempre dispuesto!

A Rubén Hernández quien salvó la vida de una persona a fuerza de querer.

A Ernesto Caffarena una persona que hace mejores los lugares donde está y a las personas que están con él.

A Néstor Sánchez Fornillo por el GMX, por Star Trek, y porque no engaña a nadie y lo queremos igual!

A Cristina Donnamaría por su modo de pelearla desde su trinchera.

A Eduardo Tolosa quien me presentó a la Vax y a la Dinámica Molecular.

A Viviana Bolzicco por las charlas y su ejemplo de compromiso.

A Roberto Lindon Colombo el “grupo-dependiente en soledad”

A J. Raúl Grigera Se aprende mucho con observar y escuchar.

A Inés Mogilner por su don de creación y juventud.

A Viviana Zimmerman que generosamente me envió su hermosísimo estilo de tesis.

A Roberto Romero porque siempre supo que fue posible algo mejor.

A Martha y César los que tuvieron siempre que ver con todo esto.

Palabras iniciales

“Educar es el impacto de una vida sobre otra vida”

—Horacio Sosa Carbó

Existe una clase de preguntas que se hacen en esos momentos claves de la historia personal que se llaman “hitos”. Momentos de cambio, críticos, de angustia, que marcan un “antes y un después” y en los cuales convergen, se concentran grandes períodos de tiempo, como si el cambio que se efectúa hubiera demorado para formalizarse hasta que no podía “aguantar más” y sobreviene como una consecuencia lógica, superadora y tranquilizante, el **hito**.

Como un noviazgo que culmina en la unión o la ruptura, esos momentos tienen una resonancia social. Resonancia que físicamente significa vibrar cuando otro me toca con su vibración. Vibrar juntos y vibrar en armonía.

Este es un hito. Hoy se cierra un período, si se quiere de cierta adolescencia, de cierto sufrimiento. Hoy es la ceremonia de iniciación. Hoy el joven americano que fue a cazar el jabalí a la selva, y se raptó una mujer vuelve a la tribu luego de pasar mil vicisitudes, con algo de piel y de alma curtida pero definitivamente convertido en adulto.

Vuelve pues a la universidad que dejó como auxiliar docente y becario, ahora ocupando otro rol. Vuelve y no puede dejar de hacerse esas preguntas:

¿Qué sentido tiene este tipo de tareas?

¿A quién le sirve esto?

¿A quién le afecta, para bien o para mal, algo de lo que aquí se hace?

* * *

Dicen los que **saben**, que la alienación es un concepto fundamental en el formalismo clásico marxista. Este concepto caracteriza, en la organización del trabajo

pos–revolución industrial, al trabajador proletario por oposición al anterior trabajador artesano. Veamos una cita de Van der Huck:

Ahora bien, recordemos que para Marx la alienación del trabajo asalariado es fundamentalmente un extrañamiento del obrero frente al producto de su trabajo y frente al proceso de trabajo, y esto lo mismo para el trabajo manual como para el trabajo intelectual: “*La burguesía ha despojado de su halo a toda ocupación hasta ahora enaltecida y vista con admiración reverente. Ha reconvertido al médico, al abogado, al sacerdote, al poeta, al hombre de ciencia, en sus trabajadores asalariados*”[†] De hecho, el producto del trabajo asalariado se enfrenta al obrero (o al trabajador intelectual) como un ser extraño a él y lo domina: “[...] *La única forma como la gente puede obtener su libertad para hacer descubrimientos, o salvar vidas, o iluminar poéticamente el mundo, es trabajando para el capital... y usando sus habilidades creativas para ayudar al capital a acumular más capital*”[‡]. Aquí más que en ninguna otra parte podríamos decir: “*nadie sabe para quién trabaja*”[§].

Estamos hablando de una suma de divorcios que se acumulan sobre el trabajador: el que lo separa de la retribución justa, el que lo aleja de las decisiones y el que lo vuelve un desconocido para con el producto final de su trabajo.

Un sistema compartimentado es útil para que algunos tomen las decisiones y que nadie sea responsable.

En la óptica cristiana del trabajo también aparece este concepto de alienación asociado a la pérdida de la dignidad del trabajador, citando al anterior Papa de la Iglesia Católica, Karol Wojtyla, en un mensaje del 19 de marzo de 1982, durante su visita al complejo industrial Solvay (Esta empresa auspiciaba en la década de 1920 los congresos científicos donde triunfó la llamada interpretación de Copenhage de la Mecánica Cuántica):

“Al consolidarse luego la organización científica del trabajo y las consiguientes cadenas de montaje, se ha acentuado aún más el estado de **alienación** del hombre y su imposibilidad de participar responsablemente en el trabajo que realiza.”

[†] Marshal Berman, *Melodía desencadenada* en *El malpensante*, No.20, febrero 1 marzo 15 del 2000, pp.38–46

[‡] Marshal Berman, op.cit.

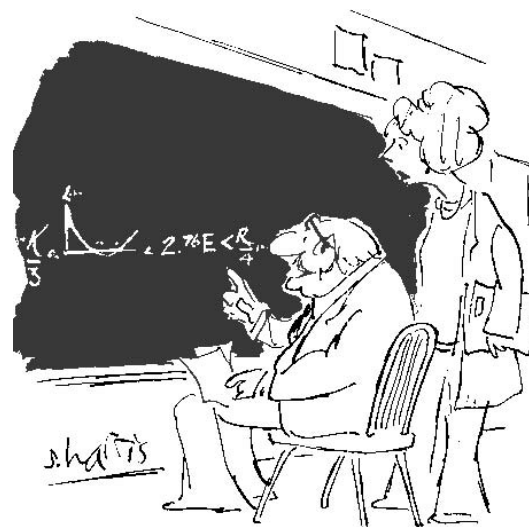
[§] Felipe Van der Huck, *Trabajo y alienación: el cambio en las formas y la permanencia de un sistema* en “Trabajo XXI”, revista virtual que edita el Grupo de Estudios de Sociología del Trabajo de la Universidad del Valle en Cali (Colombia) <http://www.galeon.com/grupogest/articulos/art0008.htm>

Este concepto desarrollado para analizar problemas de trabajadores obreros, o manuales, fue luego aplicado a los llamados “oficinistas” y posteriormente también a los “trabajadores científicos”, no obstante su resistencia a ser considerados como tales.

Escuchemos, desde el ahora lejano año de la ‘imaginación al poder’ de 1968, a Oscar Varsavsky, polifacético científico argentino, fallecido en 1976, en su conferencia “Facultad de Ciencias en un país Sudamericano”, dada en Venezuela:

“Lo que obtuvimos, pues, fue una **alienación**, un extrañamiento de todos esos jóvenes que habíamos preparado con tanto cuidado, luchando durante años para conseguirles fondos, para crear el Consejo de investigaciones Científicas y Técnicas que dio y da becas, subsidios, complementos de sueldo... con un criterio aún más científicista que el nuestro. Toda esa gente, aún quedándose en el país, cortaba sus lazos con él y [...] se ocupaban sólo de temas que interesaban a los Estados Unidos o a Europa. Cuestiones de ciencia aplicada que interesaran al país no se investigaban. Problemas de ciencia pura que pudieran tener alguna ramificación beneficiosa para el país, no se veían. [...]”

¿No es cierto que estos conceptos aplican a diario a las situaciones que uno ve en nuestro país? ¿No vemos comúnmente becarios, investigadores, que a pesar de sus serias dudas, y hasta convicciones acerca de la inutilidad de su labor, persisten (por obvia necesidad de supervivencia) olvidados (a juzgar por las apariencias) del impulso original que los llevó a iniciar la carrera científica? ¿No compartimos la mesa en los congresos científicos, con Profesores y Doctores... que opinan de sobremesa que la función fundamental del Sistema Científico Argentino es mantener vivo al “Sistema Científico Argentino”. (Esto no es privilegio de los científicos, como ejemplo, la Dirección de Vialidad de una provincia argentina llegó a consumir su presupuesto en sueldos y por tanto no podía cumplir tareas específicas de la misma#)



“La belleza de esto consiste en que es sólo de importancia teórica y no hay modo de encontrarle aplicación práctica alguna!”

* * *

#“Duros conceptos del Consejo Empresario sobre Vialidad Provincial. ”. Publicado en el sitio web: http://www.valorlocal.com.ar/despachos.asp?cod_des=360, fecha 27 de julio de 2005.

Cuando una pareja ejecuta el acto sencillo de **colocar** un ladrillo sobre la mezcla húmeda aún de concreto de una pared a medio hacer, piensa con ansiedad, con esperanza y con alegría en la casa terminada: así **colocan** su acción en un lugar trascendente.

Conocí algunas personas capaces de “parar la pelota”, detenerse y reflexionar sobre su trabajo científico. Son personas que pueden colocar su tarea en un marco más amplio de significación, donde cada pieza del accionar cotidiano adquiere su sentido último. Por ello son personas capaces de entusiasmarse una y otra vez con el esfuerzo, a veces difícil, a veces frustrante, no lineal, retorcido y paradójal de la tarea. Se trata del único lugar desde el cual el trabajo tiene sentido. El lugar que le corresponde por derecho propio también al trabajo científico.

Hombres enamorados de su tarea, de su proyecto, y en su “monogamia laboral” (única y gran diferencia con los otros hombres) subordinan a ella el resto de su vida, y son capaces de entusiasmar a los demás.



* * *

“[...] mis cantos son, para los unos, sonidos, para los otros, intención.”

—José Hernández. El gaucho Martín Fierro

Neutra no es nuestra vida, neutra no es nuestra tarea, neutro no es el producto de nuestro trabajo. Hace ya muchos años que se han abandonado las ideas sobre la supuesta neutralidad de la ciencia, de las actividades científicas y de los objetos por ella manipulados.

A cada paso que damos la realidad incómoda nos salta al encuentro. Un objeto tan inocuo como un ácido palmítico colocado en un buscador de internet nos informa que fue parte del proceso de fabricación de napalm durante la Segunda Guerra Mundial.

* * *

Así como un funcionario famosamente dijo en el año 1976 que “el mercado decidiría si debíamos producir acero o caramelos” parece que en el mundo de los científicos, el mercado decidirá si investigamos en tal o cual tema académico.

* * *

Ha llegado el día. Adiós a las torres de marfil. El momento está ya definido. No debemos, ni queremos, ni podemos excusarnos mirando para el costado. Es el momento de comenzar la construcción de un nuevo proyecto. Algo que tiene impacto, que es relevante. Nosotros mismos. Algo que sirva. El impacto de una vida sobre otra vida.

*La Plata, 11 de octubre de 2005,
en el 120 aniversario del Nacimiento de la Dra Alicia Moreau de Justo,
luchadora incansable por los Derechos Humanos.*

Diego Vallejo.

Resumen

Se presenta el estudio de dos sistemas de interés biofísico a nivel molecular mediante técnicas computacionales. Se pone de manifiesto la relevancia de las interacciones eléctricas. Se proponen mecanismos de interacción molecular relevantes para la función biológica de una proteína.

En el capítulo I se describe la motivación por este tipo de estudios en las aplicaciones de diseño de fármacos y se menciona la teoría relacionada.

El capítulo II refiere la técnica de resolución numérica de la Ecuación de Poisson–Boltzmann también llamada Modelo Macroscópico–microscópico Electrostático.

En el III se describe la técnica de simulación por Dinámica Molecular (DM), con un apéndice sobre la técnica de Dinámica Browniana (DB).

En el IV se presentan los resultados de simulación por DB de un sistema de Cloruro de Sodio en Agua.

En el V se presenta el estudio de la interacción de la proteína transportadora de Acil Coenzima A (ACBP) con una membrana biológica. Y por último,

en el VI se presentan los resultados de la simulación por DM de la ACBP en su interacción con un ligando: el Palmitoil unido a una Coenzima A.

Índice general

Agradecimientos	3
Palabras Iniciales	5
Resumen	10
Índice general	11
CAPÍTULO I: Introducción	14
I.1 Interés aplicado: La obtención de nuevos medicamentos	14
I.2 Interés Básico: La comprensión de los mecanismos macromoleculares	17
CAPÍTULO II: Técnica 1: Electroestática de Macromoléculas	19
II.1 Porqué preocuparse por la Electroestática	19
II.2 La Ecuación de Poisson	21
II.3 La ecuación de Poisson-Boltzmann	25
II.4 Solución del Problema Electroestático	27
II.5 Cálculo de las Energías Electroestáticas	28
II.6 Límite de validez de Poisson–Boltzmann	30
CAPÍTULO III: Técnica 2: Dinámica Molecular	31
III.1 Física Clásica aplicada a la Biología	31
III.2 Descripción Breve	32
III.3 El potencial interatómico	33
III.4 Programa de Dinámica Molecular	35
III.5 FASE I: Inicialización	35
III.6 FASE II: Ejecución de Dinámica Molecular	38
III.7 Evaluación de la Energía Potencial	40

III.8 FASE III: Análisis de los resultados	43
III.9 Exposición Sintética de la Técnica de Dinámica Browniana o Langevin (BD)	45
CAPÍTULO IV: Sal y Agua	49
IV.1 Introducción	49
IV.2 Tratamiento Teórico	50
IV.3 Simulaciones	52
IV.4 Código FORTRAN	53
IV.5 Resultados: Campo eléctrico	53
IV.6 Resultados: Fuerza Eléctrica	55
IV.7 Conclusiones	58
CAPÍTULO V: La Proteína Transportadora de Acil Coenzima A y la Bicapa Lipídica	60
V.1 Introducción	60
V.2 ¿Porqué el ACBP?	63
V.3 Procedimiento	64
V.4 Resultados	67
V.5 Rol de los residuos Básicos en la Orientación del complejo ACBP–Bicapa	70
V.6 Rol de los residuos hidrofóbicos en la Interacción ACBP–Bicapa	71
V.7 Discusión	72
CAPÍTULO VI: La Proteína Transportadora de Acil CoA y el Palmitato–CoA	74
VI.1 Introducción	74
VI.2 Estructura de Resonancia Magnética Nuclear	76
VI.3 Simulaciones	78
VI.4 Validación del Modelo y Resultados	84
VI.5 Análisis “Histórico”	86
VI.6 Area expuesta al solvente	96
VI.7 Tercera Validación del Modelo: Radio de giro y Radio Hidrodinámico.	103

VI.8 Cuarta Validación: Estudio de los Puentes de Hidrógeno	106
VI.9 Estudio del Desplazamiento Cuadrático Medio (RMSD)	107
VI.10 Conclusiones	113
VI.11 Pasos futuros	115
CAPÍTULO VII: Conclusiones	117
Bibliografía	123

Introducción

“Recuerde: Las simulaciones son ficciones que aspiran a emular la realidad. Los gráficos atractivos y las cifras alentadoras no garantizan buena ciencia.”

—Peter Steinbach [Steinbach, 2004]

I.1 INTERÉS APLICADO: LA OBTENCIÓN DE NUEVOS MEDICAMENTOS

Encontrar medicinas efectivas y aptas para uso humano es un proceso complejo, laborioso y costoso. Durante gran parte del siglo XX, la industria farmacéutica mundial obtuvo medicamentos consistentes en drogas sintéticas[†] o descubiertas en productos naturales, en su mayoría vegetales [Paladini 1996]. Mencionaremos algunos ejemplos que ilustren la magnitud del esfuerzo invertido en estos desarrollos[‡].

§ I.1.1 Síntesis Química. Una opción consiste en la búsqueda sistemática en familias de compuestos obtenidos por **síntesis química**. Según datos de la compañía Merck (farmacéutica norteamericana), para lograr un medicamento apto para uso humano, necesita, en promedio, examinar más de 10.000 compuestos sintéticos, lo que equivale a doce años de trabajo a un costo de 300 millones de dólares [Paladini 1996].

[†]Denominaremos *medicamento*, *fármaco* o *droga* a una sustancia utilizada con objetivos terapéuticos, es decir, con propiedades útiles para tratar enfermedades, y no a un producto adictivo tomado con fines intoxicantes

[‡]Interesa notar que la industria farmacéutica movilizó 364.000 millones de dólares en el 2001 (<http://www.imshealth.com>) mientras que atiende sólo al 36% de la población mundial [Paladini 1996]

§ I.1.2 **Productos Naturales.** Otro procedimiento usual consiste en la búsqueda sistemática de **productos naturales**. Como ejemplo, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos encontró, luego de treinta y dos años de trabajo (de 1950 a 1982) y de examinar más de 35.000 compuestos vegetales, sólo **una sustancia**: el taxol, aislada de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, apta para consumo humano y con propiedades anticancerosas [Paladini 1996]. Este método se acelera mediante indicios obtenidos por medio del estudio de la llamada “medicina popular” o medicina “folklórica”, recientemente reivindicada por la Organización Mundial de la Salud [OMS, 2002], y que han dado lugar a nuevas disciplinas de estudio: la *etnobotánica* y la *etnofarmacología*.

En síntesis, hasta 1950 los procedimientos accesibles a los químicos para buscar drogas estaban limitados por el escaso conocimiento de los mecanismos moleculares de acción de los fármacos. Se utilizaban reacciones químicas para producir compuestos poco explorados con la esperanza de que algunos tuvieran propiedades interesantes.

En la actualidad la búsqueda de nuevas drogas se caracteriza por planificar en detalle las estructuras a sintetizar. Entre los procedimientos novedosos se mencionarán la *química combinatoria* y el *diseño racional*.

§ I.1.3 **Procedimiento Combinatorio.** Es un conjunto de procedimientos que permiten sintetizar rápida, eficiente y simultáneamente una gran cantidad de compuestos orgánicos diferentes entre sí llamados colecciones o bibliotecas. No se trata propiamente de una nueva técnica, sino de un modo de sistematizar métodos conocidos.

Mientras que la síntesis química tradicional da lugar a un único producto, la química combinatoria genera una gran cantidad de sustancias, que luego serán evaluadas para encontrar agentes con potencial efecto biológico. Esto podría justificar su ulterior estudio en orden a desarrollar de un nuevo fármaco [Mata 1997].

§ I.1.4 **Diseño Racional de Drogas.** En este procedimiento se intenta optimizar el proceso de identificación o síntesis de fármacos–candidatos a medicamentos, utilizando la información estructural–dinámica del ligando y del receptor. Se emplean herramientas computacionales que implementan algoritmos basados en conceptos bioquímicos y biofísicos descriptivos de las interacciones moleculares. Algunos de estos procedimientos y tecnologías se presentan en esta tesis.

§ I.1.5 **Utilización de la información estructural.** Muchas drogas están constituidas a nivel molecular por pequeñas moléculas llamadas “ligandos” que interactúan con las superficies de los complejos macromoleculares. La afinidad y la especificidad de este tipo de uniones están determinadas en gran medida por los patrones de

las superficies involucradas, su semejanza química y su complementaridad estructural. Asimismo están caracterizadas por uniones no covalentes que son de naturaleza electrostática. La comprensión de los sistemas biológicos ligando–receptor nos permite avanzar hacia aplicaciones del diseño eficiente de estas pequeñas moléculas–fármacos, altamente específicas y de baja o nula toxicidad [Bueler, 2005]

Estos fármacos ejercen su efecto al interactuar con las moléculas receptoras dentro de nuestros cuerpos y así alterar su actividad en un modo beneficioso para nuestra salud. En algunos casos, los *agonistas* estimulan la actividad de su receptor, mientras que en el caso de los *antagonistas* trabajan bloqueando la actividad de la molécula–destino [Wellcome, 2002].

Una fuente de información estructural la proveen experiencias de Cristalografía de Rayos X o experimentos de Resonancia Nuclear Magnética (ver capítulos V y VI).

Esta información es procesada mediante herramientas computacionales (entre ellas mencionamos las técnicas basadas en Modelos Electroestáticos del continuo con detalle atómico (capítulo II) y las técnicas temporales como Dinámica Molecular (capítulo III).

En caso de no poseer esta información inicial, una alternativa es invertir el proceso: se genera la información de estructura directamente *in-silico*, es decir, computacionalmente, debiendo validarse el modelo posteriormente contra datos obtenidos por métodos experimentales (ver sección V.3.1).

Estas herramientas permiten básicamente extraer información útil mediante la aplicación de las leyes físicas y químicas a dichos datos de entrada.

Se dispone asimismo de grandes bases de datos que contienen estructuras de compuestos químicos. Mediante la computadora se seleccionan compuestos por afinidad con el receptor. Si no se encuentra un compuesto de este modo, se utiliza otro conjunto de herramientas que permiten *construir* al estilo mecánico moléculas de gran probabilidad de interacción con el receptor. La idea es estrechar lo máximo el foco de búsqueda para minimizar el costoso tiempo de laboratorio.

Como ejemplos podemos mencionar el fármaco Zanamivir[§] (nombre comercial en Argentina ‘Relenza’), primer fármaco desarrollado para tratar la gripe por el procedimiento de diseño racional. Este fue desarrollado eligiendo moléculas que interactúen con la neuroamidasa, una enzima producida por el virus de la gripe como paso del proceso que ocurre en la célula infectada.

Muchas de las drogas recientes que tratan las infecciones por VIH (por ej. Ritonivir, Indinavir) fueron diseñadas para interactuar con la proteasa viral, la enzima que divide las proteínas virales y les permite ensamblarse adecuadamente.

[§]<http://www.fda.gov/cder/consumerinfo/druginfo/relenza.htm>

Otra droga bien conocida producida por diseño basado en el ligando es el Viagra. Se intentó producir una molécula semejante al cGMP, un ligando que se une a una enzima llamada fosfodiesterasa. Por medio del bloqueo de su actividad, se esperaba que este fármaco relaje el músculo cardíaco suave vascular y por lo tanto disminuya los síntomas de la angina. En las pruebas clínicas el efecto de la droga sobre la angina no fue alentador. Sin embargo algunos pacientes masculinos desarrollaron erecciones. El resto es historia conocida.

I.2 INTERÉS BÁSICO: LA COMPRESIÓN DE LOS MECANISMOS MACROMOLECULARES

“No hay nada más práctico que una buena teoría”

—Kurt Lewin, 1940

Para investigar los procesos biomoleculares se necesita entender con claridad el rol de las interacciones moleculares y en particular el rol de las interacciones eléctricas y sus propiedades en el nivel macro y microscópico [Baker, 2004].

Actualmente vivimos un proceso de muchísima rapidez de determinación de estructuras de proteínas y biopolímeros en general, via diferentes tipos de métodos genómicos. Asimismo los roles específicos de estas macromoléculas en el concierto de las rutas metabólicas celulares y los conjuntos supramoleculares se obtienen mediante diferentes técnicas experimentales.

Un gran desafío es la integración de esta información en modelos físicos para el diseño de fármacos. Esto requiere poner en juego la capacidad de evaluar las diferentes contribuciones energéticas tanto intra e inter moleculares. Entre los distintos tipos de interacciones moleculares, las fuerzas eléctricas son de importancia central debido a su *largo alcance*, y la relevancia que posee la carga de los aminoácidos y los ácidos nucleicos.

Dada la naturaleza ubicua de las interacciones electrostáticas en los sistemas biomacromoleculares, se ha trabajado fuertemente en el desarrollo de métodos computacionales para el esclarecimiento de los mecanismos y procesos en los cuales subyace una componente electrostática.

Los métodos computacionales para esto pueden ser clasificados básicamente en dos categorías:

1. aquellos que modelan al sistema con **“solvente explícito”** que tratan al sistema con completo detalle molecular, (capítulo III, y

2. y los de “**solvente implícito**”, que incorporan las influencias del solvente en un tratamiento promedio o continuo (capítulo II)

En la presente tesis se utilizarán ambos tipos de métodos. Esto implica una decisión cuidadosa basándose en el tipo de información que se desea obtener y el tipo de sistema que se desea representar computacionalmente. Se deberá para ello hacer un balance entre la necesidad de información detallada que puede proveer el método explícito, contra el costo computacional que un método implícito permite ahorrar, (obviamente a expensas de la calidad de la información) al integrar sobre los numerosos grados de libertad del solvente, y así obtener datos de interés del sistema biológico.

Técnica 1: Electroestática de Macromoléculas

II.1 PORQUÉ PREOCUPARSE POR LA ELECTROSTÁTICA

En los últimos años ha habido un interés renovado por la Electroestática en la biología [Honig, 1995] [Uhdman, 1999] [Juffer, 1991], debido a tres factores básicamente:

1. el rol muy importante que juegan dichas interacciones en la caracterización de las propiedades estructurales y funcionales de las macromoléculas,
2. los avances en la resolución numérica de las ecuaciones básicas que gobiernan estos fenómenos, y
3. el incremento del poder de cálculo que hizo factible crear herramientas computacionales que implementen los algoritmos numéricos en tiempos de cálculo razonables.

La relevancia de estas interacciones es particularmente notable para las moléculas con carga neta no nula, como es el caso del ADN y otros polielectrolitos. Asimismo, en el caso de las proteínas han sido reconocidos efectos funcionales de importancia producidos por los dipolos correlacionados de las hélices alfa [Hol, 1978] [Berendsen, 1986]. La interacción electrostática entre partículas coloidales y macromoléculas a menudo desempeña un rol crucial en la *estabilidad* de estos sistemas [Harries, 1998] [Israelachvili, 1992].

En problemas que involucran la presencia de una membrana biológica también ocurre este fenómeno. Muchas de las propiedades estructurales de las membranas

(rigidez, estabilidad, transición lateral de fase y dinámica) dependen *sustancialmente* de las interacciones electrostáticas [Andelman, 1995] [Verwey, 1948] [Israelachvili, 1992].

§ II.1.1 Dificultad de los cálculos. La presencia del solvente acuoso, con una gran diferencia en polarizabilidad respecto de la de una macromolécula, o dicho macroscópicamente, la diferencia de valores de permitividad en los dominios biológicos de interés a nivel molecular, aparta considerablemente el comportamiento de las interacciones del Coulombiano puro, básicamente debido a la presencia del *campo de reacción* del medio. Esta influencia sobre una carga en solución es el término determinante de sus propiedades de solubilidad como fue tempranamente advertido por Born [Born, 1920].

Asimismo, la presencia de sal en el medio, o sea, de iones móviles en agua, introduce también otros efectos que no pueden ser tenidos en cuenta mediante interacciones Coulombianas puras.

§ II.1.2 Tratamientos con completo detalle atómico. Los tratamientos “puramente microscópicos”, tales como Dinámica Molecular (DM) (técnica expuesta en el capítulo III) o Monte Carlo (MC), representan el sistema con *detalle atómico*. Esto quiere decir que no existen fronteras dieléctricas definidas, ni tampoco las funciones espaciales—dato que caracterizan el sistema, tales como la permitividad, la presión, la temperatura. En este marco dichas funciones se *calculan* a partir de parámetros atómicos, entre otros: distribuciones moleculares de carga, polarizabilidades, masas atómicas y fluctuaciones. Estas técnicas computacionales de simulación con detalle atómico han tenido en los últimos años un importantísimo progreso (tanto algorítmico como en potencia de cálculo) en orden a simular macromoléculas y líquidos.

Sin embargo, aún subsisten dificultades al momento de representar adecuadamente el solvente salino-acuoso. Como ejemplo, para simular un sistema molecular a concentración fisiológica de ClNa en agua (0.1—0.15 Molar), necesitamos del orden de 10^4 moléculas de agua, para contar con apenas 100 moléculas de Cloruro de Sodio. Vale decir que estaremos invirtiendo el 99 % de la capacidad computacional instalada en representar al solvente, en vez de ocuparnos en nuestra molécula y la nube iónica de interés.

Esto impone importantes limitaciones al tipo de experimentos computacionales que se pueden llevar a cabo mediante estos modelos.

§ II.1.3 Descripciones Alternativas. Frente a esta dificultad se han propuesto diversas simplificaciones

Dinámica Browniana (BD, también llamada dinámica de Langevin, ver sección III.9 en la página 45). Este tipo de técnica elimina los grados de libertad “no

interesantes” reteniendo un formalismo temporal, es decir que nos devuelve trayectorias del sistema de interés al estilo de la DM, aunque la ley que rige la evolución temporal del sistema ya no es newtoniana determinista, sino que se trata de una evolución estocástica (un mismo estado inicial puede conducir a diferentes configuraciones finales). En esta tesis hemos utilizado esta técnica en el capítulo IV.

Modelo Mixto Macroscópico-microscópico Electroestático Este modelo *no contempla el tiempo* como variable del problema ya que trata únicamente con *promedios estadísticos* de las funciones espaciales–dato del problema. Se comienza desde una descripción *continua* del sistema: este típicamente consiste en una o más macromoléculas rodeadas de solvente (usualmente agua y sal). La región del espacio que ocupa la macromolécula se supone una cavidad de baja permitividad. El solvente se representa como un medio de elevada permitividad, que puede contener un electrolito. A esta descripción se le agrega algún *detalle atómico*: cargas y posiciones de los átomos que se suponen *fijas* en sus posiciones dadas experimentalmente (por cristalografía de rayos X o NMR) o dadas por modelos computacionales (provenientes de DM o MC). Finalmente se resuelve el problema *electroestático* por medios computacionales. Describiremos en mayor detalle a continuación esta técnica.

II.2 LA ECUACIÓN DE POISSON

La Electroestática Clásica, en su aproximación del continuo, está regida por la Ecuación de Poisson [Ten Eyck, 2005]:

$$-\nabla[\epsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = \rho(\mathbf{r}) \quad (1)$$

donde $\phi(\mathbf{r})$ es el potencial electrostático, $\epsilon(\mathbf{r})$ la permitividad relativa del medio (o constante dieléctrica), $\rho(\mathbf{r})$ es la densidad de carga en el punto dado por el vector posición \mathbf{r} y ∇ es el operador vectorial diferencial $\nabla = \frac{\partial}{\partial x}\mathbf{i} + \frac{\partial}{\partial y}\mathbf{j} + \frac{\partial}{\partial z}\mathbf{k}$. Las funciones $\epsilon(\mathbf{r})$ y $\rho(\mathbf{r})$ son datos del problema.

Estas magnitudes en general *no son constantes en \mathbf{r}* , (nótese esto especialmente para la “constante” dieléctrica). Dado que el operador ∇ es básicamente una derivada con respecto a la posición, la ecuación (1) expresa la manera en que el potencial ϕ *varía* en el espacio. Solamente al encontrar una solución, (o sea, una función escalar ϕ que reemplazada en la ecuación (1), la satisfaga), se podrá conocer el valor del potencial.

§ II.2.1 **Ley de Coulomb.** Para los casos particulares en los cuales podemos suponer que la permitividad vale constante e igual a uno, $\epsilon = 1$, la ecuación (1) tiene por solución a la Ley de Coulomb:

$$\phi(\mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}') \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' \quad (2)$$

§ II.2.2 **La permitividad.** En el caso de un sistema compuesto por una macromolécula y agua, la utilización de la ley de Coulomb resulta en una descripción poco adecuada, debido a que la función $\epsilon(\mathbf{r})$ toma valores muy diferentes en la molécula y en el agua. Esto se debe a que esta función es la que tiene en cuenta (en este contexto clásico) los efectos de la *polarizabilidad* de un medio. Dicha polarizabilidad es una medida de la *respuesta* de un sistema a la aplicación de un campo eléctrico [Gilson, 2000].

Si pensamos a nuestro sistema ahora *microscópicamente*, cuando existe un campo eléctrico no nulo en un sistema, las moléculas que constituyen el mismo sufren un leve reordenamiento de modo tal de contrarrestar el campo eléctrico neto. Este reordenamiento ocurre a nivel *electrónico* y también a nivel de la *conformación* de la molécula. No todas las moléculas pueden reordenarse en la misma medida: en el caso del agua (y de muchos solventes polares) la redistribución incluye su habilidad para reorientar la molécula entera, que posee un momento dipolar permanente. Esto resulta en una mayor efectividad para contrarrestar el campo, que macroscópicamente corresponde a una permitividad alta (en nuestro caso de alrededor de 80). Por otro lado en el caso del interior de una macromolécula biológica como una proteína, existe una contribución mayoritaria de la polarización electrónica, con algunas porciones particulares de reordenamiento de cadenas laterales. Estudios de DM son compatibles con una constante dieléctrica en el rango 2–4 [Simonson, 1994] [Roux, 1999].

§ II.2.3 **Solución.** La notación vectorial compacta de la ecuación (1) puede inducir erróneamente a una aparente simplicidad. Sólo se conocen muy pocos casos en que esta ecuación tiene solución analítica exacta, por ejemplo, cuando la geometría y distribuciones de carga del problema tienen simetría esférica o cilíndrica.

La función solución se puede escribir como

$$\phi = \phi[\mathbf{r}; \rho(\mathbf{r}), \epsilon(\mathbf{r})] \quad (3)$$

donde la notación quiere indicar que ϕ depende de las funciones espaciales—dato $\rho(\mathbf{r})$ y $\epsilon(\mathbf{r})$.

Esta solución debe cumplir en toda frontera dieléctrica las condiciones de a) continuidad del potencial $\phi(\mathbf{r})$ y b) continuidad de la componente normal del vector Desplazamiento eléctrico $\partial\phi(\mathbf{r})/\partial\mathbf{n}$ (\mathbf{n} es el vector normal).

Sin embargo, en el caso de las macromoléculas, que tienen forma arbitraria, el problema analítico es insoluble, y se debe recurrir a métodos numéricos.

§ II.2.4 Diferencias Finitas. En este método se transforma una porción del espacio continuo en una matriz *discreta*, compuesta de puntos que están espaciados una determinada cantidad h entre primeros vecinos.

Las derivadas se aproximan por cocientes de diferencias:

$$\frac{\partial\phi}{\partial x} = \frac{1}{h}[\phi_{i,j,k} - \phi_{i-1,j,k}] \quad (4)$$

donde $\phi_{i,j,k}$ representa al potencial evaluado en el punto i, j, k . Las funciones dato ($\epsilon(\mathbf{r})$ y $\rho(\mathbf{r})$) son asignadas sobre redes cúbicas convenientes. Este proceso realizado sobre la ecuación (1) conduce a una ecuación en *diferencias finitas*:

$$\begin{aligned} h^2\rho_{i,j,k} = & \epsilon_{i-1/2,j,k}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i-1,j,k}) + \epsilon_{i+1/2,j,k}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i+1,j,k}) + \\ & \epsilon_{i,j-1/2,k}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i,j-1,k}) + \epsilon_{i,j+1/2,k}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i,j+1,k}) + \\ & \epsilon_{i,j,k-1/2}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i,j,k-1}) + \epsilon_{i,j,k+1/2}(\phi_{i,j,k} - \phi_{i,j,k+1}) \end{aligned} \quad (5)$$

§ II.2.5 Distribución de Carga. Como fue discutido en la sección II.1.3, tomaremos un conjunto de coordenadas atómicas obtenidas mediante cristalografía y construiremos la densidad de carga, correspondiente a un conjunto de N cargas puntuales, en los sitios atómicos:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{l=1}^N q_l \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_l) \quad (6)$$

Esta distribución de cargas puntuales, se descompone en suma de cargas fraccionales y se asignan a los 8 sitios más cercanos del reticulado de acuerdo con algún criterio. Uno de los más sencillos es el llamado *trilineal*:

$$\rho_{ijk} = q_l(1-a)(1-b)(1-c) \quad (7)$$

donde q_l es la carga que está en la vecindad del sitio y a, b, c son las coordenadas fraccionales (en unidades de h) del punto donde está la carga, con respecto al sitio ijk . Si se suman las 8 cargas asignadas se recupera el valor de la carga original (ver en la figura 1 un esquema bidimensional).

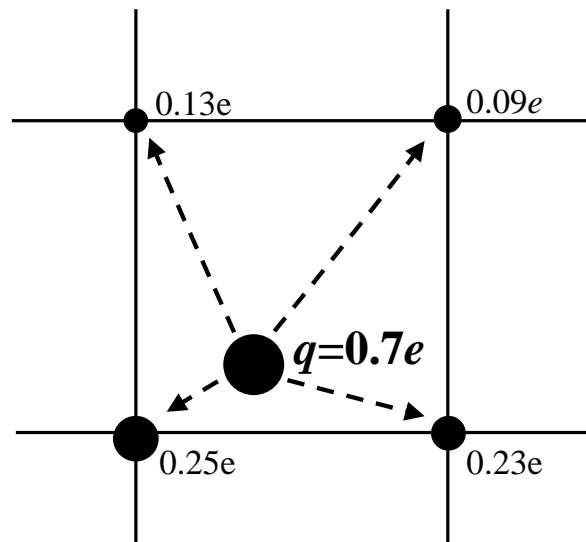


Figura 1: Método de distribución lineal de cargas atómicas en 2D

§ II.2.6 Asignación de la función $\epsilon(\mathbf{r})$ al reticulado. Los valores $\epsilon_{i\pm 1/2, j\pm 1/2, k\pm 1/2}$ se obtienen mediante la evaluación de la función $\epsilon(\mathbf{r})$ en los puntos *intermedios* de la red. Según lo dicho en la sección II.2.2 tomamos un valor de 2 para los puntos *internos* al espacio ocupado por la proteína o la bicapa lipídica, y de 78.54 a los puntos ubicados en la zona del solvente.

En este punto es importante notar que la palabra “*interno*” remite a la definición de la *frontera* dieléctrica entre soluto y solvente, que requiere algo de cuidado. Existen en general dos posibilidades que se ilustran en la figura 2:

Molecular: El dominio del problema se divide en dos regiones. El volumen asignado al solvente se define como la unión de los volúmenes accesibles a esferas del tamaño de una molécula de agua (radio 0.14 nm) que no ingresen al espacio reservado a átomos explícitos (de la o las macromoléculas), o sea, que lo más cerca que se puede estar es cuando la esfera rodante es tangente a las esferas de Van der Waals de los átomos de proteína. A este volumen se le asigna $\epsilon_{solvente} = 78,54$. Al complemento de este volumen se le asigna $\epsilon_{soluto} = 2$ (figura 2 caso A).

Van der Waals: Es similar al anterior, haciendo tender el radio de la esfera rodante a cero. El lugar geométrico de la frontera se “aplata” sobre las superficies de Van der Waals externas de los átomos de la macromolécula (figura 2 caso B)

§ II.2.7 Condiciones de Frontera. Aquí tenemos varias posibilidades:

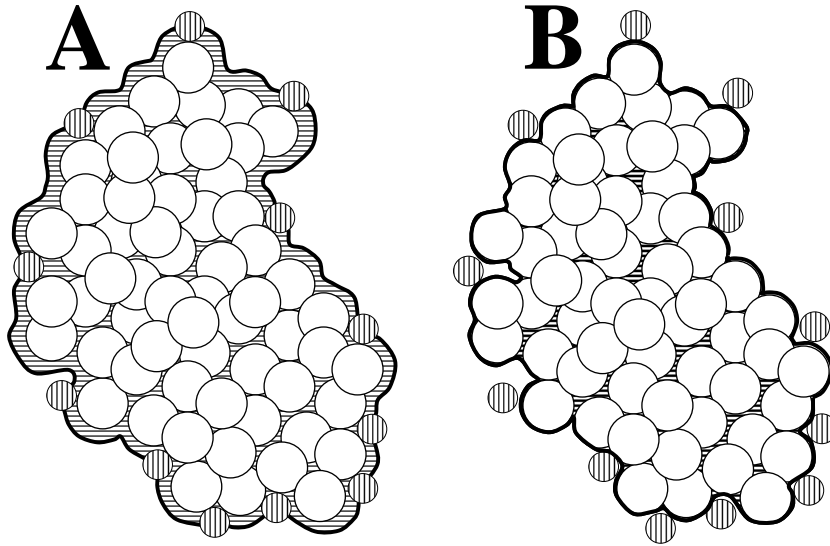


Figura 2: Definición de superficie. **A:** Molecular, **B:** Van der Waals [Baker, 2004].

Cero: Esta es la condición tradicional de potencial nulo a distancias muy alejadas del sistema de interés. Traducido esto al lenguaje de diferencias, significa hacer cero el potencial en las caras de la caja. Esta condición es en general inaceptable e induce a errores importantes.

Debye-Hückel: Se representa a la macromolécula como una esfera. La carga y el radio se toman respectivamente iguales a la carga total y el radio medio de la proteína. Esta condición es buena si el borde de la molécula está lo suficientemente alejado de las caras de la caja. En el capítulo V se utilizó esta condición de borde.

II.3 LA ECUACIÓN DE POISSON-BOLTZMANN

El comportamiento de las macromoléculas en solución, depende fuertemente no sólo de la presencia del agua, sino del hecho de estar inmersas en solución salina.

Este aspecto no despreciable, debido al carácter de largo alcance de las fuerzas electrostáticas, hace que tengamos que tener en cuenta la manera en que las cargas de los iones de sal se *distribuyen* en la solución. Esto puede describirse mediante

la Ecuación de Poisson-Boltzmann, la que puede derivarse mediante una aproximación de campo medio al problema mecánico estadístico completo del gas Coulombiano via el formalismo de la función de Green [Coalson, 1997] [Coalson, 1992].

Veamos una justificación *más intuitiva* de esto. Utilizamos la teoría de *Debye-Hückel* [Debye, 1923] suponiendo que *la densidad de iones* n_i de tipo i por unidad de volumen en una dada región del espacio es

$$n_i = n_i^0 e^{-q_i \phi(\mathbf{r})/kT} \quad (8)$$

donde n_i^0 es la densidad de iones en el seno de la solución, q_i es la carga del ion i , $\phi(\mathbf{r})$ es el potencial electrostático en esa región del espacio, k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

Esta es una distribución de Boltzmann que representa la existencia de una nube de carga opuesta alrededor de un ión cualquiera dado.

Por lo tanto la densidad de carga debida a esta densidad numérica n_i , será $\rho_i = q_i \cdot n_i$, y la suma sobre i será la ρ neta debida a la presencia de sal en el agua.

Incluyendo este efecto en la ecuación (1), obtenemos la ecuación de **Poisson-Boltzmann**:

$$-\nabla[\epsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = \rho_m(\mathbf{r}) + \rho_s(\mathbf{r}) \quad (9)$$

donde $\rho_m(\mathbf{r})$ es la densidad de carga debida a las posiciones fijas de todas las cargas dentro de la macromolécula y

$$\rho_s(\mathbf{r}) = \sum_i q_i n_i^0 e^{-q_i \phi(\mathbf{r})/kT} \quad (10)$$

es la debida a la presencia de sal en el agua, y tiene en cuenta la redistribución estadística ya mencionada.

Supondremos que estamos en presencia de una sal ClNa de concentración x Molar. Los cationes tienen carga $+1e$ y los aniones, $-1e$. Esto se conoce como una sal uni-univalente.

$$\rho_s(\mathbf{r}) = \rho_{Na+} + \rho_{Cl-} = ex \exp\left[-\frac{e\phi(\mathbf{r})}{kT}\right] - ex \exp\left[\frac{e\phi(\mathbf{r})}{kT}\right] = -2ex \sinh\left[\frac{e\phi(\mathbf{r})}{kT}\right]$$

Por lo tanto, la ecuación (9) se convierte en este caso en la ecuación conocida como Ecuación No lineal de Poisson-Boltzmann:

$$-\nabla[\epsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = \rho_m(\mathbf{r}) - 2ex \sinh\left[\frac{e\phi(\mathbf{r})}{kT}\right] \quad (11)$$

En el caso de que el campo ϕ sea lo suficientemente pequeño (la densidad de carga de la molécula y la intensidad iónica de la solución suficientemente bajas), podemos

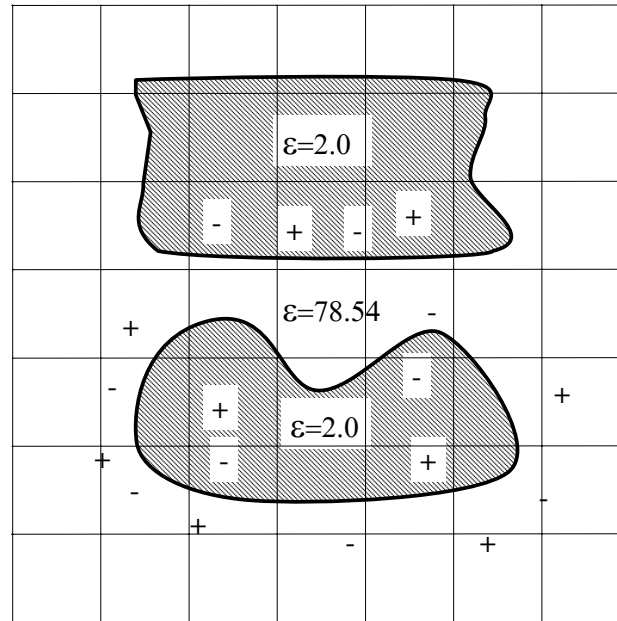


Figura 3: Macromolécula y membrana en una representación en 2D

aproximar el seno hiperbólico por el valor de su argumento, y mediante algunas manipulaciones sencillas queda:

$$-\nabla[\epsilon(\mathbf{r})\phi(\mathbf{r})] = \rho_m(\mathbf{r}) - \epsilon(\mathbf{r})\kappa^2\phi(\mathbf{r}) \quad (12)$$

donde κ es la longitud de apantallamiento inversa de Debye, definida como

$$\kappa^2 = \frac{2Ie^2}{\epsilon(\mathbf{r})kT} \quad \text{con} \quad I = \frac{1}{2} \sum_i n_i (q_i/e)^2 \quad (13)$$

aquí I es la *intensidad o fuerza iónica*.

En la figura 3, podemos ver un esquema simplificado de los elementos que constituyen este modelo de Modelo de Poisson–Boltzmann.

II.4 SOLUCIÓN DEL PROBLEMA ELECTROSTÁTICO

Una vez especificados los parámetros que definen el problema, se emplea, para la obtención de la solución, un algoritmo iterativo de *enfocado*[†]. Este consiste en

[†]*focusing* en inglés

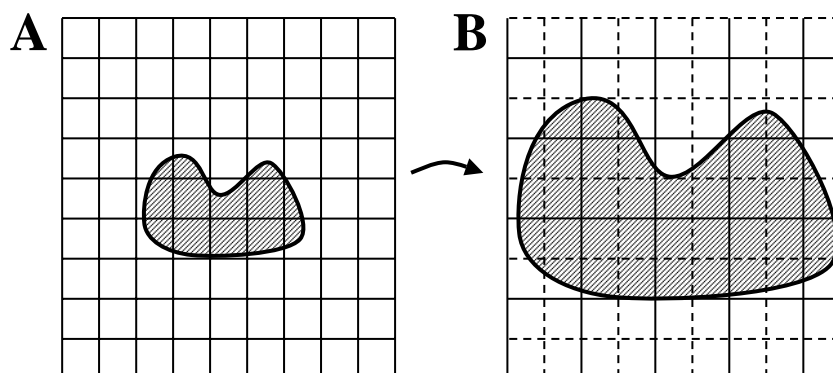


Figura 4: El sistema se coloca en una red gruesa (A), y luego se utilizan los datos para especificar condiciones de borde para la red fina (B)

partir de una aproximación inicial en una red de resolución gruesa, de mayores dimensiones que el reticulado que comprende el dominio de interés. Luego se refina el cálculo, utilizando la anterior solución como un punto de partida para reiniciar el proceso. Esto acelera el proceso iterativo que supone resolver la ecuación (5) (véase la figura 4). La salida de esta etapa consiste en los valores del potencial en los puntos discretos de la red.

II.5 CÁLCULO DE LAS ENERGÍAS ELECTROSTÁTICAS

§ II.5.1 El Potencial. Veamos los factores que contribuyen al potencial electrostático. Consideremos dos cargas en una cavidad de baja constante dieléctrica, rodeada por un solvente de alta constante dieléctrica [Accelrys, 2003].

Las moléculas de solvente y los iones responderán al campo generado por cada carga en el soluto. Esta respuesta (básicamente reorientación dipolar y polarización electrónica) creará un campo que actúa en la posición de las cargas originales: el campo de reacción [Bottcher, 1973] que ya hemos mencionado en la sección II.1.1. La intensidad de este campo está determinada por la magnitud de la carga, su distancia a la frontera dieléctrica, la forma de tal frontera y las constantes dieléctricas del interior y exterior. Todas las cargas del sistema están expuestas a este campo de reacción incluyendo a la carga fuente original. Por lo tanto, el campo externo ϕ^{ext} en la posición de una carga puntual será la suma de la interacción de cada carga con su propio campo de reacción ϕ^{reacc} más el campo de reacción de las otras cargas

ϕ^{cruz} , más el campo directo (coulombiano) de interacción con las otras cargas ϕ^{coul} .

$$\phi^{ext} = \phi^{coul} + \phi^{reacc} + \phi^{cruz} \quad (14)$$

A esto se le debe sumar el campo generado por la carga en *su propia posición* ϕ^{propio} que es infinito.

$$\phi^{total} = \phi^{ext} + \phi^{propio} \quad (15)$$

Este es el potencial que devuelve la solución numérica de la ecuación 11 o 12. La técnica de distribuir las cargas en un reticulado *elimina* las singularidades pero *crea* “artefactos” numéricos que dependen en la posición de la red y el lugar específico que ocupa la macromolécula. Veremos en la próxima sección cómo eliminarlos.

§ II.5.2 Energía Electroestática Total. La Energía Electroestática[‡] Total del sistema viene dada por:

$$G_E = \frac{1}{2} \sum q_i \phi_i^{ext} = \frac{1}{2} \sum q_i (\phi_i^{total} - \phi_i^{propio}) \quad (16)$$

Lamentablemente esta no es una cantidad que se obtenga mediante la resolución numérica ya mencionada en la sección II.5.1. Lo que se puede obtener es

$$G_E^{e+c} = \frac{1}{2} \sum q_i \phi_i^{total} \quad (17)$$

donde los superíndices “e+c”, quieren decir que en esta energía la contribución coulombica propia aún no fue eliminada.

En las aplicaciones donde interesa calcular variaciones de energía, esta energía *propia* se cancela naturalmente. Un ejemplo es cuando se computa la energía de solvatación de un sistema mediante dos cálculos con *idénticas* asignaciones en el reticulado y la misma constante dieléctrica de la cavidad interna. En un cálculo se utiliza la cte dieléctrica del solvente (78.54 para el agua) y en el otro se iguala a 1.0 (vacío). Al restar

$$\Delta G_E(\epsilon_s, \epsilon_{solvente} : 1 \xrightarrow{solv} 80) = G_E(\epsilon_s, 80) - G_E(\epsilon_s, 1) \quad (18)$$

obtenemos el cambio en la Energía Electroestática al transferir el sistema del vacío al solvente, o sea obtenemos la componente *electroestática de la energía de solvatación*. en esta ecuación, $G_E(\epsilon_s, \epsilon)$ es la energía electroestática total de un soluto de cte ϵ_s en un solvente de constante ϵ .

[‡]Es usual denominar Energía Libre Electroestática a esta cantidad. Sin embargo no resulta claro que la misma contenga las contribuciones entrópicas, por lo que esta denominación puede ser cuestionable.

Al utilizar la *misma* asignación, todas las cargas se distribuyen de la misma manera en los puntos del reticulado, y el potencial ϕ^{propio} será idéntico, y se cancelará al restar. Por tanto podemos calcular la diferencia del siguiente modo:

$$\Delta G_E(\epsilon_{solvente} : 1 \xrightarrow{solv} 80) = G_E^{e+c}(\epsilon_s, 80) - G_E^{e+c}(\epsilon_s, 1) \quad (19)$$

II.6 LÍMITE DE VALIDEZ DE POISSON–BOLTZMANN

§ II.6.1 Aproximaciones que subyacen a la Teoría de PB. En síntesis, son las siguientes [Andelman, 1995]:

- Las cargas iónicas están *distribuidas* en una “nube”, y pueden ser representadas por funciones de *variación suave*.
- No se tiene en cuenta el *tamaño del ión*.
- No se tiene en cuenta *toda otra interacción* entre los iones y las moléculas de agua (entre otras, ni las fuerzas de Van der Waals ni las de hidratación)
- Se ignoran las *correlaciones carga-carga*. Se reemplazan los observables físicos tales como la distribución de carga, por promedios térmicos, y en este sentido, se acercan a una teoría de campo medio.

O sea, esta aproximación dejará de valer para densidades de carga superficiales suficientemente altas, para distancias cercanas a los iones explícitos o para partículas que tienen tamaños comparables con la longitud de apantallamiento de Debye [Debye, 1923] [Harries, 1998]

§ II.6.2 Fuerza dieléctrica de frontera. Asimismo el modelo no incluye fuerzas de frontera dieléctricas[§], que se han revelado importantes para el estudio de los comportamientos difusivos en algunos sistemas biológicos [Nadler, 2003]. Tales efectos son importantes en la difusión de especies cargadas en espacios confinados tales como canales iónicos pero no tiene un impacto significativo para interacción proteína ligando, a relativamente bajas concentraciones donde en gran parte estos efectos se cancelan [Songyuhua, 2004].

[§]en inglés: dielectric boundary forces

Técnica 2: Dinámica Molecular

Describiremos la técnica de la Dinámica Molecular, mediante la cual obtuvimos los resultados del capítulo VI, utilizando el paquete de simulación GROMACS [van der Spoel, 2004] [Berendsen, 1995] [Lindahl, 2001]. Agregaremos una somera descripción de la técnica de Dinámica Browniana que fue utilizada en el capítulo IV, en su implementación del paquete de simulación GROMOS [Van Gunsteren, 1987] [Van Gunsteren, 1996].

III.1 FÍSICA CLÁSICA APLICADA A LA BIOLOGÍA

§ III.1.1 Validez de la aproximación clásica. Una pregunta central previa a todo tratamiento de este tipo es:

Supuesto que la Mecánica Cuántica es el mejor formalismo para la descripción de un sistema biológico a nivel molecular, ¿cuándo es razonable aplicarle las leyes de la Mecánica Clásica?

Esbozamos un argumento simplificado [Steinbach, 2004]: En Mecánica Clásica una partícula puede poseer cualquier energía de entre un continuo de valores, pero, en el Dominio Cuántico, la energía está *cuantificada* es decir, que el sistema sólo puede aceptar determinados valores de la energía separados por “saltos” discretos. A temperaturas muy bajas estos saltos son mayores que la energía térmica disponible y el sistema estará *confinado* a uno o varios de los estados de *menor* energía. En este caso esperamos que el carácter Cuántico del paisaje de energía se haga evidente en el comportamiento del sistema. Si, en cambio, incrementamos la temperatura, más y más estados se vuelven térmicamente accesibles, y el sistema tiende a parecerse a uno que se comporte clásicamente.

Consideremos un oscilador armónico (este sistema ideal puede razonablemente ser un modelo de una porción de un sistema biológico). Los niveles cuánticos de energía están separados por la cantidad $\Delta E = hf$ donde h es la constante de Planck, y f es la frecuencia de oscilación. El comportamiento tenderá al clásico si $k_B T \gg hf$, donde k_B es la constante de Boltzmann, y $k_B T = 0,6$ kcal/mol a 300 K. En el límite resulta $f \approx 6,25/\text{ps}$ o $t \approx 1$ ps. Por lo tanto el tratamiento clásico resulta válido para tiempos característicos del orden de 1 ps o más a temperaturas fisiológicas.

III.2 DESCRIPCIÓN BREVE

La Dinámica Molecular genera la posición y la velocidad de cada partícula del sistema en cada instante de tiempo. Mediante la Mecánica Estadística podemos pasar de esta información microscópica a la obtención de magnitudes macroscópicas observables [Allen, 1987] [Gutierrez, 2001].

Sea un sistema compuesto por N partículas, dentro de un volumen V y con una energía fija E . Las posiciones y velocidades definen un espacio de fases de $6N$ dimensiones. Obtener la posición y la velocidad de cada una de las partículas, en cada instante, significa obtener la trayectoria de un punto Γ en el espacio de las fases en función del tiempo.

Llamemos \mathcal{O} al valor instantáneo de un cierto observable. El promedio de esta cantidad, denominado $\langle \mathcal{O} \rangle_{obs}$ está dado por

$$\langle \mathcal{O} \rangle_{obs} = \langle \mathcal{O} \rangle_{temporal} = \frac{1}{\tau} \sum_{\tau=1}^{\tau_f} \mathcal{O}(\Gamma(\tau)) \quad (1)$$

donde τ representa un *tiempo* (un índice que señala cada paso de dinámica molecular) y τ_f es el tiempo total total de la corrida. Suponiendo que el sistema es ergódico, podemos igualar directamente este promedio *temporal* con el promedio usual sobre un conjunto de la Mecánica Estadística.

$$\langle \mathcal{O} \rangle_{observable} = \langle \mathcal{O} \rangle_{temporal} = \langle \mathcal{O} \rangle_{conjunto} \quad (2)$$

Por medio del formalismo de la simulación lo que se hace es generar una sucesión de diferentes estados (puntos) del espacio de fases, compatibles con las condiciones externas macroscópicas (N , V , E) en este caso), sobre los cuales se toman los promedios.

La elección del conjunto bajo el cual llevar a cabo la simulación está dictada fundamentalmente por el tipo de problema a tratar. Los promedios estadísticos pueden llevar a pequeñas diferencias en los diferentes conjuntos, pero éstas desaparecen

en el límite termodinámico, que se alcanza incluso con unos pocos cientos de partículas [Allen, 1987]. Sin embargo la elección del conjunto sí influye al momento de calcular las fluctuaciones cuadráticas medias de las magnitudes termodinámicas. Estas permiten calcular, por ejemplo, la capacidad calorífica o el módulo de elasticidad [Allen, 1987].

Los experimentos típicos de Dinámica Molecular se realizan en el conjunto microcanónico (N, V, E) . Mediante algoritmos que acoplan adecuadamente el sistema a un baño térmico o a un “baño” de presión [Berendsen, 1984] [Nose, 1984] [Hoover, 1985] [Nose, 1983], se pueden realizar simulaciones en el canónico (N, V, T) o en el conjunto isotérmico-isobárico (N, P, T) a presión y temperatura constante, respectivamente.

III.3 EL POTENCIAL INTERATÓMICO

Un punto de importancia central es la elección del potencial interatómico del sistema a simular. De la fidelidad con que éste represente las interacciones reales entre las partículas dependerá la calidad de los resultados: un proceso de refinamiento del potencial, que le incorpore mayor detalle en la representación de la interacción debería por tanto mejorar la calidad de la simulación. Sin embargo, hay que ser cuidadoso en este punto ya que la adición de un término realista puede no mejorar los resultados. Esto se debe a que el potencial es aún incompleto y el proceso de ajuste realiza una ‘compensación’ de errores debidos a la carencia de ciertos términos.

Por otro lado mientras mayor sea la complejidad funcional del potencial, mayor también será el tiempo de computación requerido. Si lo que se busca es sólo investigar ciertos aspectos de un modelo teórico, lo mejor será emplear un potencial lo más simple posible que reproduzca la esencia de ese modelo. Diferente es la situación si lo que se desea es acercar el mundo ideal de la simulación al mundo real de un sistema biológico: entonces el potencial deberá contener el máximo de información posible de modo de reproducir los resultados no sólo cualitativamente, sino también cuantitativamente.

Cuando se desea resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema de N partículas interactuantes, se deben utilizar métodos desarrollados específicamente para esta tarea: por ejemplo los *ab-initio* o primeros principios, como el Método de Car-Parrinello [Car, 1985], que combina DM con teoría del funcional de la densidad. Sin embargo, el costo computacional de esto es alto, limitando las posibilidades a sistemas cuyo tamaño máximo sea del orden de cientos de partículas. En esos casos (sistemas del orden de $O(10^4)$ — $O(10^6)$ de partículas), por el contrario, se recurre típicamente a las simulaciones clásicas con potenciales empíricos y semi-empíricos.

En esta tesis se trabajará con este último tipo de simulaciones.

§ III.3.1 El Potencial – Campos de Fuerza. La definición de un campo de fuerzas comporta la elección de una forma funcional y un conjunto de parámetros. Los campos de fuerzas se parametrizan para reproducir propiedades estructurales. A pesar de ser utilizados para predecir otras propiedades, como por ejemplo, energías relativas, o propiedades espectroscópicas, no necesariamente estas propiedades no incluidas en la parametrización serán descritas correctamente. Se debe tener en cuenta que los diferentes parámetros se ajustan en *conjunto*, o sea que no pueden ser modificados independientemente.

Las funciones $U(r)$ pueden ser subdivididas en tres tipos de interacciones:

$$\begin{aligned}
 U(r) = & \underbrace{\sum_{\text{pares}} \left(\frac{C^{12}}{r^{12}} - \frac{C^6}{r^6} \right)}_{\text{Dispersion-Repulsion}} + \underbrace{\sum_{\text{pares}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r}}_{\text{Coulomb}} \\
 & + \underbrace{\sum_{\text{ligados}} \frac{1}{2} k_r (r - r_0)^2}_{\text{enlace}} + \underbrace{\sum_{\text{ligados}} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2}_{\text{angular}} \\
 & + \underbrace{\sum_{\text{dih.imp}} k_\xi (\xi - \xi_0)^2}_{\text{dihedros impropios}} + \underbrace{\sum_{\text{dih.prop.}} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_0))^2}_{\text{dihedros propios}} \quad (3)
 \end{aligned}$$

No ligadas Utilizaremos aquí un término Coulombiano, más un término 6–12 de Lennard Jones. Se calculan basados en listas de vecinos que se actualizan generalmente a intervalos regulares (ver sección III.7.3).

Ligadas Aquí están los términos que dan ‘forma’ a la molécula. Se fija la *longitud* del enlace covalente, los *ángulos* entre tres átomos ligados, los *dihedros impropios* que logran dar la forma “plana” a grupos de átomos y los *dihedros propios* que regulan las torsiones de sucesión de 4 átomos ligados. Se calculan basados en listas fijas.

Especiales Aquí entran los términos que restringen posiciones, distancias, o ángulos entre átomos. Se calculan basados en listas fijas.

Estos términos se ilustran en la figura 1 (en pág. 35)

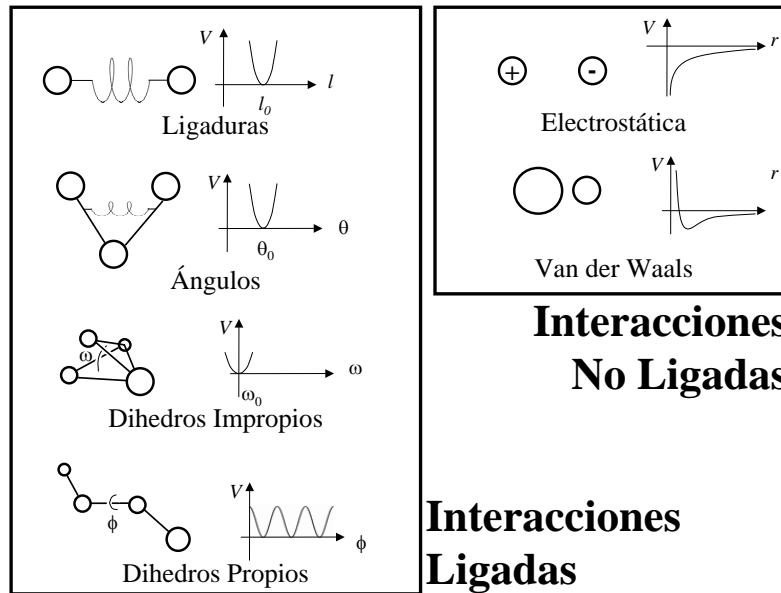


Figura 1: TÉRMINOS DE UNA FUNCIÓN ENERGÍA POTENCIAL [STEINBACH, 2004]

III.4 PROGRAMA DE DINÁMICA MOLECULAR

Típicamente el estudio mediante DM tiene tres fases:

- FASE I: Inicialización:** Se especifican las condiciones iniciales. Se describe el sistema a simular.
- FASE II: Ejecución de la Dinámica Molecular:** Se integran numéricamente las ecuaciones de movimiento que gobiernan el sistema.
- FASE III: Análisis de los resultados** Se evalúan las propiedades físicas tomando como dato la información de la trayectoria del sistema, que es la *salida* de la etapa anterior.

III.5 FASE I: INICIALIZACIÓN

§ III.5.1 Topología. Una vez definido el modelo, es decir, el conjunto estadístico y el potencial de interacción entre otros, se describe el sistema en cuestión. Se especifica sobre cuáles átomos y combinaciones de átomos se deben aplicar las diferentes

contribuciones a la función de energía potencial. Debe conocer cuáles son los valores de los parámetros de las formas funcionales, (por ejemplo: cargas parciales, radios atómicos, longitudes de enlaces, ángulos dihedros, y demás parámetros ligados del potencial). En lo que respecta a parámetros de estado, se prescriben según corresponda la temperatura, el volumen, la presión, la densidad, etc. La topología propiamente dicha no comprende la especificación de los atributos dinámicos (posición, velocidad, ...). Por lo tanto, salvo excepciones (como experiencias realizadas en la Universidad de La Plata [Marañón, 1998]) se puede decir que la DM realiza simulaciones *a topología constante*.

§ III.5.2 Condiciones iniciales y condiciones de borde. La especificación de las condiciones iniciales para la posición y la velocidad de cada partícula puede realizarse en una variedad de formas, dependiendo de las características del sistema a simular. En el caso de una proteína se suelen tomar las posiciones iniciales como sus posiciones cristalográficas. Para el caso de estructuras no resueltas experimentalmente (sea por difracción de Rayos X o por Resonancia Magnética Nuclear), se pueden generar las coordenadas iniciales por medios computacionales (un ejemplo en esta tesis es el caso de las membranas biológicas [Tieleman, 1996] [Pandit, 2002]). Estos datos pueden ser propios, o pueden obtenerse de bases de datos tales como el *Protein Data Bank* [Berman, 2000].

Las velocidades iniciales se especifican generalmente asignándoles a cada partícula una velocidad escogida al azar de una distribución de Maxwell-Boltzmann a la temperatura deseada:

$$P(\mathbf{v}_i) = \frac{m_i}{2\pi kT} \exp\left(-\frac{m_i \mathbf{v}_i^2}{2kT}\right) \quad (4)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, \mathbf{v}_i la velocidad y m_i la masa de la partícula i -ésima.

En la figura 2 vemos el gráfico de una distribución maxwelliana del módulo de las velocidades.

Para obtener esto se generan los números distribuidos normalmente sumando doce números al azar distribuidos uniformemente en el intervalo [0;1], y restando el número 6.0 de su suma. El resultado se multiplica por la desviación estándar de la distribución: $\sqrt{kT/m_i}$. La correcta elección de las condiciones de borde es otro aspecto que debe considerarse en la simulación.

§ III.5.3 Condiciones Periódicas de Contorno. Una manera usual de minimizar los efectos de la frontera en una simulación finita de una porción de un sistema extenso es utilizar las Condiciones Periódicas de Contorno (PBC). Los átomos del sistema a simular son colocados en una caja poliédrica que “llena el espacio” (o sea

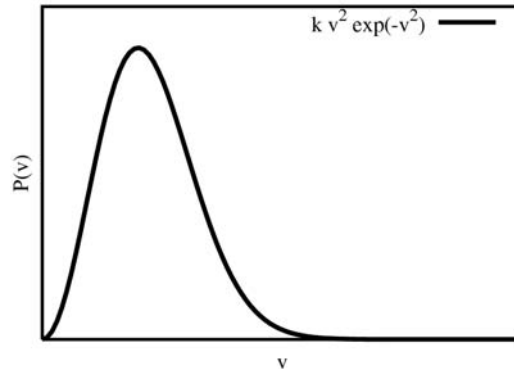


Figura 2: UNA DISTRIBUCIÓN MAXWELLIANA GENERADA MEDIANTE NÚMEROS ALEATORIOS

que el espacio normal de tres dimensiones puede ser particionado en estas cajas, todas copias trasladadas de una original). En la figura 3 vemos una representación bidimensional. De este modo se eliminan las fronteras del sistema simulado al precio de reemplazarlas por una periodicidad inexistente en el sistema original. Esta dificultad no aparece en el estudio de sistemas cristalinos, por ejemplo sólidos, donde dicha periodicidad existe naturalmente.

Por el contrario, si se desea simular sistemas no periódicos tales como líquidos

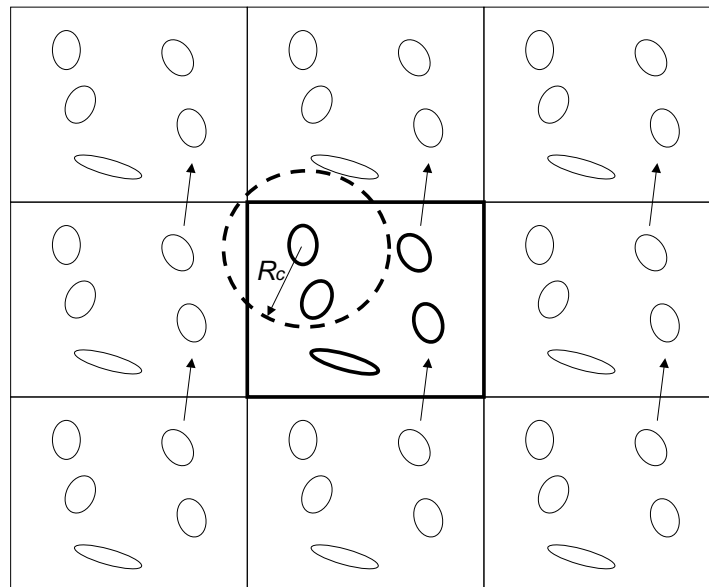


Figura 3: CONDICIONES PERIÓDICAS DE CONTORNO EN 2D

o soluciones, se deberá tener en cuenta la aparición de errores debido a la imposición de una periodicidad extraña. Una manera de evaluar estos errores es estudiar el efecto de la variación del tamaño del sistema (generalmente caracterizado por el número de partículas N). Usualmente estos efectos son menores que las simulaciones sin PBC.

Hay varias opciones para la forma de la caja, tales que llenen el espacio. A lo largo de esta tesis utilizaremos las cajas cúbicas, que son las de mayor sencillez aunque no las de menor costo computacional.

III.6 FASE II: EJECUCIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR

§ III.6.1 Algoritmo. Una parte central de todo programa de DM lo constituye el algoritmo de integración. Dadas las posiciones y velocidades iniciales a un tiempo inicial t_0 , la tarea del algoritmo es entregar las posiciones y velocidades al tiempo $t_0 + \Delta t$.

En lo que sigue revisaremos el formalismo básico de la DM en el conjunto microcanónico. En este caso las variables termodinámicas que se mantienen constantes son el número de partículas N , el volumen V y la energía interna E .

La dinámica de este sistema está gobernada por las ecuaciones de Newton

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla V, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (5)$$

con la convención usual de símbolos. Estas son un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas, no lineales, de segundo orden. Ellas deben ser resueltas numéricamente.

Cuando las fuerzas entre las partículas son conservativas el Hamiltoniano \mathcal{H} es una constante de movimiento y la energía total se conserva:

$$E = K + V \quad (6)$$

Notemos que generalmente en Dinámica Molecular el impulso también es una cantidad conservada cuando las paredes del recipiente son reemplazadas por condiciones de borde periódicas (PBC). Esto significa que existe una ligadura adicional, que se reflejará en las propiedades termodinámicas calculadas en la simulación. Sin embargo, tales efectos son despreciables para sistemas de más de cien partículas [Lado, 1981] [Wallace, 1983].

Existen numerosos algoritmos para integrar las ecuaciones de Newton. Todos ellos convierten las ecuaciones diferenciales en ecuaciones en diferencias finitas.

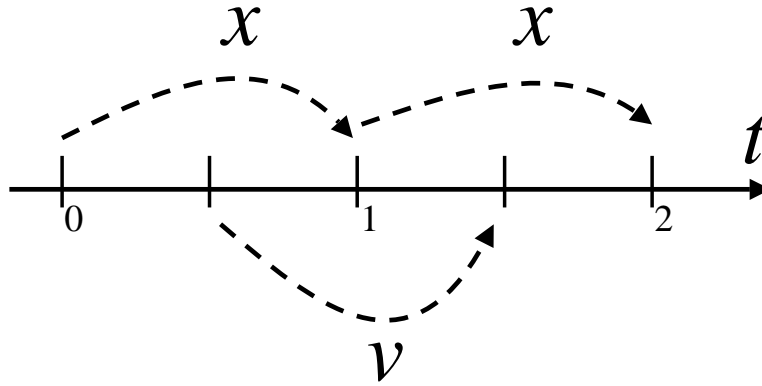


Figura 4: ALGORITMO LEAP-FROG

En DM la elección del algoritmo es (nuevamente) un compromiso entre el grado de precisión requerido y el costo computacional. Utilizamos aquí el algoritmo *leap-frog* [Hockney, 1974] (ver la figura 4) que es equivalente al algoritmo de Verlet. Para deducirlo, partimos del desarrollo en serie de Taylor de $\mathbf{r}(t)$,

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)(\Delta t)^2 + \dots \quad (7)$$

donde la aceleración es $\mathbf{a}(t) = \mathbf{F}(t)/m$. Del mismo modo,

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)(\Delta t)^2 + \dots \quad (8)$$

Sumando ambos desarrollos, obtenemos

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) + \mathbf{r}(t - \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) + \mathbf{a}(t)(\Delta t)^2 + O((\Delta t)^4) \quad (9)$$

Así, la nueva posición \mathbf{r} buscada, en el tiempo $t + \Delta t$, viene dada por

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) \approx 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \mathbf{a}(t)(\Delta t)^2 \quad (10)$$

El error estimado que contiene la nueva posición \mathbf{r} es del orden de Δt^4 , donde Δt es el paso de tiempo (o paso de integración) en la simulación de DM. Nótese que para evaluar la nueva posición $\mathbf{r}(t + \Delta t)$ sólo necesitamos conocer la posición anterior (en $t - \Delta t$) y la aceleración en el tiempo t ; no se necesita la velocidad.

Sin embargo, ésta la podemos calcular a partir de

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) = 2\mathbf{v}(t)\Delta t + O((\Delta t)^3) \quad (11)$$

de donde

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O((\Delta t)^2) \quad (12)$$

Como se ve, el error en la velocidad es del orden Δt^2 .

Veamos en el siguiente cuadro la forma general de un algoritmo de Dinámica Molecular:

1. Se leen los parámetros que especifican las condiciones de la corrida: Temperatura inicial, el número de partículas, la densidad, el intervalo de integración Δt , tiempo total de simulación, ...
2. Se inicializa el sistema, esto es, se asignan las posiciones y las velocidades iniciales de todas las partículas del sistema. Se leen los parámetros del potencial $V(\mathbf{r})$.
Deben repetirse los siguientes pasos, hasta llegar al último paso:
3. Se calculan las fuerzas sobre todas los átomos no ligados, $F_i = \partial V / \partial r_i$, $F_i = \sum_j F_{ij}$ más las fuerzas debidas a todas las interacciones ligadas, que pueden depender de 1, 2, 3 o 4 átomos. Se calculan las restricciones, o fuerzas externas si las hubiera. Se calculan las energías cinéticas y el tensor de presiones.
4. El movimiento en el instante de cada átomo se obtiene resolviendo numéricamente las ecuaciones de Newton.
5. Si corresponde se imprimen las posiciones, velocidades, fuerzas, energías, presiones.

III.7 EVALUACIÓN DE LA ENERGÍA POTENCIAL

La evaluación de la energía potencial y las fuerzas es la parte más costosa, en términos de tiempo de computación en una simulación. De hecho, el tiempo que se ocupa en integrar las ecuaciones es casi despreciable al lado de éste. Para un sistema de N partículas, evaluar en forma directa la interacción de dos cuerpos requiere $O(N^2)$

de operaciones, mientras que evaluar la parte de tres cuerpos requiere en principio $O(N^3)$ de operaciones. De allí la necesidad de elaborar técnicas que permitan ahorrar tiempo en esta tarea.

§ III.7.1 Radio de Corte para el potencial. Supongamos que tenemos un sistema de N partículas interactuando a través de un potencial de pares con PBC y necesitamos evaluar la energía potencial y la fuerza sobre una cierta partícula i . Representemos esta situación por medio de una “supercelda” consistente en la caja de simulación rodeada por sus imágenes, como se muestra en la Figura 3 de la página 37. La fuerza sobre la partícula i corresponde a la suma sobre sus $N - 1$ vecinos de la caja. Pero, debido a las PBC, deberíamos también sumar sobre sus imágenes. Una manera de hacer esto es mediante la convención de mínima imagen: a partir de la partícula i se construye una caja imaginaria de igual dimensión y forma que la caja de simulación, y se suma sólo sobre las partículas dentro de ella. En todo caso el alcance del potencial debe ser menor que la mitad de la longitud de la caja (ya que de lo contrario una partícula interactuaría más de una vez con el resto). Esto último permite dar una idea de las dimensiones mínimas de la caja de simulación (y por tanto del número de partículas) a emplear en relación al potencial usado. La contribución principal a la energía y a las fuerzas sobre una partícula provienen de sus vecinos más cercanos. Una aproximación consiste en utilizar potenciales de corto alcance, introduciendo un corte (*cutoff*), R_c , más allá del cual el potencial es nulo. Para asegurar que las fuerzas y la energía potencial tiendan suavemente a cero en $r = R_c$ se puede usar una función de “encendido” que elimine la discontinuidad en la derivada del potencial (o sea la fuerza).

De este modo, la suma ya no se realiza sobre los $N - 1$ vecinos, sino que queda restringida a los que están dentro de la “esfera de influencia del potencial” de radio R_c , como se muestra en la Figura 3.

El programa GROMACS utiliza la convención de la ‘imagen más cercana’:

- al calcular las interacciones de *corto alcance* se tendrá en cuenta *solamente* la imagen más cercana de todas las correspondientes a una partícula.
- En el caso de las interacciones electrostáticas de *largo alcance*, esto no siempre es lo suficientemente exacto, y por tanto se utilizan otros métodos de cálculo como Campo de Reacción, Sumas de Ewald o PME (ver sección III.7.2)

§ III.7.2 Problema del potencial Coulombiano. La solución anterior introduce serios artificios en las simulaciones que posean partículas con carga no nula. Esto es debido a que el potencial coulombiano es de largo alcance y no puede representarse adecuadamente por *ningún* potencial truncado.

Se debe evaluar la contribución a la energía del potencial coulombiano:

$$V = k \sum_{nx} \sum_{ny} \sum_{nz} \sum_i \sum_j q_i q_j / r_{ij,\mathbf{n}} \quad (13)$$

donde $(nx, ny, nz) = \mathbf{n}$ es el índice del vector de la caja, y en la suma deben omitirse los términos $i = j$ cuando $(nx, ny, nz) = (0, 0, 0)$. $r_{ij,\mathbf{n}}$ es la distancia real entre las partículas y no la de mínima imagen. Esta suma es condicionalmente convergente y de modo muy lento.

Se han propuesto varias alternativas para este cálculo:

Sumas de Ewald: Fue introducida primero en sólidos cristalinos [Ewald, 1921].

Básicamente la idea es convertir la suma lentamente convergente de la ecuación (13) en combinaciones de sumas en el espacio recíproco y en el espacio real. Lamentablemente el costo computacional de la suma en el espacio recíproco se incrementa como $O(N^2)$, lo cual es inaceptable para sistemas grandes.

Campo de Reacción: [Schreiber, 1992] En este método se asume que cualquier molécula está rodeada por una *cavidad* esférica de radio finito. Dentro de la cavidad las interacciones electrostáticas se calculan explícitamente. Fuera de la cavidad el sistema es *reemplazado* por un dieléctrico continuo. Cualquier dipolo neto que ocurra dentro de la cavidad induce una polarización en el dieléctrico, la cual a su vez interactúa con la partícula dada. El modelo permite reemplazar la suma infinita de Coulomb por una suma finita más un término de Campo de Reacción. Una gran ventaja es que no impone ninguna periodicidad extraña al sistema.

PME: (*particle mesh ewald*) Apareció en la década del 90. Es más eficiente que el tradicional algoritmo de Ewald. Fue propuesto por Darden para mejorar la eficiencia de la suma en el espacio recíproco. En vez de directamente sumar sobre vectores de onda, las cargas se asignan a un reticulado mediante una interpolación. Se le aplica una transformación rápida de Fourier, y la energía recíproca es obtenida mediante una suma única en el espacio \mathbf{k} . El potencial en los puntos del reticulado se calcula mediante la transformada inversa y mediante los factores de interpolación obtenemos las fuerzas en cada átomo [Darden, 1993]. Este algoritmo es $O(N \log(N))$ lo cual es mucho mejor que el Ewald. Se debe hacer notar que este tipo de técnicas introduce (al igual que las PBC) una periodicidad inexistente en el sistema original (para líquidos o soluciones). No se ha evaluado aún propiamente el impacto que pueda tener esta forma de sumar el campo sobre el sistema simulado, específicamente el efecto que pueda tener el carácter de *periodicidad* que introduce (problema que también posee el método original de Ewald).

§ III.7.3 Lista de vecinos . El tiempo de computación que hemos ahorrado proviene de que la evaluación de la energía y la fuerza no se hace para $N - 1$ partículas, sino para un número mucho menor. Sin embargo, para saber cuales partículas son las que están a distancia mayor del corte, y por tanto no contribuyen ni a la energía ni a la fuerza, debemos examinar, en cada paso de computación, la distancia entre todos los pares de partículas. El tiempo de esta operación es proporcional a N^2 .

Para reducir este tiempo, Verlet ideó un sistema de lista de vecinos de cada partícula, que se renueva cada cierto número de pasos. El método supone que los vecinos con los cuales interactúa la partícula i , o sea aquellos que están dentro de la esfera de radio R_c (ver Figura 3) no varían mucho entre paso y paso de integración. A lo sumo cada cierto número de pasos, digamos 30 por ejemplo, algunas partículas entran y otras salen, quedando a distancias menores que R_c . Lo que propuso Verlet fue hacer una lista, para cada partícula, de todos los vecinos que están dentro de su esfera de radio R_c , y así en vez de examinar la distancia de la partícula i con todas las $N - 1$ restantes, se examinan esas distancias sólo con las partículas de su lista. Esta lista se contruye cada cierto número de pasos. El ahorro con este método es significativo para sistemas de entre 500 a 5000 partículas, para los cuales el tiempo por paso de simulación baja prácticamente a la mitad [Verlet, 1967].

III.8 FASE III: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Este se realiza comúnmente tomando promedios temporales sobre las diferentes configuraciones. Los valores medios así obtenidos, considerados durante un tiempo suficientemente largo, representan promedios termodinámicos suponiendo un comportamiento ergódico del sistema.

En el caso de la presente tesis se estudian propiedades microscópicas de interés tales como: distancia entre átomos, superficie expuesta al solvente, desvíos cuadráticos medios.

§ III.8.1 Area Expuesta al Solvente. La herramienta `G_SAS` (parte del paquete GROMACS), calcula el área expuesta al solvente mediante el procedimiento de permitir “rodar” una esfera de 0.14nm sobre la superficie generada por las esferas de van der Waals del conjunto de átomos del sistema. Esta herramienta asimismo permite discriminar entre las áreas por residuo, o entre las expuestas hidrofílicas e hidrofóbicas. Mediante un trabajo de programación adicional se extrae la información en “ventanas” móviles de determinado número de pasos de simulación a fin de seguir su evolución temporal.

§ III.8.2 Radio de Giro. Se define tradicionalmente en Física para un objeto sólido de masa M con respecto a un eje O como la distancia a la cual hay que colocar una partícula de la misma masa M respecto del mismo eje O para que tenga el mismo momento de Inercia que el objeto original. Mide el grado de dispersión promedio que tiene la distribución de masa respecto del eje.

Aquí se *modifica* levemente la definición reemplazando la distancia al eje por la distancia al Centro de Masa. Así, resulta una medida de la compacidad de una estructura macromolecular. A mayor radio de giro, menos compacta la estructura es. Esta magnitud es utilizada en la ciencia de polímeros, y está dada por

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{CM}|^2 m_i}{\sum_{i=1}^N m_i}} \quad (14)$$

donde m_i es la masa de la partícula i -ésima, \mathbf{r}_i es la posición de la misma y \mathbf{r}_{CM} es la posición del centro de masa del sistema.

Interesa notar que esta cantidad se puede obtener por métodos experimentales tales como Cristalografía de Rayos X, Dispersión a pequeños ángulos (SAS) [Casadio, 1999].

§ III.8.3 Distancias Interatómicas. Para analizar las distancias entre átomos se utilizó la herramienta `G_DIST` del `gromacs`, combinada con scripts realizados localmente, para estudiar la evolución temporal de las mismas y compararlas con la estructura de NMR de referencia.

§ III.8.4 Desplazamiento Cuadrático Medio. Se utilizó la herramienta `G_RMS` para calcular esta característica. Esta compara dos estructuras mediante el cómputo de la RMSD. La RMSD de un grupo de átomos en una molécula en el tiempo t con respecto a una estructura de referencia (típicamente en un tiempo t_0) se obtiene ajustando mediante cuadrados mínimos la estructura en t a la misma en t_0 . Luego se calcula la cantidad:

$$\text{RMSD}(t, t_0) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t_0)|^2} \quad (15)$$

donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ es la masa total, y $\mathbf{r}_i(t)$ es la posición de la misma en el tiempo t . Generalmente se elige un subconjunto conveniente de los grados de libertad de una estructura para su ajuste. Si se trata de una proteína se pueden elegir los carbonos- α , o el “esqueleto” de la misma.

§ III.8.5 Estudio de Puentes de Hidrógeno. Se utilizó la herramienta `G_HBOND` que devuelve el número de puentes en función del tiempo, las distribuciones de longitudes y ángulos de los puentes, y las autocorrelaciones.

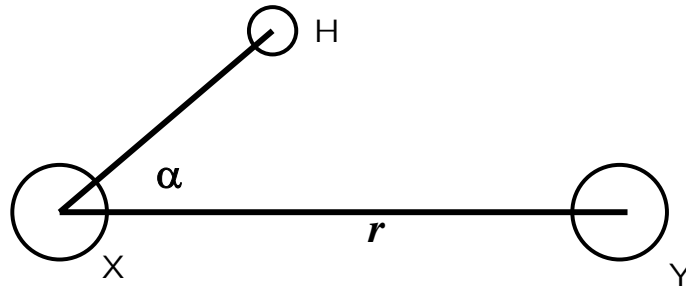


Figura 5: CRITERIO PARA DETERMINAR LA EXISTENCIA DE UN PUENTE DE HIDRÓGENO (VER CAPÍTULO 8 DEL MANUAL DE GROMACS 3.2 [VAN DER SPOEL, 2004])

El *criterio* utilizado para determinar si una terna de átomos del tipo X(donor)–H–Y(aceptor) es efectivamente un puente de hidrógeno es *geométrico* (ver figura 5). Conviene notar que esta definición equivale para agua líquida normal (a $T=298\text{K}$ y $p=.1\text{ MPa}$) al criterio denominado *energético* [Kalinichev 1994 pág. 305].

1. Distancia X–Y $< 3.5 \text{ \AA}$ y
2. Angulo H–X–Y < 60 grados.

FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN $C_{HB}(t)$: Esta función es independiente de la historia del sistema ya que opera mediante un mecanismo de cálculo de “ventanas temporales móviles” y expresa la probabilidad de que un par de moléculas elegidas al azar estén unidas en el tiempo $t_0 + t$ supuesto que están unidas en t_0 . Formalmente se obtiene por la ecuación:

$$C_{HB}(t) = \frac{\langle \Delta h(0) \cdot \Delta h(t) \rangle}{\Delta h^2} \quad (16)$$

donde $\Delta h(t) = h(t) - \langle h \rangle$, los signos $\langle \dots \rangle$ indican promedio sobre todos los posibles pares y la función $h_{ij}(t)$ vale 1 si el par $i - j$ de átomos están unidos en el tiempo t , y 0 si no lo están. Como todas las funciones de autocorrelación, se cumple que $C_{HB}(0) = 1$ y $C_{HB}(t) \rightarrow 0$ si $t \rightarrow \infty$.

III.9 EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA TÉCNICA DE DINÁMICA BROWNIANA O LANGEVIN (BD)

Describiremos esta técnica según las referencias [Van Gunsteren, 1978] [Shin Yun Yu, 1988] [Van Gunsteren, 1988]. Se recomienda sobre el tema ver el capítulo 9 de [Allen, 1987].

§ III.9.1 Introducción. La dinámica estocástica (BD o SD) constituye un método computacional para obtener un conjunto canónico [Hess, 2002]. En la BD, se incorpora una fuerza de roce proporcional a la velocidad a la fuerza conservativa. La fricción remueve energía cinética del sistema. Mientras tanto aparece una fuerza estocástica que aporta energía cinética al sistema. Para generar un conjunto canónico, ambas fuerzas deben obedecer el teorema fluctuación–disipación [Allen, 1987].

En general una dinámica de Langevin aparece a partir de un sistema clásico, al *remover grados de libertad*. Los grados de libertad que son eliminados ejercen, fuerzas conservativas y de roce sobre el resto del sistema. Todas las demás fuerzas se considerarán que contribuyen como una fuerza al azar. El ejemplo clásico es una partícula coloidal en un solvente, cuando consideramos sólo los grados de libertad de la partícula coloidal, estaremos haciendo un modelo de Langevin. Las fuerzas de roce y la fuerza al azar serán causadas por las *colisiones* de las moléculas del solvente contra la partícula coloidal.

Nota sobre la nomenclatura: En muchos trabajos de la literatura se denomina *Dinámica de Langevin* o estocástica a la formulación general que describiremos a continuación, y se reserva el nombre Dinámica Browniana para el límite de fricción suficientemente grande, cuando las correlaciones en la velocidad decaen en un período en el cual los cambios en la fuerza son despreciables. Tal sistema se denomina *sobreamortiguado*. En este caso el sistema se regirá por un conjunto acoplado de ecuaciones diferenciales de primer orden. En esta tesis, la denominaremos *indistintamente* Dinámica Browniana (DB), Estocástica (SD) o de Langevin [Turq, 1977].

§ III.9.2 Motivación. Al modelar sistemas macromoleculares mediante DM, se presentan limitaciones prácticas debidas a la capacidad computacional disponible. Esto impulsa la búsqueda de métodos que permitan reducir al máximo el número de grados de libertad, reteniendo no obstante la descripción significativa del fenómeno de interés. Dos modos usuales de hacer esto son:

La Dinámica restringida: Consiste en restringir los grados de libertad de alta frecuencia de movimiento, y así eliminarlos directamente de la dinámica. De este modo se puede incrementar el paso de simulación.

Dinámica Estocástica (SD): Se ignoran los grados de libertad menos relevantes y su influencia en el resto del sistema se aproxima por una combinación de interacciones de fuerza media, fuerzas estocásticas y fuerzas de roce.

Cuando se simula una macromolécula en solución el foco de interés no está en los detalles de movimiento de las moléculas de solvente. Sin embargo el número de átomos del solvente suele ser un orden de magnitud mayor que el de átomos de so-

luto. Se desea por tanto eliminar esos grados de libertad no interesantes, reteniendo su efecto sobre el soluto. Esta influencia se puede dividir en tres tipos:

1. La interacción promedio entre átomos de soluto está afectada por la presencia del solvente.
2. Los átomos de soluto experimentan una fuerza de fricción debida al solvente.
3. Aparece una fuerza aleatoria sobre los átomos de soluto debida a las colisiones de ellos con los átomos de solvente.

Sea α el índice que corre sobre los átomos de solvente y i el índice que corre sobre los átomos de soluto. Sea $V_m(\{x_i\})$ la función energía potencial media entre átomos de soluto o potencial de fuerza media (donde x_i representa las coordenadas x, y o z de los átomos del sistema). Esta incorpora los efectos del solvente mediante un promedio sobre las coordenadas α . Por tanto:

$$V_m(\{x_i\}) = \langle V(\{x_i\}, \{x_\alpha\}) \rangle_\alpha \quad (17)$$

Los otros efectos se tienen en cuenta *modificando* las ecuaciones del movimiento de Newton (5) de la página 38. Esto resulta en una dinámica diferente, regida por la ecuación de *Langevin* que regula la evolución del sistema cuyos resultados se reportan en el capítulo IV de esta tesis:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(\{x_i\}) - m_i \gamma_i \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} + \mathbf{R}_i, \quad i = 1, 2, \dots, N_p \quad (18)$$

donde γ_i es el *coeficiente de roce atómico*, \mathbf{F}_i es la fuerza *sistemática* que se deriva del potencial $-\nabla V_m(\{x_i\})$, N_p es el número de átomos de soluto, y \mathbf{R}_i es la fuerza *aleatoria*, que se supone una variable aleatoria distribuida normalmente con media cero, sin correlación con las velocidades previas, ni con la fuerza sistemática. El ancho de la distribución gaussiana está relacionado con el coeficiente γ_i , por medio de:

$$\langle \mathbf{R}_i(0) \mathbf{R}_j(t) \rangle = 2m_i \gamma_i k T_{ref} \delta_{ij} \delta(t) \quad (19)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T_{ref} es la temperatura de referencia del baño de solvente, δ_{ij} es la delta de Kroenecker y $\delta(t)$ es la delta de Dirac.

La elección de los coeficientes γ_i más apropiados dependerá en general del tipo de sistema considerado. Para pequeños solutos tales como butano o decano, γ_i podrá ser tomado igual para todos los átomos de soluto, y puede ser determinado a partir de la constante de difusión molecular D_{mol} mediante las relaciones:

$$D_{mol} = \frac{k T_{ref}}{M \gamma_{mol}} \quad (20)$$

donde M es la masa molecular y tomamos $\gamma_i = \gamma_{mol}$. Los valores para D_{mol} pueden ser obtenidos a partir de tres fuentes:

1. experimentalmente,
2. por medio de una simulación mediante DM del líquido apropiado,
3. o suponiendo válida la ley de Stokes:

$$\gamma = 6\pi R_s \eta / m \quad (21)$$

donde R_s denota el radio de Stokes para un átomo y η es la viscosidad del solvente.

En una macromolécula, como una proteína, no todos los átomos del soluto estarán en contacto con el solvente. En este caso γ_i deberá depender del grado de interacción átomo i de soluto con el solvente. Una opción es suponer que γ_i es proporcional al área expuesta al solvente del átomo i -ésimo.

Al igual que las ecuaciones de Newton en la DM, la ecuación (18) se integra mediante un algoritmo numérico tipo leap–frog. Utilizamos el esquema de tercer orden de Van Gunsteren y Berendsen [Van Gunsteren, 1988]. En el límite de fricción despreciable, este esquema converge al algoritmo de integración tipo leap–frog para DM.

La utilización de una técnica de Dinámica Estocástica como una aproximación a la DM íntegra de un soluto en presencia de un solvente, resulta en una reducción del tiempo de cálculo en un factor 2–30 [Shin Yun Yu, 1988].

Sal y Agua

IV.1 INTRODUCCIÓN

§ IV.1.1 Teoría de Debye–Hückel. En el tratamiento de la interacción eléctrica en soluciones electrolíticas se observó un hito en el modelo pionero de Debye–Hückel [Debye, 1923]. No obstante sus limitaciones (se cumple estrictamente sólo en el caso de bajas concentraciones), ha tenido un éxito considerable. Avances posteriores en este campo [Blum, 1975] [Grigera, 1976] han conducido a mejoras que sin embargo, preservan las principales predicciones de la teoría original.[†]

De acuerdo con esta teoría las interacciones eléctricas sufren una modificación de acuerdo con la concentración y composición salina del medio circundante a un sistema biológico, contribuyendo fuertemente a su estabilidad [Mahler, 1969] [Tanford, 1961]. Esta predice que existe una distancia crítica más allá de la cual, *no actúa interacción eléctrica*. Los tratamientos más elaborados, por ejemplo la Aproximación Esférica Media (MSA) [Blum, 1975], muestran la relación de esta distancia característica con el tamaño finito de los iones, en mayor acuerdo con la evidencia experimental [Triolo, 1976].

Otro aspecto de importancia al analizar las fuerzas eléctricas en soluciones electrolíticas es el *comportamiento dinámico* de las cargas. Este aspecto *no puede* obtenerse mediante la aplicación de la teoría de Debye–Hückel, ni tampoco de ningún método de equilibrio, ni de ningún método que incorpore los efectos dinámicos en un “promedio estadístico” tal como el método descrito en el capítulo II.

[†]PUBLICADO COMO TRABAJO ORIGINAL BAJO LA REFERENCIA: “VALLEJO D. F. Y GRIGERA J. R. *Frequency effect on the charge screening in electrolyte solutions. Charge fluctuation and spatial oscillations studied by Brownian Dynamics simulation*. J. CHEM. PHYS. **101**, 9049(1994)”.

§ IV.1.2 Efectos dinámicos. Ya en el siglo XIX, Maxwell predijo que cuando aparecen en escena campos que oscilan en función del tiempo, existirá una frecuencia característica ω_M por debajo de la cual el sistema se comporta básicamente según la teoría de Debye, pero por sobre la cual el sistema cambiará del régimen dieléctrico hacia uno conductor [Maxwell, 1954], como veremos. Esto equivale a considerar a la solución electrolítica como un “filtro pasaaltos” de la electrónica convencional.

Al analizar las fuerzas intermoleculares en soluciones de macromoléculas –para las cuales los co-solutos son los *iones*–, vemos que una macromolécula puede tener grupos cargados que se muevan a diferentes frecuencias, algunas de las cuales pueden superar las frecuencias características de la solución. La posibilidad que el apantallamiento de carga sea eliminado a altas frecuencias, produciendo un *filtro* de las interacciones, tendría por tanto, importantísimas consecuencias en la cinética de una gran variedad de procesos.

Dado que los tratamientos dinámicos generalmente consideran un campo externo oscilante o cargas fluctuantes, debemos considerar la validez de tales resultados a un sistema en el cual las cargas vibran en lugar de fluctuar en magnitud.

En este capítulo se presentan varias simulaciones por Dinámica Browniana (ver sección III.9) que estudian el apantallamiento del campo eléctrico en casos de fluctuaciones de posición y de magnitud de carga.

IV.2 TRATAMIENTO TEÓRICO

Consideremos una solución de permitividad ϵ^* y conductividad σ^* en la cual hay una carga q . La divergencia del desplazamiento eléctrico es

$$\nabla \mathbf{D} = 4\pi[q\delta(\mathbf{r}) + \rho(\mathbf{r}, t)], \quad (1)$$

donde $\delta(\mathbf{r})$ es la delta de Dirac, y ρ es la densidad de carga de la solución. El primer término representa la contribución de la carga q y el segundo, la de la nube iónica, tratada como un continuo.

Sabemos que la densidad de corriente \mathbf{J} está relacionada al campo eléctrico \mathbf{E} por la ley de Ohm:

$$\mathbf{J} = \sigma^* \mathbf{E} \quad (2)$$

y aplicando la ecuación de continuidad obtenemos

$$-\nabla(\sigma^* \mathbf{E}) = \frac{\partial \rho}{\partial t} \quad (3)$$

Suponiendo un campo oscilante $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}) \cdot \exp(i\omega t)$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla[\sigma^* \mathbf{E}_0(\mathbf{r}) \cdot \exp(i\omega t)] \quad (4)$$

obtenemos

$$\rho = -(\sigma^*/i\omega)\nabla\mathbf{E} \quad (5)$$

Aplicando la ecuación 1, y la relación $\mathbf{D} = \epsilon^* \mathbf{E}$ obtenemos,

$$\nabla\mathbf{D} = 4\pi[q\delta(\mathbf{r}) - (\sigma^*/i\omega)\nabla\mathbf{E}], \quad (6)$$

pero por otro lado

$$\nabla\mathbf{D} = \epsilon^* \nabla\mathbf{E} \quad (7)$$

Definamos el *desplazamiento eléctrico generalizado* \mathcal{D} como el desplazamiento debido *sólo* a las cargas puntuales explícitas

$$\nabla\mathcal{D} = 4\pi q\delta(\mathbf{r}) \quad (8)$$

De la 6 y la 7, tenemos

$$4\pi q\delta(\mathbf{r}) = [\epsilon^* - (4\pi\sigma^*/i\omega)\nabla\mathbf{E}] \quad (9)$$

De donde tenemos

$$\nabla\mathcal{D} = \eta^* \nabla\mathbf{E} \quad (10)$$

aquí definimos $\eta^* = \epsilon^* - (4\pi\sigma^*/i\omega)$ como la *permitividad dieléctrica generalizada* [Bottcher, 1978].

El campo eléctrico generado por una carga $q(\omega)$ en un medio conductor como una solución electrolítica, será

$$\mathbf{E} = \Re \left\{ \frac{1}{\eta^*} \right\} \frac{q(\omega)}{4\pi r^2} \quad (11)$$

El rol de η^* es el de una permitividad *efectiva* que muestra la dependencia de la frecuencia *aún en ausencia de relajación de la permitividad y la conductividad*. En tal caso (en el que la permitividad y la conductividad son constantes en todo el dominio de las frecuencias tenemos:

$$\eta^* = \epsilon_0 + i4\pi\sigma_0/\omega \quad (12)$$

Vemos que $1/\eta^* \rightarrow 1/\epsilon_0$ si $\sigma \rightarrow 0$ (caso dieléctrico puro). Tenderá a ∞ si $\sigma \neq 0$ y $\omega \rightarrow 0$ (régimen conductor). Finalmente si $\omega \rightarrow \infty$ nuevamente ocurrirá que $1/\eta^* \rightarrow 1/\epsilon_0$ régimen dieléctrico aún en un medio conductor.

Esta teoría, consecuentemente, predice (y los experimentos lo confirman [Grigera, 1976]) que para una carga fluctuante o un campo externo fluctuante, *desaparecerá* el apantallamiento de las interacciones coulombianas, siempre que la frecuencia sea lo suficientemente alta.

Si el efecto de las cargas fluctuantes, es reproducido por *oscilaciones espaciales* esto tendría importantes consecuencias para el análisis de las interacciones eléctricas en macromoléculas. Las interacciones de las cargas serán filtradas de acuerdo con las frecuencias de sus movimientos.

Cabe notar que no sólo la teoría predice este fenómeno sino que también se ha encontrado en el IFLYSIB, evidencia experimental de este efecto [Grigera, 1989]. En la citada referencia aparecen las ecuaciones (11) y (12).

IV.3 SIMULACIONES

Se optó por el método de dinámica browniana para evitar el costo computacional de simular explícitamente el solvente acuoso (se encontrará la descripción en la sección III.9 de la página 45).

La interacción directa ión–ión fue tomada de la utilizada en [Wood, 1987] y [Turq, 1977] para el NaCl:

$$U^{\alpha\beta}(r) = \frac{q^\alpha q^\beta}{\epsilon r} + \frac{C_{12}^{\alpha\beta}}{r^{12}}, \quad (13)$$

donde los índices α y β corren sobre las especies iónicas Na, Cl, q^α es la carga iónica ϵ es la permitividad del solvente que fue tomada 78,54 y $C_{12}^{\alpha\beta} = (e^2/12)(r_\alpha^* r_\beta^*)$, con e la carga electrónica, y r_α^* el radio iónico de Pauling de la especie α

§ IV.3.1 Configuración Inicial de la Simulación. Se incluyeron 216 iones en una celda cúbica del tamaño apropiado para obtener la concentración requerida. El radio de corte fue siempre elegido como la mitad de la longitud de un lado de la caja. Para 0.5 mol/l, por ejemplo el lado de la caja fue de 7.05 nm.

§ IV.3.2 Criterio de Equilibrio. Se utilizaron los dos criterios clásicos: a) la constancia de la energía potencial, y b) la regularidad de la función de distribución radial de a pares $g^{\alpha\beta}$. De acuerdo con estos criterios el equilibrio se alcanza luego de los 40 ps de simulación.

IV.4 CÓDIGO FORTRAN

Se utilizó básicamente el paquete de simulación GROMOS87 [Van Gunsteren, 1987]. En el mismo se realizaron varias modificaciones del programa PROSD.F, agregándole las condiciones de contorno periódicas,

§ IV.4.1 Cálculo del Campo Eléctrico. Se desarrolló un programa de análisis del campo eléctrico PROER.F cuyos datos de entrada son básicamente las trayectorias de dinámica molecular producidas por PROSD.F y recalcula el campo eléctrico. Para realizar esto se diseñó un algoritmo basado en la idea del Teorema de Gauss.

1. Se selecciona un ión central arbitrario de referencia
2. Se construye una sucesión de esferas concéntricas centradas en el mismo, de radios equiespaciados.
3. Para cada esfera se seleccionaron 200 puntos regularmente distribuidos en la superficie.
4. Para cada punto se calcula el campo eléctrico debido a los *iones internos* a la esfera.
5. Se promedia sobre los 200 puntos.
6. Se tabula así función $E_r(r)$ que muestra la componente radial del campo eléctrico en función de la distancia.
7. Luego de todo esto se promedia sobre todas las configuraciones disponibles en la trayectoria.

§ IV.4.2 Cálculo de las Fuerzas. Para las cargas oscilantes espacialmente, se calcularon las fuerzas seleccionando un par de iones. A uno de ellos se le aplicó una restricción en la posición y el otro fue lentamente “arrastrado” hacia afuera. La fuerza sobre el par fue obtenida como la suma de todas las contribuciones de los iones dentro de la esfera centrada en el ión fijo con un radio igual a la distancia ión–ión. Las posiciones de los iones fueron controladas mediante un potencial armónico.

IV.5 RESULTADOS: CAMPO ELÉCTRICO

La figura 1 muestra el campo eléctrico (en adelante nos referiremos así a la *componente radial*, la otra desaparece prácticamente en el promedio.) Vemos que el campo está fuertemente apantallado para $r > \lambda_D = 1/\kappa_D$ donde κ_D es la recíproca de la longitud de Debye, para la dada concentración. Para este caso tenemos un valor teórico de aproximadamente $\lambda_D = 0,4nm$.

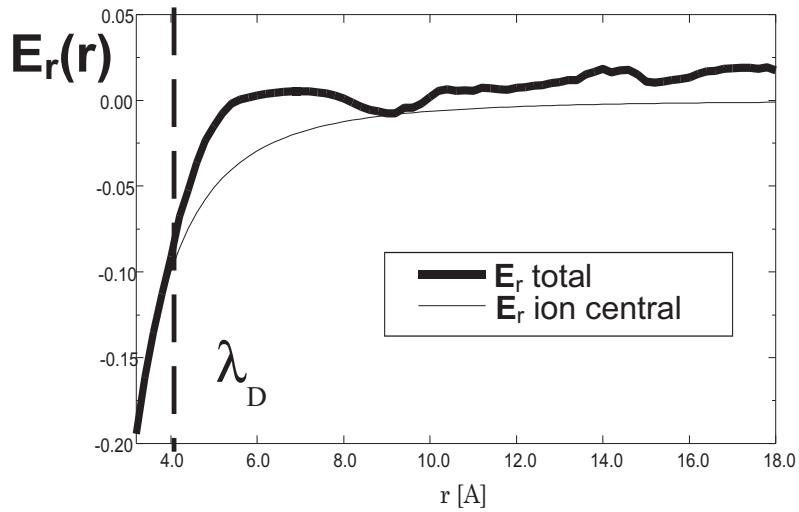


Figura 1: CAMPO ELÉCTRICO EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA. LA LÍNEA GRUESA MUESTRA EL CAMPO PRODUCIDO POR UN IÓN EN SOLUCIÓN, EN EQUILIBRIO. λ_D DENOTA LA LONGITUD DE DEBYE CORRESPONDIENTE A LA SOLUCIÓN SIMULADA. LA LÍNEA FINA MUESTRA EL VALOR TEÓRICO DEL CAMPO ELÉCTRICO PRODUCIDO POR UN IÓN AISLADO EN UN MEDIO DE $\epsilon_0 = 78,54$

§ IV.5.1 Fluctuación de Carga. Se reemplazó la carga de uno de los iones en la solución por la expresión

$$q(t) = q_0 \cos(\omega t) \quad (14)$$

donde q_0 es la carga original del ión. La frecuencia ω fue elegida igual a $1/10\Delta t$, donde Δt es el paso temporal de simulación. Esto equivale a una frecuencia de 314 THz. La frecuencia experimental de Maxwell para una solución acuosa al 0,5 mol/l de NaCl es aproximadamente 76 MHz. Esto implica que la simulación fue llevada a cabo en el régimen dieléctrico.

La configuración obtenida para la solución regular fue utilizada como configuración inicial para las simulaciones con carga fluctuante. Se le aplicó un “golpe térmico” al sistema (una elevación de temperatura destinada a la decorrelación del estado del sistema) y se realizó una corrida de equilibración de 50 ps que fue luego descartada. Luego se corrieron las simulaciones de producción. De estas últimas trayectorias se volvió a calcular el campo eléctrico. En la figura 2 se ve el campo eléctrico alrededor de un ión de carga fluctuante. La curva del campo calculado se acerca a la curva r^{-2} y el apantallamiento disminuye. Ya no existe la separación alrededor del punto $r = \lambda_D$. Este “desapantallamiento” que está en acuerdo con la predicción teórica, es sin embargo un caso artificial dado que la carga *cambia en valor y en signo*, comportamiento lejano a la realidad.

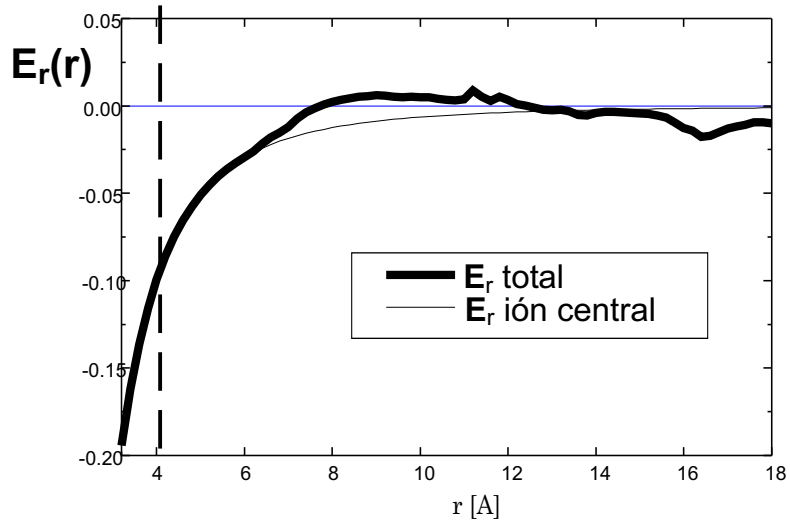


Figura 2: CAMPO ELÉCTRICO DE UNA CARGA OSCILANTE $q(t) = q_0 \cos(\omega t)$ (LÍNEA GRUESA) EN LA MISMA SOLUCIÓN QUE LA FIGURA 1 COMPARADA CON LA CARGA AISLADA (LÍNEA FINA).

§ IV.5.2 Oscilaciones en la Posición. En la siguiente fase consideramos el caso de las fluctuaciones espaciales, para modelar un caso más cercano al físico. Se aplicó una restricción de la forma

$$\mathbf{r}(t) = \mathbf{r}_0 + \mathbf{r}_A \cos(\omega t) \quad (15)$$

donde la frecuencia fue elegida igual al caso anterior, \mathbf{r}_0 es la posición del ión en la configuración inicial, y la amplitud del movimiento está dada por el vector $\mathbf{r}_A = (0, 0, 1)$. El resultado se muestra en la figura 3. Nuevamente el apantallamiento desaparece en este caso, obteniéndose una situación similar al caso de la carga fluctuante.

IV.6 RESULTADOS: FUERZA ELÉCTRICA

Las características del campo eléctrico obtenidas por simulación están de acuerdo con las predicciones teóricas [Maxwell, 1954]. Sin embargo aparecen interrogantes relacionados con las fuerzas. Una carga móvil (o fluctuante) perderá su nube iónica de carga opuesta (predicha por Debye), eliminando así el efecto de apantallamiento (siempre que la frecuencia del movimiento sea mayor que la característica de Debye). Por otro lado, las otras cargas también tendrán su propia nube iónica que conservarán o no de acuerdo con el criterio ya mencionado. Surge entonces la pregunta acerca de cuál será la interacción entre una carga móvil muy rápida,

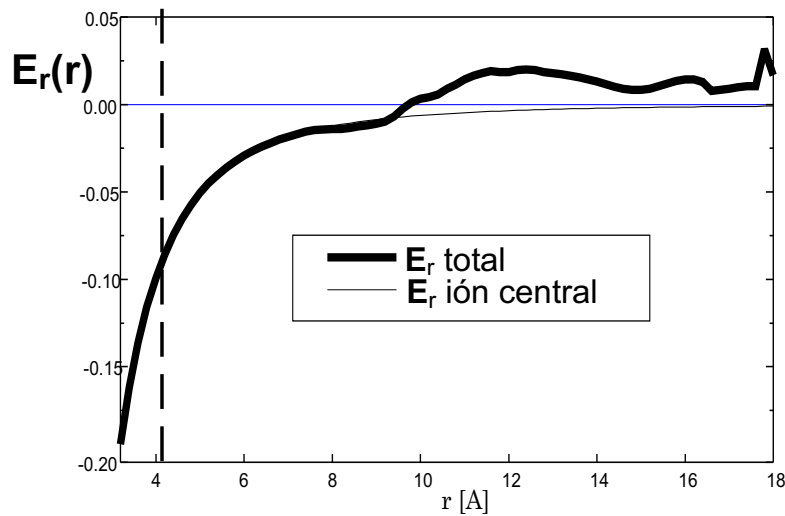


Figura 3: IDEM FIGURA 2 PARA UNA CARGA MOVIÉNDOSE CON LA LEY $\mathbf{r}(t) = \mathbf{r}_0 + \mathbf{r}_A \cos(\omega t)$ CON LA MISMA FRECUENCIA.

desapantallada con un ión libre que difunde en la solución. Cuando dos cargas fluctúan o se mueven rápido, tendrán ambas su propia frecuencia. Esto puede presentar efectos de resonancia cuando las frecuencias son iguales.

Hemos explorado tres casos:

- a) Dos cargas libres.
- b) Una carga vibrante y la otra fija.
- c) Dos cargas vibrantes a la misma frecuencia.

§ IV.6.1 Dos cargas libres. Los resultados se ilustran en la figura 4 Aquí vemos que la fuerza es cero si $r < 0,7nm$. Esto se debe a que no existen iones a menos de esa distancia para el cálculo de las fuerzas.

§ IV.6.2 Una carga fija y otra oscilante. En este caso, donde una de las dos cargas vibra a una frecuencia ω superior a la frecuencia de Maxwell, obtenemos el resultado que se muestra en la figura 5.

§ IV.6.3 Distancias. ESTUDIO DE LAS DISTANCIAS. En este caso, comenzamos de la misma configuración hemos corrido en paralelo dos simulaciones.

- a) con un ión i oscilante y otro j en difusión libre.
- b) la otra con los mismos iones i y j , pero ambos en difusión libre. Esta corrida fue denominada “de referencia” o ref.

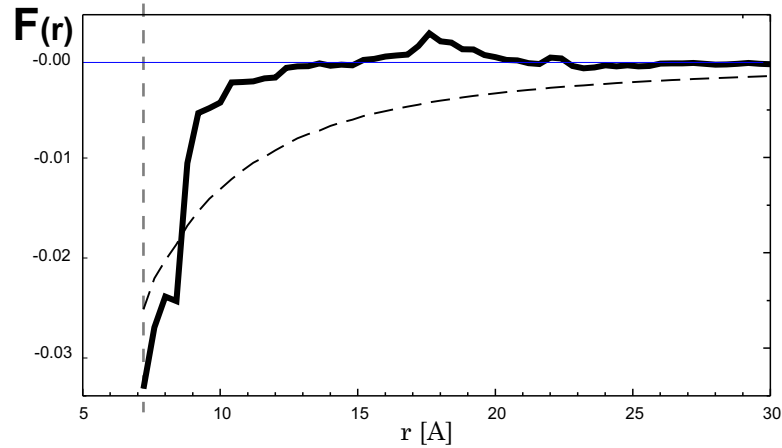


Figura 4: FUERZA ELÉCTRICA ENTRE DOS IONES EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA. LA LÍNEA LLENA MUESTRA LA FUERZA ENTRE IONES Y LA LÍNEA GUIONADA LA CORRESPONDIENTE FUERZA COULOMBIANA PURA. A DISTANCIAS MENORES QUE 0,7 NM NO HUBO IONES PARA CALCULAR LA FUERZA.

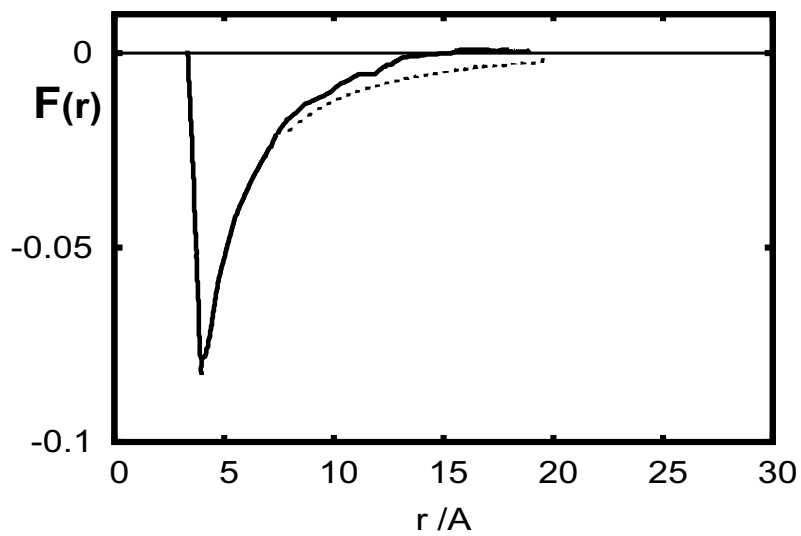


Figura 5: FUERZA ELÉCTRICA EFECTIVA ENTRE DOS IONES EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA PARA UNA SOLUCIÓN 0.5 MOL/L, PROVENIENTE DE LA SIMULACIÓN (LÍNEA LLENA) COMPARADA CON LA LA CORRESPONDIENTE FUERZA COULOMBIANA PURA (LÍNEA PUNTEADA). NÓTESE LA DIFERENCIA EN LA ESCALA COMPARADA CON LA FIGURA 4

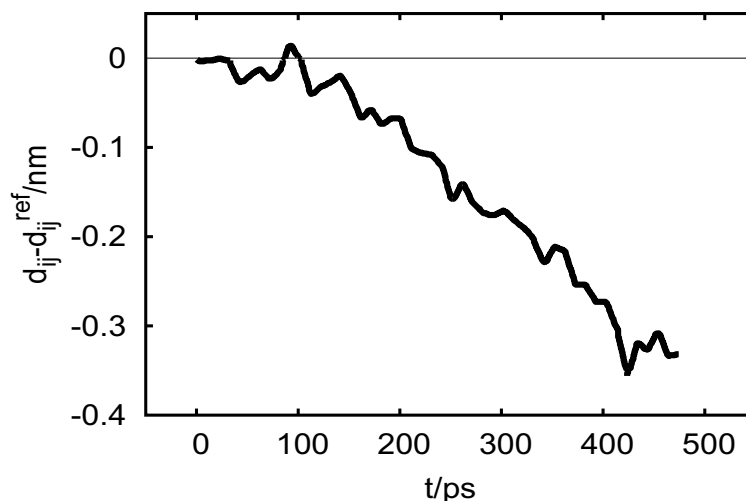


Figura 6: DIFERENCIA DE DISTANCIA IÓN–IÓN PARA UN SISTEMA CON DIFUSIÓN LIBRE Y UNA CARGA OSCILANTE, VS. UN SISTEMA DE REFERENCIA. LAS CONFIGURACIONES INICIALES SON IDÉNTICAS.

Extrajimos las posiciones relativas de ambas trayectorias, y calculamos las distancias d_{ij} . Obtuvimos la función diferencia de distancias $d_{ij} - d_{ij}^{ref}$. No es esperable que esta función sea nula ya que las trayectorias fueron obtenidas en condiciones diferentes (aunque iguales configuraciones iniciales).

Un resultado típico de tales experimentos se puede observar en la figura 6. A medida que pasa el tiempo, se observa que la función $d_{ij}(t)$ decrece comparada con $d_{ij}^{ref}(t)$. Esto es compatible con el argumento fundamental de este capítulo: El apantallamiento ‘blinda’ las interacciones electrostáticas, pero el proceso de desapantallamiento hace que se recupere la interacción: en el caso de los dos iones de cargas opuestas, reaparece una atracción neta.

§ IV.6.4 Dos iones a la misma frecuencia. Este caso no presentó diferencias cualitativas con la situación previa, es decir, que la fuerza entre los iones se comporta básicamente como el caso de interacción coulombiana pura en un medio de permitividad dieléctrica dada.

IV.7 CONCLUSIONES

Las simulaciones realizadas nos dan información detallada del campo eléctrico y reproducen datos obtenidos experimentalmente en nuestro laboratorio [Grigera, 1989].

Resulta de interés el hecho de que una carga fluctuante en magnitud y en signo, produzca una situación similar que el caso de la oscilación en posición. Esto nos permitiría utilizar una herramienta adicional para el estudio computacional de estos sistemas.

Hemos visto argumentos favorables a las suposiciones de que este efecto dinámico tendría gran importancia en variados tipos de sistemas particularmente en aquellos en los cuales la cinética depende de las interacciones eléctricas. Para grandes moléculas tales como anticuerpos, enzimas u otras macromoléculas activas, podría actuar este *filtro* de las interacciones de largo alcance de acuerdo con la frecuencia.

La Proteína Transportadora de Acil Coenzima A y la Bicapa Lipídica

V.1 INTRODUCCIÓN

§ V.1.1 Descripción. Las Proteínas transportadoras de Acil Coenzima A[†] (ACBP, por sus siglas en inglés: “Acyl CoA Binding Proteins”) constituyen una familia de proteínas de 86 a 103 residuos con secuencias altamente conservadas [van Aalten, 2001] [Faergeman, 1997]. Se conocen más de 30 secuencias de un amplio rango de especies y datos genómicos de secuencia, tales como *Caenorhabditis elegans*. Estos datos sugieren la existencia de otras proteínas que puedan contener dominios tipo ACBP [Kragelund, 1999]. Los ésteres de cadena larga de Acil CoA constituyen importantes intermediarios en la síntesis de lípidos y la degradación de ácidos grasos. Además de esta función de limpieza, se ha acumulado un gran cuerpo de evidencia indicando que los ésteres de cadena larga de Acil CoA también tienen una función importante en la regulación del metabolismo intermedio y la regulación genética [Faergeman, 1997] [van Aalten, 2002]. En el *Trypanosoma Brucei*, se ha observado que el ACBP es un importante componente de la biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI) [Milne, 2000] donante de miristoil-CoA para las reacciones de remodelado de ácidos grasos [Masterson, 1990]. Las ACBPs típicamente ligan ésteres de Acil CoA saturados e insaturados C₁₄–C₂₂ con estequiometría 1:1 y un alto grado de afinidad ($K_d = 2 - 10nM$) [Faergeman, 1997]. Los ésteres de Acil CoA de cadena larga son moléculas anfipáticas que se pueden encontrar tanto en solución como en en las bicapas lipídicas e inhibir un gran número de funciones

[†]TRABAJO A SER ENVIADO A PUBLICAR BAJO EL TÍTULO: “ELECTROSTATIC ENERGY LANDSCAPE STUDY FOR AN ACYL COA BINDING PROTEIN-MEMBRANE COMPLEX”, A JOURNAL OF MOLECULAR GRAPHICS AND MODELING.

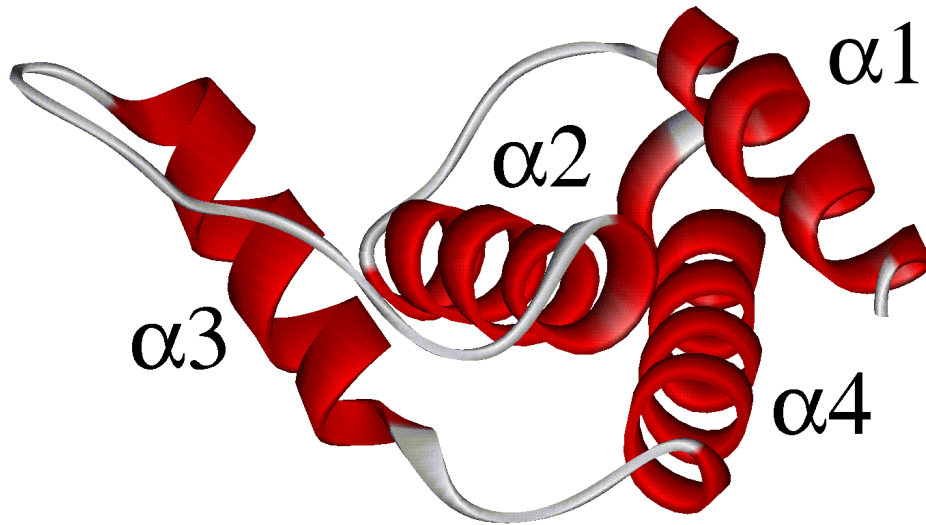


Figura 1: ACBP. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE ACBP PROVENIENTE DE GLÁNDULA HARDE-
RIANA DE ARMADILLO OBTENIDA POR RAYOS X [COSTABEL, 2005].

celulares y enzimas a bajas concentraciones [Faergeman, 1997]. La función de las enzimas de Acil CoA de cadena larga como intermediarios en el metabolismo de los lípidos y como reguladores de las señales en la célula requiere mantener un reservorio de Acil CoA ligado a una proteína transportadora para rápida disponibilidad. La *principal* molécula que cumple este rol en la célula eucariota es el ACBP [van Aalten, 2002].

§ V.1.2 Estructura. Los estudios de NMR han determinado la estructura de ACBP bovino recombinante (bovACBP) y de ACBP de hígado bovino ligado con Palmitato-Coenzima A (código acceso pdb: 1ACA), ACBP-Ply-CoA [Andersen, 1992] [Kragelund, 1993]. Consiste en cuatro hélices α en forma de cuenco (ver figura 1) con un sitio (donde se liga el Ply-CoA) altamente expuesto. El ligando se une por medio de interacciones específicas con residuos en la proteína. Interesa notar que esta unión se verifica a través de un considerable número de cargas positivas conservadas (fundamentalmente las Lys32 y la Lys54, ver figura 2) que interactúan con el grupo fosfato en la porción de la adenosina-3'-fosfato. Asimismo es notable que la cadena Acil está entre las superficies hidrofóbicas[‡] del CoA y la proteína.

[‡]el término “efecto hidrofóbico”, acuñado por Walter Kauzmann [Kauzmann 1959], se refiere al hecho de la existencia de una repulsión entre moléculas no polares, o ‘tipo aceite’ (hidrocarburos por ejemplo) y las moléculas de agua. Esto promueve la formación de agregados intermoleculares en presencia del agua, y favorece energéticamente ciertos modos de plegamiento de las proteínas.

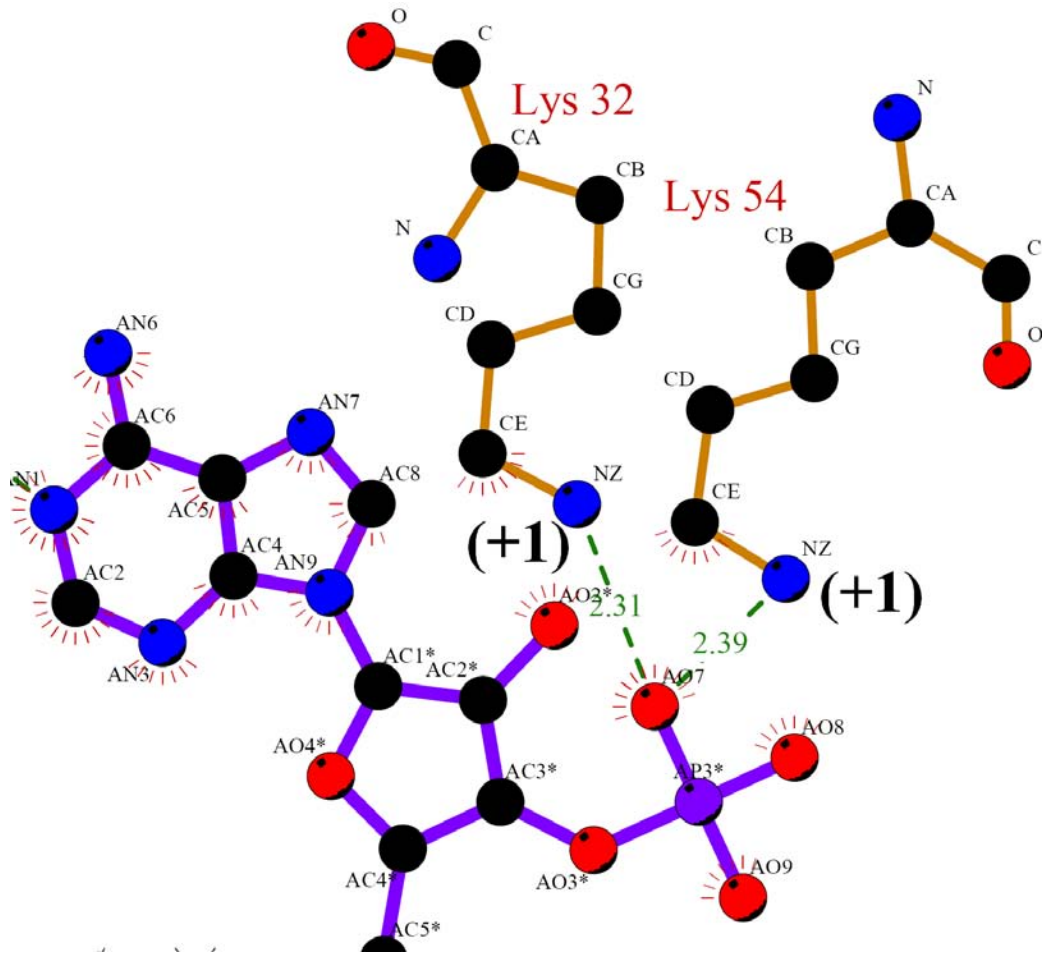


Figura 2: CARGAS POSITIVAS DE LAS LYS32 Y LYS54 QUE SE CONSERVAN EN LAS SECUENCIAS PROTEICAS [VAN AALTEN, 2001]

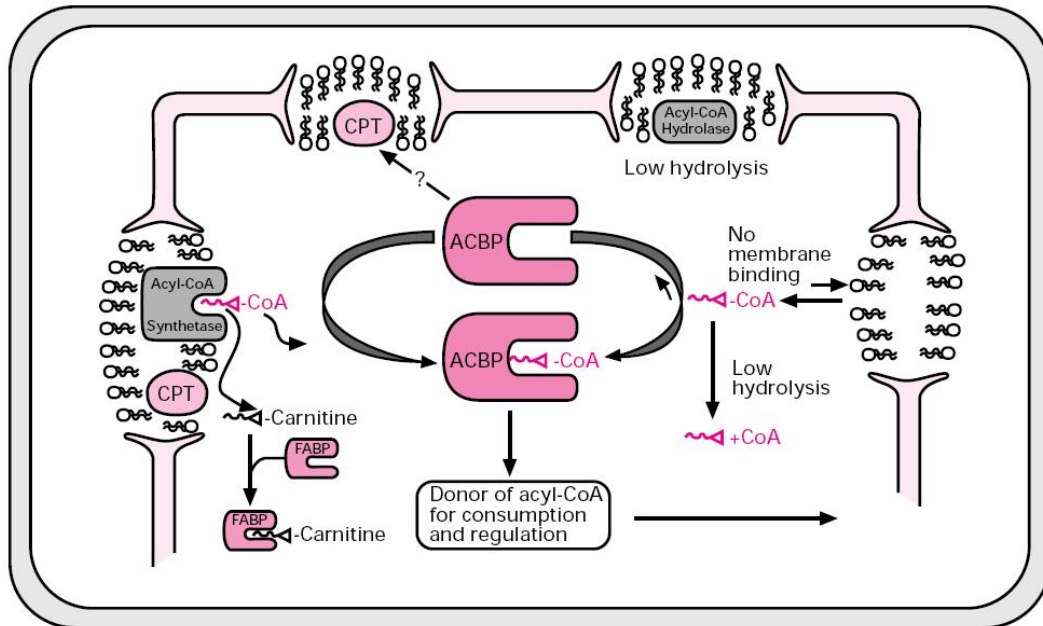


Figura 3: ROL DEL ACBP EN LA FORMACIÓN DEL REPOSITARIO DE ÉSTERES DE ACILCoA [FAERGMAN, 1997].

V.2 ¿PORQUÉ EL ACBP?

Se ha acumulado considerable evidencia que muestra que, además del componente difusional, el intestino, el corazón, el tejido adiposo y el hígado expresan un sistema de transporte específico y saturable para los Ácidos grasos de Cadena larga (LCFAs, por sus siglas en inglés), de entre los cuales, el ACBP juega un rol preponderante específicamente en el caso del Palmitato Coenzima A (ver sección VI.1.2).

Construir y validar los modelos moleculares de los portadores de los ácidos grasos es de suma importancia: estos modelos pueden ayudarnos a entender los mecanismos de recepción de los LCFAs. Tanto la recepción celular aumentada o disminuida más allá de ciertos umbrales han resultado estar relacionadas con enfermedades tales como la diabetes tipo II [Hjelte, 1990] o síndromes de hepatitis fulminantes [Odaib, 1998] [Stahl, 2002].

§ V.2.1 Objetivos. A la fecha, sólo se ha determinado la estructura de dos diferentes ACBPs, junto con la posición de sus Sitios Activos [van Aalten, 2001]. No obstante, no se han entendido completamente las funciones fisiológicas ni los mecanismos de acción del ACBP. Estudios *in vitro* indican que la ACBP afecta las actividades de las proteínas tanto en estado soluble, como aquellas que están unidas a membranas. Más aún, muchas observaciones establecen claramente que la ACBP

interactúa con las membranas, sin develar aún el *mecanismo de interacción* [Chao, 2002].

El trabajo presentado en el presente capítulo intenta estudiar el modo en que la proteína ACBP se une con la membrana lipídica, cuáles son los residuos involucrados en la interacción, cuál el rol de la interacción electrostática, tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Se pospone para el capítulo VI el estudio de la interacción del ACBP con su ligando, el Palmitoil-Coenzima A.

Se hizo uso de la experiencia de nuestro grupo en la realización de este tipo de cálculos para estudiar sistemas biomacromoleculares [Costabel, 1998] [Costabel, 2001].

V.3 PROCEDIMIENTO

§ V.3.1 Coordenadas Atómicas. Utilizamos el método descrito en el Capítulo II. Las coordenadas atómicas de la proteína ACBP fueron obtenidas mediante la cristalografía de Rayos X realizada en colaboración entre grupos de investigadores argentinos [Costabel, 2005]. Los modelos de Membranas biológicas provienen de simulaciones de Dinámica Molecular en equilibrio. En dichos modelos constan los tipos de átomos, las posiciones y las cajas que las contienen. Las tomamos de dos fuentes:

0 %PS: una membrana *neutra* (carga eléctrica $Q_0 = 0$): Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) obtenida en el grupo de Tieleman [Tieleman, 1996].

100 %PS: una membrana aniónica: Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) diseñada en el laboratorio de Berkowitz [Pandit, 2002]. Su carga eléctrica total es $Q_{100} = -128e$ (donde e es la carga del electrón). Se procedió a alterar esta última membrana anulando parcialmente la carga. Con este proceso modelamos tres casos de membranas *mixtas*:

50 %PS: Una bicapa 1:1 PC/PS, carga $Q_{50} = -64e$

33 %PS: una 2:1 PC/PS, $Q_{33} = -42e$, y por último

25 %PS: una 3:1 PC/PS, $Q_{25} = -32e$.

Esto fue realizado con el objeto de representar el efecto de variación de carga en nuestro sistema.

§ V.3.2 **Parámetros.** Se le asignó un radio y una carga parcial a cada átomo en su centro geométrico mediante la aplicación web **pdb2pqr** [Dolinsky, 2004]. Esta convierte archivos estándar PDB [Berman, 2000] al formato PQR (los archivos PQR son idénticos a los PDB salvo que los campos “occupancy” y B-factor han sido reemplazados por los datos de *carga* y *radio* atómicos). Asimismo, el programa implementa un algoritmo para 1) resolver conflictos *estéricos* y 2) optimizar la red de puentes de hidrógeno que circunda la proteína [Nielsen, 1999] [Hooft, 1996]. Se le asignó el conjunto de cargas PARSE [Sitkoff, 1994].

Se colocó el conjunto de átomos del sistema ACBP–membrana en un reticulado tridimensional de mayores dimensiones, de tal modo que cualquier átomo del sistema está a una distancia mayor que $1,3\lambda_D$ de la frontera del reticulado, donde $\lambda_D = 10\text{Å}$ es la longitud de Debye a concentración fisiológica de sal (150 mM).

Se tuvo cuidado en *no desplazar* la posición del sistema en los cálculos. Esto hace que se cancelen exactamente los términos de autoenergía electrostática que aparecen necesariamente al distribuir una carga puntual en 8 vértices discretos de un reticulado (ver sección II.5.2).

Se utilizaron condiciones de frontera de Debye–Hückel. Esto es, en la frontera del reticulado se impone el valor del potencial previsto por el modelo de Debye–Hückel para una *única esfera* con una carga *puntual*. El radio de la esfera se iguala al radio promedio de la biomolécula, y la carga se toma igual a la carga *total* del sistema.

Se representó la presencia de iones Na⁺ y Cl⁻ a 150 mM, mediante la inclusión de dos especies iónicas de carga +1 y -1.

Este trabajo se realizó mediante el paquete APBS [Baker, 2001] que implementa el algoritmo PMG [Holst, 1993] [Holst, 1995] para resolver la Ecuación de Poisson–Boltzmann (12) (ver pág. 27).

§ V.3.3 **Diferencia de Energía Libre Electrostática.** Como fue descrito en la sección II.5 el potencial electrostático, solución de la Ecuación de Poisson–Boltzmann se puede utilizar para determinar la Energía Electrostática Total de un sistema. *Definimos* la Energía Libre Electrostática de Interacción dE como la diferencia entre la Energía del sistema cuando la membrana y la proteína están *cerca* con respecto a la situación en la cual están a distancia *infinita* una de otra. Por lo tanto, para hallarla se deben realizar *tres* cálculos:

1. Energía $E(pm)$ de la proteína y la membrana, ambas dentro del reticulado
2. Energía $E(p)$ de la proteína aislada, en la misma posición que antes.
3. Energía $E(m)$ de la membrana, idem.

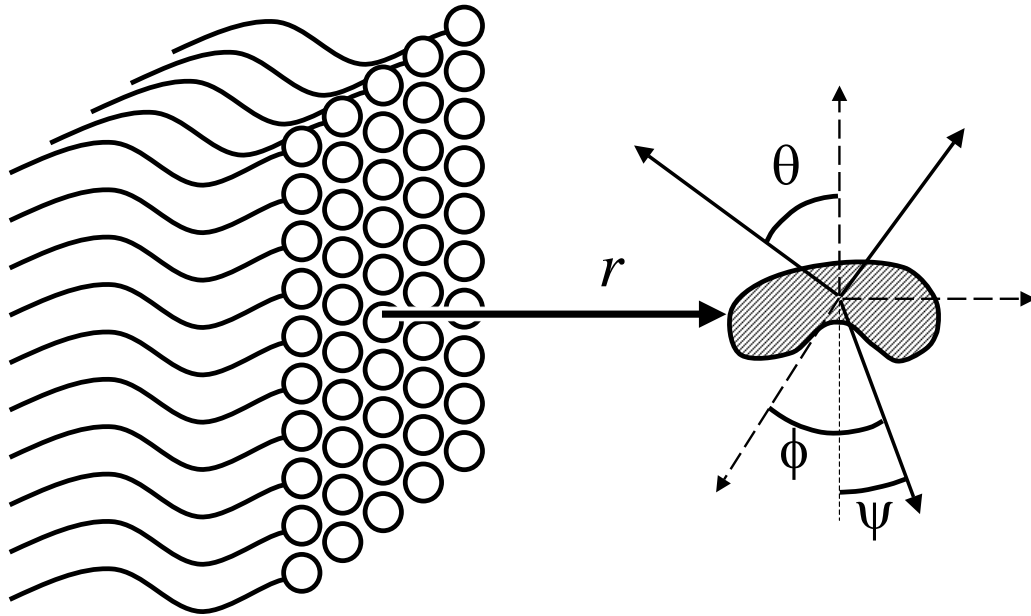


Figura 4: VARIABLES RELEVANTES QUE CARACTERIZAN LA POSICIÓN RELATIVA PROTEÍNA-MEMBRANA

Por lo tanto,

$$dE = E(pm) - E(p) - E(m) \quad (1)$$

Esta Energía obviamente cambia con la posición relativa del ACBP y la Membrana. Por lo tanto

$$dE = dE(x, y, r, \phi, \theta, \psi) \quad (2)$$

donde r es la distancia mínima ACBP-Membrana (medida entre superficies de Van der Waals), ϕ , θ , ψ son los *Ángulos de Euler* que utilizamos para describir cualquier rotación de la proteína respecto de una posición inicial. Veamos esto en la figura 4. Suponemos que la *configuración preferida* por el sistema se hallará cuando dE tenga un mínimo. Esto implica *descartar* toda otra contribución a la Energía de Ligadura.

§ V.3.4 Muestreo del Paisaje de Energía Libre Electroestática. Para determinar el mínimo global de energía, desarrollamos un programa denominado ESUP.f en estándar ansi fortran 77. Este automatiza la generación de los archivos PQR conteniendo configuraciones del sistema membrana-proteína que muestrean a intervalos regulares las cuatro variables de interés. Estos archivos son los datos de entrada para el programa APBS [Baker, 2001].

Este proceso combinado se completó mediante la elaboración de programas realizados en lenguaje de script de la BASH[§] y en el lenguaje de script del programa Gnuplot [Williams, 2004] que en su conjunto controlan el proceso computacional.

V.4 RESULTADOS

Mediante el método ya descrito buscamos caracterizar las interacciones no específicas para la asociación ACBP–membrana.

§ V.4.1 Exploración inicial de dE . Para determinar si la ACBP tiene una posición preferencial relativa en su interacción con una membrana biológica, se analizó un espectro extenso de posiciones, con el método ESUP+APBS (descrito en la sección V.3.4). Para valores de distancia fijos se estudió la cantidad dE en función de los ángulos de Euler.

Para todas las curvas analizadas se encontró que la variación en x , y y ψ , no correspondían a regiones relevantes del dominio de la función dE de modo tal que aproximadamente

$$dE(x, y, r, \phi, \theta, \psi) \approx dE(r, \phi, \theta) \quad (3)$$

Para r fijo, obtenemos una función de dos variables. Los ángulos se muestrearon a intervalos de 45° . A fin de representarla del modo más sencillo decidimos llevar los dos ángulos sobre *un mismo eje horizontal* (del mismo modo que una matriz bidimensional puede escribirse ordenadamente como un vector). En la figura 5 vemos una curva típica.

Encontramos que para *diferentes distancias* se hallaba un mínimo de dE en la región central de dicho gráfico ($\phi \approx 180$).

§ V.4.2 Variación de la Carga de la Membrana. Estudiamos diferentes tipos de membrana mediante los modelos descritos en la sección V.3.1.

Para la posición del mínimo de la sección anterior obtuvimos la curva que muestra cómo varía la Energía de Interacción dE con el porcentaje molar de PS en un sistema a 0.1M NaCl. (ver figura 6). Encontramos que la interacción es más efectiva con las membranas aniónicas.

Es interesante ver que ésta ajusta con una función cuadrática simple $dE = dE(100\%PS) \cdot x^2$ donde x es la fracción PS:PC (0.25, 0.33, 0.50, 1.00). Esto equivale, por ejemplo, a que la asociación ACBP–membrana es 1.7 veces más intensa en el caso 33 %PS, que en el caso 25 %PS.

[§]una excelente *shell* del sistema operativo Linux

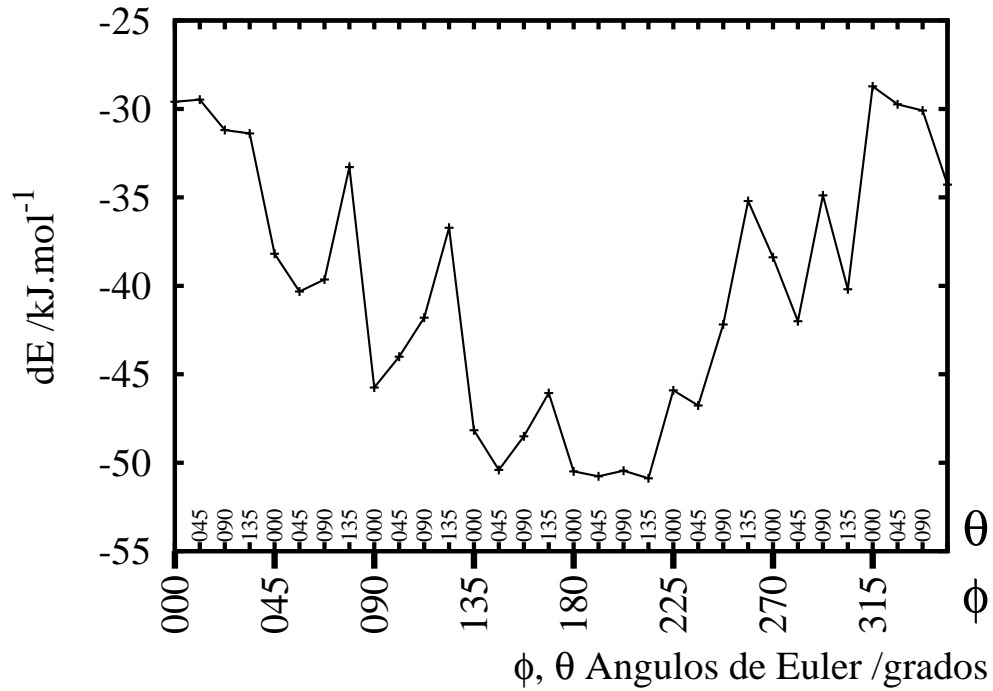


Figura 5: VARIACIÓN DE dE CON LOS ÁNGULOS DE EULER.

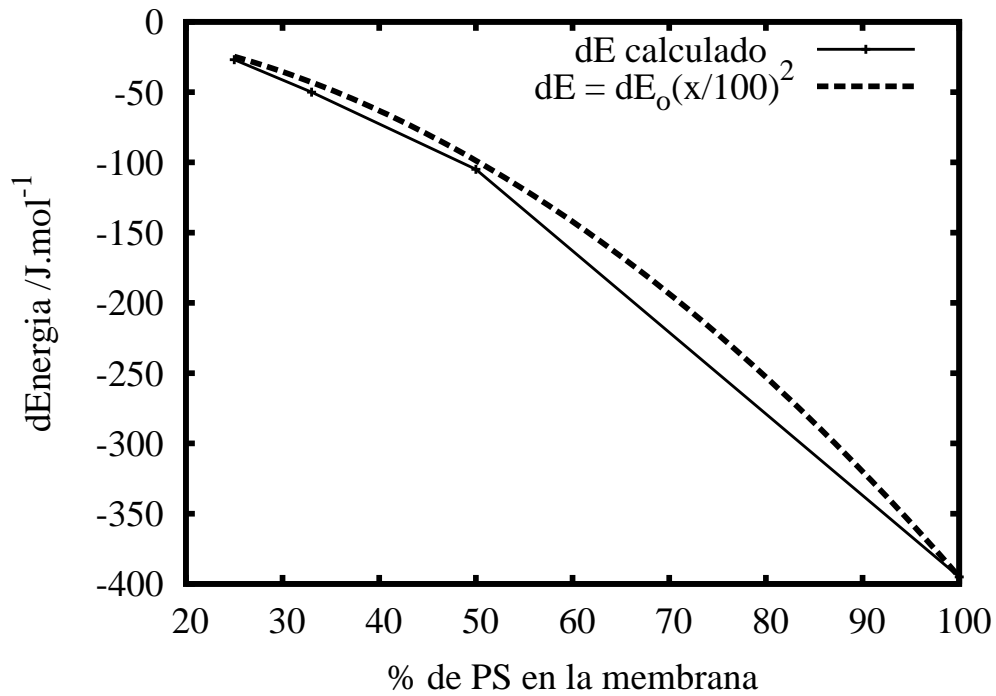


Figura 6: VARIACIÓN DE dE CON EL PORCENTAJE DE FOSFATIDILSERINA (PS) EN LA MEMBRANA. AJUSTE CUADRÁTICO.

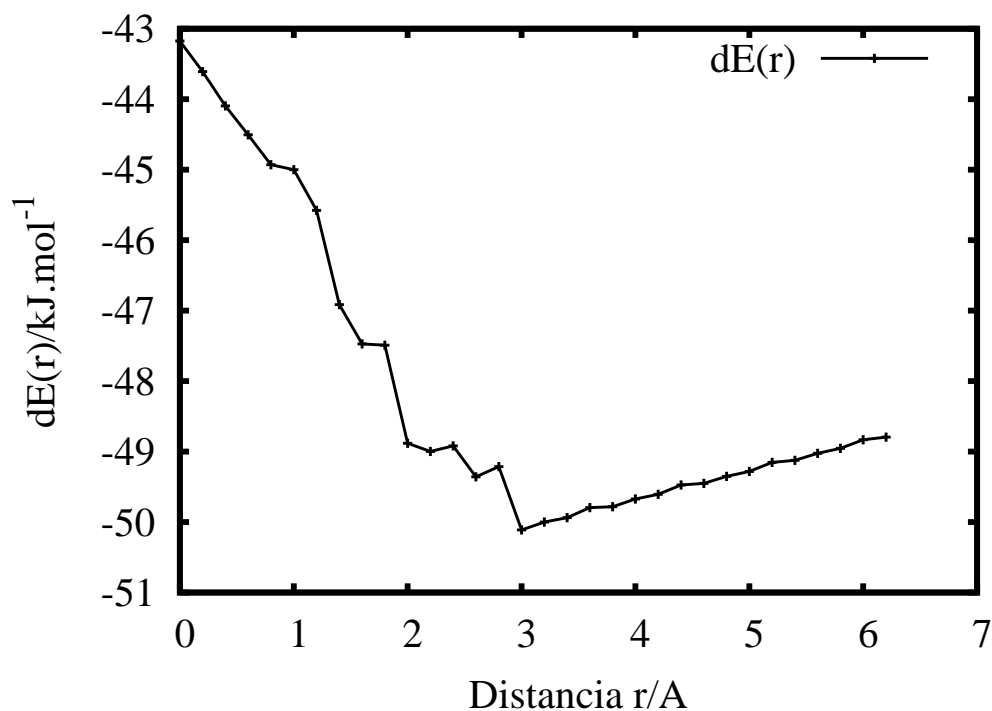


Figura 7: VARIACIÓN DE dE CON r , PARA EL MÍNIMO HALLADO PARA LA CONFIGURACIÓN DE ÁNGULOS DE EULER $(\phi, \theta, \psi)=(315,135,135)$

§ V.4.3 Variación con la distancia. Con los datos precedentes y para la configuración angular de mínimo, calculamos el valor de dE en función de la distancia medida entre superficies de van der Waals del ACBP y de la membrana. El resultado en conjunto muestra que las interacciones son lo suficientemente fuertes para inducir una preferencia del ACBP hacia membranas intracelulares (PS:PC 1:3 = 33 %PS) que contienen fosfolípidos ácidos, con un mínimo definido en r . En la figura 7 se muestra el citado caso de asociación con la PS:PC 1:3 aniónica. La interacción experimenta una posición preferencial para $r = 3\text{Å}$.

Estos resultados en conjunto sugieren que las interacciones electrostáticas juegan un rol *significativo* en la asociación preferencial del ACBP con membranas de carga global negativa.

Al inspeccionar la configuración de mínima dE encontramos que los residuos hidrofóbicos en las porciones entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ interactúan directamente con la membrana (ver figura 8).

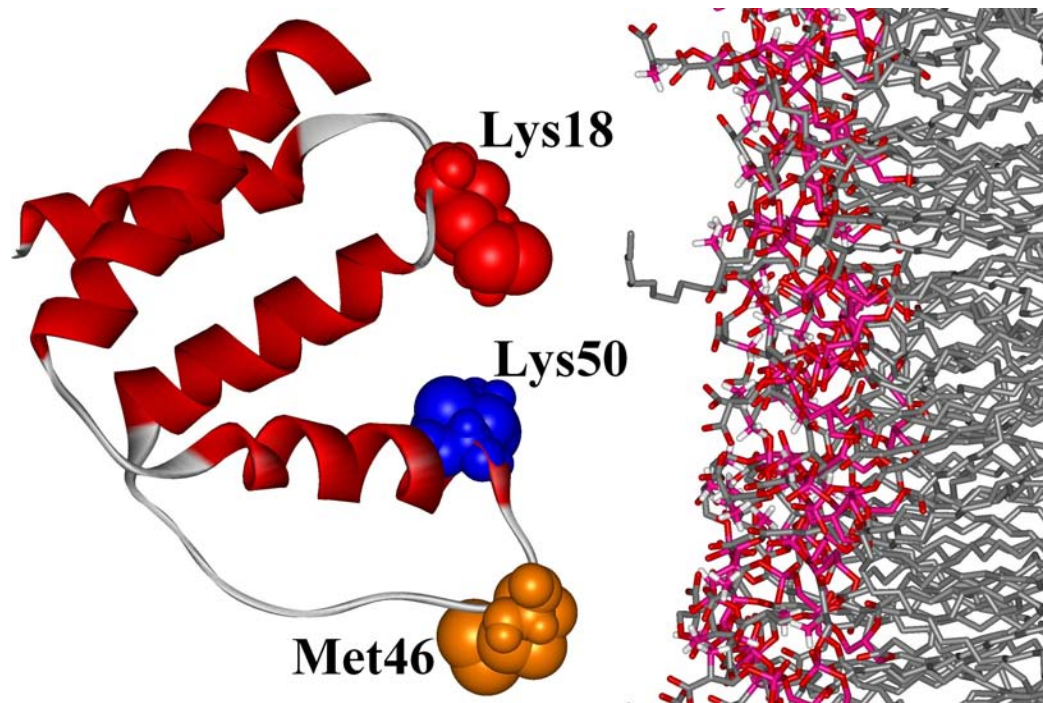


Figura 8: MINIMO DEL SISTEMA ACBP-MEMBRANA, CALCULADO POR ESUP.F+APBS

V.5 ROL DE LOS RESIDUOS BÁSICOS EN LA ORIENTACIÓN DEL COMPLEJO ACBP–BICAPA

Como ya fue descrito en la sección V.1.2, la forma global de la proteína revela una estructura tipo *cuenco* que contiene una región hidrofóbica de ligadura en el fondo del cuenco, y una región hidrofílica en el borde del mismo. No obstante que las cuatro hélices α están involucradas en la unión con el ligando sólo las hélices α_1 , α_2 y α_4 son importantes para la estabilidad global de la proteína [Chao, 2002].

Se inspeccionaron las posiciones preferenciales para cada distancia (ver sección V.4.3), de modo visual mediante los programas RASMOL [Sayle, 1998] y VMD [Humphrey, 1996].

Se encontró que los residuos **Lys18** y **Lys50** podrían jugar un rol crítico a la hora de determinar la energía de interacción. Este efecto favorecería la posición estratégica de los residuos **Met46** y **Leu47** (ver propiedades de los veinte aminoácidos naturales en la página 122 del Apéndice). que, dada la evidencia, *proponemos* que se “hunden” en la membrana para *estabilizar* el complejo.

Los cálculos previos soportan las siguientes conclusiones:

1. La energía electrostática promueve la unión entre el ACBP y la Membrana[#].
2. No todas las orientaciones del ACBP están permitidas energéticamente.
3. Las posiciones permitidas adoptadas por el ACBP, son tales que los residuos *hidrofóbicos*, es decir, aquellos que están en la porción entre la hélice α_2 y α_3 apuntan a la membrana, en la “aproximación” a la unión.

V.6 ROL DE LOS RESIDUOS HIDROFÓBICOS EN LA INTERACCIÓN ACBP–BICAPA

Es sabido que los residuos hidrofóbicos pueden jugar un rol destacado en la interacción proteína–proteína o proteína–membrana.

Basados en nuestros datos, proponemos que las interacciones hidrofóbicas están intermediadas por los residuos expuestos en la porción interactuante ya descrita del ACBP, particularmente **Metionina 46** y **Leucina 47**, los cuales son, asimismo, esenciales para la unión fuerte con los fosfolípidos. De este modo la afinidad del ACBP por las membranas biológicas estaría determinada no sólo por las interacciones electrostáticas como fue supuesto inicialmente, sino que también por interacciones hidrofóbicas.

En su conjunto, los resultados indican que la unión ACBP–fosfolípido, no obstante ser *disparada* o iniciada por un mecanismo de *llave electrostática*, es *estabilizada* por un mecanismo hidrofóbico. Este tipo de mecanismos combinados fueron propuestos en la literatura para algunos otros sistemas biológicos en trabajos de modelado computacional [Diraviyam, 2003], y en estudios experimentales como el de la inserción en membrana de dominio T de la toxina de la difteria via Fluorescencia y CD [Chenal, 2002].

§ V.6.1 El sitio Activo. Hemos encontrado que el sitio activo de la proteína, permanece *abierto* al solvente mientras se está uniendo con la membrana. Esto sugiere que el ACBP podría utilizar esta geometría particular para favorecer la unión con el ligando (que está *contenido* en la membrana), aún encontrándose unido electro–hidrofóbicamente a la bicapa lipídica.

Proponemos así que la interacción electrostática *orientante* del ACBP podría dar cuenta de la alta eficiencia que posee para unirse con el ligando Palmitoil–CoA.

[#]Este tipo de resultado permite conjeturar la existencia de puentes de hidrógeno que estabilicen la unión. Sin embargo se requiere una técnica con completo detalle atómico para poder evaluar esto ya que, por ejemplo, este modelo no considera la presencia de agua explícita.

V.7 DISCUSIÓN

No obstante que muchas células de mamíferos contienen al menos tres familias de proteínas solubles intracelulares que ligan LCFA–CoAs (ver la sección VI.1.1) sólo la ACBP se une *específicamente con los LCFA–CoAs* [Faergeman, 1997].

La bicapa lipídica es una componente estructural *esencial* a nivel celular. Para los estudios biofísicos, se utilizan membranas soportadas o libres como un *modelo controlado* de una membrana *in vivo*. Una clase importante de fenómenos la constituye la interacción de membranas con surfactantes^{||} presentes en fase acuosa. Los tioésteres de cadena larga de Acil CoA grasos (LCFA–CoA) representan una clase bioquímicamente importante de surfactante.

Los LCFA–CoA son derivados activados de los ácidos grasos que sirven como intermediarios en el metabolismo y la biosíntesis de los lípidos. Son moléculas *anfifílicas* con un ácido graso de cadena larga de carácter hidrofóbico, y una cabeza constituida por una Coenzima A, hidrofóbica.

Estudiamos el posible mecanismo estructural para el *reconocimiento* y la *unión* del ACBP a un Acil-CoA inserto en la membrana biológica.

El trabajo expuesto en este capítulo se basa en la resolución cristalográfica de la estructura del HgACBP (ACBP proveniente de Glándula Harderiana de Armadillo) realizada en nuestro país por Costabel y colaboradores [Costabel, 2005] que muestra que la estructura de HgACBP es muy similar a la bovACBP, atendiendo a su estructura tridimensional. Por otro lado, sus patrones electrostáticos resultan muy diferentes [Vallejo, 2003].

Asimismo, hemos mostrado que la asociación ACBP–membrana está mediada, al menos en parte, por interacciones electrostáticas. El método FPDB nos permite calcular las interacciones proteína–fosfolípido basados en un modelo continuo con detalle atómico. Las fuerzas electrostáticas pueden *traducir* estas interacciones no específicas en términos *cuantitativos*, mensurables y así proveer un método efectivo para evaluar su importancia dentro del cuadro general de una interacción entre proteína y membrana.

No se pretende aquí describir toda la complejidad de una unión entre una proteína y una membrana reales. El modelo FPDB no incluye términos energéticos tales

^{||}Los surfactantes o *tensoactivos* son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases, (p.ej. dos líquidos insolubles uno en otro), debido a su estructura atómica. Son moléculas anfifílicas. Al contacto con el agua las moléculas individuales se orientan de tal modo que la parte hidrofóbica sobresale del nivel del agua encarándose al aire o bien se juntan con las partes hidrófugas de otras moléculas formando burbujas en que las partes hidrófugas quedan en el centro, y los restos solubles en agua quedan entonces en la periferia disueltos en el agua. Estas estructuras se denominan micelas [Wikipedia, 2005a].

como la Energía de desolvatación de la superficie de unión de proteína y membrana. Sin embargo existe una vasta experiencia en el ámbito académico en el sentido de que la electrostática del continuo puede realizar predicciones de interés en el nivel molecular [Honig, 1986].

Este modelo predice una orientación como la *más favorable* para el complejo ACBP–membrana. Es de interés notar que esto ocurre para una membrana *neutra* tanto como para una *aniónica*, resultando un efecto magnificado en este último caso.

Basados en los cálculos hemos propuesto mecanismos por los cuales las interacciones electrostáticas contribuyen a la asociación. El procedimiento de minimizar la diferencia de Energía nos permite predecir modelos plausibles para los estados del Complejo. Estos cálculos muestran que en los tipos de membranas considerados aquí, para la posición *más favorable*, este proceso de unión se lleva a cabo, exponiendo los residuos **Met46** y **Leu47** y apuntándolos a la superficie de la membrana.

Nuestra evidencia computacional nos permite predecir que la interacción ACBP–membrana guarda un notable *paralelismo* con la que se da entre la Proteína transportadora de ácidos grasos (FABP) de hígado.

Dado nuestro desconocimiento experimental para decidir (si existiese) cuál sería la posición preferencial de aproximación del ACBP a la membrana, encontramos interesante que las interacciones electrostáticas permitan predecir dicha configuración.

La unión entre proteínas y péptidos a interfaces aniónicas de membranas es un área de considerable interés. Esta puede involucrar *cambios conformacionales* en relación estrecha con el proceso de *inserción* en la membrana.

Es de sumo interés, asimismo, poner este tipo de técnica de relativamente *poco costo computacional* entre las *herramientas* de uso corriente de los experimentistas en este área. Esto puede conducir a un diseño *eficiente* de los experimentos relevantes.

La Proteína Transportadora de Acil CoA y el Palmitato–CoA

VI.1 INTRODUCCIÓN

§ VI.1.1 La ruta de los ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga (LCFAs por sus siglas en inglés) no son sólo importantes metabolitos sino que contribuyen a un sinnúmero de funciones celulares que incluyen la activación de las isoformas de la proteína quinasa C (PKC en inglés) y los factores de transcripción nuclear tales como los receptores activados por el proliferador de la peroxisoma (PPAPs, por sus siglas en inglés) Para cumplir estas funciones los LCFA tienen que atravesar primero la membrana plasmática, un proceso que puede ocurrir via difusión simple o ser mediado por proteínas[†].

El mecanismo se ilustra en la figura 1. Los Ácidos grasos pueden unirse directamente a los FATP (proteínas portadoras de Ácidos Grasos) y ser transportadas directamente dentro de la célula. Alternativamente los LCFA pueden unirse primero al CD36 (Translocasa de Ácidos Grasos) que los orienta hacia los dímeros FATP. Los LCFA intracelulares se unen por medio de una unión éster con la CoA por medio de la Acil CoA Sintetasa de cadena larga (sigla en inglés: LACS), previniendo su pérdida, mientras que las FABPs y

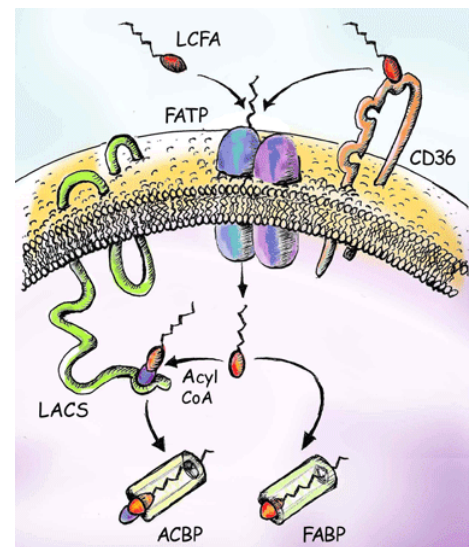


Figura 1: RUTA METABÓLICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA [STAHL, 2002].

[†]TRABAJO A SER ENVIADO A PUBLICAR BAJO EL TÍTULO: “MOLECULAR DYNAMICS STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN ACYL COA BINDING PROTEIN AND PALMITOYL-COENZYME A.”

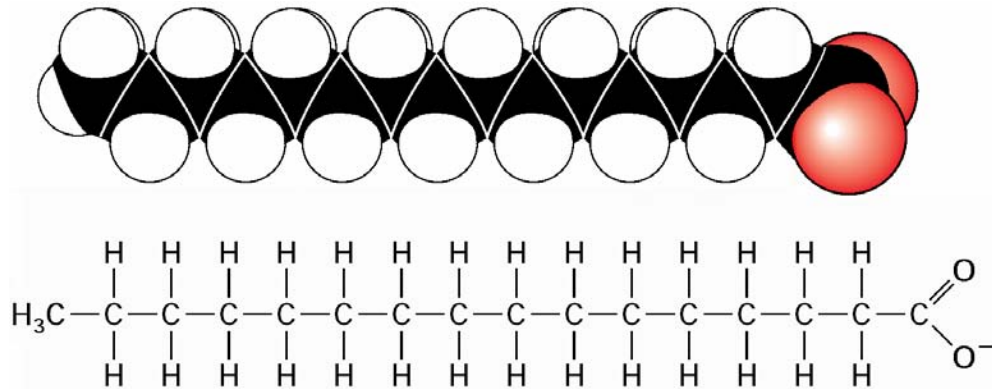


Figura 2: ESTRUCTURA DE PALMITATO, FORMA IONIZADA DEL ÁCIDO PALMÍTICO [Lodish, 2003].

ACBPs actúan como un buffer en el citoplasma para contener los LCFAs incorporados.

Se ha acumulado considerable evidencia que muestra que, además del componente difusional, el intestino, el corazón, el tejido adiposo y el hígado expresan un sistema de transporte específico y saturable para los LCFAs.

§ VI.1.2 El ácido palmítico. Se trata de uno de los ácidos grasos saturados más comunes tanto en el reino animal como en el vegetal. Es un sólido blanco que funde a 63.1°C. Su fórmula química es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$. También se lo suele llamar ácido hexadecanoico. En la figura 2 vemos su estructura. Es el primer ácido graso producido durante la lipogénesis y del mismo se derivan ácidos de cadenas más largas[‡] [Wikipedia, 2005b].

§ VI.1.3 Coenzima A. La Coenzima A (CoA, CoASH, o HSCoA) es un derivado de la β-mercaptoetilamina, pantotenato y adenosín-trifosfato. Desempeña un rol importante en el metabolismo de la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico. Su función principal es el *transporte* de grupos *Acilo* tales como el Acil o los tioésteres. Se denomina Acil-CoA a una molécula de Coenzima A que lleva unido un grupo Acil. A menudo se la denomina *CoASH* or *HSCoA* a causa de estar unida a un grupo SH (sulfidrido) cuando no está en unión con un Acilo [Wikipedia, 2005b].

El Acil-CoA es una molécula de gran importancia en sí misma. Es el precursor del HMG-CoA, componente vital en la síntesis del Colesterol y la síntesis de Cetonas. Asimismo contribuye el grupo acetilo a la acetilcolina: la adición del grupo acetilo a la colina, una reacción catalizada por la Colina acetiltransferasa. Su tarea

[‡]Este ácido tiene historia: sus derivados se utilizaron durante la Segunda Guerra Mundial para producir napalm

principal es el transporte de los átomos de carbono dentro del grupo acetil al ciclo del ácido cítrico para ser oxidados en orden a la producción de energía.

La Coenzima A desempeña un rol central en el balance entre el metabolismo de los *carbohidratos* y el de los *lípidos*. El primero necesita la presencia de CoA para que el ciclo del Acido Cítrico continúe, y el segundo necesita una gran cantidad de CoA para romper las cadenas de ácidos grasos durante la oxidación β . Esta oxidación sólo puede tener lugar en la mitocondria. Para entrar en ella se requiere que los ácidos grasos estén *activados*, es decir que tengan una CoA unida.

Los lípidos sólo pueden proveer energía mediante la ruptura de sus enlaces, en unidades de menor tamaño, y nuestras células tiene sólo *un modo* de hacer esto: romper los lípidos en una inmensa multitud de moléculas de Acil-CoA, cada una de las cuales necesita su *propia* molécula de CoA.

Por otro lado el CoA sólo puede provenir de ciertos procesos: el metabolismo de los carbohidratos obtiene el CoA de su propio ciclo del Acido Cítrico donde es constantemente reciclado. Sin embargo, durante el metabolismo de los lípidos, dado que el ciclo del Acido Cítrico está detenido (como ocurre por ejemplo durante los períodos de hambre), todo el CoA está atrapado en ese grupo de moléculas de Acil-CoA. La única manera de liberar suficiente CoA es combinar moléculas de Acil-CoA de a pares, creando cetonas y liberando un CoA. Esta es la razón por la cual los compuestos cetónicos se producen en períodos de hambre o en dietas bajas en carbohidratos.

§ VI.1.4 El ACBP. La ACBP (ver introducción en el capítulo V) liga preferentemente ésteres de Acil-CoA de cadena media y larga con una muy alta afinidad, en particular, con preferencia por los ésteres C_{16} - C_{22} de Acil CoA. Por otro lado, el ACBP muestra baja afinidad por los ácidos grasos, las Acilcarnitinas, el colesterol y los nucleótidos. Mediante microcalorimetría isotérmica se determinaron los valores de K_d para la unión Acido Palmítico-CoA con ACBPs bovinas y de levaduras. $0,6 \times 10^{-10}$ M y $0,5 \times 10^{-10}$ M por titulación microcalorimétrica directa e indirecta [Rasmussen, 1994] [Knudsen, 1994]. Existe un importante cuerpo de evidencia acerca de la capacidad de la ACBP para unir con alta afinidad estos ésteres, y por lo tanto desempeñar el rol de su *portador intracelular* de tal modo de mantenerlos disponibles para su liberación rápida en caso de ser necesario [Faergeman, 1997].

VI.2 ESTRUCTURA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

En 2003, Lerche y colaboradores [Lerche, 2003] publicaron una estructura refinada del complejo ACBP-Acido palmitico-Coenzima A (fórmula $C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S$, sigla ACBP-PlyCoA), obtenida mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN),

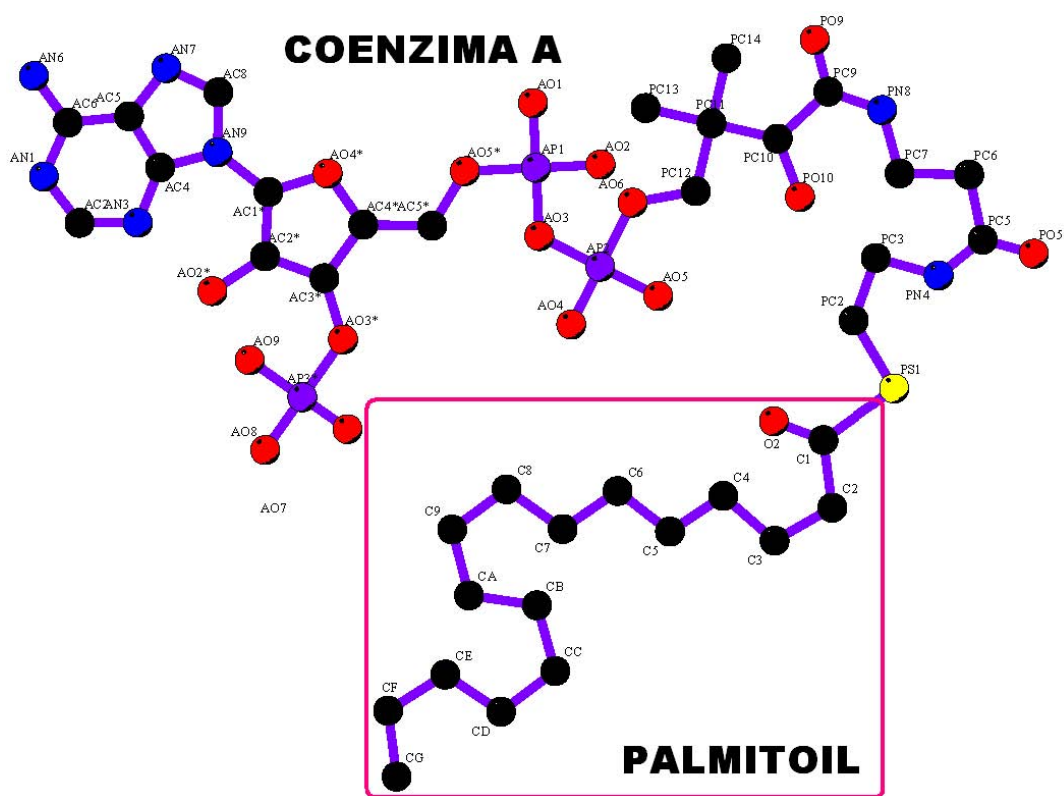


Figura 3: EL PALMITATO-CoENZIMA A, CON LA NOMENCLATURA ATÓMICA.

disponible bajo el código 1NVL en el Protein Data Bank [Berman, 2000]. Este archivo contiene 20 diferentes estructuras compatibles con los datos de RMN. Es notable la similitud que presentan todas las estructuras de la proteína. En la figura 3 vemos una estructura del palmitato esterificado con Coenzima A, extractada de los mismos datos de RMN.

§ VI.2.1 Valor de las estructuras de RMN. Los resultados de RMN proveen información sobre distancias interatómicas para una molécula en solución. A partir de dicha información se puede *inferir* (mediante algoritmos computacionales apropiados) la estructura tridimensional de la macromolécula *compatible* con las restricciones experimentales (y también con ciertos criterios de *calidad* de estructuras proteicas). La solución de este problema en general *no es única*. Por lo tanto tendremos un conjunto de estructuras que suelen interpretarse como *representativas* de la molécula.

Al provenir los datos de RMN de una solución “dinámicamente viva” del sistema de interés resultan un dato crucial a la hora de contrastar la bondad de un modelo. Analizaremos por tanto los resultados de la simulación por Dinámica Molecular comparándolos con estos datos experimentales. Veamos un gráfico plano donde se representa la estructura número 20 de RMN, donde se destacan las interacciones ligando-proteína, en la figura 4 y en la figura 5 vemos un diagrama de estructura secundaria donde en puntos grises figuran las interacciones con el ligando. En la figura 6 vemos una imagen tridimensional.

VI.3 SIMULACIONES

§ VI.3.1 Muestra en Equilibrio de ACBP. Se partió de la estructura cristalográfica obtenida por Costabel y colaboradores [Costabel, 2005]. De ella se seleccionó un monómero (86 residuos). Se seleccionó el campo de fuerzas GROMOS96 43A1 [Van Gunsteren, 1996]. Se conservó la protonación idéntica a la realizada por el server de PDB2PQR, en particular, la Histidina 30, se protonó el Nitrógeno $\delta 1$. La carga total del ACBP es nula. Se realizaron 19 pasos de minimización en energía en vacío con cutoff simple, donde la Energía potencial descendió de $-5,4 \times 10^3$ a $-8,03 \times 10^3$ kJ/mol. Se colocó la proteína en una caja rectangular de dimensiones $4.958 \times 5.426 \times 5.190$ nm. Se hidrató la estructura en esa caja con 4184 moléculas de agua SPC [Berendsen, 1981]. No se agregaron contraiones. Se minimizó nuevamente en energía (ahora con agua) donde ahora la energía potencial bajó de $-1,2 \times 10^5$ a $-2,4 \times 10^5$. Se cambió el modelo de agua SPC al SPC/E [Berendsen, 1987]. No se realizó Dinámica con restricción de posiciones. Finalmente, se realizó una corrida de 400 ps reasignando velocidades al inicio. La estructura final se depositó en el

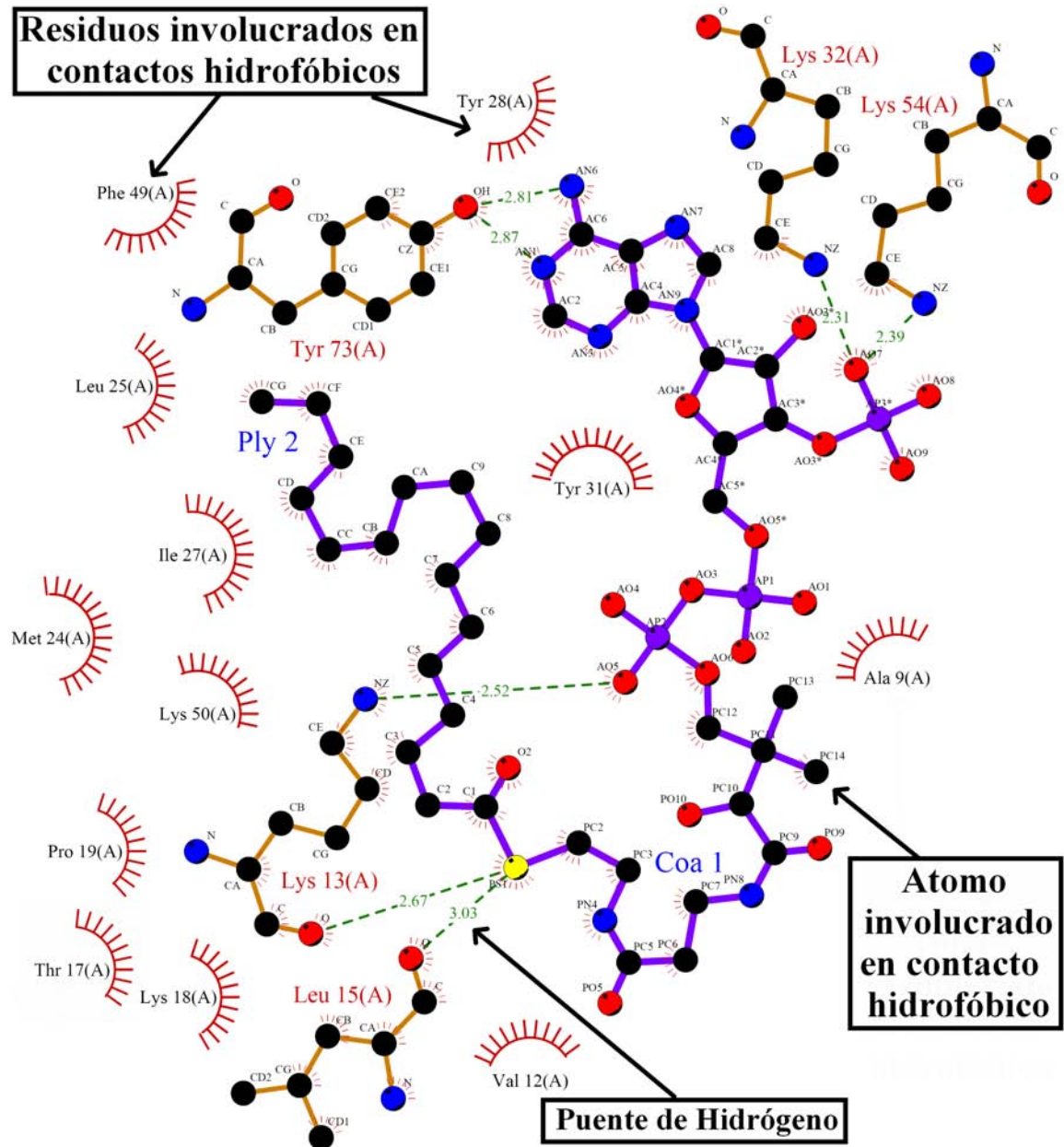


Figura 4: DATOS DE RMN: INTERACCIÓN ENTRE EL PALMITATO-CoENZIMA A Y LA ACBP. GENERADO MEDIANTE PDBSUM [LASKOWSKI, 2005] Y LIGPLOT [WALLACE, 1995]

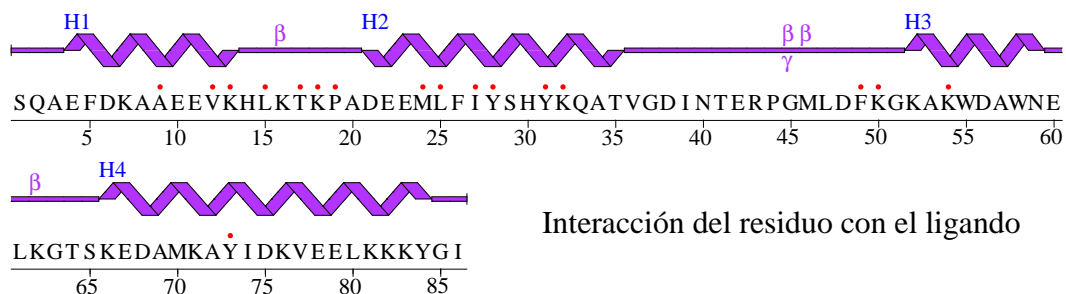


Figura 5: DATOS DE RMN: ESTRUCTURA SECUNDARIA. LOS PUNTOS SOBRE LOS CÓDIGOS DE UNA LETRA DE LOS AMINOÁCIDOS REPRESENTAN LA INTERACCIÓN DE DICHO RESIDUO CON EL LIGANDO PLY-CoA [LASKOWSKI, 2005].

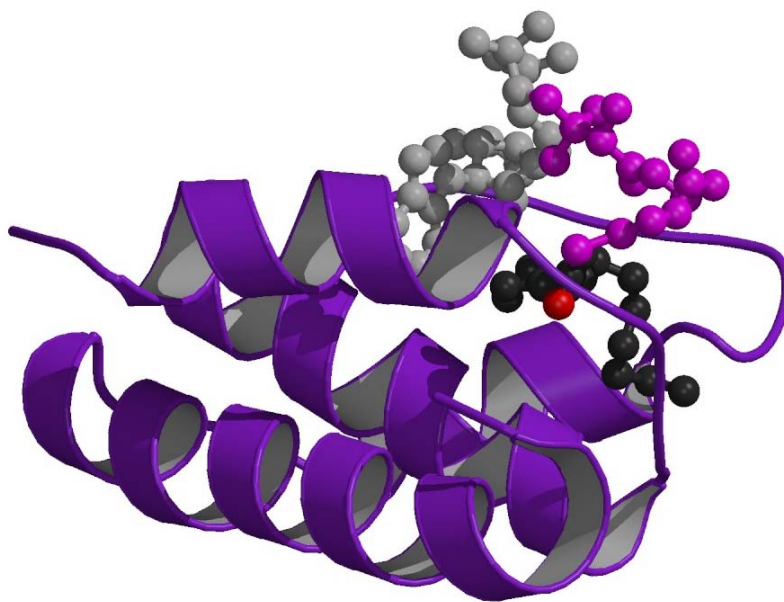


Figura 6: DATOS DE RMN: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL MODELO NRO 20 DEL COMPLEJO ACBP-pALMITATO-CoENZIMA A [LERCHE, 2003] (GENERADO MEDIANTE PDBSUM [LASKOWSKI, 2005], MOLSCRIPT [KRAULIS, 1991] Y RASTER3D [MERRIT, 1997]).

archivo MD_ACBP1M_2.GRO.

§ VI.3.2 Muestra en Equilibrio de Ply–CoA. Se partió de la estructura del Palmitato-Coenzima A de datos de RMN depositados en el pdb bajo el código 1NVL [Lerche, 2003] del protein data bank [Berman, 2000]. Del mismo se obtuvo el archivo PLYCOA.PDB, por edición manual. Se seleccionó el primer modelo. Para construir la topología se procedió a estudiar el campo de fuerzas buscando estructuras similares. En una modificación del campo FFG43A1 original [Van Gunsteren, 1996], que condujo al FFG43A2X[§], se identificó una estructura tipo lípido que contenía cadenas hidrocarbonadas semejantes a las del palmitato. Se realizó el modelo de bloques de la figura 7. Este trabajo se hizo manualmente, por comparación visual con estructuras pertenecientes al campo de fuerza elegido. Así se asignaron cargas parciales, parámetros de enlaces, ángulos, diedros propios e impropios. Esto garantiza la compatibilidad del modelo de ligando con los parámetros estándar del resto del sistema (la proteína).

Se generó un archivo de coordenadas iniciales PLYCOA.GRO, para los átomos del ligando, extractados manualmente de los datos de RMN. Se realizaron 15 pasos de minimización en energía en vacío. Se generó una caja de dimensiones 2.92 x 2.96 x 3.08 nm. Se la solvató, adicionando en el espacio vacío en la caja, 843 moléculas de agua SPC [Berendsen, 1981]. Debido a la carga negativa de la CoA, se reemplazaron cuatro moléculas de agua por contraiones Na⁺ para lograr electroneutralidad. Se volvió a minimizar mediante 2000 pasos, el sistema combinado de ply–CoA, agua y contraiones. Se cambió el agua al modelo SPC/E [Berendsen, 1987]. Se realizó una corrida de Dinámica de este sistema, durante 1.25 ns. La estructura final se almacenó en el archivo MD_PLYCOA_3.GRO.

§ VI.3.3 DM de ACBP+PlyCoA. Una vez generadas las muestras en equilibrio de ACBP, y de PlyCoA, se procedió a “ensamblar” el sistema combinado. Se utilizó para ello la herramienta gráfica VMD [Humphrey, 1996].

Se cargaron en ella los archivos MD_ACBP1M_2.GRO y MD_PLYCOA_3.GRO. Se procedió a trasladar y rotar convenientemente la molécula de Ply–Coa. Luego se salvaron los archivos iniciales en un archivo de formato PDB, apto para iniciar la simulación (ver figura 8). La distancia PlyCoa—ACBP es de 1.0 nm, medida de átomo a átomo más cercano.

Se colocó el ligando *en el lugar que el mismo ocuparía en la membrana*, de acuerdo con los resultados del Capítulo V (ver figura 8).

La topología fue simplemente concatenada entre las topologías que describen el ACBP en agua, y al plycoa+agua+Na⁺ manualmente con algún cuidado. Se le retiró

[§]ver http://www.gromacs.org/topologies/force_fields.php

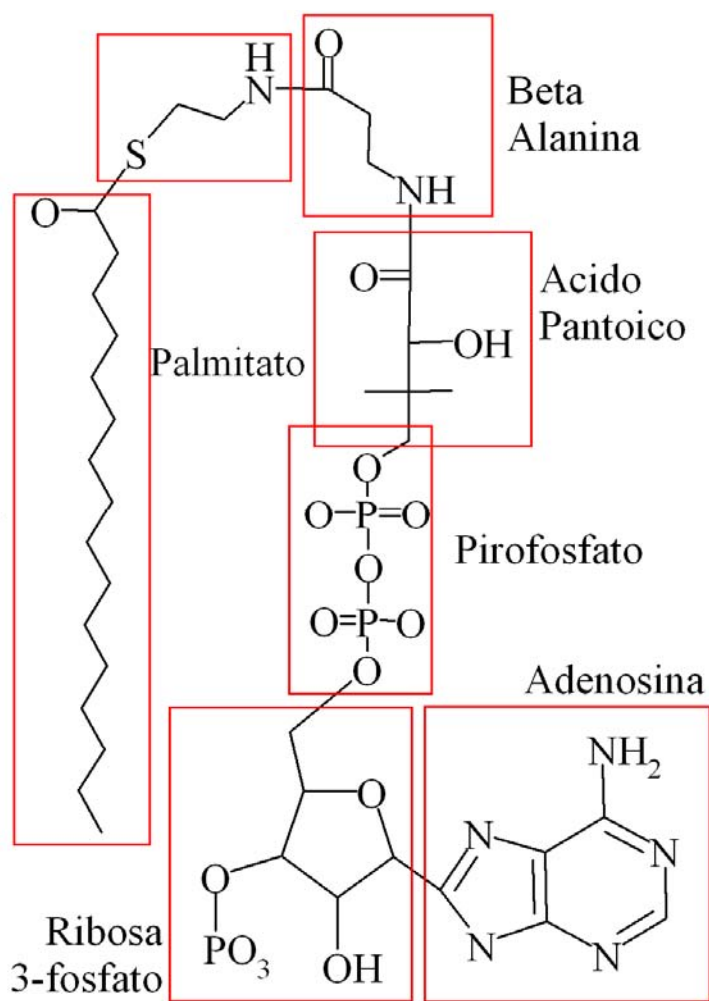


Figura 7: MODO DE ELABORACIÓN DEL MODELO DE PALMITOIL-COENZIMA A: SE ASIMILÓ EL CONTENIDO DE CADA BLOQUE A UNA ESTRUCTURA EXISTENTE DENTRO DEL CAMPO DE FUERZAS GROMOS43A1.

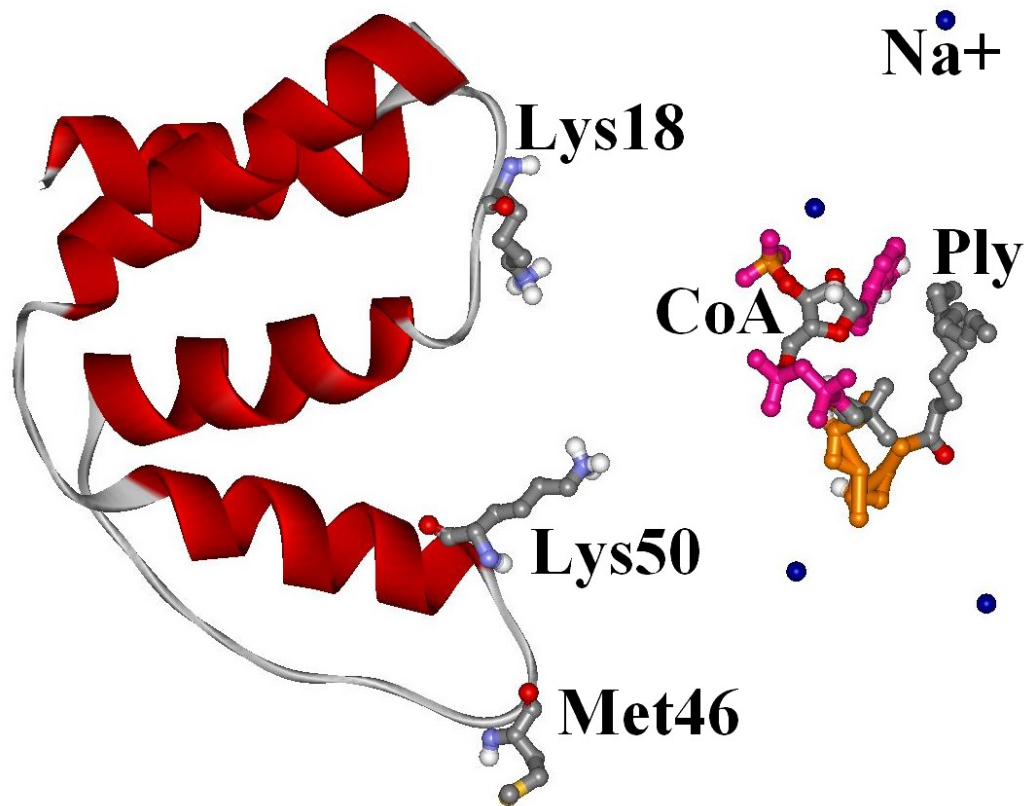


Figura 8: ESTRUCTURA INICIAL DE LA ACBP-PlyCoA-Na⁺ PARA LA EJECUCIÓN DE DM. LA ACBP PROVIENE DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA PROTEÍNA EN LA GLÁNDULA HARRERIANA DE ARMADILLO [COSTABEL, 2005], MIENTRAS QUE EL PLY-CoA PROVIENE DE DATOS DE RMN [LERCHE, 2003].

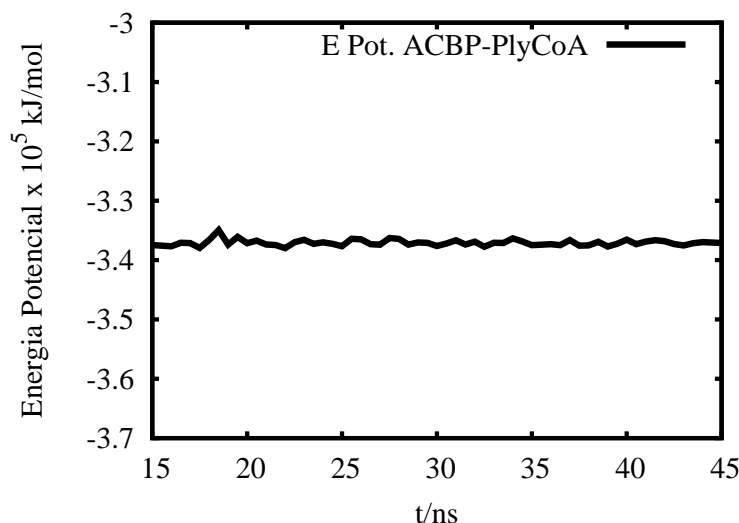


Figura 9: ENERGÍA POTENCIAL COMO CRITERIO DE EQUILIBRIO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

todo el solvente al sistema, conservando sin embargo las contracciones. Se minimizó la estructura combinada sin agua, en vacío, con 101 pasos del método estándar de “descenso rápido”. Se colocó el sistema en una caja rectangular de dimensiones $4.57 \times 6.64 \times 7.23$ nm. Se solvató el sistema agregándole 6830 moléculas de agua. Se minimizó nuevamente con 2000 pasos de descenso rápido. Se realizó una corrida de equilibración final de DM de 200 ps que fue descartada. Se logró así la estructura MD_ACP_2.GRO que fue la inicial para las corridas de producción.

§ VI.3.4 Equilibrio. Se monitoreó la energía potencial como criterio de equilibrio. Esta energía se estacionó en $-3,3 \times 10^5$ kJ/mol con variaciones de $0,01 \times 10^5$ kJ/mol, o sea de 0,3 %. En la figura 9 vemos una curva típica.

VI.4 VALIDACIÓN DEL MODELO Y RESULTADOS

Se utilizó VMD para inspeccionar las trayectorias visualmente. Esto permitió apreciar visualmente que el ligando se aproxima a la proteína dentro del primer ns ($= 10^{-9}$ seg) de simulación.

§ VI.4.1 Distancias ACBP-PlyCoA entre centros de Masa.. Para investigar con más detalle este acercamiento se utilizó la herramienta `G_DIST` de GROMACS [Lindahl, 2001] para analizar las distancias ACBP—PlyCoA entre Centros de Masa de ambas moléculas en función del tiempo. En la figura 10 vemos una curva típica. Así se pudo constatar cuantitativamente la aproximación de ambas moléculas.

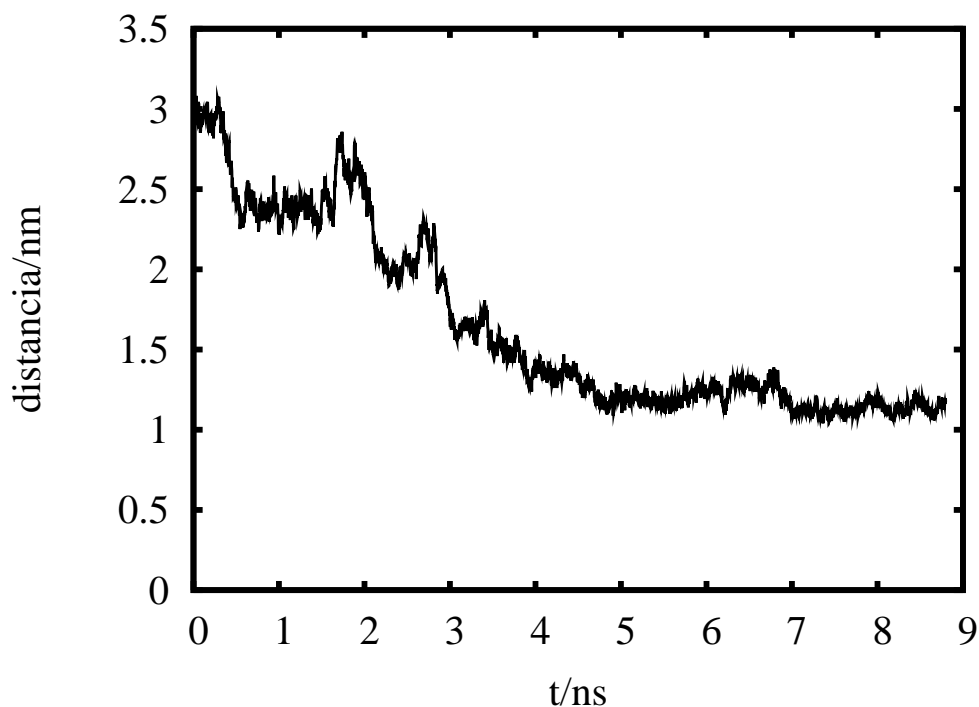


Figura 10: DISTANCIA ACBP—PLYCoA, ENTRE LOS CENTROS DE MASA

§ VI.4.2 Primera Validación: Distancias interatómicas de RMN. A los efectos de la comparación se debe recordar que el origen del ACBP no es el mismo en el experimento de RMN y en la DM: en el primer caso es el ACBP de origen Bovino, mientras que en las simulaciones reemplazamos el ACBP Bovino de RMN por el ACBP de glándula *harderiana* de armadillo obtenido por cristalografía de rayos X en nuestro país [Costabel, 2005].

Notemos que en la figura 4 de la página 79 se aprecian los puentes de hidrógeno (línea punteada) que constituyen la unión entre ACBP y el Ply-CoA. Resultó entonces natural comparar la unión que se forma en la simulación entre el ACBP y el PlyCoA con la información sobre la unión que se obtiene de los datos de RMN (que como dijimos en la sección VI.2.1, son compatibles con múltiples estructuras).

Para realizar esto se analizó la *distribución* de las distancias entre los 7 pares de átomos que forman puentes de hidrógeno en la estructura de RMN. Por ejemplo, se calculó la distancia PCOA.AN6–Tyr73.OH (esta notación representa la distancia entre el nitrógeno AN6 del Ply-CoA, al OH de la Tyr73 del ACBP). En la figura 4 que representa el modelo nro. 20 de RMN constatamos que esa distancia es 0.281 nm, siendo distinta en otros modelos.

Dado que (como puede comprobarse por inspección directa de la figura 4) esto

no nos informa de la posición de la cola hidrocarbonada del ácido palmítico, se decidió incluir un par atómico adicional para tal registro. Se realizó una búsqueda de distancias entre pares de átomos de NMR sobre los 20 modelos, para detectar cuáles de ellas se mantenían aproximadamente constantes. Se detectó que el carbono CG del PlyCoA (el extremo del Acido Palmítico) está coordinado con el Oxígeno de la Phe49. Se procedió a agregar este par a la lista de pares provenientes de puentes de hidrógeno.

Se calculó así para los veinte modelos de RMN la estadística sencilla de las distancias interatómicas. En la tabla 1 se puede observar el resultado. Un análisis

Par de átomos ACBP–PlyCoA	DISTANCIA nm			
	Media (A)	Máx (B)	Mín (C)	Rango (C)-(B)
1. Tyr73.OH—PCoA.AN6	0.30	0.36	0.27	0.09
2. Tyr73.OH—PCoA.AN1	0.30	0.31	0.28	0.03
3. Lys32.NZ—PCoA.AO7	0.43	0.78	0.23	0.55
4. Lys54.NZ—PCoA.AO7	0.41	0.72	0.23	0.49
5. Lys13.NZ—PCoA.AO5	0.28	0.44	0.24	0.20
6. Lys13.O—PCoA.PS1	0.61	0.80	0.27	0.54
7. Leu15.O—PCoA.PS1	0.60	0.86	0.30	0.55
8. Phe49.O—PCoA.CG	0.41	0.73	0.28	0.44

Cuadro 1: Datos de RMN: Distancias interatómicas. (A): Promedio, (B): Máxima, (C): Mínima, (C)-(B): Rango. (Estadística sobre las 20 estructuras).

somero de los datos anteriores muestra que hay porciones del ligando que permanecen a distancia relativamente *fija* con respecto al ACBP. Por ejemplo los átomos Nitrógeno AN6 y AN1 del doble anillo de la Coenzima A, permanecen a 0.3 nm de distancia del Oxígeno de la Tirosina. Por otro lado el resto del ligando presenta variaciones de distancia grandes, de aproximadamente 0.5 nm.

Estas distancias aparecen en línea punteada como *referencia* en las figuras 11, 12, 13 y 14 que muestran los datos de simulación por *dinámica molecular*. En esas figuras se representan las evoluciones temporales de las distancias correspondientes en el modelo computacional, a lo largo de 45 ns de tiempo (esto representa aproximadamente dos meses de tiempo de CPU en gromacs).

VI.5 ANÁLISIS “HISTÓRICO”

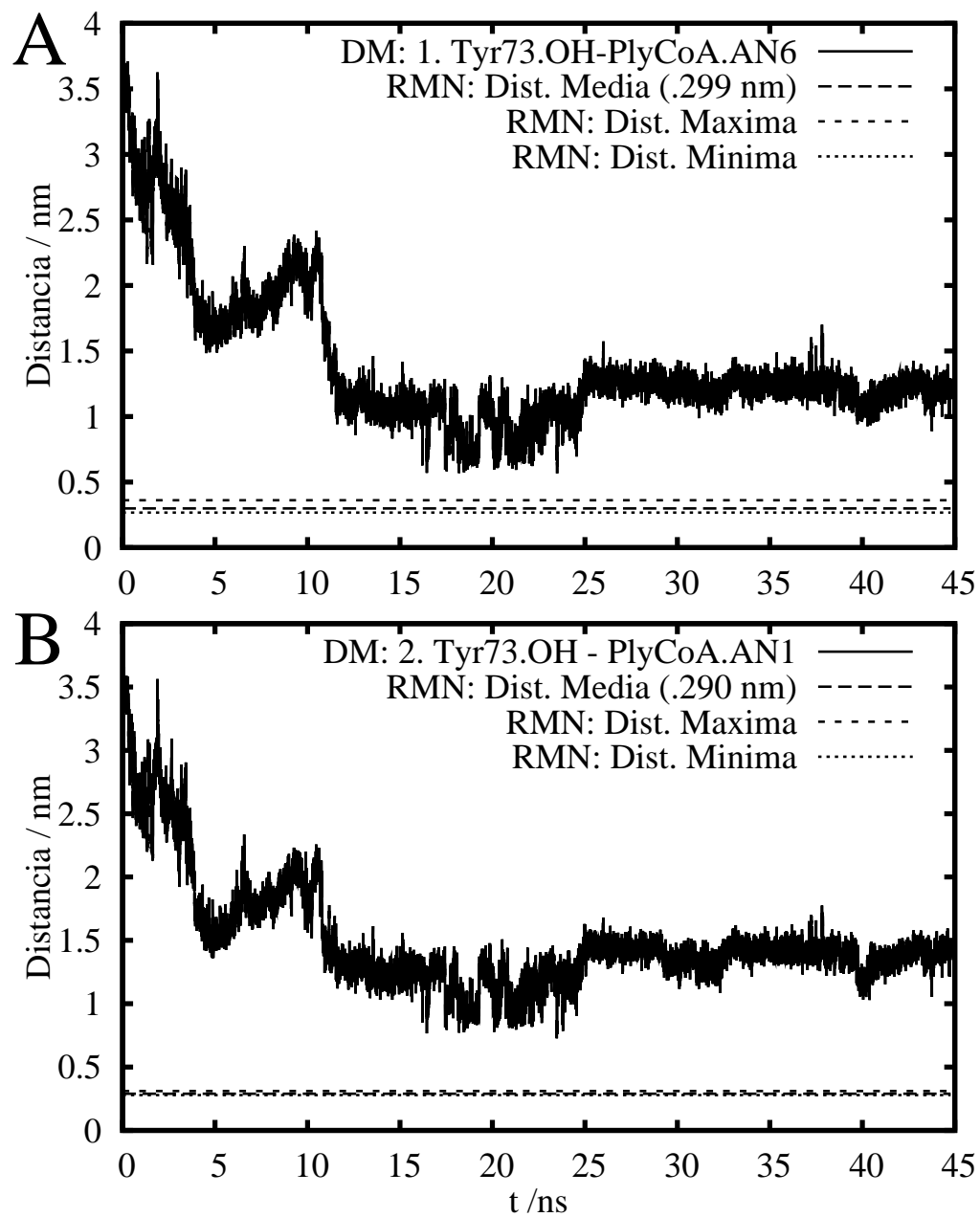


Figura 11: DISTANCIA ACBP—PlyCoA. VER TEXTO EN SUBSECCIÓN: VI.4.1

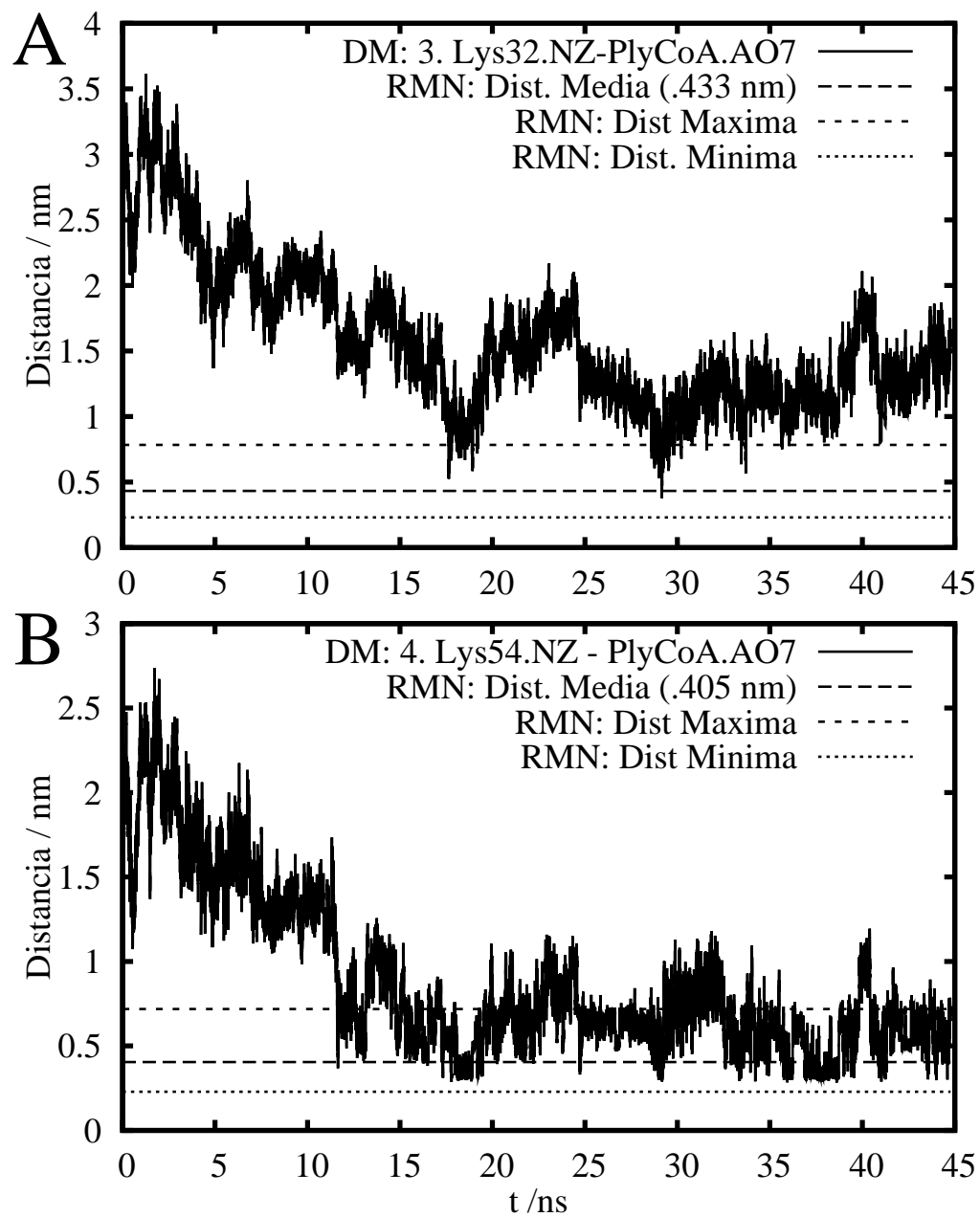


Figura 12: DISTANCIA ACBP—PLYCoA. VER TEXTO EN SUBSECCIÓN: VI.4.1

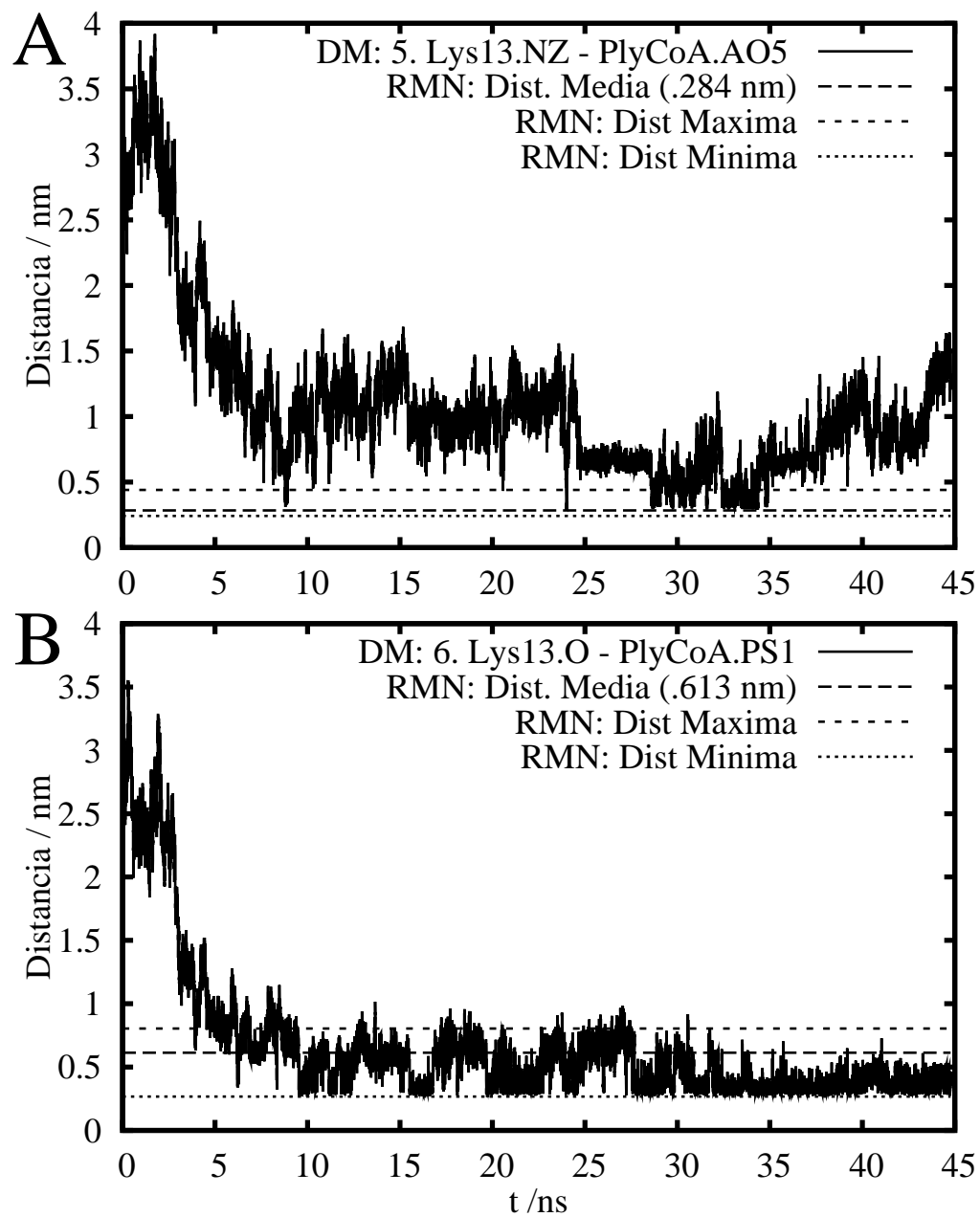


Figura 13: DISTANCIA ACBP—PLYCoA. VER TEXTO EN SUBSECCIÓN: VI.4.1

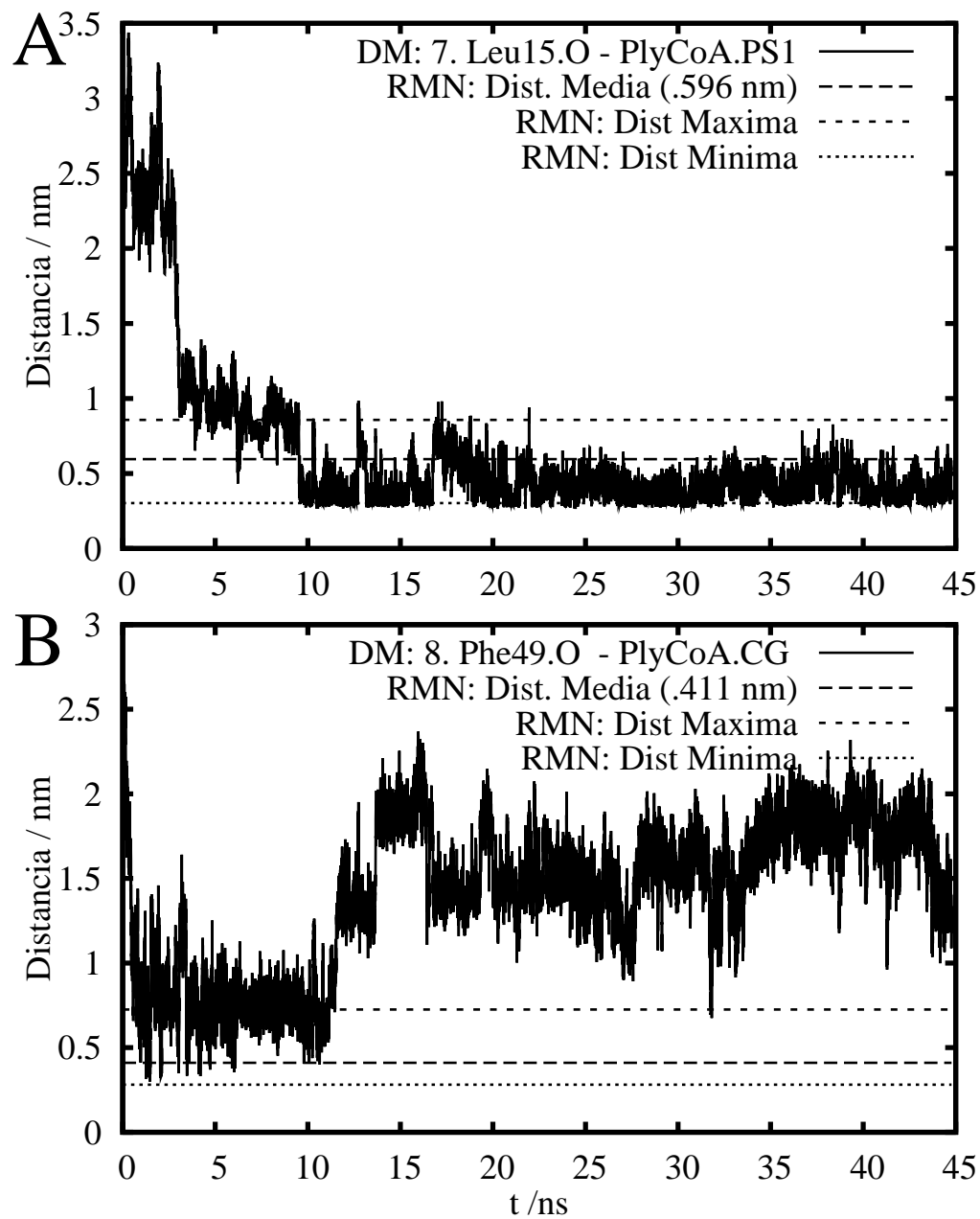


Figura 14: DISTANCIA ACBP—PLYCoA. VER TEXTO EN SUBSECCIÓN: VI.4.1

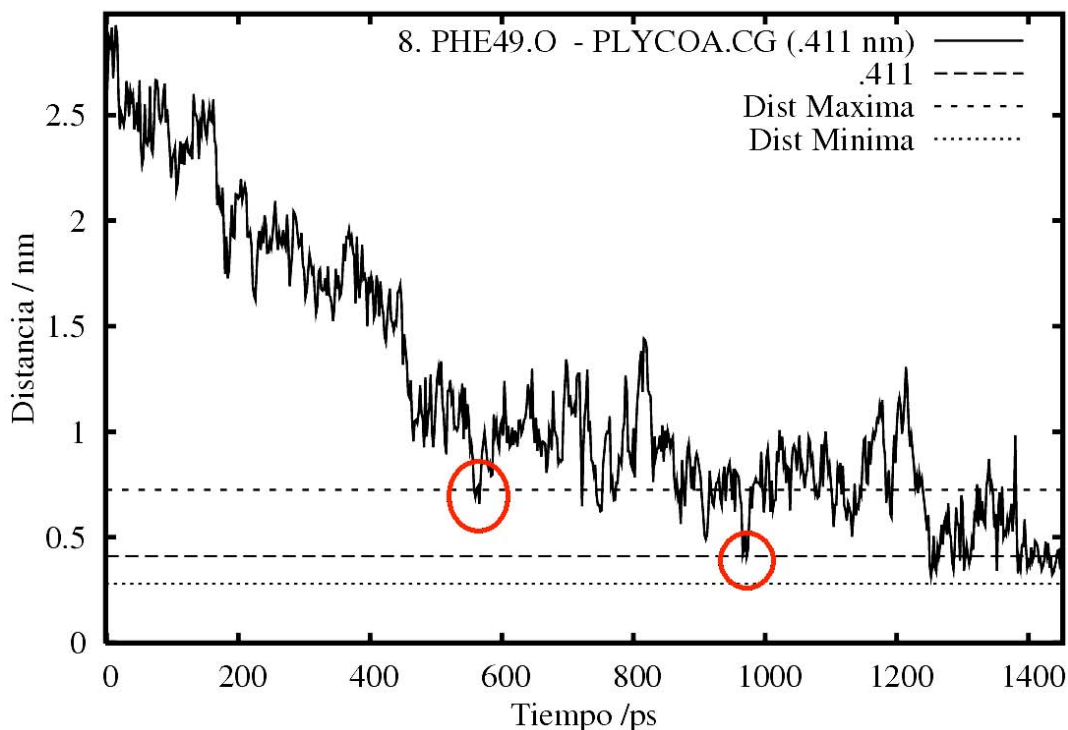


Figura 15: DISTANCIA ACBP—PLYCoA. A LOS 557 PS Y A LOS 965 SE APRECIA LA INSERCIÓN DEL CARBONO CG EN EL SITIO DE RMN

§ VI.5.1 Descripción de lo observado. El sistema parte de una distancia de 3 nm entre centros de masa y rápidamente (esto es en tiempos de simulación y para objetos como una proteína y su ligando) en 600 ps llega el carbono CG (ver figura 3 en la página 77), a la zona “compatible” con los datos de RMN (aproximadamente 0.7nm) Esto es, recorre 2.1 nm en ese tiempo lo que equivale a una velocidad de $2,1 \times 10^{-9} \text{nm} / 600 \times 10^{-12} \text{s} = 3,5 \text{m/s}$.

La primera impresión al estudiar las 8 distancias interatómicas es que todas *convergen en promedio* a sus respectivos valores de RMN. Pasemos ahora a estudiar el caso de cada par de átomos.

§ VI.5.2 Ingreso del Carbono CG. El primer hito notable es la introducción del carbono CG (ver la página 77) en la zona de compatibilidad RMN a los $t=557$ ps, llegando al promedio de los valores RMN a los 965 ps (ver figura 15). Esto es compatible con la evidencia experimental acerca de la *partición* del Acil-CoA en las membranas que *comienza* por la introducción de la zona *no polar* (la cadena de carbonos del ácido palmítico en la membrana página 1 de [Faergeman, 1997]). Veamos un gráfico del complejo a los 965 ps, en la figura 16. En ella se representa

la interacción de los residuos **Lys50**, **Leu47**, y **Phe49** con la cola de carbonos del ligando. Notablemente estos residuos son los que orientan fuertemente al ACBP en la dirección de la membrana (ver el estudio realizado por el método electrostático en el capítulo V).

§ VI.5.3 Posición del Azufre **PS1**. Entre los $t=3$ a los 5 ns ingresa el azufre (ver página 77) en la zona de compatibilidad RMN (ver figura 14 **A**) y 13 **B**). Este azufre se posiciona de tal modo que va formando y rompiendo puentes de hidrógeno con el oxígeno de la **Lys13**, y el oxígeno de la **Leu15**. Por ejemplo, veamos el momento de la simulación $t=3926$ ps. Un detalle de las distancias se ve en las figuras 17 **A** y **B**). Se observó que durante los 45 ns de simulación el azufre **PS1** permaneció en el lugar dado por los datos de RMN.

§ VI.5.4 Posición del Oxígeno **AO5**. A los $t=8800$ ps de evolución del sistema, se posiciona el Oxígeno AO5 del CoA (ver figura de la página 77), cerca del Nitrógeno Zeta de la Lisina 13 (en la figura 18 vemos la evolución de la distancia entre dichos átomos). Veamos el esquema Ligplot [Wallace, 1995] de esta fase del sistema en la figura 19. El algoritmo LIGPLOT detecta en esta fase de la simulación los puentes de hidrógeno entre los pares: **Lys18.NZ–CoA.AO3***, **Lys18.NZ–CoA.AO2***, **Lys50.NZ–CoA.AO5***. Notemos que el gráfico reconoce la importancia de la **Lys13** como parte de la interacción. En lo que sigue se encontrarán más argumentos en favor de la importancia de estos residuos en la interacción.

§ VI.5.5 Divergencias del Modelo. En el tiempo de simulación no se reproduce la situación que nos muestran los datos de RMN en los siguientes aspectos:

1. A los $t=11$ ns, el carbono CG se aleja de su posición esperada, quedando a una distancia de 1.5–2.0 nm del Oxígeno de la **Phe49** (ver figura 14).
2. Los átomos AN6, AN1 parecen acercarse pero no llegan a la distancia experimental (figura 11).
3. El átomo AO7 se acerca y luego diverge de la distancia con el átomo **Lys32.NZ**. Sin embargo la distancia con respecto a la **Lys54.NZ** se logra satisfactoriamente (figura 12). Cabe mencionar que las **Lys32** y **Lys54** se *conservan* en las secuencias de 16 especies de ACBP.

Aún así, esto es compatible con la idea de que no se ha alcanzado aún el “equilibrio” en la unión de la proteína con el ligando.

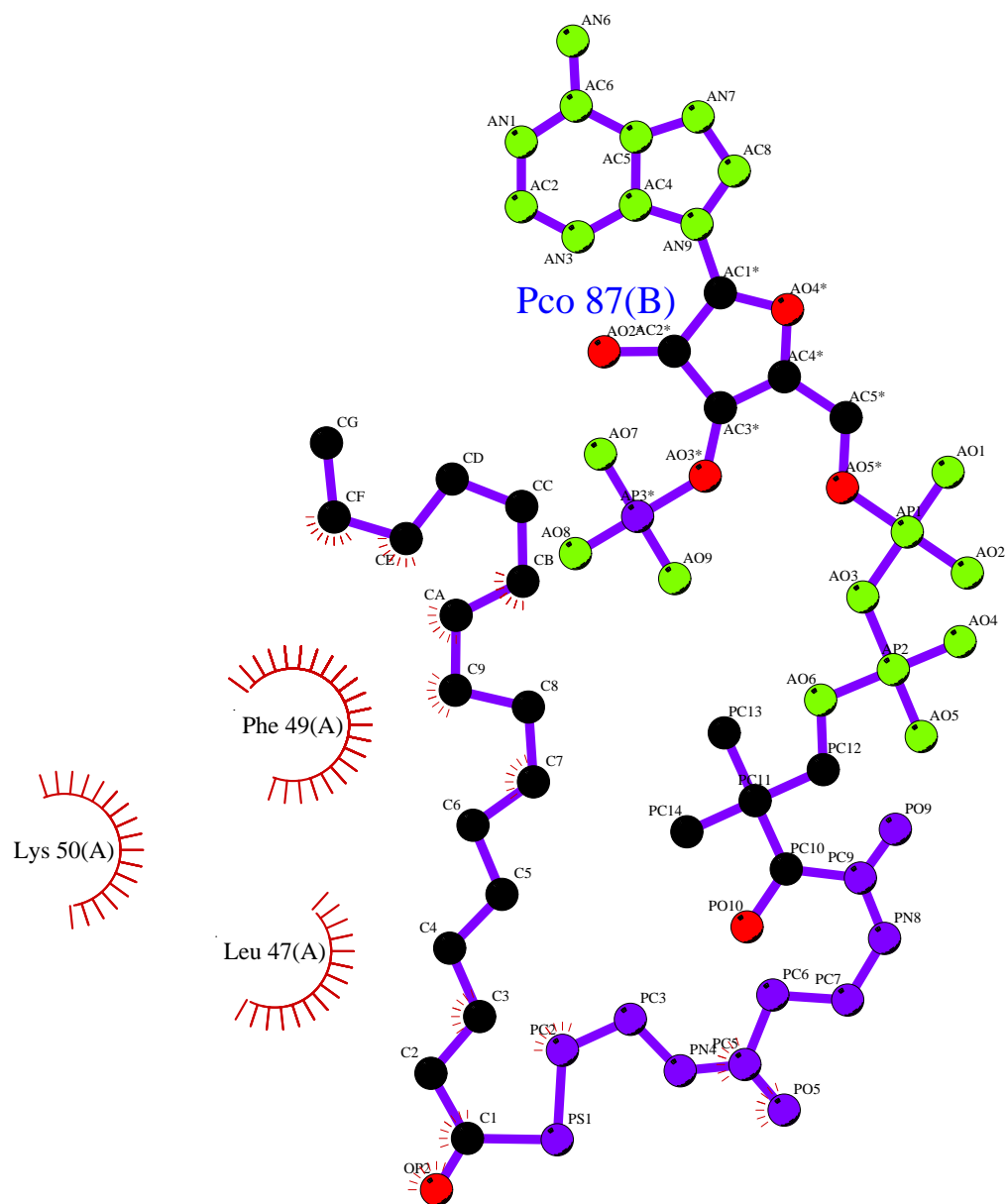


Figura 16: GRÁFICO ESQUEMÁTICO LIGPLOT [WALLACE, 1995] INDICANDO LA INTERACCIÓN TÍPICA QUE APARECE A LOS 965 PS DE SIMULACIÓN.

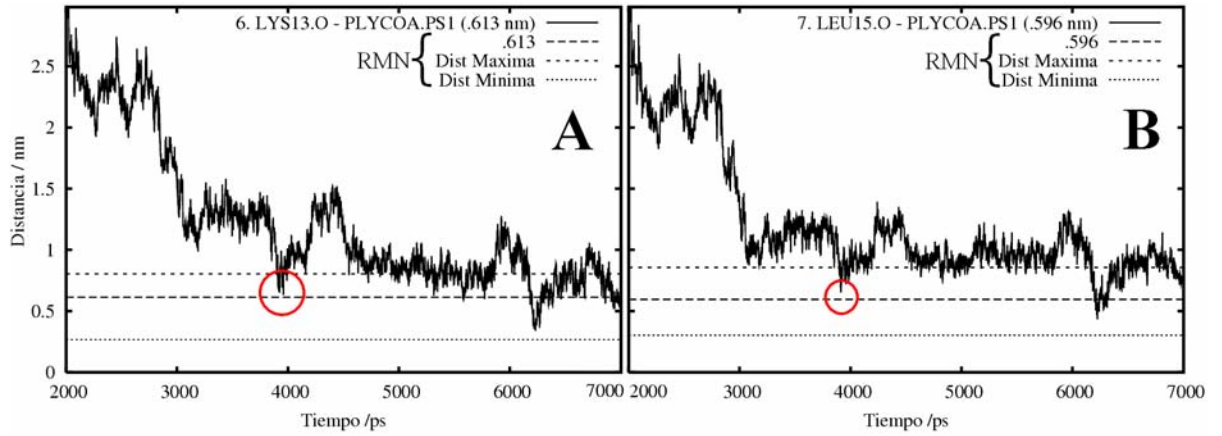


Figura 17: DETALLE DEL PROCESO DE INGRESO Y PUESTA EN POSICIÓN DEL AZUFRE, A LOS 3926 PS DE SIMULACIÓN.

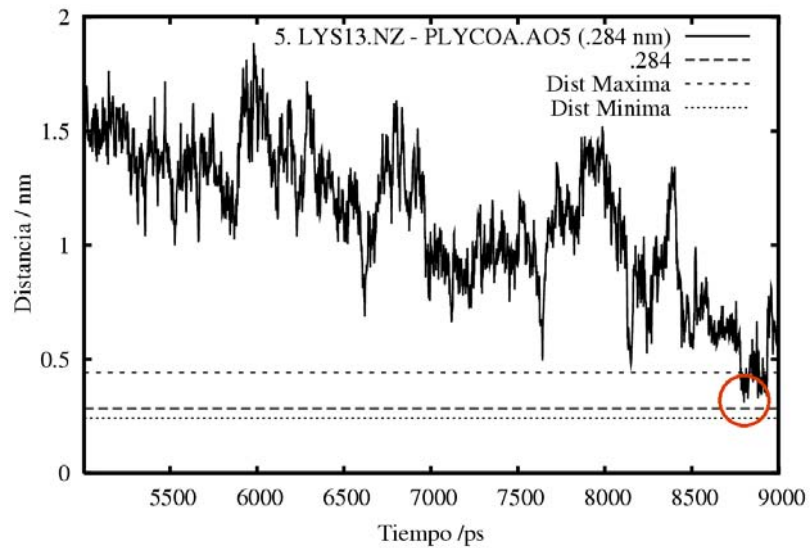


Figura 18: FASE INGRESO DEL AO5, $t=8800ps$

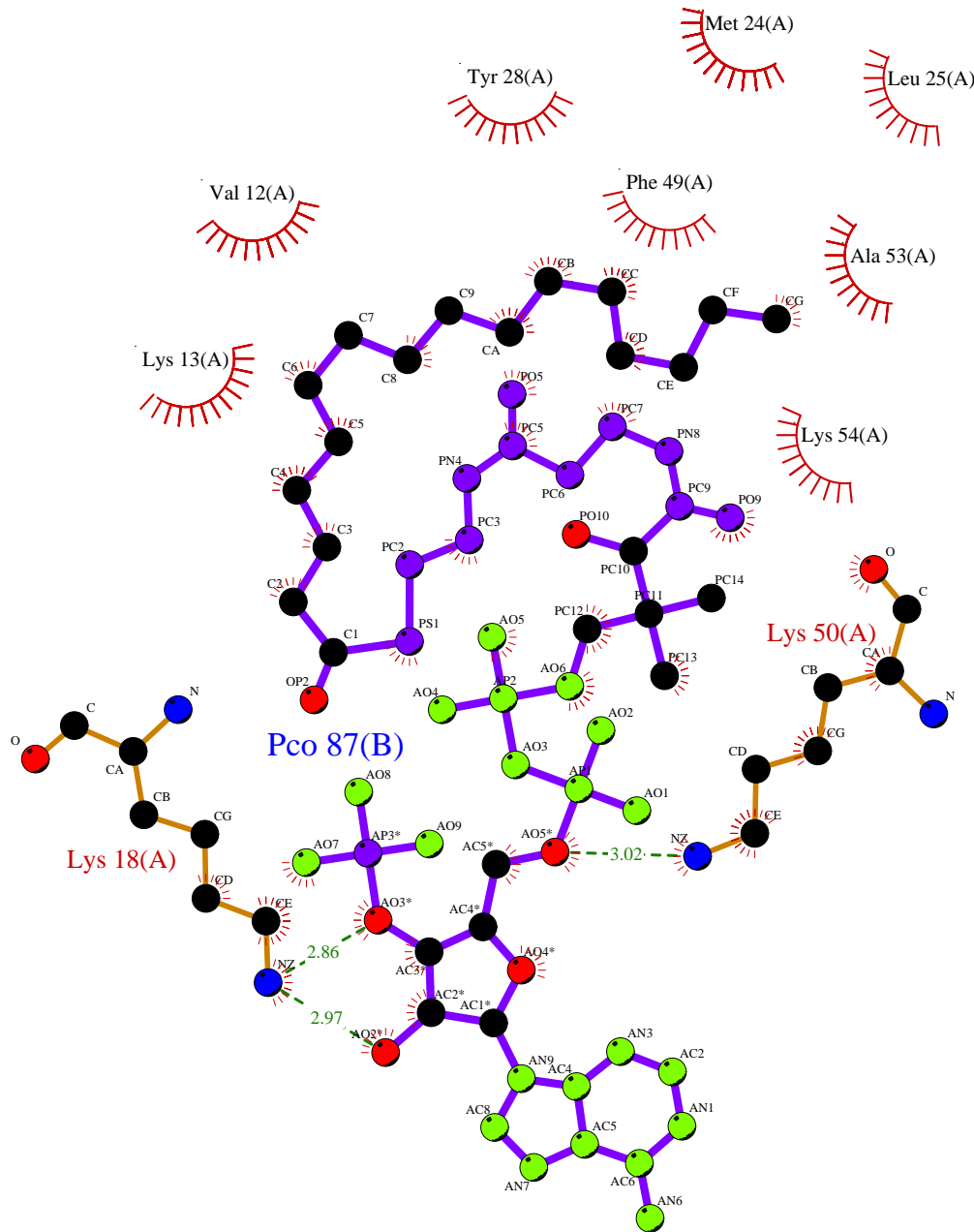


Figura 19: ESQUEMA LIGPLOT DE LA FASE DEL INGRESO DEL **AO5**, T=8800ps.

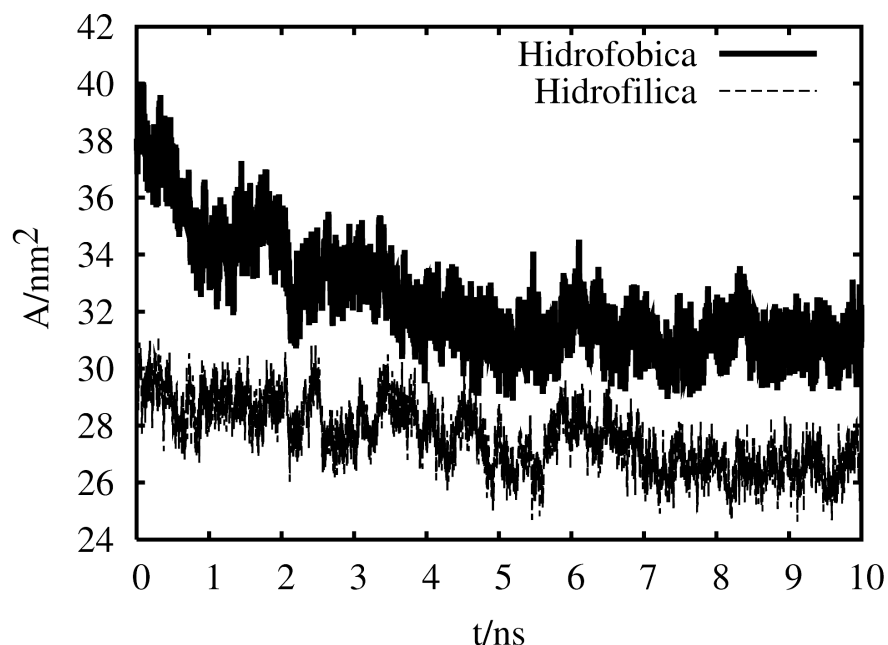


Figura 20: DISMINUCIÓN DEL ÁREA EXPUESTA AL SOLVENTE. EN LÍNEA GRUESA EL ÁREA HIDROFÓBICA Y EN LÍNEA PUNTEADA LA HIDROFÍLICA.

VI.6 AREA EXPUESTA AL SOLVENTE

Se estudió la variación del área expuesta al solvente del sistema. Aquí se considera al *conjunto* del ACBP más el ligando. Está claro que si ambos se aproximan, deberán sufrir una deshidratación en las zonas de sus superficies que terminen en contacto. Por lo tanto el área expuesta deberá naturalmente descender. Para el cálculo se utilizó la herramienta `G_SAS` estándar del paquete Gromacs (ver página 43).

En la figura 20 vemos un gráfico típico. Se constatan diferentes aspectos de la unión:

1. El área hidrofóbica y el área hidrofílica disminuyen como era esperable para dos moléculas que se unen (ver en el apéndice, en la página 122 una tabla básica de hidrofobicidad de aminoácidos). El efecto es inicialmente *mayor* en el caso del área de residuos hidrofóbicos. En la figura 21 se observa la disminución del área hidrofóbica en relación con la hidrofílica. A fin de cuantificar se decidió comparar el momento inicial de simulación con el $t=7000$ ps. Numéricamente el área Hidrofóbica expuesta al solvente pasó de 38 a 31 nm^2 , resultando en una disminución absoluta de 7 nm^2 , mientras que su contrapartida hidrofílica pasó de 30,51 a 26,64, resultando en una disminución de 3,9 nm^2 . Inicialmente el área hidrofóbica era un 25 % mayor que la hidrofílica

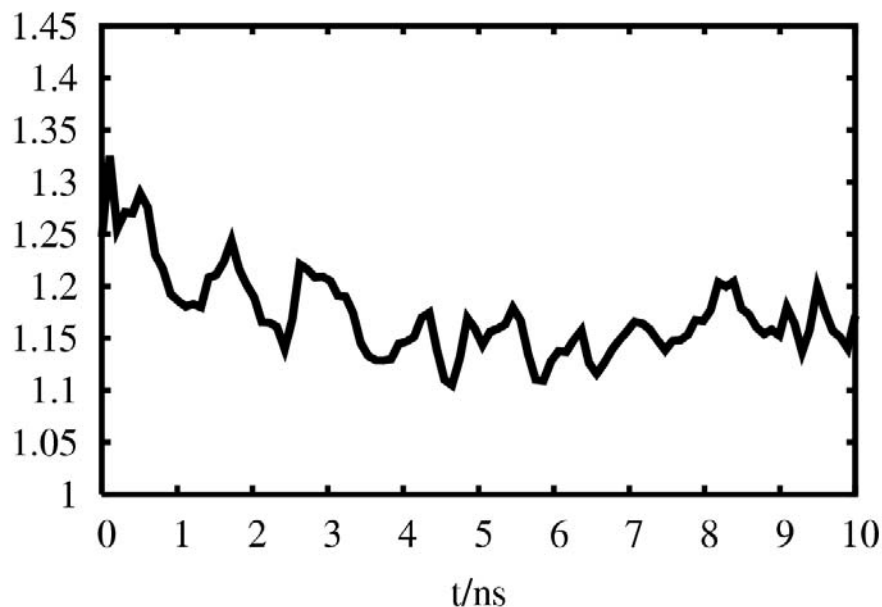


Figura 21: RELACIÓN ÁREA HIDROFÓBICA/ÁREA HIDROFÍLICA VS TIEMPO.

mientras que a $t=7$ ns, esa relación bajó al 17 %.

2. La disminución del área total sin embargo, continúa hasta los 10 ns aproximadamente como puede verse en la figura 22.

Esto sugiere que la unión proteína–ligando resulta favorecida (*en los momentos iniciales* al menos) por la *interacción hidrofóbica*. La combinación de áreas hidrofóbicas ayuda fuertemente a la aproximación en los primeros momentos del reconocimiento. Sin embargo este efecto deja posteriormente de tener un rol protagónico para compartirlo con otros fenómenos que tienen que ver con cambios de la conformación de la macromolécula.

§ VI.6.1 Segunda Validación del Modelo: Estudio del área por Residuo. Para medir la evolución del área expuesta en función del tiempo discriminada por residuo, se procedió a utilizar ventanas temporales de 100 ps, y promediar el área expuesta para los tiempos de 1 a 100 ps, asignando el promedio a $t=0$ ns; para la ventana 1000-1100 ps se asignó el promedio a $t=1$ ns, y así sucesivamente hasta llegar a la ventana temporal 9000-9100 ps (9ns). Luego se utilizó un algoritmo de filtrado semiautomático para detectar los residuos que tienen una tendencia significativa de variación del área expuesta en función del tiempo.

Con este criterio se clasificaron los residuos del ACBP, junto con la molécula del ligando, en grupos:

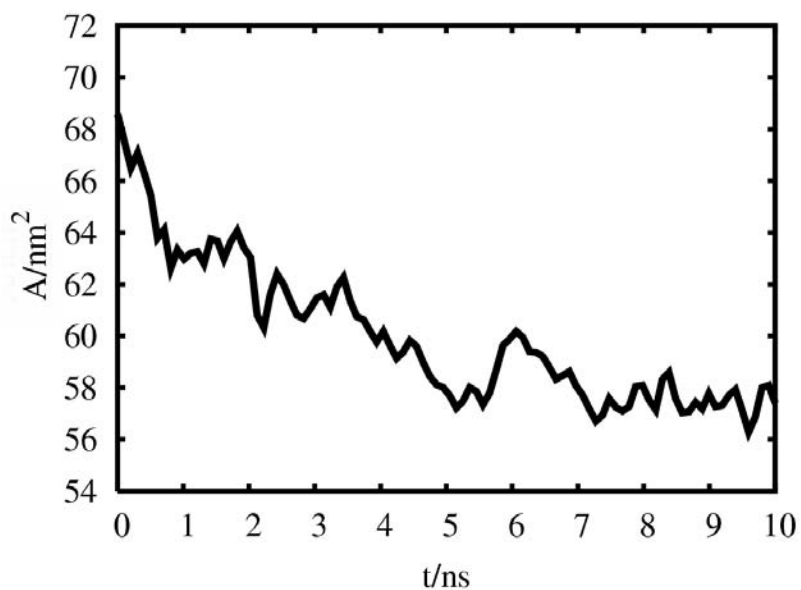


Figura 22: AREA TOTAL EN FUNCIÓN DEL TIEMPO. SE OBSERVA DISMINUCIÓN MÁS ALLÁ DEL LIMITE DE $t = 5\text{ns}$

GRUPO 0: PLY-CoA. Se observa una brusca disminución de 5.7 nm^2 durante los primeros 7 ns (ver figura 23).

GRUPO I: RESIDUOS QUE AUMENTAN SU ÁREA. Se estudió luego el **aumento del**

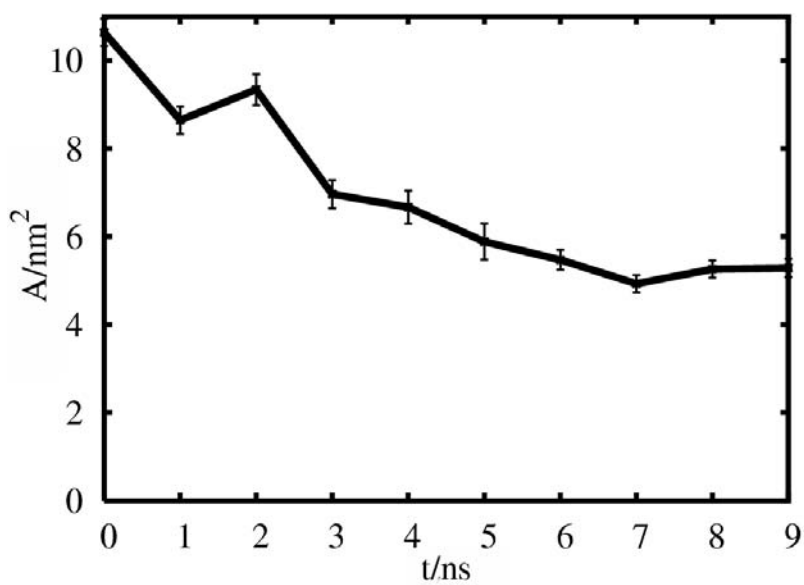


Figura 23: DISMINUCIÓN DEL ÁREA EXPUESTA DEL PLY-CoA

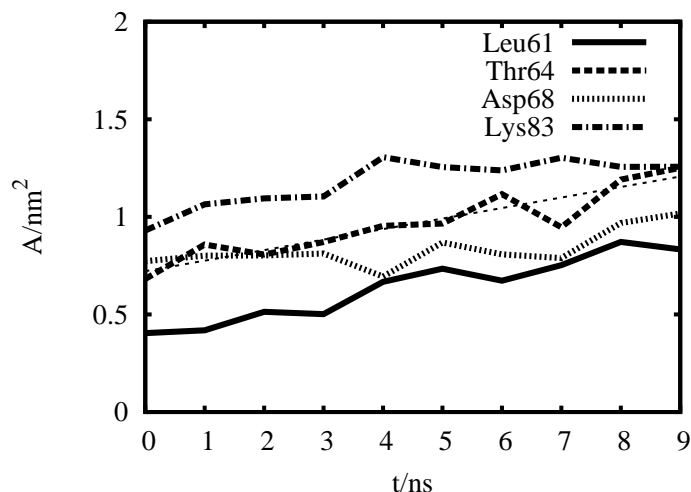


Figura 24: AUMENTO DEL ÁREA EXPUESTA AL SOLVENTE DE LOS RESIDUOS 61, 64, 68 Y 83 EN EL PROCESO DE UNIÓN CON EL LIGANDO.

área de los 4 residuos 61, 64, 68, 83. Los valores iniciales de áreas expuestas son consistentes con el carácter Hidrofóbico de la **Leu61** ($A_{61} \approx 0,4\text{nm}^2$) y el carácter Hidrofílico de la **Lys83** y la **Asp68** ($A_{83} \approx 1\text{nm}^2$ y $A_{68} \approx 0,6\text{nm}^2$ de tal modo que $A_{61} < A_{83}, A_{68}$). Este hecho (que ocurre, como era esperable para otros residuos, ver Grupo III en la página 100) constituye otra corroboración acerca de la bondad del modelo implementado en la simulación.

Su comportamiento es muy similar, ajustándoseles una recta mediante el algoritmo de ajuste no lineal Marquardt-Levenberg implementado en Gnuplot [Williams, 2004]. Vemos los resultados de la pendiente de la recta de ajuste en el cuadro 2. Se

Residuo	Pendiente Recta de Ajuste
Leu61	0.053 ± 0.005 (10 %)
Thr64	0.054 ± 0.008 (15 %)
Asp68	0.021 ± 0.008 (39 %)
Lys83	0.034 ± 0.008 (23 %)

Cuadro 2: Residuos que Aumentan el área expuesta al Solvente

observa que las pendientes son muy similares. La figura 24 da la evolución temporal. Estos aminoácidos están ubicados en la hélice $\alpha 1$, y en el loop entre la tercera y la cuarta (**leu61**). Es destacable que todos estos residuos que **aumentan** su área

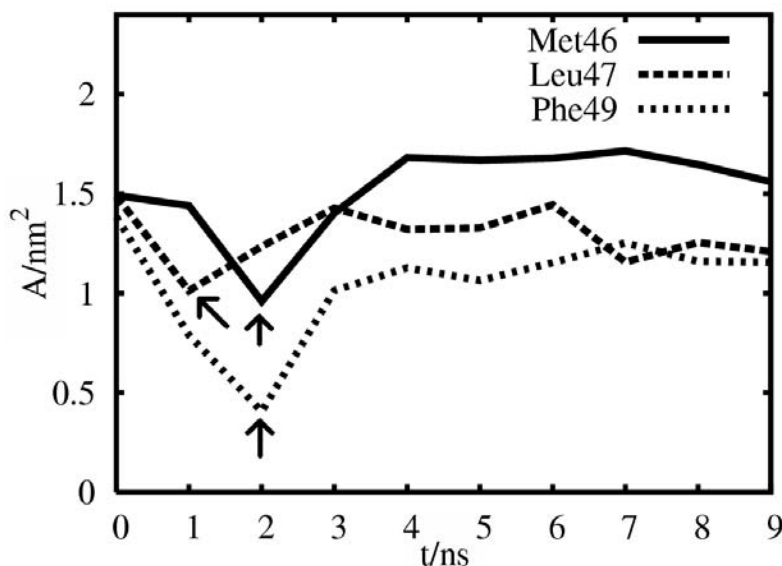


Figura 25: DISMINUCIÓN DEL ÁREA EXPUESTA DEL PLY-CoA

expuesta están en el lado **opuesto a la zona de unión** con el ligando. Esto sugiere un cambio de conformación que será discutido en las conclusiones (en la página 113).

GRUPO II: RESIDUOS DE ÁREA VARIABLE. Los residuos **46, 47 y 49** tienen un comportamiento notable: su área expuesta baja en $t=2\text{ns}$, y luego vuelve a subir a su valor anterior, como se observa en la figura 25. Estos aminoácidos son *hidrofóbicos*, estando sin embargo *fuertemente expuestos al solvente*, justamente en la *zona donde se liga inicialmente* el PLY-CoA. Asimismo la **Met49** fue implicada en el mecanismo de unión del ACBP con la Membrana, donde los cálculos electrostáticos indican que deben estos residuos estar apuntando a la membrana a una distancia de 0.3nm (ver en el capítulo anterior sección V.5 en la página 70). Es también notable que baje inicialmente la **Leu47** y luego lo hagan la **Met46** y la **Phe49**. Esto nos lleva a sugerir que los tres residuos actúan como una “*carnada hidrofóbica*” para atraer al ligando.

Luego de la unión inicial el ligando deberá moverse por la superficie del ACBP hasta llegar a su lugar definitivo en la posición que muestra la experiencia de RMN. Se propondrá una hipótesis sobre este tema en la sección VI.7.

GRUPO III: RESIDUOS QUE DISMINUYEN SU ÁREA. Mediante el método de ajuste de una recta se pueden clasificar en grupos de importancia[#] (en cuanto a la unión con

[#]Nótese que esta clasificación en residuos de “media”, o “alta” importancia surge simplemente debido a la tendencia numérica de la pendiente de la recta de regresión y deben ser validados con criterios

el ligando) según la pendiente tomada como medida del grado en que disminuye su área expuesta. Veámoslo en la tabla 3. Este primer grupo (Importancia **Alta**) de resi-

Importancia	Residuo	Pendiente Recta de Ajuste
Alta	Lys18	-0.091 ± 0.034 (37 %)
Alta	Met24	-0.089 ± 0.016 (16 %)
Alta	Lys50	-0.079 ± 0.019 (24 %)
Media	Gly63	-0.047 ± 0.0085 (18 %)
Media	Gln60	-0.045 ± 0.0085 (19 %)
Media	Lys81	-0.035 ± 0.0058 (17 %)
Media	Tyr28	-0.031 ± 0.0083 (27 %)
Media	Ala53	-0.030 ± 0.011 (37 %)
Media	Ala57	-0.030 ± 0.007 (23 %)
Baja	Tyr31	-0.013 ± 0.002 (19 %)
Baja	Val12	-0.019 ± 0.008 (42 %)
Baja	Glu42	-0.014 ± 0.008 (56 %)
Baja	Lys62	-0.017 ± 0.010 (57 %)

Cuadro 3: Residuos que Disminuyen el área expuesta al Solvente

duos está constituido por la **Lys18** y **Lys50** (hidrofilicas) y la **Met24** (hidrofóbica). Sus áreas son: $A_{18} \approx 1,5\text{nm}^2$ y $A_{50} \approx 1,3\text{nm}^2$, mayores que $A_{24} \approx 0,7\text{nm}^2$.

Estos residuos están implicados en la unión con el ligando: en la estructura de RMN (1NVL) estos tres residuos son los que están coordinados con el Ply-CoA. Eso se observa asimismo en la simulación por DM. Se puede ver la evolución del área de estos tres residuos en la figura 26.

El grupo de importancia **Media**, lo constituyen residuos más alejados (salvo el **Tyr28**) o involucrados en la unión de modo menos claro.

Como es esperable observamos que los residuos hidrofílicos (Gln y Lys) presentan áreas al solvente mayores que los respectivos hidrofóbicos (Ala).

Nótese la disminución del área de los residuos **Gly63** y **Gln60** (esto en la estructura HgACBP, la utilizada en DM). Estos están alejados del ligando (1.1nm entre átomos más cercanos en la estructura de RMN, notar que en la misma el aminoácido de la posición 60 es un **Glutamato**). Sin embargo la disminución que se observa en la figura 27 es notable en los primeros 5 ns. Esto *se corresponde también con el gráfico 26 de los residuos de importancia alta*.

Por último, el grupo de importancia baja, presenta una disminución del área de biofísicos antes de ser tomados como definitivos.

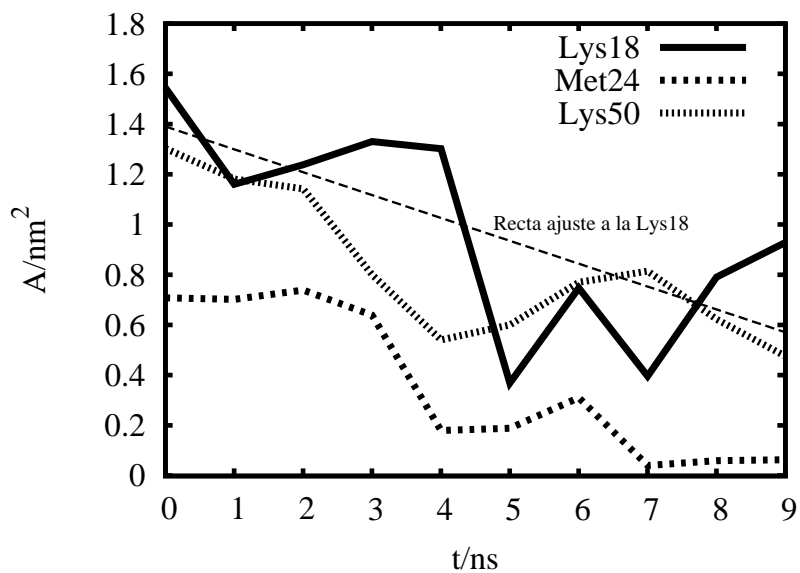


Figura 26: DISMINUCIÓN DEL ÁREA EXPUESTA DE LOS RESIDUOS **Lys18**, **Met24** y **Lys50**, CLAVES PARA LA UNIÓN CON EL LIGANDO

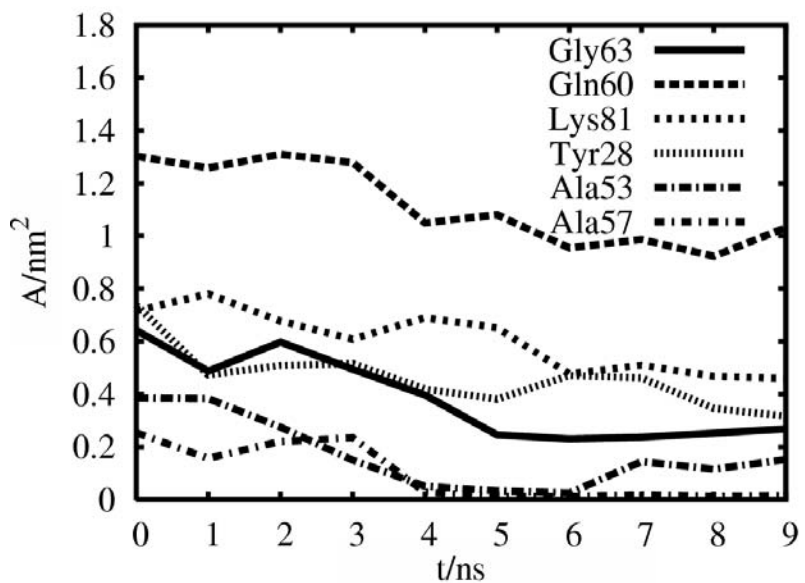


Figura 27: DISMINUCIÓN DEL ÁREA EXPUESTA DE LOS RESIDUOS DE “MEDIA” IMPORTANCIA,

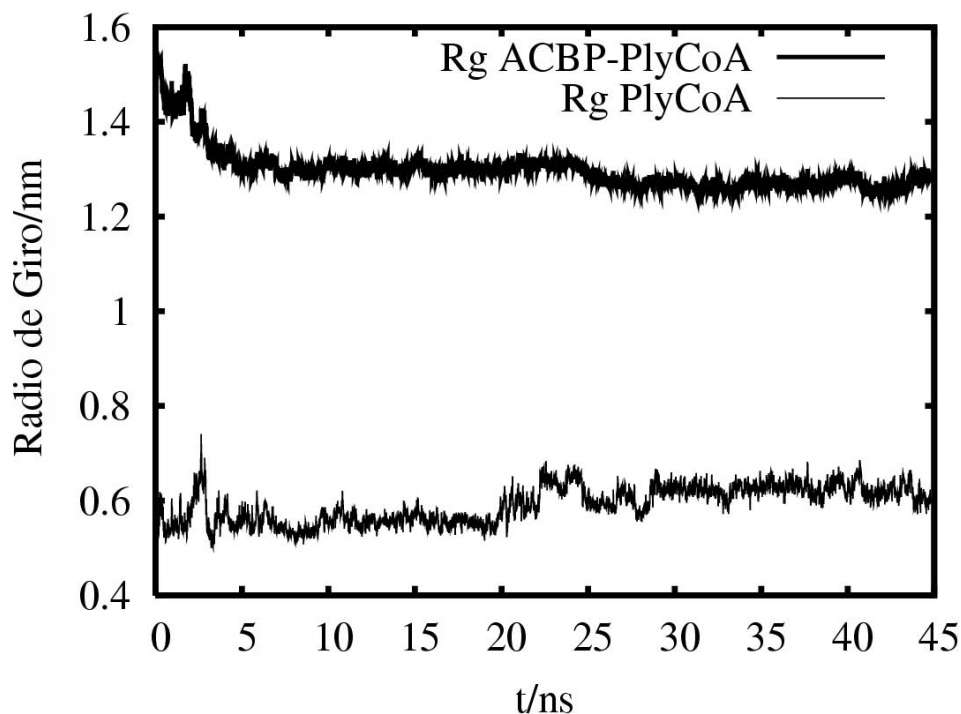


Figura 28: RADIO DE GIRO, PARA EL ACBP EN PROCESO DE UNIÓN CON EL PLY-CoA, Y PARA EL LIGANDO CONSIDERADO AISLADO.

menor cuantía y mas difícil interpretación.

VI.7 TERCERA VALIDACIÓN DEL MODELO: RADIO DE GIRO Y RADIO HIDRODINÁMICO.

Se calculó el Radio de Giro R_g (ver página 43) para el ligando y el complejo. Su resultado puede verse en la figura 28. Se observa que el complejo disminuye su R_g en dos oportunidades: en los primeros 5 ns de simulación y luego a los 25ns. Mientras eso ocurre con el complejo, el ligando considerado aisladamente experimenta una fuerte variación de su R_g , a los 2.6 ns de simulación, pasando de 0.55 a 0.74nm, para luego caer a su valor histórico. Esto muestra que el ligando debe “estirarse” durante el proceso de unión con la proteína.

§ VI.7.1 Distancia entre extremos del Ligando. Para observar en mayor detalle el movimiento del Palmitoil-Coenzima A, se decidió realizar un gráfico de la distancia entre los extremos de la cadena principal del ligando: Carbono(CG)—Nitrógeno(AN6) (ver notación en la figura 3 de la página 77).

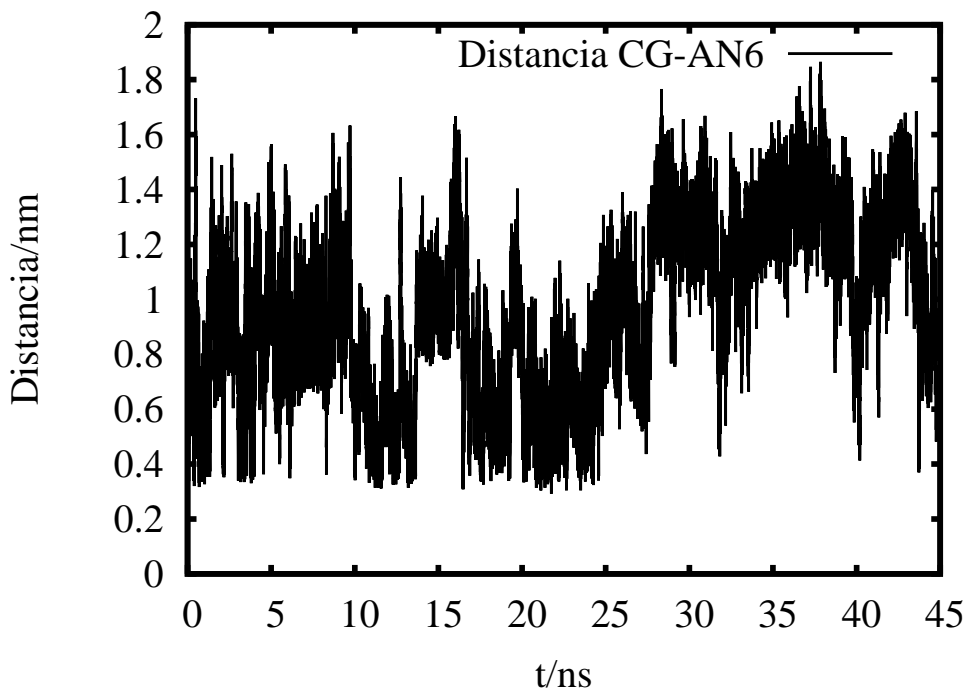


Figura 29: EVOLUCIÓN DE LA DISTANCIA ENTRE LOS EXTREMOS DEL LIGANDO.

Se obtuvo el comportamiento graficado en la figura 29. Se observa que dicha cantidad varía entre 0.4 nm y 1.4 nm. Este gráfico indica que el ligando está contra- yéndose y extendiéndose, *mientras* se desplaza hacia su zona de unión dada por los datos de RMN.

El carbono CG del ligando llega rápidamente (tiempo < 1 ns) a tomar contacto con la superficie del ACBP. Sin embargo el Ply-CoA dista bastante de estar en “su sitio”. La idea es que realiza un movimiento similar al “reptar” que hace un animal sin pies para avanzar. El ligando invierte mucho tiempo (comparado con el que le toma hacer contacto inicial) en “acomodarse” mediante este movimiento repetitivo.

§ VI.7.2 Radio de Giro del ACBP. Para las trayectorias de Dinámica Molecular, calculamos R_g solo para la ACBP (ignorando la existencia del plyCoA). El resultado se observa en la figura 30. Esta disminución de R_g constituye una nueva validación del modelo computacional: es cualitativamente compatible con la disminución de 0.2nm del diámetro hidrodinámico observado por Frolov [Frolov, 1998] mediante experimentos de fluorescencia del Triptofano resuelta en el dominio temporal (con sensibilidad de hasta 1 ns). Este trabajo experimental no se refiere al mismo sistema: la ACBP proviene de hígado de rata mientras que el ligando lo constituyen cis- y trans-parinaroil-CoAs. Sin embargo la gran similitud de las proteínas y los ligandos hacen que sea pertinente la comparación.

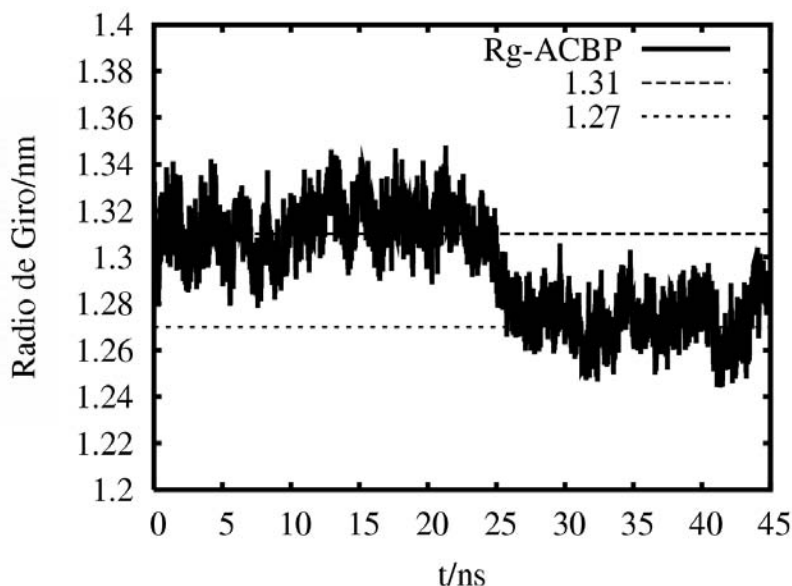


Figura 30: EVOLUCIÓN DEL RADIO DE GIRO DEL ACBP

Suponiendo a la proteína una esfera rígida y suponiendo la validez de la ley de Stokes, puede derivarse la fórmula aproximada para la relación entre el radio hidrodinámico y el de giro:

$$R_h = \sqrt{5/3}R_g \approx 1,29R_g.$$

La disminución medida por DM del radio de giro es aproximadamente $0,043\text{nm}$ (ver figura 30) resultando en $R_{hDM} = 0,043 \times 1,29 \approx 0,055\text{ nm}$. Esto resulta *del orden* del valor experimental $R_h = 0,1\text{nm}$. Aquí suponemos que estamos observando el cambio conformacional (referido experimentalmente) a los $t=25\text{ns}$ de simulación.

Para precisar aún más esto estudiamos la evolución temporal del Radio Hidrodinámico mediante la herramienta HYDROPRO [García de la Torre, 2000]. Esta implementa un algoritmo para el cálculo de las propiedades hidrodinámicas (que incluyen el radio efectivo hidrodinámico) mediante un modelo de esferas con roce.

Se le aplicó este algoritmo a las configuraciones obtenidas mediante nuestra simulación de Dinámica. El resultado se observa en la figura 31. Efectivamente, el modelo reproduce cualitativamente (y cuantitativamente devuelve un resultado dentro del orden de magnitud correcto) los datos experimentales de Frolov y colaboradores.

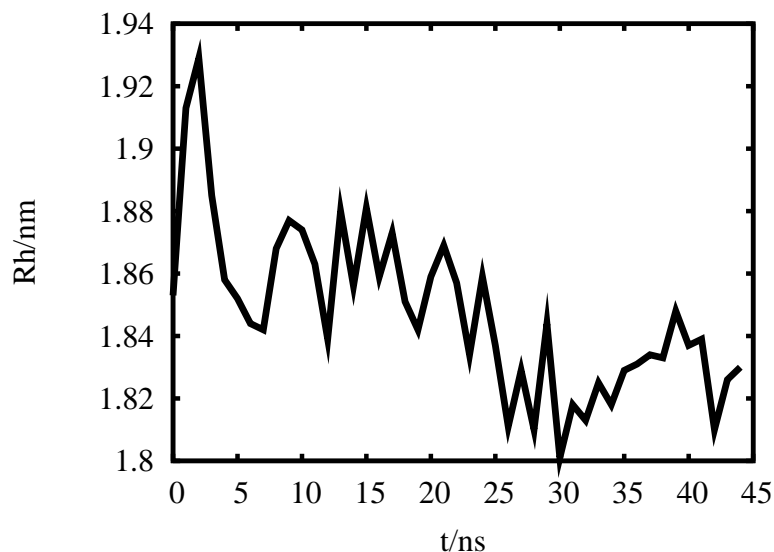


Figura 31: EVOLUCIÓN DEL RADIO HIDRODINÁMICO DEL ACBP-PlyCoA

VI.8 CUARTA VALIDACIÓN: ESTUDIO DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO

§ VI.8.1 No equilibrio.. Se evaluó la formación de puentes de Hidrógeno en función del tiempo de simulación. Esto se ve en la figura 32. Al efecto del cálculo se tomaron todos los pares que se puedan formar entre el ligando y el ACBP. Fueron considerados los átomos Oxígeno y Nitrógeno del Ligando como posibles aceptores de puentes de hidrógeno. Se ignoraron los posibles dadores del ligando. En cuanto al ACBP, se utilizó el criterio estándar para donores y aceptores (ver página 44).

La primera información que se obtiene de este gráfico es que a los 45 ns de simulación *no se puede asegurar* que el sistema esté *en equilibrio* dado que el número de puentes de hidrógeno no se muestra estable.

§ VI.8.2 Función de AutoCorrelación $C_{HB}(t)$:. Para obtener mayor información estudiamos la Autocorrelación de Puentes de Hidrógeno, Esta provee información sobre la dinámica de un puente de hidrógeno, por ejemplo, permite obtener su vida media (ver página 106) mediante su integral o un ajuste de una función exponencial extendida.

En estas funciones se ve que los puentes de hidrógeno en la superficie proteica tienen un comportamiento distinto al que tienen en el seno del agua, por contraste con la literatura [Starr, 2000].

Se calculó entonces la función $C_{HB}(t)$ con el agua del seno del líquido, es decir más alejada que 5 capas de hidratación de la superficie de la macromolécula. Se

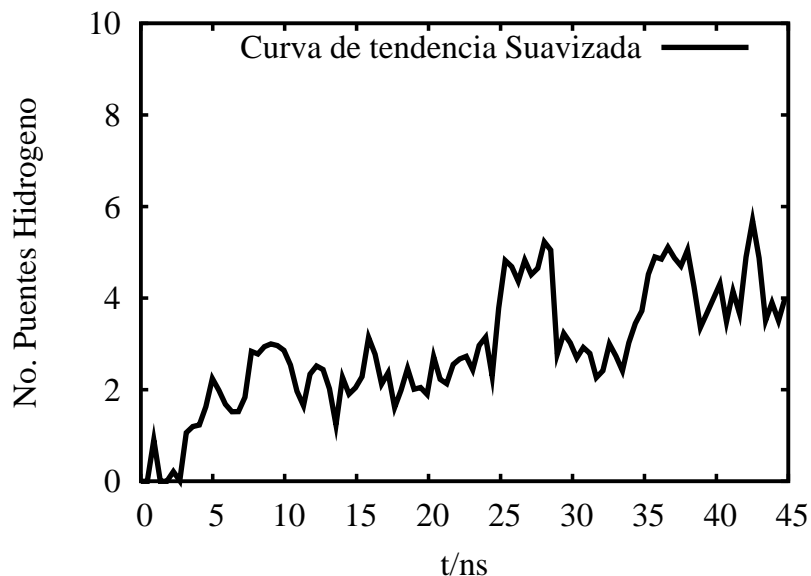


Figura 32: EVOLUCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE PUENTES DE HIDRÓGENO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, VER PÁGINA 106

seleccionaron 400 moléculas de agua del *mismo* sistema simulado y se les calculó la función de autocorrelación. La curva obtenida fue ajustada con una función $a_0 \exp[-(t/\tau_R)^\beta]$ (ver en [Starr, 2000] el origen de esta forma funcional) mediante el procedimiento NLLS implementado en Gnuplot [Williams, 2004]. Esto reproduce el resultado obtenido por Starr y Stanley (ver pág.584 de [Starr, 2000]) con un tiempo de relajación $a_0 = 1,0055 \pm 0,0017(0,2 \%)$, $\beta = 0,58 \pm 0,002(0,3 \%)$, $\tau_R = 4,233ps \pm 0,02ps(0,5 \%)$ también se reproduce el buen ajuste dentro de los 5 tiempos de relajación τ_R apartándose luego de la función teórica como la misma referencia lo menciona. En la figura 33 se ve la función $\log(C(t))$ con su ajuste. Esto lleva a decir que los grados de libertad del seno del solvente acuoso están (desde este aspecto) *en equilibrio* mientras que no podemos afirmar lo mismo para la macromolécula y su zona de influencia (ver página 371 de [Lazaridis, 2003]).

VI.9 ESTUDIO DEL DESPLAZAMIENTO CUADRÁTICO MEDIO (RMSD)

En la figura 34 se observa la evolución del desplazamiento cuadrático medio de los carbonos- α de la estructura de la proteína (ver página 44). Nuevamente aparece la idea de la existencia de un cambio conformacional. Se observa un aumento del RMSD en la curva, aproximadamente a los 25 ns de simulación.

Para ver este cambio, comparamos varias estructuras del sistema mediante el

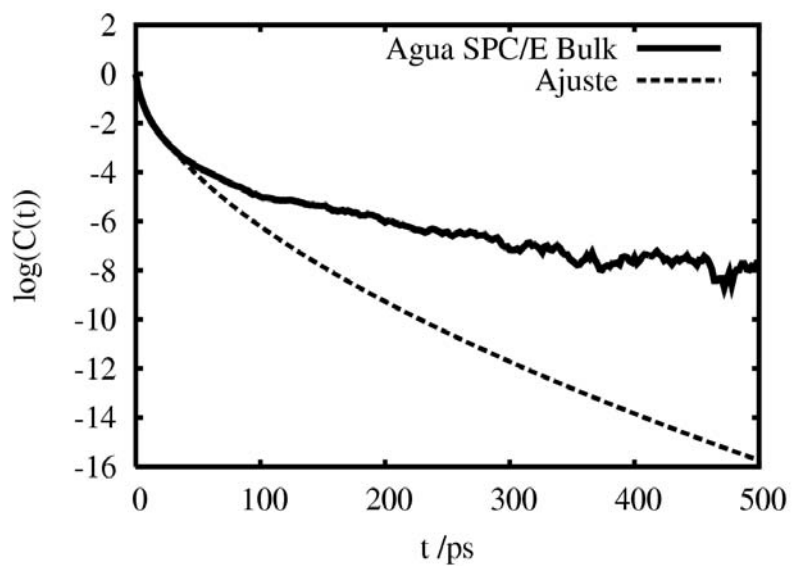


Figura 33: LOGARITMO DE LA FUNCIÓN DE AUTOCORRELACIÓN DE EXISTENCIA DE PUENTES DE HIDRÓGENO, PARA EL AGUA SPCE ALEJADA DEL SISTEMA ACBP-PlyCoA, CALCULADA A PARTIR DE LA SIMULACIÓN

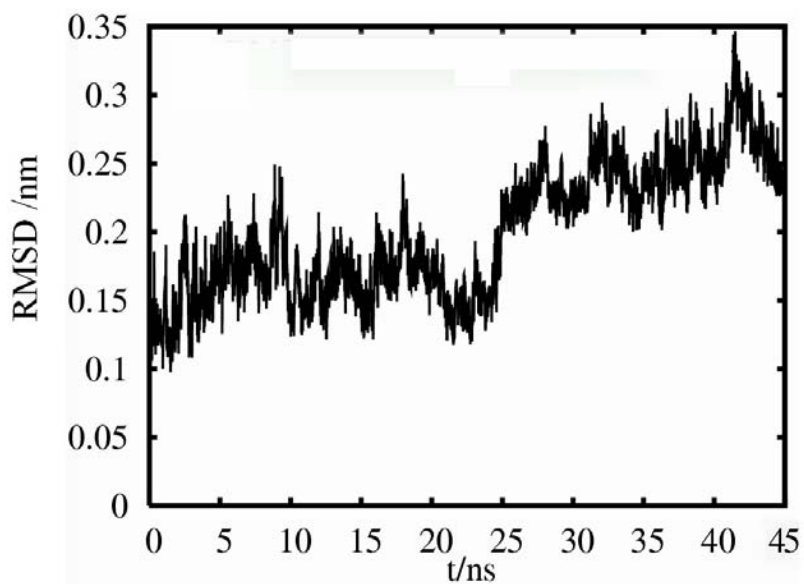


Figura 34: DESVÍO CUADRÁTICO MEDIO (RMSD) DE LA CADENA DE CARBONOS- α TOMANDO COMO REFERENCIA LA CONFIGURACIÓN INICIAL DEL MISMO SISTEMA.

programa Swiss-PDBViewer [Guex, 1997]. Se realizó un alineamiento estructural de los carbonos alfa y se inspeccionó visualmente.

Hallamos que, entre las estructuras previas y las posteriores a los 25 ns, hay un *cambio* visible de la *conformación* consistente en el *desplazamiento lateral* de la hélice $\alpha 1$ en una distancia de aproximadamente 2 – 3 Å. Este efecto hace que dicha hélice se posicione a 4Å en promedio de distancia de la cadena hidrocarbonada del ácido palmítico. Asimismo, la hélice $\alpha 3$ se cierra también sobre el ligando. Este mecanismo de “llave” podría estabilizar al Ply–CoA en el bolsillo hidrofóbico del ACBP.

Veamos en las figuras siguientes el efecto de “llave” sobre el ligando. En la figura 35 vemos el desplazamiento lateral de la hélice alfa3 aproximándose al ligando.

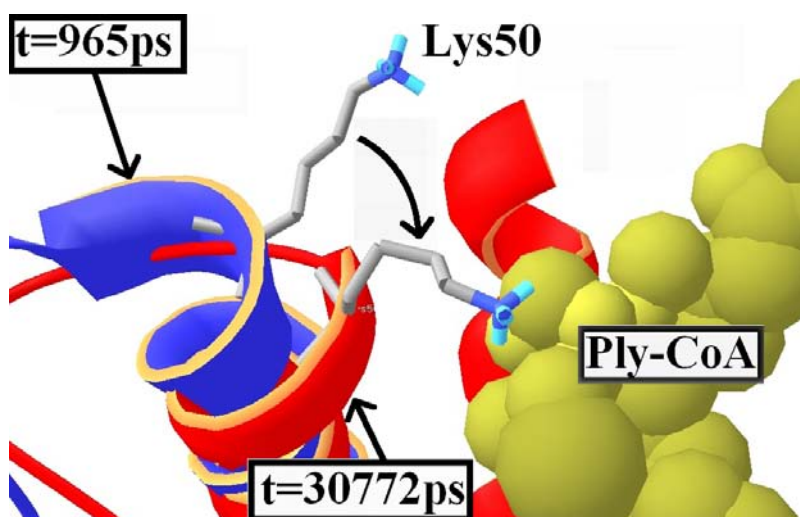


Figura 35: COMPARACIÓN ENTRE LAS ESTRUCTURAS A T=965PS Y T=30.7 NS. SE OBSERVA EL DESPLAZAMIENTO LATERAL DE LA HÉLICE ALFA3 Y EL MOVIMIENTO DE CIERRE, SÍMIL AL DE UN “DEDO” DE LA **Lys50**.

Asimismo se ve el Nitrógeno NZ del extremo de la cadena lateral de la **Lys50** que interactúa formando un puente de hidrógeno con el oxígeno AO3* de la CoA, con una distancia Lys50.NZ–CoA.AO3* de 2.88 nm (visible de manera esquemática en el ángulo superior izquierdo de la figura 36) y un ángulo de 28.8 grados (lo que satisface nuestro criterio geométrico ver sección III.8.5). En la figura 36 vemos la segunda parte del sistema de “pinzas” que la **Lys18** y la **Lys13** realizan sobre el ligando. La **Lys18** específicamente se une el Oxígeno OP del Ply-Coa, con el Nitrógeno de la **Lys18** a través de un puente de hidrógeno. La distancia O-N es de 2.8 Å. El NZ de la **Lys50** está coordinado con el Oxígeno AO4* de la CoA (3.14Å) y con el Oxígeno AO3* a (2.88Å). Estas cantidades están dentro del criterio de longitud de un puente de hidrógeno. La **Lys13** se cierra abrazando la estructura del Palmitoil.

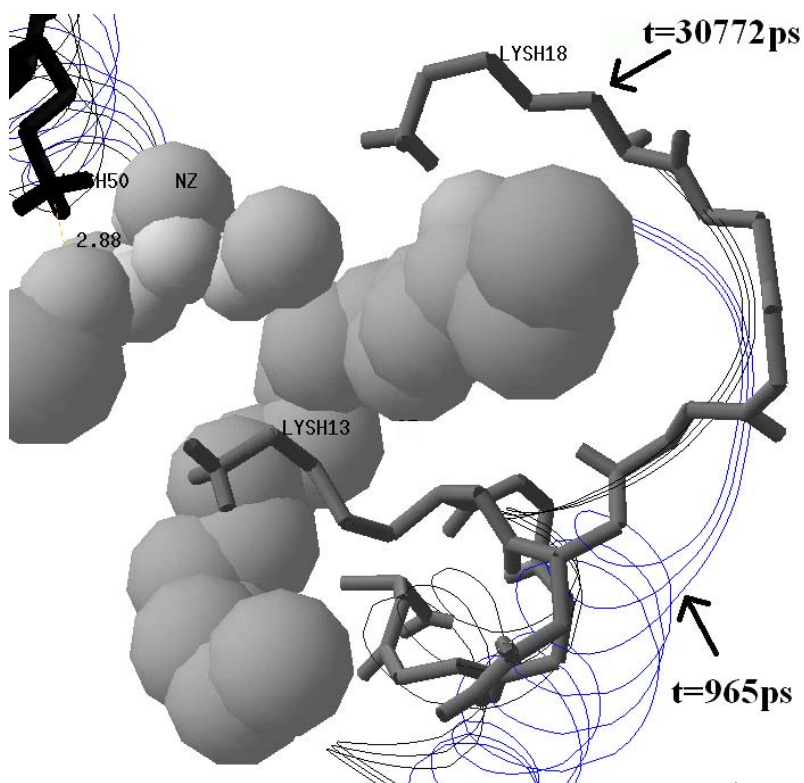


Figura 36: COMPARACIÓN ENTRE LAS ESTRUCTURAS A $t=965\text{ps}$ Y $t=30.7\text{ ns}$. DETALLE DE LA **Lys13** Y LA **Lys18**.

El mecanismo semeja el sistema de tres dientes colocados en que se suele ver en dispositivos que deben elevar cuerpos de forma irregular.

Para precisar más esta imagen, se analizaron las posiciones de las Lisinas para configuraciones previas y posteriores al momento estimado del cambio conformacional. En la figura 37 se ilustra el mecanismo *abierto* y en la figura 38 se muestra la misma posición pero luego del cambio. La pinza triple está *cerrada*.

Esto mismo se puede ver cuantitativamente graficando la evolución temporal de la distancia: **Lys18.Nz–Lys50.Nz** en la figura 39, y la distancia **Lys13.Nz–Lys50.Nz** en la figura 40.

Se observa que la distancia entre los Nitrógenos de la **Lys18** y la **Lys50** permanece mucho más constante que la respectiva entre la **Lys13** y las otras dos. Esto sugiere que este mecanismo de tres pinzas es más similar al modo en que se come la comida con tres dedos (tradicional en la cultura árabe) donde la **Lys13** juega el rol del pulgar oponible, y los otros dos dedos actúan “en conjunto”.

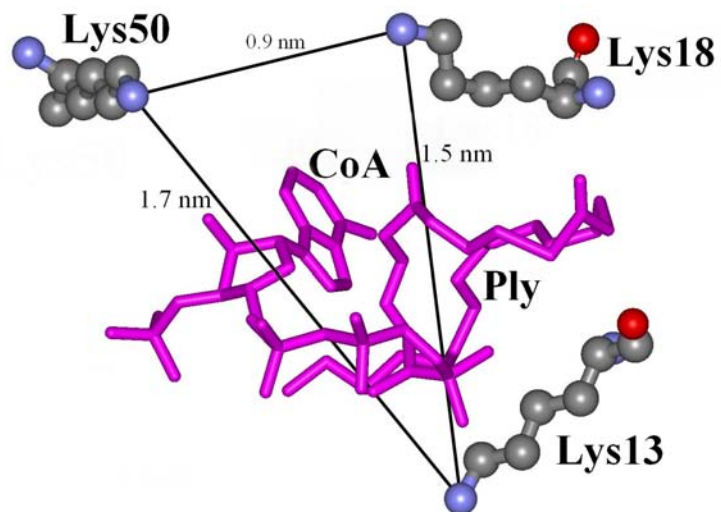


Figura 37: MECANISMO DE PINZA DE TRES BRAZOS: PINZA "ABIERTA" A LOS $t = 17ns$.

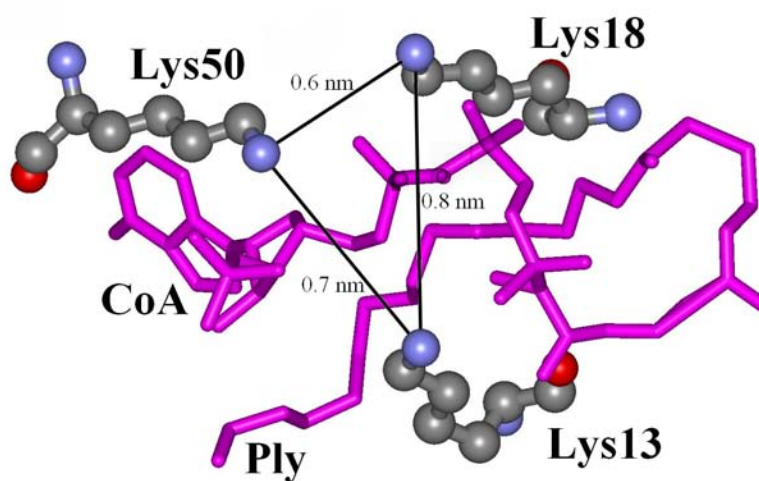


Figura 38: MECANISMO DE PINZA DE TRES BRAZOS: PINZA "CERRADA" A LOS $t = 27ns$.

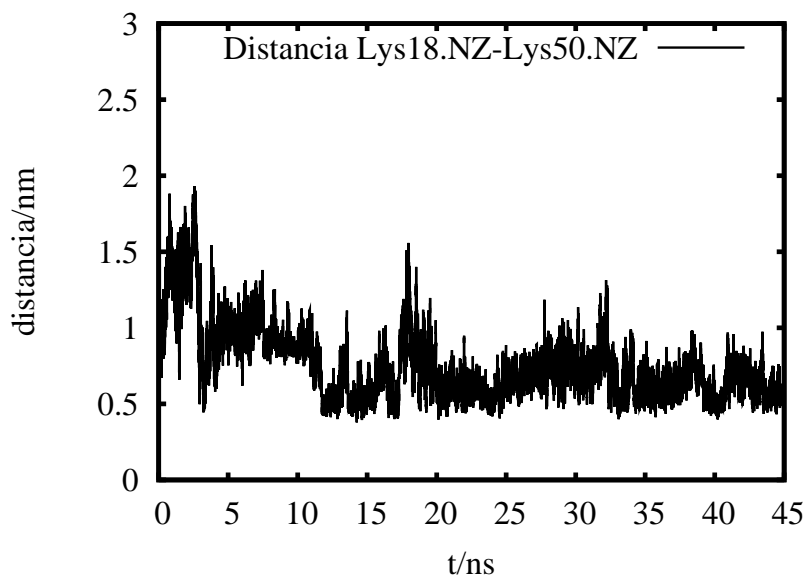


Figura 39: DISTANCIA ENTRE LOS NITRÓGENOS DE LAS Lys18–Lys50

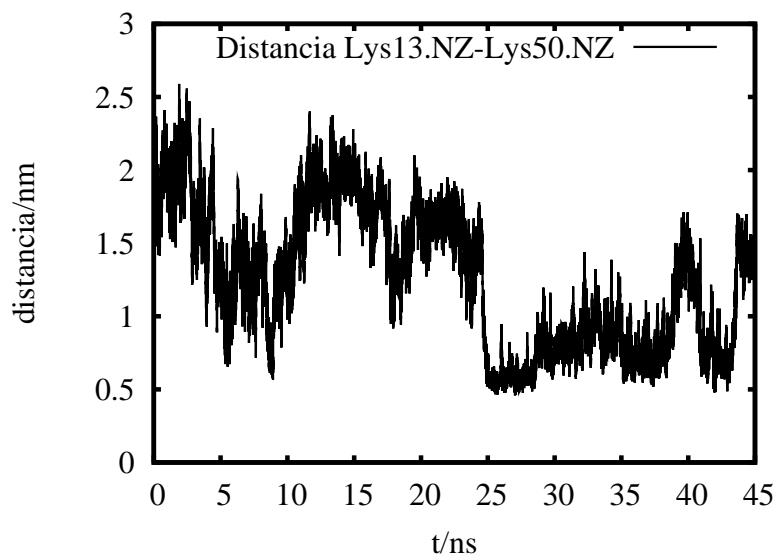


Figura 40: DISTANCIA ENTRE LOS NITRÓGENOS DE LAS Lys13–Lys50

VI.10 CONCLUSIONES

§ VI.10.1 Validación del Modelo. Veamos una síntesis de las validaciones realizadas en la siguiente tabla:

Dato de Simulación corroborado	Evidencia
1) Distancias interatómicas	Estructura de RMN [Lerche, 2003]
2) Area expuesta al solvente	Cualidad Hidrofóbica de los residuos
3) Radio Hidrodinámico	Fluorescencia resuelta en el tiempo [Frolov, 1998]
4) Puentes de hidrógeno	Simulaciones de Starr y Stanley [Starr, 2000]

§ VI.10.2 Interacción Hidrofóbica como ayuda inicial. Se propone que el conjunto de residuos hidrofóbicos expuestos **Met46—Leu47—Phe49** representan una especie de “**carnada hidrofóbica**” que sirve para capturar inicialmente el ligando.

Lamentablemente, al alinear las secuencias de aminoácidos de ACBP de 16 especies [Knudsen, 1994], constatamos que estos residuos *no se conservan*. No obstante se decidió atender a la conservación no ya del residuo sino del carácter de hidrofobicidad del sitio de la secuencia. Entonces notamos que en la posición 46 y 49 todas las mutaciones alojan en esos sitios residuos hidrofóbicos. En el caso del sitio 47, en 15 de las 16 especies se conserva la hidrofobicidad mientras que en la última, este es reemplazado por un aminoácido sin preferencia hidrofílica o hidrofóbica (Thr). Esto puede observarse en la figura 41. En el esquema ligplot del sistema para $t=965\text{ps}$ (ver figura en la página 93) se representa la misma interacción con los aa. 47 y 49. Notemos que esta figura se obtiene mediante Dinámica Molecular del sistema. El algoritmo Ligplot la representa convenientemente en forma plana.. Esto nos lleva a proponer que el sitio donde se conserva la *hidrofobicidad*, tiene una razón funcional importante para la proteína, tanto para la captura del Ply-CoA como para la inserción en las membranas (ver capítulo V). Hay referencias en la literatura sobre la conservación de la hidrofobicidad y su relevancia funcional, como por ejemplo, el estudio experimental de la actividad Catalítica de la Quinasa Src C-Terminal [Mikkola, 2003].

§ VI.10.3 Modo de Introducción del ligando en el ACBP. Una vez llegado el ligando a la superficie de la proteína, se introduce en la misma inicialmente la cola hidrocarbonada en acuerdo con la interacción hidrofóbica. Así secuencialmente se desarrolla la introducción del ligando, llegando a la posición de datos de RMN. Allí es retenido mediante puentes de hidrógeno. En particular resulta muy fuertemente ligado el azufre PS1 a la **Leu15** y la **Lys13**.

	4	4	4
	6	7	9
	↓	↓	↓
Hombre-1	P	G	M
Hombre-2	P	G	M
Rata	P	G	L
Ratón	P	G	L
Buey	P	G	M
Cerdo	P	G	I
Perro	P	G	L
Tortuga	P	G	F
Pato	P	G	M
Pollo	P	G	M
Rana	P	G	M
<i>M. Secta</i>	P	G	L
<i>Drosoph.</i>	P	G	L
levadura 1	P	G	I
levadura 2	P	G	I
<i>B. napus</i>	P	G	M
<i>A. thal.</i>	P	G	M
Algodón	P	G	M
ELP	P	E	A

·PGMLDFTGKAKWDAWNELKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI-
 ·PGMLDFTGKAKWDAWNELKGTSKEDAMKAYINKVEELKKKYGI-
 ·PGLLDLKGKAKWDSWNKLKGTSKENAMKTYVEKVEELKKKYGI-
 ·PGLLDLKGKAKWDSWNKLKGTSKESAMKTYVEKVDELKKKYGI-
 ·PGMLDFKGGKAKWDAWNELKGTSKEDAMKAYIDKVELKKKYGI-
 ·PGILDLKGKAKWDAWNLKGTSKEDAMKAYINKVDELKKKYGI-
 ·PGLLDLRGKAKWDAWNLKGTSKEDAMKAYVNVDELKKKYGI-
 ·PGFLDFKGGKAKWDAWDALGMAKEEAMKAYIAKVEELKGGYGI-
 ·PGMLDFKGGKAKWDAWNLKGMSKEDAMKAYVAKVEELKGGYGI-
 ·PGMLDFKGGKAKWDAWNLKGMSKEDAMKAYVAKVEELKGGYGI-
 ·PGMLDLKGKAKWDAWNLKGLSKEDAMSAYVSKAHELIEKYGL-
 ·PGLLDLKGKAKFDAWHKAGLSKEDAQKAYIAKVESLIASLGLQ
 ·PGLLDLKGKAKWEAWNKQKGSSEAAQQEYITFVEGLVAKYA--
 ·PGIFNMKDRYKWEAWENLKGKSQEDAEKEYIALVDQLIAKYSS-
 ·PGIFNMKDRYKWEAWENLKGKSQEDAEKEYIAYVDNLIKYSS-
 ·PGMFSMKERAKWDAWKAVEGKSTDEAMSDYITKVKQLLEAEASSA
 ·PGMFSMKERAKWDAWKAVEGKSSEEAMNDYITKVKQLLEVAASKA
 ·PGMFNREKYKDAWKAVEGKSKEEAMGDYITKVKQLFEAAGSS
 ·PEATVRAKAKYEAWMVNKGMSKMDAMRIYIAKVEELKKKEPC-

↑

Figura 41: Porción de secuencias de 16 especies de ACBP. En las posiciones 46, 47 y 49 no se conserva la secuencia pero sí la **HIDROFOBICIDAD** (excepto en la posición 47 del último caso, señalado con la flecha. Allí hay una TREONINA, sin preferencias hidrofóbicas/hidrofílicas) [FAERGEMAN, 1997]. (Cada letra representa un aminoácido, ver código en la tabla de aminoácidos del Apéndice, en la página 122.

Resulta notable que la Leucina 15 sea un residuo *conservado* en las 16 especies ya mencionadas (ver [Knudsen, 1994], pág. 6). Este acuerdo entre datos de estructura de RMN, la conservación de la secuencia y resultados de Dinámica Molecular, nos mueve a conjeturar que el rol funcional de la **Leu15** está íntimamente ligado a su capacidad para estabilizar el Ply-CoA, en estrecha relación con el Azufre, que justamente es el átomo que participa de la unión de la Coenzima A con el Acido Palmítico. Recordemos que esto ocurre intracelularmente, y se realiza a fin de impedir la liberación al espacio extracelular del Acido.

§ VI.10.4 Aumento de área expuesta de los residuos del “lomo”: 61, 64, 68, 83.. Este efecto es notable. Es posible que provenga de la necesidad que tiene la estructura de “cerrarse” sobre el ligando para retenerlo.

§ VI.10.5 Distancia entre extremos del Ply-CoA: Reptar. La imagen que emerge de la DM: El ligando luego del contacto inicial con la proteína, debe realizar movimientos de contracción–extensión similares a los que realiza un animal que “repta”. Son estos movimientos los que le permiten encontrar el bolsillo hidrofóbico donde deberá quedar retenido.

§ VI.10.6 Corrimiento de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$. Mientras el ligando ejecuta estos movimientos, la proteína prepara un cambio conformacional. Este tiene varios aspectos. Uno de ellos consiste en que las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$ se cierran sobre el ligando. En particular la hélice $\alpha 1$ traslada su eje paralelamente en alrededor 2 a 3 Å. Esto favorecerá el paso siguiente.

§ VI.10.7 Pinza Triple de las Lisinas. Posiblemente sea el aspecto más novedoso que surge de la simulación: una vez que el ligando se encuentra “reptando” y que las hélices se han desplazado, las cadenas laterales de las lisinas 18 (en la hélice $\alpha 1$ y 50 (en la $\alpha 3$) “abrazan” al ligando y la Lys13 se vuelca hacia el mismo. Esto convierte a las cadenas laterales de las lisinas en una especie de “pinza” de tres brazos, que funciona como los dedos índice (Lys18), mayor (Lys50), y pulgar (Lys13) de la mano humana.

VI.11 PASOS FUTUROS

Hay algunos proyectos interesantes para el estudio de estos sistemas macromoleculares:

- Realizar una DM del ACBP con otras posiciones iniciales. Esto permitiría verificar que estos mecanismos operan en distintos contextos.

- Realizar la Dinámica de un ACBP mutado. Se propone reemplazar los tres residuos de la “carnada hidrofóbica” por otros residuos hidrofílicos. Se conjetura que esa mutación haría perder la función biológica al ACBP.
- Dinámica del sistema ACBP más bicapa lipídica. Resultaría muy interesante poder lograr una simulación del proceso de partición del ACBP en la membrana y obtener así información sobre la evolución temporal de la interacción.
- De obtenerse una buena configuración con la membrana, en el paso anterior, habría que reemplazar algún(os) fosfolípido(s) con un Ply–CoA, y ver cómo se comporta el ACBP en esa situación nueva. La conjetura es que si están lo suficientemente cerca el ACBP rescatará al ply–CoA de la membrana, primero mediante la unión electrostática con la membrana, luego colocando al Ply–CoA en su bolsillo y por último, retirándose de la bicapa.
- Asimismo resultaría de interés simular un ply–CoA en la vecindad de una membrana, sin ACBP. La conjetura es que el Ply–CoA particionaría en la misma.

Conclusiones

Las interacciones a nivel molecular determinan fundamentalmente la función de las macromoléculas biológicas. Este trabajo recorre un camino que comenzó en la fisicoquímica de las soluciones de sal en agua. Allí se estudió el efecto dinámico de la aparición del fenómeno del *apantallamiento* singular hecho predicho por Maxwell con un modelo del continuo en el siglo XIX.

Es notable este efecto debido a que introduce una distancia característica de la solución salina en particular: la *longitud de Debye*. Esto tiene la virtud de convertir una interacción de largo alcance (la eléctrica), en una de corto alcance, modulada en promedio por una exponencial decreciente. Asimismo este efecto presenta una dependencia importante con la frecuencia del movimiento de las cargas: Existe la llamada *frecuencia de Maxwell*, valor por encima del cual, las interacciones eléctricas *recuperan* su carácter de *largo alcance*, debido a la dinámica de los iones en movimiento, y la peculiar característica de la existencia de dos tipos distintos de carga, fenómeno que no se presenta en la interacción gravitatoria. Sin duda que la biología no sería la que se conoce, de no ser por este hecho.

Las simulaciones por Dinámica Browniana del capítulo IV permitieron reproducir el resultado experimental de la existencia de la longitud de Debye. Se reconoció el efecto de una frecuencia mayor que la frecuencia de Maxwell. Se estudió la estructura de la nube que circunda a los iones en solución. Asimismo, se asimiló el efecto de la frecuencia en la posición, contra el efecto (imaginario, o alquímico si se quiere) de la frecuencia afectando al valor de la carga. Esta equivalencia, sin utilidad a primera vista, puede muy bien rendir frutos cuando se necesite modelar sistemas complejos, en los cuales se requiera evaluar efectos de la dinámica de las cargas en solución, a menor costo computacional que el de efectivamente moverlas.

Una conjetura interesante, para evaluar la validez de esta transformación, consiste en oscilaciones al valor de la carga, de frecuencia superior a la de Maxwell a

cargas *fijas* en el espacio, e intentar modelar con ello sistemas no accesibles a la simulación por DM hoy en día, tales como una unidad de un ribosoma, o una porción importante de un microtúbulo.

Luego de ello, en el capítulo V se estudió (mediante los métodos “del continuo con detalle atómico” descritos en el capítulo II), un problema que es típico de la biofísica: la interacción entre una proteína y una membrana biológica. El método de Poisson–Boltzmann, ya convertido en una técnica computacional clásica (ha llegado en algunas universidades a las materias de grado) permitió estudiar con relativamente bajo costo computacional, dicha interacción.

Se obtiene una imagen razonable del llamado *Paisaje de Energía Electroestática del Complejo ACBP–Membrana Biológica*. Dentro del mismo se aprecia claramente la posición energéticamente favorable para la interacción del ACBP con la membrana.

Este tipo de técnicas sólo puede devolvernos energías y campos eléctricos. Toda otra contribución a la unión deberá ser obtenida aparte. Sin embargo la importancia de la interacción eléctrica hace que este tipo de cálculos nos devuelva una visión de lo que ocurre en la interacción macromolecular con la suficiente bondad del modelo como para retener una interesante capacidad predictiva.

Los cálculos electrostáticos por sí solos sugieren que hay un mecanismo de intermediación de las interacciones hidrofóbicas via los residuos expuestos en la porción interactuante del ACBP, en particular la **Met46** y **Leu 47**, esenciales también para la unión con los fosfolípidos. Así, la afinidad del ACBP por las bicapas lipídicas estaría dada no sólo por las interacciones electrostáticas sino que también por interacciones hidrofóbicas.

El capítulo VI presentó los resultados del estudio desde el otro extremo del espectro de la modelización de sistemas macromoleculares de más de 1000 átomos esto es, incluir el detalle atómico completo con energías potenciales ad-hoc.

Es notable que, en coincidencia con los resultados electrostáticos, la dinámica molecular *apunta* fuertemente al rol de los residuos hidrofóbicos 46, 47, 49. Y los estudios de conservación de la hidrofobicidad en la secuencia, también señalan en esa dirección.

Para la unión con el ligando, se *propone* por tanto un mecanismo de *captura* hidrofóbica, seguido por la dinámica *reptante* del movimiento del ligando y finalmente un mecanismo de *triple pinza* de las cadenas laterales de las lisinas que ayudan a fijar el ligando en el sitio activo.

* * *

Estos trabajos aquí expuestos, constituyen una ilustración del poder de los méto-

dos computacionales en orden a colaborar para hacer más eficiente la obtención de fármacos de mayores prestaciones.

Lista de Abreviaturas

ACBP Proteína transportadora de Acil CoA. A lo largo de esta tesis a menos que se diga explícitamente, se refiere a HgACBP, es decir el ACBP proveniente de Glándula Harderiana de Armadillo. Ver capítulos V y VI.

APBS Programa *Adaptative Poisson-Boltzmann Solver*. Ver sección [Baker, 2001].

bovACBP Proteína transportadora de Acil CoA, obtenida de bos taurus. Ver capítulos V y VI.

BD Dinámica Browniana. Ver sección III.9

CoA Coenzima A. Ver sección: VI.1.

dE Energía Electrostática de Interacción. Ver sección: V.3.3.

DM Dinámica Molecular. Ver capítulo III.

FABP Proteína transportadora de ácidos grasos (FABP). En esta tesis se menciona la obtenida de hígado. Ver sección V.7.

FDPB Ecuación de Poisson-Boltzmann, escrita en diferencias finitas. (En inglés: *Finite Difference Poisson-Boltzmann*). Ver sección II.3

HgACBP ACBP (proteína transportadora de Acil CoA) proveniente de Glándula de Armadillo.

LCFA Ácidos grasos de Cadena larga. Ver sección V.7

LCFA-CoAs Ácidos grasos de Cadena larga ligados con Coenzima A. Ver sección V.7

LD Dinámica de Langevin. Ver sección III.9

LPB Ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada. Ver página 27

NLPB Ecuación de Poisson-Boltzmann no lineal. Ver página 26

PBC Condiciones Periódicas de Contorno. (En inglés: *Periodic Boundary Conditions*). Ver sección III.5.3

PLY Palmitato.

PME Método para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance (En inglés: *Particle Mesh Ewald* ver sección III.7.2).

RMSD Siglas en inglés de Desplazamiento Cuadrático Medio (Root Mean Square Deviation). Ver sección III.8.4.

SD Dinámica Estocástica. Ver sección III.9

Tabla Básica de Aminoácidos

Nombre del Aminoácido	Código 1 letra	Código 3 Letras	Carga Eléctrica	Hidro-fóbico	Polar
Alanina	A	Ala	0	X	
Cisteína	C	Cys	0	X	
Aspartato	D	Asp	-		X
Glutamato	E	Glu	-		X
Fenilalanina	F	Phe	0	X	
Glicina	G	Gly	0	X	
Histidina	H	His	+		X
Isoleucina	I	Ile	0	X	
Lisina	K	Lys	+		X
Leucina	L	Leu	0	X	
Metionina	M	Met	0	X	
Asparagina	N	Asn	0		X
Prolina	P	Pro	0		
Glutamina	Q	Gln	0		X
Arginina	R	Arg	+		X
Serina	S	Ser	0		X
Treonina	T	Thr	0	X	X
Valina	V	Val	0	X	
Triptofano	W	Trp	0	X	X
Tirosina	Y	Tyr	0	X	X

Bibliografía

- [Accelrys, 2003] *Manual de Delphi*. Accelrys Inc. http://www.bio.unizh.ch/docu/acc_docs/doc/delphi/02_Theory.html
- [Allen, 1987] Allen M.P. y Tildesley D.J. *Computer Simulations of Liquids* Caps. 2, 6 y 9. Clarendon Press – Oxford (1987).
- [Andelman, 1995] Andelman D., *Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson–Boltzmann Theory*. Capítulo 12, de *Handbook of Biological Physics*, Vol.1. Ed. Elsevier (2004).
- [Andersen, 1992] Andersen K. V., Poulsen F. M. *Three dimensional structure in solution of acyl–coenzyme–A binding–protein from bovine liver*. *J. Mol. Biol.* **226**, 1131–1141(1992).
- [Baker, 2001] Baker N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., McCammon J. A. *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037–10041(2001). <http://agave.wustl.edu/apbs/>
- [Baker, 2004] Baker N.A., *Poisson–Boltzmann Methods for Biomolecular Electrostatics*. Capítulo 5 de *Methods in Enzymology*, **383**. Academic Press: San Diego, CA (2004). ([http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)83005-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(04)83005-2)).
- [Beckman, 1993] Beckman J. S. et al., *ALS, SOD and peroxynitrite*. *Nature* **364**, 584(1993).
- [Berendsen, 1981] Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, y J. Hermans. *Interaction models for water in relation to protein hydration*. In *Intermolecular Forces*. B. Pullman, editor. Reidel, Dordrecht, the Netherlands. 331–342 (1981).
- [Berendsen, 1984] Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R. *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).

- [Berendsen, 1986] Berendsen H.J.C. et al., *Long-range electrostatic forces*. *Europhys. News* **17**, 8(1986).
- [Berendsen, 1987] Berendsen H.J.C., Grigera J.R., Straatsma T.P., *The Missing Term in Effective Pair Potentials*, *J. Phys. Chem.* **91**, 6269–6271(1987).
- [Berendsen, 1995] Berendsen H. J. C., van der Spoel D., van Drunen R., *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation*. *Comp. Phys. Comm.* **91**, 43–56(1995).
- [Berman, 2000] Berman H.M. et al., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235–242(2000).
- [Blum, 1975] Blum L., *Mean spherical model for asymmetric electrolytes I: method of solution*. *Mol. Phys.* **30**, 1529(1975).
- [Born, 1920] Born M., *Volumen und hydrationswärme der ionen*. *Z. Phys.* **1**, 45(1920).
- [Böttcher, 1978] Böttcher C.J.F. y Bordewijk P., *Theory of Dielectric Polarization, Vol II*. Elsevier, Amsterdam, (1978).
- [Böttcher, 1973] Böttcher C.J.F., *Theory of Electric Polarization*. Elsevier, Amsterdam, (1973).
- [Buehler, 2005] Buehler L. K., *Fundamentals of Rational Drug Design*. <http://www.whatislife.com/reader/Molecular-Interactions.html>, Lecture developed for UCSD Extension, Bioscience Program (2005).
- [Car, 1985] Car R. y Parrinello M., *Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory*. *Phys. Rev. Lett.* **55**, 2471 (1985).
- [Casadio, 1999] Casadio R. et al., *The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions*. *Eur. J. Biochem.* **262**, 672–679 (1999).
- [Chao, 2002] Hsu Chao et al., *Membrane Charge and Curvature Determine Interaction with Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) and Fatty Acyl-CoA Targeting*. *Biochemistry* **41**, 10540–10553(2002).
- [Chenal, 2002] Chenal A. et al., *Membrane Protein Insertion Regulated by Bringing Electrostatic and Hydrophobic Interactions into Play. A CASE STUDY WITH THE TRANSLOCATION DOMAIN OF THE DIPHTHERIA TOXIN**. *J. Biol. Chem.* **277**, 43425–43432(2002).
- [Coalson, 1992] Coalson R. D. y Duncan A. J. *Chem. Phys.* **97**, 5653(1992).

-
- [Coalson, 1997] Coalson R. D. y Beck T. L., *Numerical Methods for Solving Poisson and Poisson–Boltzmann Type Equations*. <http://bessie.che.uc.edu/tlb/rctb6/node28.html>
- [Costabel, 1998] Costabel M.D., Vallejo D. F, Grigera J. R., *Electrostatics of the Phospholipase-Membrane Interaction* *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 185–189(1998)
- [Costabel, 2001] Costabel M.D., Vallejo D. F, Grigera J. R., *Electrostatic recognition between Enzyme and Inhibitor: Interaction between Papain and Leupeptin*. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 161-166(2001).
- [Costabel, 2005] Costabel M.D., Guerin D., Ermacora M., *Trabajo sin publicar*.
- [Darden, 1993] Darden T., York D., Pedersen L. *Particle mesh Ewald: An $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems*. *J. Chem. Phys.* **98**,10089–10092(1993).
- [Debye, 1923] Debye P., Hückel, *Zur Theorie der Elektrolyte*. *Phys. Z.* **24**, 185(1923).
- [Diraviyam, 2003] Diraviyam K. et al., *Computer Modeling of the Membrane Interaction of FYVE Domains* *J. Mol. Biol.* **328**, 721–736(2003).
- [Dolinsky, 2004] Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A., *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations*. *Nucleic Acids Research* **32**, W665–W667(2004). <http://agave.wustl.edu/pdb2pqr/>
- [Ewald, 1921] Ewald P. P., *Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale*. *Ann. Phys.* **64**, 253–287(1921).
- [Faergeman, 1997] Faergeman N. J. y Knudsen J. *Role of long–chain fatty acyl–CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling*. *Biochem. J.* **323**(Pt 1), 1–12(1997).
- [Frolov, 1998] Frolov A., Schroeder F., *Acyl Coenzyme A Binding Protein. Conformational Sensitivity To Long Chain Fatty ACYL–CoA*. *J. Biol. Chem.* **273**, 11049–11055(1998).
- [Garcia de la Torre, 2000] Garcia de la Torre J., Huertas M.L. y Carrasco B., *Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic–level structure*. *Biophys. J.* **78**, 719–730(2000).

-
- [Gilson, 2000] Gilson M. *Introduction to continuum electrostatics*. En Beard, D. A. (ed.), *Biophysics Textbook Online*. Biophysical Society, Bethesda, MD, Vol. *Computational Biology*. <<http://www.biophysics.org/btol>>
- [Grigera, 1976] Grigera J. R., Blum L., *Mean spherical model approximation for the primitive model of sodium chloride*. *Chem. Phys. Letters* **38**, 486(1976).
- [Grigera, 1989] Grigera J. R. et al., *On the threshold frequency of long-range interactions in physiological solutions*. *Chem. Phys. Lett.* **156**, 615(1989).
- [Guex, 1997] Guex N. y Peitsch M.C., *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling*. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723(1997). <http://www.expasy.org/spdbv/>.
- [Gutierrez, 2001] Gutiérrez G., *ELEMENTOS DE SIMULACION COMPUTACIONAL. Dinámica Molecular y Método de Monte Carlo*. Santiago de Chile, Chile. Abril 2001. <http://fisica.ciencias.uchile.cl/~gonzalo/>
- [Harries, 1998] Harries D., *Solving the Poisson Boltzmann Equation for Two Parallel Cylinders*, *Langmuir* **14**, 3315(1998).
- [Heller, 1993] Heller et. al., *Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the Gel and the Liquid-Crystal phases*. *J. Phys. Chem.* **97**, 8383–8360(1993).
- [Hess, 2002] Hess B., *Stochastic concepts in molecular simulation*, tesis doctoral, Universidad de Groningen (2002), Holanda. <http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/b.hess/>
- [Hjelte, 1990] Hjelte L. et al., *Pancreatic function in the essential fatty acid deficient rat.*, *Metabolism Aug* **39**(8), 871–875(1990).
- [Hockney, 1974] Hockney R. W., Goel S. P. J., *Quite high resolution computer models of a plasma*. *J. Comput. Phys.* **14**, 148–158(1974).
- [Hol, 1978] Hol W. G. J., van Duijnen P. T. y Berendsen H. J. C. *The α -helix dipole and the properties of proteins*. *Nature* **273**, 443(1978).
- [Holst, 1993] Holst M. y Saied F., *Multigrid solution of the Poisson-Boltzmann equation*. *J. Comput. Chem.*, **14**, 105-113(1993).
- [Holst, 1995] Holst M. y Saied F. *Numerical solution of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Developing more robust and efficient methods*. *J. Comput. Chem.*, **16**, 337-364(1995).

-
- [Honig, 1986] Honig B. et al., *Electrostatic interactions in membranes and proteins* Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **15**, 163-93(1986).
- [Honig, 1995] Honig B. y Nicholls A., *Classical Electrostatics in Biology and Chemistry* Nature **268**, 1149(1995).
- [Hooft, 1996] Hooft R.W.W. et al., *Positioning Hydrogen atoms by optimizing Hydrogen-Bond Networks in protein structures* PROTEINS: Struct. Funct. and Gen. **26**, 363-376(1996).
- [Hoover, 1985] Hoover, W. G. *Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions*. Phys. Rev. **A31**, 1695–1697(1985).
- [Humphrey, 1996] Humphrey W., Dalke A. y Schulten K., *VMD - Visual Molecular Dynamics*, J. Molec. Graphics **14**, 33–38(1996).
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili J., *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press. Londres (1992).
- [Juffer, 1991] Juffer A. et al., *The electric potential of a macromolecule in a solvent: a fundamental approach*. J. Comp. Phys. **97**, 1(1991).
- [Kalinichev 1994] Kalinichev A. G. y Bass J. D., *Hydrogen bonding in supercritical water: a Monte Carlo simulation*, Chemical Physics Letters **231**, 301(1994).
- [Kauzmann 1959] Kauzmann W.J., *Factors in the interpretation of protein denaturation*, Adv. Prot. Chem. **XIV** 1–53(1959).
- [Klapper, 1986] Klapper I. et al., *Focusing of Electric Fields in the Active Site of Cu-Zn Superoxide Dismutase: Effects of Ionic Strength and Amino-Acid Modification*. PROTEINS: Struct. Funct. and Gen. **1**, 47(1986).
- [Knudsen, 1994] Knudsen J., et al. *Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size*. Biochem. J. **302**, 479–485(1994).
- [Kragelund, 1993] Kragelund B. B., Andersen K. V., Madsen J. C., Knudsen J., Poulsen F. M. *Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A*. J. Mol. Biol. **230**, 1260–1277(1993).
- [Kragelund, 1999] Kragelund B. B., Knudsen J., Poulsen F. M. *Acyl-Coenzyme A binding protein (ACBP)*. Biochim. Biophys. Acta, **1441**, 150–161(1999).

-
- [Kraulis, 1991] Kraulis P. J. *MolScript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. J. Appl. Crystallogr. **24**, 946–950(1991).
- [Lado, 1981] Lado F., *Some topics in the molecular dynamics ensemble*. J. Chem. Phys. **75**, 5461(1981).
- [Laskowski, 2005] Laskowski R.A. et al., *PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids*. Nucleic Acids Res. **33**, D266–D268(2005).
- [Lazaridis, 2003] Lazaridis T. y Karplus M. *Thermodynamics of protein folding: a microscopic view*. Bioph. Chem. **100**, 367–395(2003).
- [Lerche, 2003] Lerche M. H., Kragelund B. B., Redfield C., Poulsen F. M.: *Rdc-Refined NMR Structure of Bovine Acyl-Coenzyme A Binding Protein, ACBP, in Complex with Palmitoyl-Coenzyme A*. (Trabajo a ser publicado. La estructura fue incluida en el Protein Data Bank bajo el código 1NVL) (2003).
- [Lindahl, 2001] Lindahl E., Hess B., van der Spoel D., *Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis*. J. Mol. Mod. **7**, 306–317(2001).
- [Lodish, 2003] Lodish H. et al., *Molecular Cell Biology*, 5ta. Ed., W. H. Freeman (2003).
- [Mahler, 1969] Mahler H. R. y Cordes E. H., *Biological Chemistry* Harper and Row, New York, (1969).
- [Marañón, 1998] Marañón J. y Grigera J. R., *Molecular Dynamics Simulation with atomic partial charges update of erythrol in water*. J. Mol. Struct. (Theochem) **431**, 7(1998).
- [Masterson, 1990] Masterson W. I., Raper J., Doering T. L., Hart G. W., Englund P. T. *Fatty acid remodeling: a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors*. Cell **62**, 73–80(1990).
- [Mata 1997] Mata E. G., *Una Nueva Era En El Descubrimiento De Medicamentos: Química Combinatoria* Ciencia Hoy, V.7 (1997) Nro.40. Disponible en <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy40/quim1.htm>
- [Maxwell, 1954] Maxwell J. C., *A Treatise on Electricity and Magnetism*. Edición del Tratado original de 1873. (Dover, New York, 1954).

-
- [McLoughlin, 1989] McLoughlin S., *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 113(1989).
- [Merritt, 1997] Merritt E.A. y Bacon D.J., *Raster3D: photorealistic molecular graphics*. *Methods Enzymol.*, **277**, 505–524(1997).
- [Mikkola, 2003] Mikkola E. y Bergman M. *Conserved hydrophobicity in the SH2 kinase linker is required for catalytic activity* *FEBS Letters* **544**, 11–14(2003).
- [Milne, 2000] Milne K. G. Ferguson M. A. J. *Cloning, expression and characterisation of the acyl-coA binding protein in African trypanosomes*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12503–12508(2000).
- [Nadler, 2003] Nadler et.al., *Dielectric Boundary Force and its crucial role in gramicidin* *Phys Rev. E* **68**, 021905,(2003).
- [Nielsen, 1999] Nielsen J.E. et al. *Improving macromolecular electrostatics calculations* *Protein Eng.* **12**, 8,657–662(1999)
- [Nose, 1984] Nosé S. *A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble*. *Mol. Phys.* **52**, 255–268(1984).
- [Nose, 1983] Nosé S., Klein M. L. *Constant pressure molecular dynamics for molecular systems*. *Mol.Phys.* **50**, 1055–1076(1983).
- [Odaib, 1998] Ali Al Odaib M. S. et al. *A Defect in the Transport of Long-Chain Fatty Acids Associated with Acute Liver Failure*. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1752–1757(1998).
- [OMS, 2002] *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005* http://www.who.int/medicines/library/trm/trm_strat_span.pdf (2002)
- [Paladini 1996] Paladini A., *¿Cómo se Descubre o Inventa un Medicamento?* *Ciencia Hoy*, **6**, Nro.34. (1996) Disponible en <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy34/medic01.htm>
- [Pandit, 2002] Pandit S.A., Berkowitz M.L., *Molecular Dynamics Simulation of Dipalmitoylphosphatidylserine Bilayer with Na⁺ counterions*, *Biophysical Journal*, **82**, 1818–1827 (2002)
- [Press, 1989] Press, W.H. et al *Numerical Recipes. The art of Scientific Computing*. Cap. 12. Cambridge University Press (1989).

-
- [Rasmussen, 1994] Rasmussen J. T. et al., *Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis*. *Biochem. J.* **299**, 165–170(1994).
- [Roux, 1999] Roux B., Simonson T., *Implicit solvent models*. *Biophysical Chemistry* **78**, 1–20(1999).
- [Sayle, 1998] Sayle R. *RasMol 2.6*. Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research and Development Stevenage, Hertfordshire, UK. (1998).
- [Scott, 1994] Scott D. L. et al., *The Electrostatic Basis for the Interfacial Binding of Secretory Phospholipases A2*. *Biophys.J.* **67**, 493–504(1994).
- [Schreiber, 1992] Schreiber H., y Steinhauser O. *Taming Cut-off Induced Artifacts in Molecular Dynamics studies of Solvated Peptides. The Reaction Field Method* *J.Mol.Biol.* **228**, 909–923(1992).
- [Shin Yun Yu, 1988] Shin Yun Yu, et al., *On the approximation of solvent effects on the conformation and dynamics of Cyclosporin A by stochastic dynamics simulation techniques* *Molecular Simulation*, **1**, 369(1988).
- [Simonson, 1994] Simonson T., Perahia D. *Internal and interfacial dielectric properties of cytochrome c from molecular dynamics in aqueous solution* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1082–1086(1995).
- [Sitkoff, 1994] Sitkoff D., Sharp K.A. y Honig B. *Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models*. *J. Phys. Chem.*, **98**, 1978–1988(1994).
- [Steinbach, 2004] Steinbach P. *Introduction to Macromolecular Simulation* Center for Molecular Modeling, National Institutes of Health (NIH), USA. http://cmm.cit.nih.gov/intro_simulation/
- [Songyuhua, 2004] Song Yuhua et al., *Finite Element Solution of the Steady-State Smoluchowski Equation for Rate Constant Calculations*. *Biophys. J.* **86**, 2017–2029(2004).
- [Stahl, 2002] Stahl, A. *A current review of fatty acid transport proteins (SLC27)*. *Eur. J. Physiol.* **447**, 722–727(2004).
- [Starr, 2000] Starr F. W. et al, *Hydrogen-bond dynamics for the extended simple point-charge model of water*. *Phys.Rev. E.* **62**,1, 579–587(2000).
- [Tanford, 1961] Tanford C., *Physical Chemistry of Macromolecules*. (Wiley, New York, 1961)

-
- [Ten Eyck, 2005] Ten Eyck, Lynn et al. *Lecture Notes for UCSD Course Chemistry 115/215: Modeling Biological Macromolecules*. McCammon group. <http://mccammon.ucsd.edu/chem215/index.html>
- [Tieleman, 1996] Tieleman D.P., Berendsen H.J.C. *Molecular dynamics simulations of fully hydrated DPPC with different macroscopic boundary conditions and parameters*. J. Chem. Phys. **105**, 4871–4880 (1996). <http://moose.bio.ucalgary.ca/Downloads/files/dppc128.pdb> y <http://moose.bio.ucalgary.ca/Downloads/files/dppc.itp>
- [Triolo, 1976] Triolo R., Grigera J. R. y Blum L. J. *Simple electrolytes in mean spherical approximation*. Phys. Chem. **80**, 1858(1976).
- [Turq, 1977] Turq P., Lantelme F, y Friedman H.L., *Brownian Dynamics: Its application for ionic solutions*. J. Chem. Phys. **66**, No.7, 3039(1977).
- [Uhdman, 1999] Briggs et al. *Univ of Houston Brownian Dynamics program user's guide and program uhdman.pdf 1999 v5.1*
- [Vallejo, 1994] Vallejo D. F. y Grigera J. R. *Frequency effect on the charge screening in electrolyte solutions. Charge fluctuation and spatial oscillations studied by Brownian Dynamics simulation*. J. Chem. Phys. **101**, 9049(1994).
- [Vallejo, 2003] Vallejo D. F., Costabel M. D., Grigera J. R. *Trabajo sin publicar*.
- [van Aalten, 2001] van Aalten DM et al. *Binding site differences revealed by crystal structures of Plasmodium falciparum and bovine acyl-CoA binding protein*. J. Mol. Biol. **309**(1), 181–192(2001).
- [van Aalten, 2002] van Aalten D. M. F., DiRusso C. C., Knudsen J., Wierenga R. K. *Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold*. EMBO J. **19**, 5167–5177(2000).
- [van der Spoel, 1998] van der Spoel D., van Maaren P. J. y Berendsen H. J. C., *A systematic study of water models for molecular simulation*. J. Chem. Phys., **108**, 10220–10230(1998).
- [van der Spoel, 2004] van der Spoel D., Lindahl E., B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen and H. J. C. Berendsen, *Gromacs User Manual version 3.2*, <http://www.gromacs.org> (2004)
- [Van Gunsteren, 1978] Van Gunsteren W.F. and Berendsen H.J.C., *Stochastic Dynamics for molecules with constraints. Brownian Dynamics of N-Alkanes*. Report of CECAM Workshop June–July (1978).

-
- [Van Gunsteren, 1988] Van Gunsteren W.F. and Berendsen H.J.C., *A Leap-Frog algorithm on Stochastic Dynamics* Molecular Simulation, **1**, 173(1988).
- [Van Gunsteren, 1987] GROMOS87. Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C *GROningen MOlecular Simulation*. Disponible en BIOMOS n.v., Nijenborgh 16, 9747AG, Groningen, Holanda.
- [Van Gunsteren, 1996] GROMOS96. Van Gunsteren W.F. & Berendsen H.J.C *GROningen MOlecular Simulation*. Disponible en BIOMOS n.v., Nijenborgh 16, 9747AG, Groningen, Holanda.
- [Verlet, 1967] Verlet L., *Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. Phys. Rev. **159**, 98(1967).
- [Verwey, 1948] Verwey, E. J. W. y Overbeek, J. Th. G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, New York, (1948).
- [Wallace, 1983] Wallace D. C. y Straub G. K., *Ensemble corrections for the molecular-dynamics ensemble*. Phys. Rev. A **27**, 2201(1983).
- [Wallace, 1995] Wallace A. C., Laskowski R. A., Thornton J. M., *LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions*. Prot. Eng. **8**, 127-134(1995).
- [Wellcome, 2002] Rational Drug Design, <http://www.wellcome.ac.uk/en/genome/tacklingdisease/hg09b002.html>, 27/8/02 (2002)
- [Wikipedia, 2005a] Wikipedia, la enciclopedia libre. <http://es.wikipedia.org/wiki/Surfactante>, 24 de agosto de 2005.
- [Wikipedia, 2005b] Ver Wikipedia, 21 julio 2005. http://en.wikipedia.org/wiki/Palmitic_acid
- [Williams, 2004] Williams T., Kelley W. et al., *Gnuplot, an interactive plotting program*. version 4. <http://www.gnuplot.info/>.
- [Wood, 1987] Wood M. D. and Friedman H. L. *Brownian Dynamics Simulation of Models for Aqueous 1M ClNa and 1/2 M CuSo4*. Z. Phys. Chemie Neue Folge, Bd. **155**, S.121-132 (1987)

Esta tesis fue escrita por el autor, en una computadora personal adquirida por él mismo para todas las tareas relativas a su trabajo doctoral. El autor utilizó para esta tarea el sistema gratuito para preparar documentos denominado L^AT_EX, que fue primeramente desarrollado por Leslie Lamport en 1985, y que hoy es mantenido por un grupo importante de personas que se dan cita en el sitio de internet <http://www.latex-project.org/intro.html>. Este sistema está basado en el lenguaje de composición para documentos técnico-científicos llamado T_EX, creado por el matemático Donald Knuth, <http://www-cs-faculty.stanford.edu/~knuth/>. El autor escribió con el programa de edición T_EXNIC CENTER, creado por Sven Wiegand inicialmente en el año 1999 y un grupo de colaboradores, cuya página web es <http://www.texniccenter.org/>. La escritura duró desde el mes de abril hasta el de octubre del año 2005.

A todos los que desarrollan programas gratuitos, mi admiración y mi gratitud.