

ESTUDIO TEÓRICO DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y ELECTRÓNICAS DE UN CANAL DE POTASIO KCSA

TESIS QUE PRESENTA

MELISSA GONZÁLEZ CABALLERO

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

ENERO DE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - CUAJIMALPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

DIRECTOR:

DR. FELIPE APARICIO PLATAS

ASESOR:

DR. GERARDO PÉREZ HERNÁNDEZ

ASESOR:

DR. SALOMÓN DE JESÚS ALAS GUARDADO

ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA Y SIMULACIÓN MOLECULAR DURANTE EL PROGRAMA DE MAESTRÍA DEL POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

EL EXAMEN DE GRADO SE LLEVÓ A CABO EL DÍA 8 DE ENERO DE 2021.

EL JURADO ESTUVO FORMADO POR LOS SIGUIENTES SINODALES:

Dr. Marcelo Galván Espinosa
Dr. Roberto Bernal Jáquez
Dr. Jorge Garza Olguín

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, que sin su apoyo y cariño no podría haber llegado tan lejos. A mi familia, que aún estando a grandes distancias, siempre creyeron en mí. A mis compañeros y amigos, que junto con su conocimiento y risas, este proceso se hizo más ameno.

Agradezco infinitamente al Dr. Felipe Aparicio Platas, que con su sabiduría y dedicación, me transmitió los conocimientos aquí expuestos; así como ese mismo interés por la investigación que él posee.

Finalmente, agradezco al CONACyT por financiar mis estudios y al Laboratorio de Físicoquímica y Simulación Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa por las facilidades que me dieron para usar sus equipos de cómputo.

Por todo su apoyo y amor,

A mis padres... Rosario y Melecio

La ciencia es un juego, pero un juego con la realidad, un juego con los cuchillos afilados. . . Si alguien corta con cuidado una imagen en mil trozos, puedes resolver el rompecabezas si vuelves a colocar las piezas en su sitio.

En un juego científico, tu rival es el Buen Señor. No sólo ha dispuesto el juego, sino también las reglas, aunque éstas no sean del todo conocidas. Ha dejado la mitad para que tú las descubras o las determines. Un experimento es la espada templada que puedes empuñar con éxito contra los espíritus de la oscuridad pero que también puede derrotarte vergonzosamente. La incertidumbre radica en cuántas reglas ha creado el propio Dios de forma permanente y cuántas parecen provocadas por tu inercia mental; la solución sólo se vuelve posible mediante la superación de este límite. Tal vez esto sea lo más apasionante del juego. Porque, en tal caso, luchas contra la frontera imaginaria entre Dios y tú, una frontera que quizás no exista.

– ERWIN SCHRÖDINGER



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo teórico fue realizado de septiembre de 2018 a agosto de 2020 en el Laboratorio de Físicoquímica y Simulación Molecular de la DCNI

Melissa González Caballero

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 8 del mes enero del año 2021, la que suscribe Melissa González Caballero alumna del Programa Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; "Estudio Teórico de las Propiedades Estructurales y Electrónicas de una Canal de Potasio KcsA" realizada bajo la dirección del Dr. Felipe Aparicio Platas y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: fplatas@correo.cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Melissa González Caballero

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Melissa González Caballero, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

Melissa González Caballero

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

La que suscribe, Melissa González Caballero alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Melissa González Caballero.

Melissa González Caballero

Resumen

Esta tesis presenta un estudio teórico sobre las propiedades estructurales, funcionales y electrónicas del canal de potasio KcsA de la bacteria *Streptomyces lividans*. A partir de dinámica molecular clásica se revisan las características que hacen estable estructuralmente al canal y a su filtro de selectividad. Con un análisis de datos masivos se hace una exploración sobre el comportamiento de las especies que entran al canal y que hace posible su funcionalidad. Además, haciendo uso de los conceptos en la Teoría de Funcionales de la Densidad, se hace una revisión sobre las características electrónicas de su filtro de selectividad.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	XIII
Índice general	XV
Introducción	1
Objetivos e Hipótesis	5
1. Sistema de estudio	7
1.1. Descripción del canal KcsA	7
1.2. Antecedentes	10
1.2.1. Estudios previos sobre el canal KcsA	10
1.2.2. Estabilidad del canal KcsA	11
1.2.3. Interacciones en el filtro de selectividad	13
1.2.4. Selectividad sobre los iones K^+ en el canal KcsA	15
1.2.5. Apertura y cierre del canal KcsA	17
2. Fundamento teórico	19
2.1. Dinámica Molecular Clásica	19
2.1.1. Campos de fuerza	20
2.1.2. Técnicas de integración	22
2.1.3. Procedimiento de una simulación	25
2.2. Herramientas de análisis	25
2.2.1. Alineamiento estructural	25
2.2.2. Puentes de hidrógeno	27
2.2.3. Puentes salinos	28
2.3. Teoría de las Funcionales de la Densidad	28
2.3.1. Principios de la estructura electrónica	28
2.3.2. Teoremas	29

XV

2.3.3. Aplicación de la TFD	32
3. Propiedades dinámicas del canal KcsA	35
3.1. Planteamiento del problema	35
3.2. Descripción del sistema molecular	36
3.3. Parámetros de la dinámica molecular	37
3.4. Resultados y discusión	38
3.4.1. Análisis de Equilibración	38
3.4.2. Análisis Estructural	41
3.4.3. Análisis de puentes de hidrógeno	43
3.4.4. Análisis de puentes salinos	45
3.5. Conclusiones	48
4. Dinámica de las especies moleculares dentro del filtro	49
4.1. Planteamiento del problema	49
4.2. Detalles Computacionales	50
4.3. Resultados y Discusión	53
4.3.1. Iones K^+ dentro del filtro	53
4.3.2. Moléculas de agua dentro del filtro	59
4.3.3. Iones cloruro dentro filtro	61
4.4. Conclusiones	62
5. Propiedades electrónicas del filtro de selectividad	63
5.1. Planteamiento del problema	63
5.2. Detalles computacionales	64
5.3. Resultados y Discusión	66
5.3.1. Comportamiento con tres iones dentro del filtro de selectividad . . .	66
5.3.2. Comportamiento con dos iones dentro del filtro de selectividad . . .	71
5.4. Conclusiones	77
Conclusiones generales	79
Perspectivas	81
Bibliografía	83
A. Código para el rastreo de especies en el filtro de selectividad	89

Introducción

En la membrana de todas las células existen proteínas que les confieren propiedades funcionales y estructurales, tan importantes que llegan a ocupar del 25 al 75 % de la masa total de la membrana biológica.¹ Estas proteínas pueden clasificarse en dos grandes categorías: integrales y periféricas (Figura 1). Las proteínas que entran en el grupo de integrales son las proteínas transmembrana, que contienen regiones hidrófobas e hidrófilas para que puedan posicionarse en medio de la bicapa lipídica y así actuar en ambos lados de la bicapa o transportar moléculas a través de ella. Estas proteínas de transporte proporcionan un camino para que las moléculas hidrosolubles e iones atraviesen la barrera lipídica para así incorporar los nutrientes esenciales, desechar productos residuales del metabolismo y regular las concentraciones intracelulares de iones.²

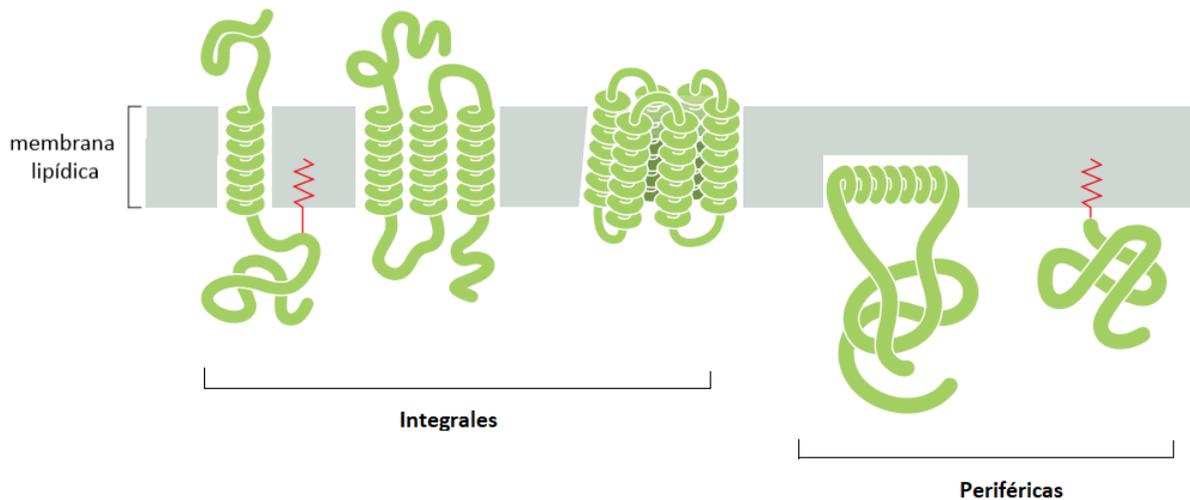


Figura 1: Proteínas de membrana. Imagen tomada de la referencia¹

Existen dos clases de proteínas de transporte: los transportadores y los canales. En los transportadores las moléculas a transferir se unen a la proteína y esta sufre un cambio conformacional en su estructura para dejar pasar esa molécula. En cambio, los canales forman un poro hidrófilo que permite el desplazamiento pasivo de solutos (en general iones inorgánicos y agua) de un lado a otro de las bicapas lipídicas, siendo así la velocidad de difusión más rápida que en los transportadores al no necesitar de un cambio estructural.

Los canales que se encuentran en mayor medida en las membranas son los canales iónicos (principalmente de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-) que comunican el interior citosólico de la célula con el exterior, por lo cual deben ser altamente selectivos a qué tipo de iones dejar pasar para no romper el equilibrio en las concentraciones iónicas intracelulares. Para esto, su apertura y cierre debe ser lo suficientemente rápida, proceso que está mediado por pequeñas moléculas que se unen al canal o por cambios en el voltaje de la membrana. Así, la *selectividad iónica* es una característica esencial en este tipo de canales porque evita que otro tipo de moléculas pasen por el poro. Por ese motivo, los canales iónicos cuentan en su

estructura con una parte más estrecha conocida como el *filtro de selectividad* que permite solo el paso al ion apropiado para el canal. Siendo tan importantes los canales iónicos para la sobrevivencia de la célula que son ubicuos para todas ellas.

Los canales iónicos más comunes en la célula son los canales selectivos al paso de los K^+ y se clasifican en tres familias: (i) canales Kv, activados por cambios en el voltaje de membrana, (ii) Kir, canales rectificadores entrantes (inward rectifier en inglés), que tienden a conducir el K^+ dentro de la célula y (iii) TWIK, canales de potasio de dos dominios que contienen dos copias del filtro de selectividad.³

Los canales de potasio son tan selectivos al ion K^+ que lo seleccionan sobre el Na^+ por más de 1000 a 1, pese a que estos dos cationes son muy similares y sólo difieren en su radio iónico aproximadamente en 0.38 \AA .⁴ Además, todos ellos comparten una misma secuencia de aminoácidos en su filtro de selectividad formado por residuos Treonina, Valina, Glicina, Tirosina y Glicina (TVGYG, en código de una letra).³ Secuencia que fue descubierta gracias a la primer estructura obtenida por difracción de rayos X⁵ de un canal de potasio de la bacteria *Streptomyces lividans*, conocido como el canal KcsA (K channel of streptomyces A, por sus siglas en inglés).

Si no hay una correcta homeostasis en el flujo de los iones que dependen directamente de la entrada o salida de los K^+ a la célula (como Na^+ y Ca^{2+}), aparecen padecimientos como el cáncer, enfermedades autoinmunes, metabólicas o desórdenes neurológicos y cardiovasculares. De este modo los canales de potasio ofrecen una gran oportunidad como blanco para el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar este tipo de enfermedades. Por ejemplo, creando metodologías con péptidos de venenos, anticuerpos o moléculas pequeñas que afectan o potencian la función de estos canales.⁶

En razón de que los canales de potasio tienen la cualidad de tener un filtro de selectividad conservado para todas las familias, y por lo tanto sus características pueden replicarse, cuando son estudiados se suele trabajar con la estructura más sencilla de un canal de potasio como lo es el canal KcsA. El cual, a pesar que ha sido objeto de investigación por muchos años, los estudios que han hecho sobre él aún no son concluyentes con respecto a su naturaleza altamente selectiva.

Por lo que el propósito de este trabajo es analizar las características estructurales y electrónicas del canal KcsA, a un nivel teórico usando dinámica molecular clásica, análisis de datos masivos y cálculos cuánticos, para comprender las propiedades que determinan su estabilidad estructural, su funcionalidad y sus propiedades electrónicas. Esta tesis está organizada de la siguiente manera: en el capítulo 1 describimos el sistema de estudio y los últimos avances en investigación sobre el mismo, en el capítulo 2 presentamos los fundamentos teóricos pertinentes para esta tesis, en el capítulo 3 discutimos las propiedades dinámicas del canal, en un capítulo 4 presentamos un análisis sobre la funcionalidad dentro del filtro de selectividad y finalmente en el capítulo 5 mostramos algunas propiedades electrónicas del filtro de selectividad.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general

Comprender los fundamentos moleculares y electrónicos que determinan la estabilidad estructural y la reactividad del canal KcsA.

Objetivos específicos

1. Determinar los factores estructurales y moleculares que estabilizan el canal KcsA.
2. Describir el funcionamiento del filtro de selectividad del canal KcsA y el comportamiento de los iones y moléculas de agua dentro de él.
3. Estudiar las propiedades electrónicas y de reactividad que determinan la selectividad de los canales KcsA por el K^+ .

Hipótesis

La estabilidad estructural del canal KcsA está determinada por fuerzas intermoleculares entre las unidades que lo conforman y la reactividad del filtro de selectividad está relacionada con el comportamiento de los iones y las moléculas de agua dentro de él.

Capítulo 1

Sistema de estudio

En esta sección describimos las características y propiedades del canal de potasio KcsA, como su estructura secundaria y terciaria, así como su funcionalidad. Además, se hace una revisión bibliográfica sobre los estudios teóricos más relevantes que se han realizado sobre él. En ellos se vislumbran cuatro temas principales que compete para los objetivos del trabajo: la estabilidad estructural del canal, las interacciones que ocurren dentro del filtro de selectividad (FS), la selectividad sobre los iones potasio y la apertura y cierre del mismo.

1.1. Descripción del canal KcsA

El canal de potasio KcsA se encuentra en la bacteria *Streptomyces lividans*, es así que sus siglas vienen del inglés como K channel of streptomyces A. Está formado por cuatro subunidades o cadenas altamente simétricas que comparten la misma secuencia de 103 aminoácidos (Figura 1.1).^a

^aLa estructura cristalográfica del canal empieza a partir del aminoácido 22.

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
cadena A	S	A	L	H	W	R	A	A	G	A	A	T	V	L	L	V	I	V	L	L	A	G	S	Y	L	A	V	L	A	E	R	G	A	P	G
cadena B	S	A	L	H	W	R	A	A	G	A	A	T	V	L	L	V	I	V	L	L	A	G	S	Y	L	A	V	L	A	E	R	G	A	P	G
cadena C	S	A	L	H	W	R	A	A	G	A	A	T	V	L	L	V	I	V	L	L	A	G	S	Y	L	A	V	L	A	E	R	G	A	P	G
cadena D	S	A	L	H	W	R	A	A	G	A	A	T	V	L	L	V	I	V	L	L	A	G	S	Y	L	A	V	L	A	E	R	G	A	P	G
	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
cadena A	A	Q	L	I	T	Y	P	R	A	L	W	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	V	T	L	W	G	R	C	V
cadena B	A	Q	L	I	T	Y	P	R	A	L	W	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	V	T	L	W	G	R	C	V
cadena C	A	Q	L	I	T	Y	P	R	A	L	W	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	V	T	L	W	G	R	C	V
cadena D	A	Q	L	I	T	Y	P	R	A	L	W	W	S	V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	V	T	L	W	G	R	C	V
	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124		
cadena A	A	V	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	V	G	R	E	Q	E	R	R	G	H		
cadena B	A	V	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	V	G	R	E	Q	E	R	R	G	H		
cadena C	A	V	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	V	G	R	E	Q	E	R	R	G	H		
cadena D	A	V	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	V	G	R	E	Q	E	R	R	G	H		

Coil Alpha helix Turn

Figura 1.1: Secuencia de aminoácidos del canal KcsA. Se muestra con el código de colores la estructura secundaria de la proteína. Encerrado en rectángulo negro están señalados los aminoácidos que corresponden al filtro de selectividad del canal.

La estructura del canal está constituida principalmente de cuatro cadenas de hélices alfa (Figura 1.2(a)), las cuales se clasifican en tres regiones: (1) una hélice de menor tamaño que corresponde a la hélice más cercana al FS, que está en los residuos 62 al 74; (2) una hélice mediana que está en la zona externa del canal (hélice M1), que está en los residuos 24 al 51; y (3) la hélice de mayor tamaño localizada en la parte interna del canal (hélice M2), que corresponde a los residuos 86 al 122. En la parte extracelular del canal se encuentran los bucles o *loops* que conectan las hélices M1 y M2 para cada cadena (Figura 1.2(b)).

El poro del canal se encuentra entre las cuatro cadenas con un largo de 45 Å y en él está el filtro de selectividad que se ubica en *loops* que están uno frente al otro (cuadro rojo de la Figura 1.2(b)). El FS está constituido de cinco residuos Treonina, Valina, Glicina, Tirosina y Glicina (TVGYG, en código de una letra) que están posicionados en los aminoácidos del 75 al 79, respectivamente. Entre los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos, el filtro tiene cuatro sitios de unión para el ion, nombrados desde del S1 al S4. Además, el filtro tiene un largo de 12 Å y un diámetro aproximado de 10 Å (Figura 1.2(c)).

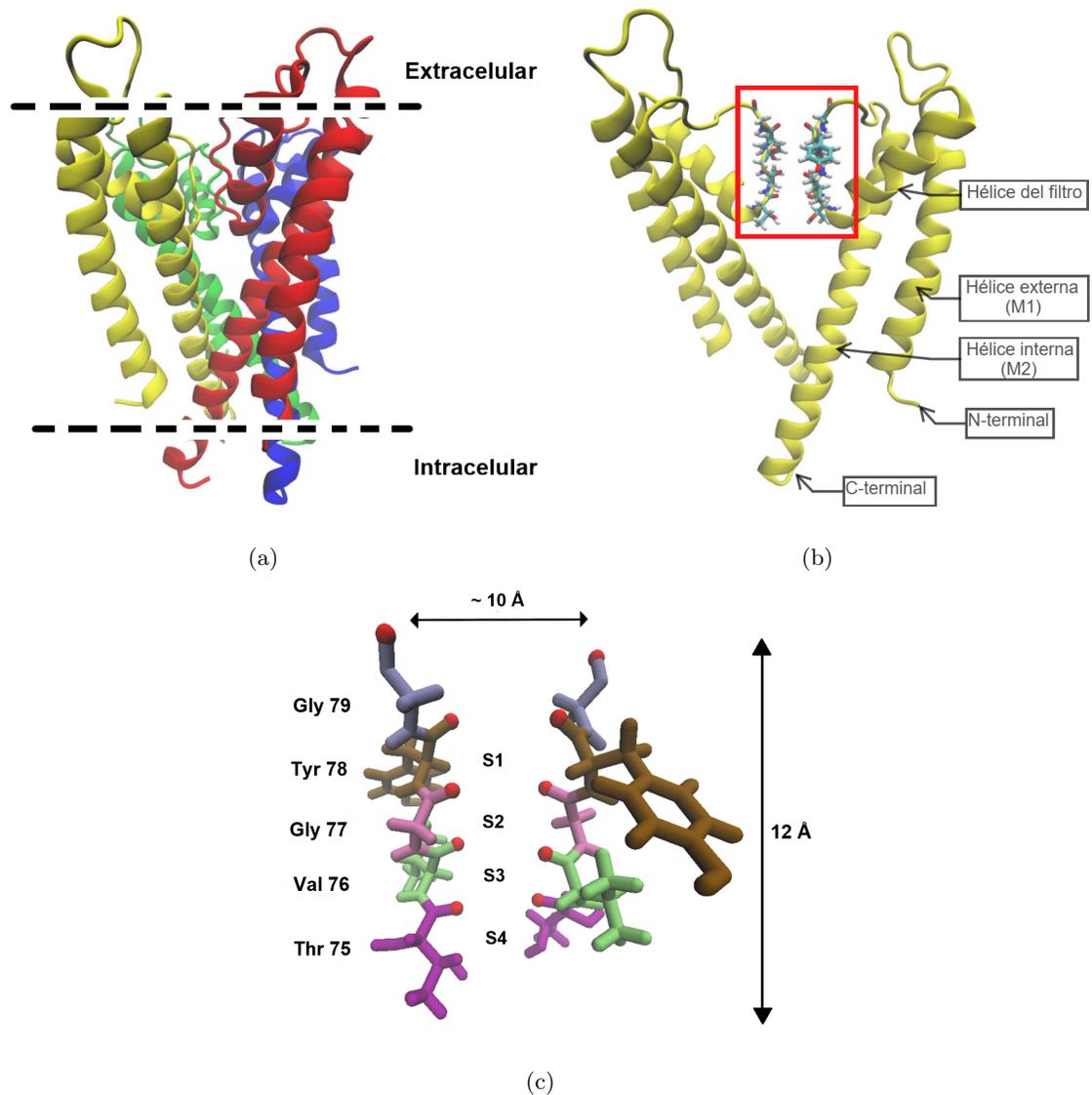


Figura 1.2: Estructuras del canal de potasio de la bacteria *Streptomyces lividans*. a) Vista lateral del tetrámero completo del canal de potasio KcsA. b) Se muestran solo dos cadenas del canal KcsA y el recuadro rojo señala la localización del filtro de selectividad. c) Se muestran los cinco residuos del filtro de selectividad (de solo dos cadenas) formado por Glicina 79, Tirosina 78, Glicina 77, Valina 76 y Treonina 75, ordenados en forma de aparición desde la parte extracelular del filtro. La longitud y el diámetro del filtro están señalados por flechas negra.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Estudios previos sobre el canal KcsA

El estudio de los canales iónicos se remonta a 1840 cuando von Brücke y otros biofísicos, presentaron la hipótesis que explicaba la ósmosis,⁷ quienes concibieron la idea que los canales dejaban pasar agua y otras pequeñas partículas para mantener la homeostasis en la célula. Pero no es hasta 1952 con el trabajo de Hodgkin y Huxley, donde describen la propagación de los potenciales de acción en el axón gigante de calamar y por el cual ganaron un Premio Nobel; ideas que revolucionaron a la biofísica y crearon un nuevo campo de estudio: la investigación sobre los canales iónicos.

En 1998 Roderick MacKinnon y colaboradores⁸ por primera vez logran caracterizar por rayos X la estructura cristalográfica de un canal de K^+ , el canal KcsA. Ellos plantearon que: (i) el filtro de selectividad es de 12 Å de longitud, (ii) la cavidad está llena de agua que ayuda al catión a superar la barrera energética para pasar por la membrana, (iii) el filtro de selectividad está estructurado con una línea de oxígenos de grupos carbonilos que permiten que un ion K^+ deshidratado se coloque en una geometría óptima, y la cual el Na^+ no puede obtener y (iv) dos iones K^+ cercanos en el FS se repelen, permitiendo así la rápida conducción de iones.

Posteriormente a que se obtuviera la estructura del canal KcsA, se desarrollaron muchos estudios entorno a este. Sin embargo, en esta sección nos enfocaremos a los estudios teóricos sobre el canal KcsA. Por ejemplo, el estudio de Roux y del mismo MacKinnon⁹ en 1999 quienes analizaron la entrada de iones al canal usando la ecuación de diferencias finitas de Poisson. En este trabajo propusieron que las hélices alfa del canal ayudan a mantener el catión dentro del filtro y que la selectividad es debida a efectos electrostáticos. En ese mismo

año, se publicó el primer estudio usando dinámica molecular de Guidoni y colaboradores¹⁰ para comprender la preferencia del canal por el ion K^+ con respecto al ion Na^+ . Ellos expusieron que (1) el canal está construido con cargas negativas para repeler los aniones y atraer a los cationes hacia el poro, (2) que el canal tiene la capacidad de eliminar las moléculas de agua que rodean al cation hidratado para que pueda entrar y por lo tanto la selectividad se deba a que el ion Na^+ tiene unido más moléculas de agua a diferencia del ion K^+ y (3) que el aspartato 89 (Asp89) forma puentes salinos que contribuye a la estabilidad del tetrámero.

Así, a partir del año 2000 han surgido numerosas investigaciones sobre el canal KcsA y en el que principalmente tratan de responder tres preguntas: ¿Por qué el canal KcsA es estable?, ¿Cuáles son las interacciones que ocurren dentro del FS? y ¿Por qué es altamente selectivo a los iones K^+ ? A pesar de ello, ninguna ha sido concluyente y han dejado dudas o preguntas sin responder.

En esta sección se resumen algunas de esas investigaciones, de las cuales sólo mencionamos aquellas en las que se hicieron experimentos de tipo teórico donde usaron análisis de dinámica molecular, cálculo cuánticos o alguna otra estrategia teórica.

1.2.2. Estabilidad del canal KcsA

Antes de comenzar con esta sección, es necesario establecer la definición de estabilidad desde el punto de vista de la biofísica de las biomoléculas, y en especial de las proteínas. En la literatura encontramos diferentes métodos para medir esta propiedad pero todos están asociados a diferentes ideas que se tiene sobre la estabilidad. En esta tesis vamos a referirnos a tres conceptos de estabilidad de acuerdo con la descripción hecha por Becktel et al.¹¹.

El primer concepto es la estabilidad energética, el cual se refiere a un mínimo de energía de la proteína; que depende principalmente de variables termodinámicas (temperatura, presión, número de partículas, etc.). El segundo concepto es la estabilidad estructural, que se refiere a aquella estabilidad que puede verse perturbada debido a pequeños cambios químicos o físicos en la proteína, en particular en su estructura primaria (los aminoácidos que la conforman). Estos cambios se observan en las variaciones de la energía libre con respecto a un estado de referencia. Por último, el tercer concepto es la estabilidad conformacional, la cual se puede considerar como una estabilidad que engloba las definiciones anteriores y que considera los cambios que puede sufrir la proteína en su estructura secundaria y terciaria. Esto incluye la diferencia entre dos estados de la proteína, por ejemplo entre un estado nativo y un estado desnaturalizado.

Por lo tanto, muchos investigadores se han preguntado qué hace al canal KcsA estable, si se estabiliza dentro de la membrana lipídica o si existen cambios estructurales o conformacionales que afecten a la estabilidad. Esto es, si hay algún cambio que haga pasar de una configuración abierta que permite el flujo de iones, a una configuración cerrada que bloquea ese flujo.

A principios del año 2000, Bernéche y colaboradores¹² usaron dinámica molecular (DM) para encontrar que el canal KcsA era muy estable dentro de la membrana, mostrando que su RMSD era de 1.9 Å, y los puentes de hidrógeno del filtro de selectividad eran muy importantes para su estabilidad junto con los residuos Trp67, Trp68, Tyr78, y Tyr82. Además, demostraron que la configuración más estable conformacionalmente del FS es la que contiene dos o tres iones dentro. Si hay ausencia de iones en el FS este sufre cambios conformacionales importantes. Así mismo, Bucher et al.¹³ evidenciaron que la protonación de Glu71 es más favorable sobre la protonación de la Asp80.

En el 2007, Furini et al.¹⁴ demostraron que cuando hay cambios estructurales en el vestíbulo intracelular no afectan a la selectividad, pero juegan un rol importante en la conductividad de los potasios. Ngo et al.¹⁵ confirmaron que esta región del vestíbulo reduce sus moléculas de agua cuando un ion K^+ está localizado en su posición S4. Weingarth et al.¹⁶ comprueban que la presencia de moléculas de agua alrededor del FS sirven como elementos reguladores de la función del canal. Idea enfatizada por el trabajo de Wu et al.¹⁷ donde mostraron que los filtros con pocas moléculas de agua son menos estables estructuralmente pero se pueden estabilizar rápidamente cuando más moléculas se infiltran detrás de él.

De este modo, los estudios que se han realizado sobre la estabilidad estructural del canal KcsA han coincidido en que: *a)* los residuos principales de filtro de selectividad y las moléculas de agua que lo rodean, brindan estabilidad conformacional y estructural al FS y *b)* la concentración de los iones K^+ es la que dirige esta estabilidad.

1.2.3. Interacciones en el filtro de selectividad

Además del objetivo de comprender la selectividad, es necesario conocer las interacciones entre los residuos del filtro de selectividad, los iones potasio y moléculas de agua dentro del canal de potasio.

Este problema se empieza a abordar en el mismo trabajo del año 2000 de Bernéche et al.¹², donde mostraron que el flujo de iones toma alrededor de 300 ps y en cual ocurren colisiones entre los iones, moléculas de agua y los átomos de los residuos del FS. Shrivastava et al.¹⁸ en el año 2000, evidenciaron que este flujo se da por una traslocación en una sola fila de iones de la forma $K^+-H_2O-K^+$, con el objetivo de mantener interacciones óptimas entre los oxígenos del filtro y los iones. Bucher et al.¹³ en el 2007 descubrieron que es el puente

salino entre Asp80 y Arg89 el que influye en esta transferencia de protones. Adicionalmente, Kopfer et al.¹⁹ en el 2014 refirieron que el flujo eficiente de iones ocurre por una repulsión coulombica ion-ion.

Guidoni et al.²⁰ mostraron que el canal está construido de tal forma para que pueda polarizar las moléculas de agua dentro filtro y así inducir un largo dipolo. Además Zhou et al.²¹ aluden a que la cavidad central mantiene un ion rodeado de 8 moléculas de agua.

El tipo de interacciones que ocurre entre el filtro de selectividad y los iones se describe a partir del 2002 por Guidoni et al.²², el cual expusieron que los sitios S1 y S2 proveen una geometría de coordinación antiprismática octahédrica al ion que se induce por la polarización de los residuos del filtro a los iones. Reafirmado con el trabajo del 2006 de Bucher et al.²³ en el que también afirmaron que los cationes en el FS inducen una polarización electrónica del grupo carbonilo a los iones. Conjuntamente, Furini et al.¹⁴ comprobaron que la concentración de los iones K^+ en la cavidad inferior al FS, junto con este potencial electrostático, son los que controlan las fuerzas que actúan en los iones del filtro de selectividad. Por lo tanto, la conformación con baja concentración de iones, no coordina apropiadamente estos y no crea ninguna interacción fuerte en los sitios de unión.²⁴ Si esto se lleva a cabo correctamente, cuando un K^+ se acerca al FS, este es atraído y estabilizado por un enlace al sitio S4.¹⁵

En el estudio cuántico realizado en el 2015 por Salari et al.²⁵ expusieron que existen grados de coherencia cuántica en el que las vibraciones que experimentan los iones en un estado cerrado del FS son más grandes que los del estado abierto. Y las posiciones preferidas de los iones K^+ dentro del canal están en lo sitios de unión S1 y S3. Al mismo tiempo, si un ion Na^+ entra, este no puede moverse al sitio de unión S4.²⁶ Sin embargo, en el estudio

reciente de Oakes et al.²⁷ evidenciaron que no existe un mecanismo preferido por los iones para viajar a través del poro, ya que los iones pueden fluir solos o a veces acompañados por moléculas de agua.

Esto muestra que es necesario investigar sobre las interacciones que ocurren dentro o fuera del filtro de selectividad ya que estos procesos permiten preguntarse de cómo o por qué se da la selectividad hacia los iones K^+ .

1.2.4. Selectividad sobre los iones K^+ en el canal KcsA

Desde que se logró obtener la estructura cristalográfica del canal de potasio KcsA, surgió la pregunta de cómo este es capaz de discernir entre los dos iones más abundantes en el medio extracelular, los iones K^+ y los iones Na^+ . Así que se han utilizado distintos enfoques para conocer la selectividad del canal.

En el año 2000 Bernéche et al.¹² se opusieron a los estudios anteriores de su época, ya que manifestaron que la selectividad por el K^+ sobre el Na^+ no solo recae en los tamaños de los iones, sino por contribuciones energéticas de las interacciones ion-proteína, ion-agua, agua-agua, agua-proteína. Al año siguiente en el 2001, Biggin et al.²⁸ exhibieron que la selectividad sí es debida a una interacción ion-agua, ya que el filtro es capaz de solvatar los iones K^+ y Na^+ . Siendo así que esta discriminación entre ellos es debido a la diferencia de energía de deshidratación entre estos dos iones. Ideas reforzadas por Zhou et al.²¹ donde expresaron que la transferencia de iones está mediado por un arreglo específico de los oxígenos de los grupos carbonilos. Sin embargo, Bucher et al.²⁹ señalaron que el número de coordinación de estos dos iones son similares en el filtro y en el agua, resultado distinto a las investigaciones previas.

Otra hipótesis de por qué se da la selectividad es la que exponen Shrivastava et al.³⁰, en la cual mostraron que la flexibilidad y la naturaleza de cambios conformacionales del FS son importantes para permitir que el canal discrimine entre iones permeables y bloqueadores. Enfatizado con el trabajo de Noskov et al.³¹ en el que declararon que la selectividad por el K^+ sobre el Na^+ es posible por esa característica flexible del poro y está determinada por propiedades electrostáticas intrínsecas de los oxígenos de los grupo carbonilo. Egwolf et al.³² confirmaron que la selectividad no está correlacionada con el número de coordinación alrededor del ion que entra al FS, sino que es por los cambios en el tipo de ligandos que coordinan a este.

El mismo grupo de Noskov et al.⁴, en una investigación posterior, expusieron que la interacción entre el ion-ligando (favoreciendo el catión más pequeño) y las interacciones repulsivas ligando-ligando (favoreciendo los cationes más grandes) son los elementos básicos que gobiernan la selectividad en los sitios de unión. Así mismo, siguiendo con la idea de las propiedades electrostáticas, Bucher et al.²³ aludieron a que los efectos de polarización y de transferencia de carga juegan un rol importante en la selectividad. Además, Ngo et al.¹⁵ que mencionaron que la selectividad está basada en exclusiones selectivas del FS en vez de uniones selectivas a sitios dentro del filtro.

Anteriormente, se tenía la idea que una coherencia clásica era la responsable de la selectividad del canal. Sin embargo, Salari et al.²⁵ confirmaron que las vibraciones de coherencia clásica de los grupos carbonilos no juegan un rol importante en la rápida conducción de los iones. Además afirmaron que las interacciones eléctricas son más fuertes que las vibraciones del FS. Asimismo, en un estudio con cálculos cuánticos, De March et al.³³ propusieron que los modelos de partículas simples cuánticas sugieren que razones del orden de 10^8 s^{-1} pueden explicar la alta eficiencia de los canales iónicos. Para él, las repulsiones coulombicas dictan

una escala de tiempo característica para el transporte de iones dentro del canal.

El tema de la selectividad en los canales de potasio sigue siendo una pregunta abierta puesto que, como se resumió en esta sección, los resultados aún no son concordantes entre ellos y ninguno ha dilucidado completamente esta problemática. Incluso en las nuevas investigaciones resurgen ideas anteriores a la época, como en el caso del trabajo de Song et al.³⁴ del año 2019 quienes retomaron la idea de que la selectividad está dada por la magnitud de energía de solvatación entre el K^+ y el Na^+ .

1.2.5. Apertura y cierre del canal KcsA

La apertura y el cierre del canal KcsA es también un tema esencial para comprender la naturaleza de su selectividad. La activación del canal está relacionada con las concentraciones de hidrógenos dependiendo del pH extracelular e intracelular en la bacteria. En él ocurren cambios conformacionales que separan las hélices M1 y M2 para crear un espacio y que los iones puedan pasar libremente (Figura 1.3). Sin embargo, Domene³ sugirió que las hélices M2 no se mueven por completo como cuerpos rígidos, sino que se doblan ligeramente, siendo así que no contribuyen lo suficiente para la apertura del poro. Shrivastava et al.¹⁸ mencionaron que son los cambios pequeños (0.1 nm o menos) en la región del anillo del residuo V115 los que pueden abrir el canal. Confirmado por Chakrapani et al.³⁵ quienes exponen que la hélice del poro, el filtro de selectividad y el vestíbulo externo son estructuras dinámicas donde hay cambios conformacionales locales pequeños (como movimientos de los oxígenos de grupo carbonilos, fluctuaciones en la cadena principal del filtro, o cambios en la configuración y ocupación de las moléculas de agua detrás del filtro) que pueden tener efectos drásticos sobre la apertura y el cierre del canal.

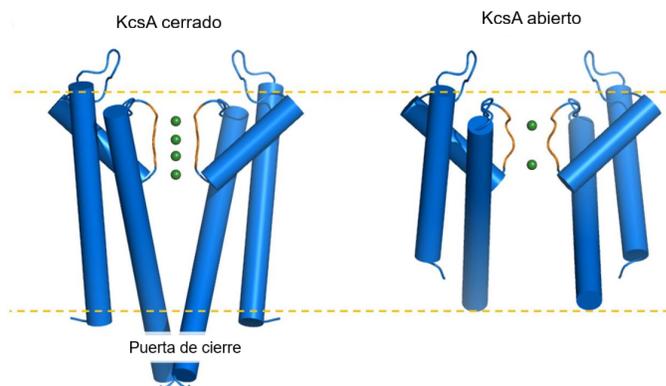


Figura 1.3: Mecanismo de apertura y cierre del canal KcsA. Se muestran los cambios conformacionales que ocurren en las hélices M1 y M2 debido a los cambios en el pH. Figura tomada de Liu³⁶ que representa la estructura de rayos X del canal cerrado (PDB: 1K4C) y del canal abierto (PDB: 3F7V). Las regiones del filtro de selectividad están en naranja y los iones potasio están en esferas verdes.

Salari et al.²⁵ afirmaron que existen dos estados del canal: abierto cuando hay tres iones en el FS y cerrado cuando solo hay dos iones. Así como Lemauserier et al.³⁷ mostraron que estos estados son debido a que la apertura del canal es muy sensible al tipo y la concentración de los iones. Comprobado por Zhou et al.²¹ quienes mostraron que el FS adopta conformaciones diferentes dependiendo de la concentración de K^+ . Esto es, a bajas concentraciones cambia a su forma no-conductiva y a altas concentraciones adopta su forma compatible con la conducción de iones. No obstante, el mecanismo por el cual una disminución del pH intracelular conduce a la apertura del canal sigue siendo tema de debate.

Finalmente, debemos hacer notar que la estructura cristalográfica del KcsA hecha por MacKinnon, corresponde a una estado cerrado del canal, comprobado por varios investigadores.^{3,18,38} En esta tesis decidimos hacer uso de esta estructura porque ha sido utilizada en muchas investigaciones y ha logrado arrojar resultados exitosos y acordes con lo observado en la naturaleza.

Capítulo 2

Fundamento teórico

En este capítulo presentamos los conceptos en los que se basan los estudios hechos en esta tesis. En la primera sección describimos el método de *Dinámica Molecular Clásica* (DM). En la segunda sección revisamos los conceptos usados para hacer el análisis estadístico de DM, como RMSD y RMSF. Finalmente, en la tercera sección de este capítulo, exponemos los conceptos de la *Teoría de Funcionales de la Densidad* (TFD) y de algunos índices de reactividad química.

2.1. Dinámica Molecular Clásica

La dinámica molecular clásica es una técnica de simulación por computadora en la que átomos y moléculas interactúan por un periodo de tiempo. Donde, bajo condiciones iniciales como la posición y las velocidades de las partículas, se resuelven las ecuaciones clásicas del movimiento de Newton:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} = m_i \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \quad (2.1)$$

Donde F es la fuerza, m la masa y a la aceleración, que también puede reescribirse como la primera derivada de la velocidad v o la segunda derivada de la posición r . Esto para todas las partículas i del sistema.

En este sentido, si tenemos N partículas y estas son átomos, se debe de calcular la fuerza entre cada uno de ellos. Dado un sistema de N átomos, la energía potencial se puede obtener a partir de $U(r_1, \dots, r_N)$, que es una función de las posiciones relativas de los átomos con respecto a cada uno.³⁹ Si estas fuerzas son conservativas (aquellas cuyo trabajo depende únicamente de las posiciones inicial y final y no de su trayectoria) se pueden escribir como un gradiente (∇) del potencial:

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}_i U(r_1, \dots, r_N) \quad (2.2)$$

2.1.1. Campos de fuerza

La Ecuación 2.2 representa una forma exacta de calcular las fuerzas conservativas a partir de un potencial. Para un sistema de N partículas, el potencial U debe representar las interacciones entre todas esas partículas como:

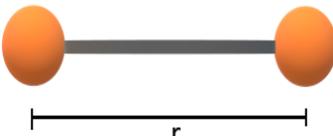
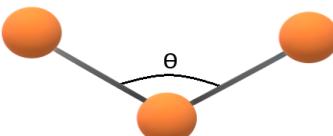
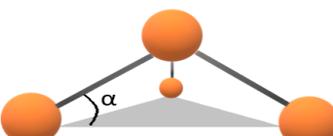
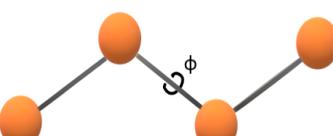
$$U = \sum_{i=1}^N v_1(r_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N v_2(r_i, r_j) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \sum_{k>j>i}^N v_3(r_i, r_j, r_k) + \dots \quad (2.3)$$

en donde el término v_1 representa las interacciones de un cuerpo, v_2 las interacciones de dos cuerpos, v_3 las interacciones de tres cuerpos y así sucesivamente. No obstante, no tenemos una forma matemática para representar las interacciones de N -cuerpos, por lo que el potencial U se debe aproximar por un campo de fuerzas. En el cual de una forma general se describen las interacciones covalentes y no covalentes de los átomos. Las interacciones covalentes o de corto alcance son de tipo enlace, ángulos, ángulos diedros propios e impropios. Las interacciones no covalentes o de largo alcance son de tipo Van der Waals y electrostáticas. Por lo que de esta forma, el potencial U se reescribe como:

$$U = U_{enlace} + U_{ángulos} + U_{Van\ der\ Waals} + U_{electrostáticas} \quad (2.4)$$

Los potenciales se describen como puntos que interactúan a través de enlaces pares o enlaces múltiples, gracias a la perspectiva de la física clásica. Existen diferentes tipos de campos de fuerza tales como MM313, MM414, Dreiding15, SHARP16, VALBON17, UFF18, CFF9519, AMBER20, CHARMM21, OPLS22 y MMFF23; los cuales se han ido mejorando en la descripción de las interacciones.⁴⁰ El campo de fuerza CHARMM21 está constituido por los términos de la Tabla 2.1 y su forma es la suma de todos ellos.

Tabla 2.1: Interacciones atómicas con sus potenciales.

Tipo de interacción	Ecuación	Modelo
Enlace (Ley de Hooke)	$U_{enlace} = \sum k_{enlace}(r - r_0)^2$ <p>k: constante de fuerza de enlace $r - r_0$: distancia que se mueve el átomo</p>	
Ángulos	$U_{angulo} = \sum k_{\theta}(\theta - \theta_0)^2$ <p>k_{θ}: constante de fuerza angular $\theta - \theta_0$: posición del ángulo entre tres átomos</p>	
Ángulo diedro impropio	$U_{impropio} = \sum k_{\alpha}(\alpha - \alpha_0)^2$ <p>k_{α}: constante de fuerza diedral $\alpha - \alpha_0$: posición del ángulo diedral</p>	
Ángulo diedro propio	$U_{diedro} = \sum k_{\phi}(1 - \cos(n\phi))$ <p>k_{ϕ}: constante de fuerza diedral n: multiplicidad de la función ϕ: ángulo diedro</p>	

Tipo de interacción	Ecuación	Modelo
De Van der Waals	$U_{vdw} = \sum \varepsilon \left(\frac{4\sigma_{ik}^{12}}{r_{ik}^{12}} - \frac{4\sigma_{ik}^6}{r_{ik}^6} \right)$ <p> ε: profundidad del potencial de Lennar-Jones² σ: distancia en la que el potencial entre partículas (i,k) es cero r: distancia entre partículas (i,k) </p>	
Electrostáticas	$U_{elec} = \sum \frac{q_i q_k}{r_{ik}^2}$ <p> q: carga de las partículas i,k r: distancia entre las partículas i,k </p>	

2.1.2. Técnicas de integración

Los métodos de dinámica molecular se rigen además por la forma hamiltoniana de la ecuación de movimiento. Donde el hamiltoniano para un sistema de N partículas está dado por⁴¹

$$H(p, r) \equiv H(p_1, \dots, p_N, r_1, \dots, r_N) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} + U(r_1, \dots, r_N) \quad (2.5)$$

en el que p_1, \dots, p_N es el momento de las partículas definidas por $p_i = m_i v_i$ y el potencial U . Por lo que la Ecuación 2.1 se reescribe a partir de la Ecuación 2.5 como

$$\dot{r}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} = \frac{p_i}{m_i} \quad (2.6)$$

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial r_i} = -\frac{\partial U}{\partial r_i} = F_i(r_1, \dots, r_N) \quad (2.7)$$

Sin embargo, estas ecuaciones no están completas sin la integración numérica de ellas

dependiendo del tiempo para seguir la interacción y la trayectoria de las partículas. Estos algoritmos de integración se basan en un paso de tiempo Δt . Después de un tiempo t la integración será ahora $t + \Delta t$. Al iterar el procedimiento, la evolución temporal del sistema se puede seguir durante mucho tiempo.³⁹

Existen diferentes métodos para resolver la integración, uno de los más usado en DM es el algoritmo de Verlet, el cual consiste en expandir en series de Taylor las posiciones $r(t)$ y velocidades $v(t)$:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \mathbf{a}(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (2.8)$$

donde \mathbf{a} es la aceleración.

Un punto importante en DM es que el hamiltoniano del movimiento es conservable a través del tiempo, lo que provee una conexión del mundo microscópico al mundo macroscópico. Es decir, a los observables físicos del sistema: las propiedades termodinámicas. Lo que hace una conexión entre la DM y la mecánica estadística, que se basa en los conceptos de ensamble de Gibbs. Los cuales son ensambles estadísticos donde se fijan variables termodinámicas como energía E , temperatura T , presión P , volumen V , número de partículas N o el potencial químico μ .⁴¹ Por ese motivo la DM es una gran herramienta para estudiar fenómenos reales.

Control de presión y temperatura

En dinámica molecular es importante llevar un seguimiento sobre la temperatura y la presión del sistema dependiendo de qué tipo de ensamble estadístico se ocupe. En un ensamble estadístico NVT, para que el volumen V y la temperatura T se man-

tengan constantes, se hace uso de modelos de barostatos y termostatos.

Para mantener una temperatura constante en DM existen diferentes modelos de termostatos, uno de ellos es el *Langevin* que se basa en la dinámica de Langevin en la cual la temperatura se mantiene modificando la Ecuación 2.6 como:

$$\dot{p}_i = F_i - \gamma_i p_i + f_i \quad (2.9)$$

donde F_i es la fuerza que actúa en una partícula i debido al potencial de interacción, γ_i es el coeficiente de fricción y f_i es una fuerza aleatoria que simula los choques térmicos entre partículas a causa de una fricción constante, manteniendo así el ensemble correcto.⁴² Una de las ventajas de usar esta técnica es que en ella se considera el movimiento de grandes partículas dentro de un solvente de partículas de menor tamaño, como en el caso de proteínas, ADN o nanopartículas en solución, reduciendo así el tiempo de cómputo en la DM.⁴³

Para el caso de una presión constante, esta se controla ajustando el tamaño de la celda unitaria y re-escalando todas las coordenadas atómicas durante la simulación.⁴⁴ Al igual que en los termostatos, existen diferentes tipos de barostatos dependiendo de las necesidades del sistema de estudio, uno de ellos es el *Pistón de Nosé-Hoover Langevin*, en donde se hace uso de la dinámica de Langevin para controlar las fluctuaciones de la presión en el barostato.⁴⁵

2.1.3. Procedimiento de una simulación

En general, una simulación de DM tiene tres componentes importantes:⁴⁰

1. Un modelo que describa las interacciones intra y extra atómicas (campo de fuerza)
2. Un algoritmo de integración
3. Un ensamble estadístico.

La dinámica molecular sigue cuatro pasos generales: *minimización*, *calentamiento*, *equilibrio* y *producción* (Figura 2.1). Debido a que muchos sistemas tienen geometrías donde las interacciones entre los átomos no corresponden al estado de mínima energía, al sistema se le tiene que hacer primero una *minimización*, en la cual se optimizan estas geometrías para obtener el mínimo de energía. Posteriormente, se aplica una temperatura deseada a alcanzar y por la cual la energía aumentará, etapa conocida como de *calentamiento*. Después, para volver a tener una energía óptima al incorporar la temperatura, se pasa por una etapa de *equilibrio*. Por último, en la *producción* se desea tener el mayor intervalo de tiempo que más se aproxime a los procesos macroscópicos. Ya que es en esta etapa donde se estudian los procesos fisicoquímicos del sistema.

2.2. Herramientas de análisis

2.2.1. Alineamiento estructural

Para hacer el análisis de DM son necesarias herramientas estadísticas que nos ayuden a comprender qué está pasando en el sistema de estudio. Una de estas formas de análisis es el cálculo de la desviación cuadrática media (Root Mean Square

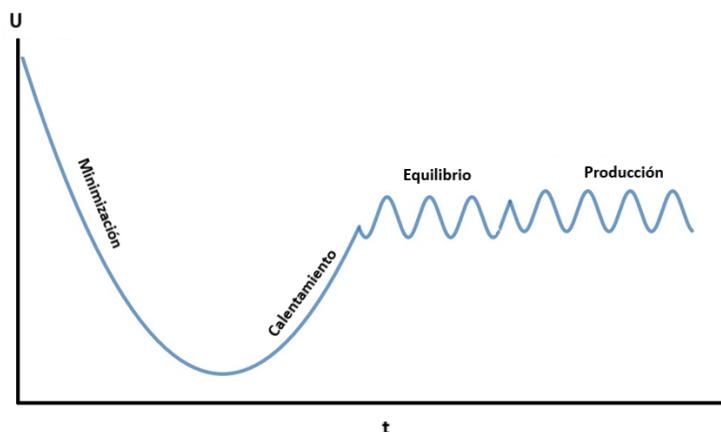


Figura 2.1: Etapas de la dinámica molecular clásica. El gráfico es una representación esquemática de la trayectoria en una DM, donde se grafica la energía U contra el tiempo t .

Deviation, RMSD por sus siglas en inglés), que se usa para conocer si la proteína ya no tiene cambios estructurales importantes en el tiempo y así conocer si se encuentra en un estado de equilibrio. Esta se calcula midiendo el promedio de las distancias entre todas las N partículas (i, j) con respecto a ellas mismas en su posición k en una estructura de referencia, por ejemplo, con la estructura experimental:

$$RMSD(i, j) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N |i_k - j_k|^2} \quad (2.10)$$

En bioinformática es usual que el RMSD sea calculado para los carbonos alfa de la estructura proteica, pero puede ser calculado para cualquier átomo de interés.

Parecido al RMSD, existe el cálculo de la fluctuación cuadrática media (Root Mean Square Fluctuation, RMSF por sus siglas en inglés) que es la medida de la desviación entre la posición r de todos los grupos funcionales R de los aminoácidos

en la proteína y alguna posición de referencia (r^{ref}) del mismo grupo funcional en un tiempo t diferente (Ecuación 2.11). Se usa principalmente para conocer los cambios o contribuciones importantes del movimiento en los aminoácidos que conforman la proteína.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{R} \sum_{t_j=1}^R |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2} \quad (2.11)$$

2.2.2. Puentes de hidrógeno

Los puentes de hidrógeno son muy importantes en la biología y sobre todo en el estudio de las proteínas porque nos permiten comprender su estructura y su función. Estos son interacciones no covalentes entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un donante electronegativo y un par solitario de electrones de un aceptor.⁴⁶ Es común que los puentes de hidrógeno se categoricen como: si la distancia entre donador-aceptor es entre 2.2 - 2.5 Å es una unión “fuerte, casi covalente”, si es entre 2.5 - 3.2 Å es “moderada, casi electrostática” o si es entre 3.2 - 4.0 Å es “débil, electrostática”.⁴⁷ Además, según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés) el ángulo que se forma entre el Donador-Hidrógeno-Aceptor es usual que sea lineal (180°) y entre más cercano a este valor el puente de hidrógeno será más fuerte.⁴⁸

Los programas de modelamiento molecular y visualización de estructuras como VMD⁴⁹, utilizan herramientas de análisis de puentes de hidrógenos. En ellas clasifican todas las interacciones que ocurren en la estructura molecular y si cumplen con los parámetros característicos (distancia y ángulo) de un puente de hidrógeno, este se categoriza y se suma al análisis.

2.2.3. Puentes salinos

Los puentes salinos en las proteínas se forman entre aminoácidos con carga opuesta que están lo suficientemente cerca entre sí como para experimentar atracción electrostática.⁵⁰ Estos contribuyen en su estructura proteica y en la interacción con otras proteínas.⁵¹ La distancia para formar estas inreacciones debe ser menor o igual a 4 Å según el criterio de Barlow et al.⁵², quien además menciona que la mínima distancia debe ser 3 Å. Para diferenciar esta distancia de un puente de hidrógeno débil, Karshikoff et al.⁵³ definen los puentes salinos como grupos funcionales que tienen distancias de 3.2 Å.

Así como con el análisis de puentes de hidrógeno, en VMD se usa un criterio de clasificación para puentes salinos que cumplan con su distancia característica.

2.3. Teoría de las Funcionales de la Densidad

2.3.1. Principios de la estructura electrónica

La Teoría de las Funcionales de la Densidad (TFD) es una herramienta usada en la química y física cuántica para hacer cálculos de estructura electrónica de átomos y moléculas.⁵⁴ Esta permite reemplazar la ecuación de Schrödinger de un sistema de N electrones:

$$\widehat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.12)$$

donde E es la energía electrónica, $\Psi = \Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_n)$ es la función de onda y \widehat{H} es el operador Hamiltoniano:

$$H = - \sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_A^n \sum_i^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{B < A}^n \sum_A^n \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.13)$$

donde i, j son los electrones, A, B son los núcleos, r_{ij} la distancia electrón-electrón, r_{iA} la distancia electrón-núcleo y R_{AB} la distancia internuclear. Así, la TFD presenta una forma alternativa a la Ecuación 2.12 donde ahora la variable de interés es la densidad electrónica $\rho(r)$. Esta teoría se basa en los trabajos de Hohenberg-Kohn y Kohn-Sham.⁵⁵

2.3.2. Teoremas

1er Teorema de Hohenberg-Kohn

El primer teorema de Hohenberg-Kohn declara que la densidad electrónica $\rho(r)$ determina el potencial externo $\nu(r)$ y al hacer su normalización se obtiene el número total de electrones N ⁵⁶

$$\int \rho(r) dr = N \quad (2.14)$$

conjuntamente, se puede determinar el Hamiltoniano H (Ecuación 2.13). Esto es, que partiendo de una densidad $\rho(r)$, se obtiene el potencial externo $\nu(r)$ y el número de electrones N . Por consiguiente, se obtiene el Hamiltoniano H y así la energía E del sistema:

$$\rho(r) \rightarrow \nu(r), N \rightarrow H_{op} \rightarrow E \quad (2.15)$$

Por lo que el primer teorema dice que la energía del estado basal corresponde a una única funcional de la densidad electrónica.

$$E = E_\nu [\rho] \quad (2.16)$$

2do Teorema de Hohenberg-Kohn

El segundo teorema de Hohenberg-Kohn proporciona una forma de obtener $\rho(r)$ minimizando la energía E y es análogo al principio variacional para las funciones de onda. Como ρ determina N y ν , la energía total $E [\rho]$ se puede reescribir como:

$$E_\nu = T [\rho] + V_{ne} [\rho] + V_{ee} [\rho] \quad (2.17)$$

en el que $V_{ne} [\rho]$ es la energía potencial de núcleo a electrones y $V_{ee} [\rho]$ es la energía potencial de electrón a electrón. Por lo tanto, resumiendo la Ecuación 2.13 como

$$E_\nu = \int \rho(r)\nu(r)dr + F_{HK} [\rho] \quad (2.18)$$

en el que $F_{HK} [\rho]$ es el funcional de Hohenberg-Kohn, que contiene la energía cinética funcional $T [\rho]$

$$F_{HK} [\rho] = T [\rho] + V_{ee} [\rho] \quad (2.19)$$

Así, dada una densidad de prueba $\tilde{\rho}(r)$, tal que esa densidad sea $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ y $\int \rho(r)dr = N$,⁵⁵

$$E_0 \leq E_\nu [\rho(r)] \quad (2.20)$$

donde $E_\nu [\tilde{\rho}(r)]$ es la energía funcional de E_ν . Lo que quiere decir que, aquella densidad electrónica que minimiza la funcional $E_\nu [\tilde{\rho}]$ es la verdadera densidad electrónica del sistema, esto es, la densidad del estado basal.

Método de Kohn-Sham

El equivalente a la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo en TFD es la ecuación de Euler-Lagrange (Ecuación 2.17), donde μ es el multiplicador de Lagrange que no depende de la posición r .⁵⁶

$$\nu(r) + \frac{\delta F_{HK}}{\delta \rho(r)} = \mu \quad (2.21)$$

La estrategia de Kohn-Sham fue introducir los orbitales a la Ecuación 2.17. Puesto que la densidad electrónica es la densidad electrónica exacta $\rho(r)$ del sistema (Ecuación 2.16), se pueden incluir los orbitales Ψ_i a las densidades ρ_s (s porque depende del espín):

$$\rho_s = \sum_i^N |\Psi_i|^2 \quad (2.22)$$

Así, la Ecuación 2.17 se puede reescribir como

$$\mu = \nu_{eff}(r) + \frac{\delta T_s}{\delta \rho} \quad (2.23)$$

donde $\nu_{eff}(r)$ es el potencial efectivo y δT_s es la funcional de la energía cinética representada por

$$T_s[\rho] = \sum_i^N \left\langle \Psi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \Psi_i \right\rangle \quad (2.24)$$

La Ecuación 2.23 contiene un potencial de correlación $\nu_{xc}(r)$ definido como:

$$\nu_{eff} = \nu(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + \nu_{xc}(r) \quad (2.25)$$

$$\nu_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho(r)} \quad (2.26)$$

Entonces, dado un potencial efectivo $\nu_{eff}(r)$, se puede obtener $\rho(r)$ haciendo independiente la parte de r de la Ecuación 2.21 como

$$\rho(r) = \int \sum_i^N |\Psi_i(x)|^2 ds \quad (2.27)$$

siendo x el vector de espacio y la integración se resuelve sobre la variable espín s . Por lo tanto los orbitales moleculares satisfacen la Ecuación 2.23 parecida a la ecuación de Hartree-Fock, que se resuelve iterativamente:

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + \nu_{eff}(r) \right) \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i \quad (2.28)$$

De este modo, la aportación de Kohn-Sham es una forma de resolver la ecuación de Schrödinger usando la densidad electrónica. Sin embargo, dado que el potencial depende de la energía de intercambio y correlación, no se conoce una forma analítica de calcularla, de modo que se usan aproximaciones. Es gracias a este potencial que se calculan estructuras electrónicas, optimizaciones de geometrías o cálculos de orbitales.

2.3.3. Aplicación de la TFD

La utilidad práctica de la teoría de las funcionales de la densidad se encuentra en los trabajos de Parr y colaboradores, quienes se concentraron en la interpretación del multiplicador de Lagrange μ en la Ecuación 2.17.⁵⁶ Ellos encontraron que μ es también la derivada parcial de la energía E del sistema con respecto al número de electrones N y a un potencial fijo $\nu(r)$ o la forma con respecto a la densidad, ya que

la energía es funcional de $\rho(r)$

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{\nu(r)} = \left(\frac{\partial E}{\partial \rho(r)} \right)_{\nu(r)} \quad (2.29)$$

Así, encontraron que esta cantidad μ por lo tanto sería el *potencial químico electrónico* que mide la tendencia de fugacidad de la nube electrónica.⁵⁵ El cual está relacionado con el potencial químico en TFD con el mismo concepto de la química clásica de las ecuaciones de Pauling (Ecuación 2.30) y de Mulliken (Ecuación 2.31).

$$\mu \approx -\frac{I + A}{2} \quad (2.30)$$

$$\chi_M = \frac{I + A}{2} \quad (2.31)$$

donde I es el potencial de ionización, A la afinidad electrónica de las especies y χ_M la electronegatividad. Hallando así una relación entre el potencial químico electrónico y el concepto de electronegatividad

$$\mu \approx -\chi_M \quad (2.32)$$

En la aproximación de diferencias finitas de la electronegatividad, se observan también relaciones de I y A . Cuando se calculan derivadas por la izquierda y por la derecha:

$$\chi^- = E(N = N_0 - 1) - E(N = N_0) = I \quad (2.33)$$

$$\chi^+ = E(N = N_0) - E(N = N_0 + 1) = A \quad (2.34)$$

$$\chi = \frac{1}{2}(\chi^+ + \chi^-) = \frac{1}{2}(I + A) \quad (2.35)$$

donde I es la energía de ionización y A es la afinidad electrónica de un sistema de N_0 electrones. La Ecuación 2.35 puede ser reemplazada por la energía de orbitales frontera descrita en el teorema de Koopman⁵⁷ dentro del esquema de Hartree-Fock (Ecuación 2.36). Los orbitales frontera son aquellos que están más altos ocupados por electrones o más bajo desocupados dentro de la teoría de orbitales moleculares. Estos se conocen como HOMO (highest occupied molecular orbital, por sus siglas en inglés) y LUMO (lowest unoccupied molecular orbital, por sus siglas en inglés).

$$\chi = \frac{1}{2}(\epsilon_{HOMO} + \epsilon_{LUMO}) \quad (2.36)$$

donde HOMO reemplaza a la energía de ionización y LUMO a la energía de afinidad.

Posteriormente, gracias a la introducción del concepto de electronegatividad en la TFD, fueron emergiendo unas series de funciones de respuesta derivado de las ecuaciones previamente descritas (Ecuación 2.24 y 2.12). Las cuales son muy importantes porque le dan una visión práctica a la TFD para estudiar la reactividad química de los sistemas.

Capítulo 3

Propiedades dinámicas del canal

KcsA

3.1. Planteamiento del problema

Las propiedades estructurales de las proteínas influyen en su estabilidad y su funcionalidad. Sin embargo, los factores que intervienen en la estabilidad del canal de potasio KcsA aún no se han comprendido con detalle, es por esto que decidimos hacer un análisis de dinámica molecular clásica para conocer los elementos que estabilizan al canal.

3.2. Descripción del sistema molecular

El sistema de estudio se obtuvo del Protein Data Bank⁵⁸ con etiqueta 1K4C, el cual fue reportado por el grupo de MacKinnon.⁵⁹ En esta estructura sólo está presente un monómero de la proteína y está ligada a un anticuerpo Fab. Nosotros modificamos la estructura al eliminar este anticuerpo y replicar por condiciones simétricas el monómero para así obtener el tetrámero completo del canal KcsA. También se eliminaron todas las moléculas de agua, los iones, el diacil glicerol y el nonan-1-ol que estaban presentes en el PDB.

De tal modo que al tener el tetrámero solo: *1)* agregamos una membrana de lípidos POPC (1-palmitoyl-oleoyl-sn-glycero-phosphocholine), *2)* solvamos con moléculas de agua TIP3P (modelo de agua que consiste en tres átomos rígidos con cargas y parámetros Lennard-Jones), *3)* ionizamos con una concentración de 0.2 M de KCl al rededor y cuatro iones K^+ dentro del canal, *4)* protonación de las histidinas en su nitrógeno ϵ y *5)* modelación de GLU71 en su forma desprotonada.

La información completa sobre el sistema se muestra en la Tabla 3.1. Por lo que obtuvimos el sistema que se observa en la Figura 3.1.

Tabla 3.1: Detalles del sistema molecular

Átomos Totales	45,297
Átomos de agua	26,079
Átomos de lípidos	12,864
Concentración KCl	0.2 M
Tamaño de la celda	80 x 80 x 90 Å

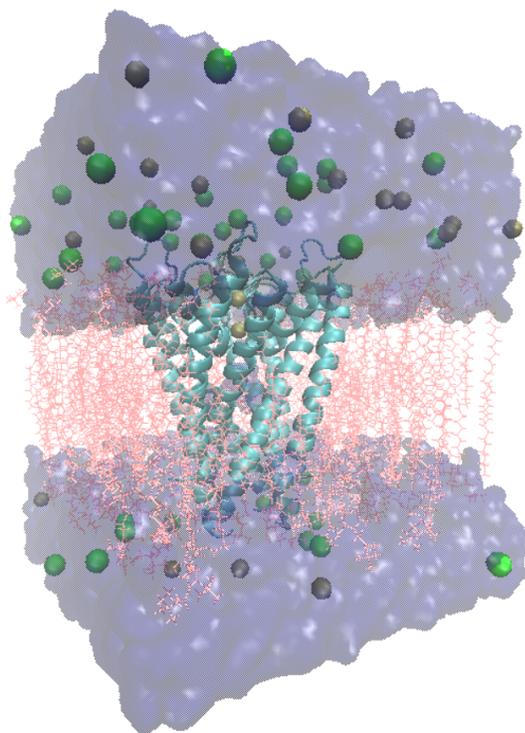


Figura 3.1: Sistema molecular. Se muestra el canal KcsA (rojo) encerrado por la membrana de lípidos POPC (azul), el solvente (representado como una superficie rugosa en azul) y los iones potasio y cloro (púrpura y verde, respectivamente). Cuatro iones K^+ dentro del canal que no se logran observar.

3.3. Parámetros de la dinámica molecular

Para realizar la dinámica molecular clásica usamos el programa NAMD⁶⁰ y el campo de fuerzas CHARMM27⁶¹ bajo los parámetros que se describen en la Tabla 3.2.

Realizamos dos minimizaciones: La primera a 0 K de 0.05 ns para evitar interacciones espurias, donde se congelan todos los átomos excepto de los lípidos para asegurarnos que estos estuvieran correctamente empaquetados en la membrana en

su mínima energía y no ocurrieran choques estéricos con la proteína a lo largo de la dinámica; y la segunda a 300 K de 0.5 ns donde ya todos los átomos podían moverse.

Tabla 3.2: Detalles de la dinámica molecular

Ensamble	NVT	
Condiciones de frontera	Periódicas	
Cut-off	12 Å	
Exclude	scaled1-4 (1.0 Å)	
Switching	10 Å	
Control de temperatura	Dinámica de Langevin (todo el sistema)	
Control de presión	Lagevin piston	
Tamaño de la malla de Ewald	80x80x90 Å	
Temperatura	Minimización 1	0 K
	Minimización 2	300 K
	Eq. y Prod.	310 K
Tiempo	Minimización 1	0.5 ns
	Minimización 2	0.5 ns
	Equilibración	0.5 ns
	Producción	500 ns
Paso de integración	2 fs	
Guardar datos	Cada 1000 pasos (2ps)	
Guardar energías	Cada 1000 pasos	

En la siguiente etapa de la equilibración el sistema lo calentamos hasta 310 K durante 0.5 ns. Finalmente, la etapa de producción la realizamos durante 500 ns, igualmente con 310 K. Se usó esta temperatura porque es equivalente a la fisiológica del organismo.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Análisis de Equilibración

Al analizar el perfil de la energía total de la minimización, que se muestra en la Figura 3.2, observamos que en un principio tuvo un cambio drástico desde una energía

de 5.54×10^7 hasta -1.2×10^5 kJ/mol, para después estabilizarse en una energía promedio de $-67,500$ kJ/mol. Posteriormente, cuando se hizo el calentamiento de 300 K a 310 K en la etapa de equilibración, la energía total aumentó de $-67,500$ kJ/mol a $-65,500$ kJ/mol.

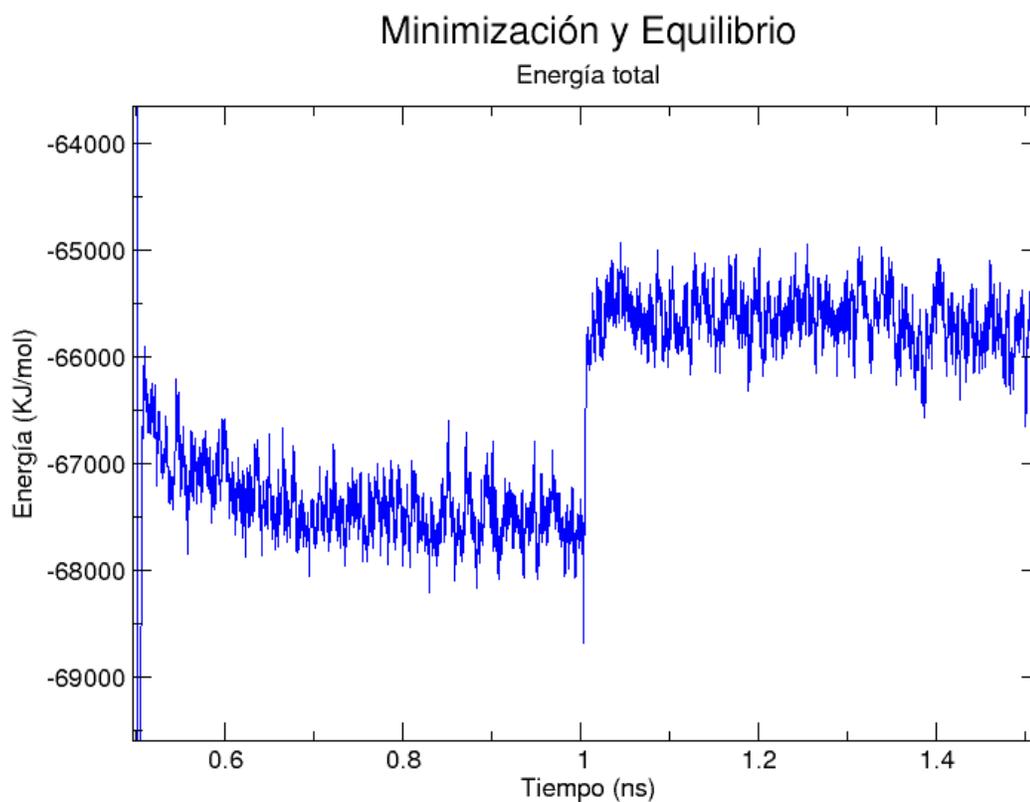


Figura 3.2: Energía total de las minimizaciones y del equilibrio del sistema de estudio durante 1.5 ns de dinámica molecular.

En la etapa de producción de 500 ns, observamos que la energía total (Figura 3.3) se mantiene en promedio al rededor de $-65,900$ kJ/mol durante toda la dinámica sin cambios significativos. Lo que denotó que el sistema de estudio se encontraba en el equilibrio y era estable energéticamente durante todo este tiempo.

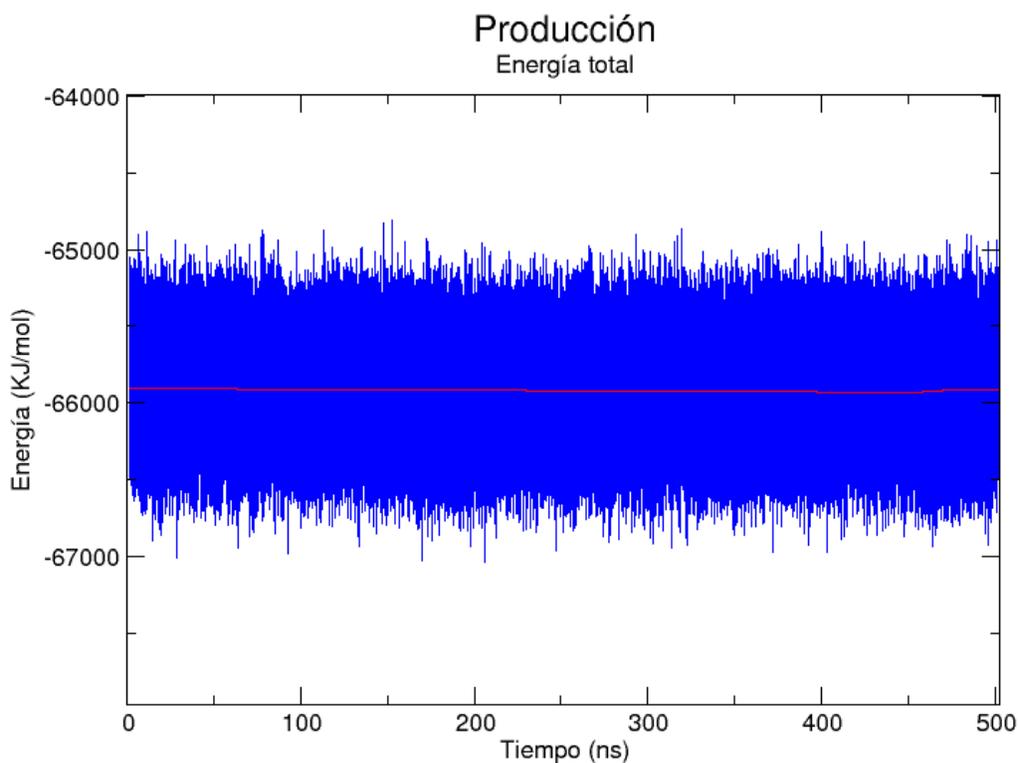


Figura 3.3: Energía total del sistema completo del canal KcsA dentro de una membrana con solvente explícito durante 500 ns de dinámica molecular. En línea roja se representa la tendencia de la media de los datos.

Para comprobar que la proteína estaba en un equilibrio conformacional, hicimos un análisis de la desviación cuadrática media RMSD (Figura 3.4) sobre los carbono alfa de la proteína comparado con la última estructura de la etapa de equilibración. En este análisis observamos que, a pesar de que existen fluctuaciones durante los 500 ns de la dinámica, estas se mantienen entre 1.4 y 1.5 Å. Valores que representan estabilidad en la proteína de acuerdo con Reva et al.⁶², que menciona que la alineación será exitosa si el RMSD es menor a 3 Å, si es cero se habla de la misma estructura.

Siendo así que en nuestros resultados el canal KcsA no tenía cambios conformacionales relevantes durante el tiempo de producción.

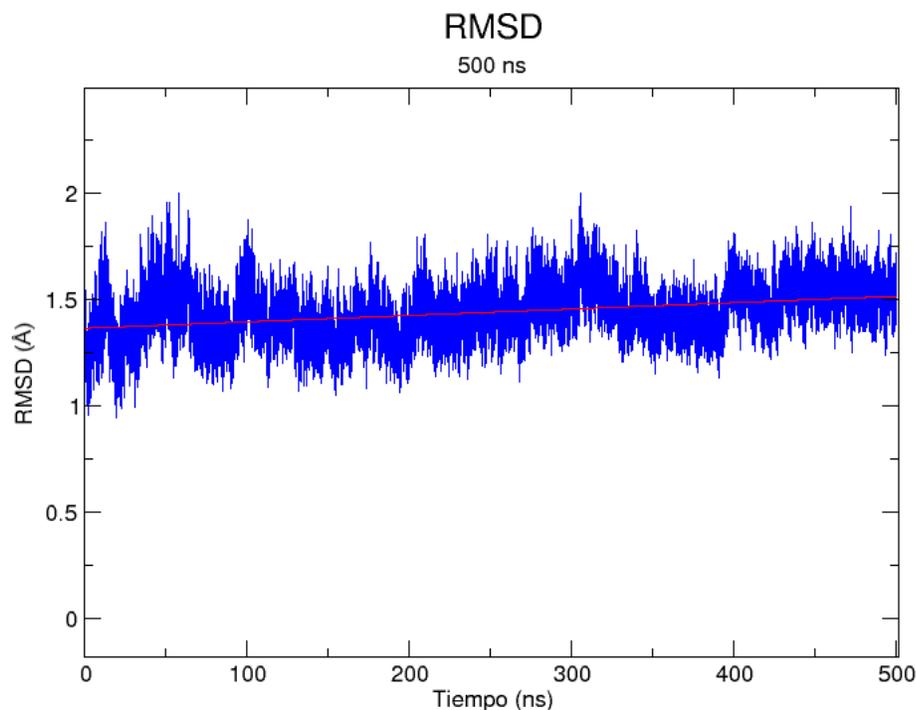


Figura 3.4: Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los carbonos alfa del canal KcsA. La línea roja representa la tendencia de la media de los datos.

3.4.2. Análisis Estructural

Realizamos un análisis de la desviación cuadrática media por residuo (RMSF) para conocer el movimiento estructural del canal KcsA y las contribuciones que tienen sus residuos. Este análisis lo hicimos en los 412 aminoácidos que conforman el canal, de los cuales cada 103 residuos corresponde a un monómero de la proteína, indicados como en la Figura 3.5.



Figura 3.5: Secuencia de aminoácidos del canal KcsA. Se muestra el número que corresponde cada residuo para el análisis del RMSF. Los colores representan en qué parte de la estructura está el aminoácido.

En este análisis (Figura 3.6) observamos que los picos más altos en la gráfica corresponden a las zonas más móviles del canal, los cuales son los residuos que se encuentran en la parte extracelular e intracelular del canal. En cambio, los residuos con menos movilidad son los que están en las zonas internas. En estos mínimos se encuentran las zonas del filtro de selectividad (encerradas en rojo), lo que indica que estos residuos contribuyen poco a la movilidad del canal y son estables estructuralmente.

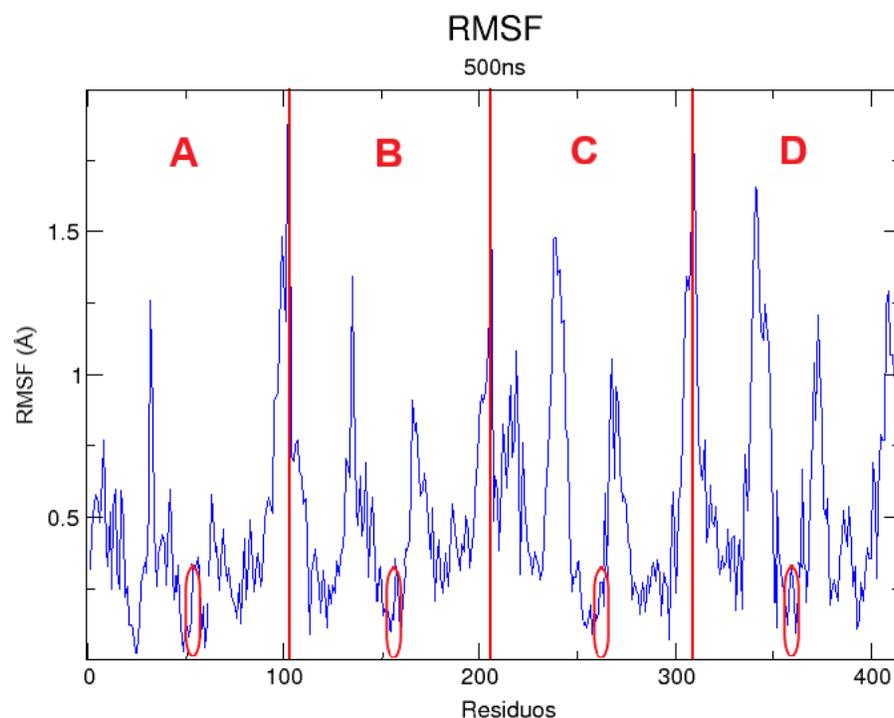


Figura 3.6: Desviación Cuadrática Media por Residuo (RMSF) del canal KcsA. Enceñado en rojo se indican los residuos que corresponden al filtro de selectividad de las cuatro subunidades. Se dividen por líneas rojas las cadenas A, B, C y D.

3.4.3. Análisis de puentes de hidrógeno

Con la finalidad de comprender los factores que dan estabilidad al filtro de selectividad, realizamos análisis de puentes de hidrógeno bajo los parámetros que se describen en el capítulo de Fundamentos teóricos (3.5 Å de distancia y 30° de ángulo).

Encontramos cuatro puentes de hidrógeno con frecuencias de ocurrencia mayor que 50%. Estos se formaron principalmente entre las moléculas de agua dentro del filtro con los residuos GLY79 de las cuatro cadenas (Tabla 3.3). Esta frecuencia indica

qué tanto apareció ese puente de hidrógeno en la dinámica; y a mayor frecuencia es más probable encontrarlo en el sistema. Estos puentes de hidrógeno se localizaron en un residuo de la entrada del FS, en la parte extracelular, entre las molécula de agua más cercana a este. Lo que podría favorecer a la entrada de moléculas de agua al canal.

Tabla 3.3: Frecuencia de ocurrencia de los puentes de hidrógeno en el filtro de selectividad durante 500 ns de dinámica molecular.

Donador	Aceptor	Frecuencia
<i>Moléculas de agua - Residuo</i>		
Agua	GLY79 - A	60.57 %
Agua	GLY79 - B	59.01 %
Agua	GLY79 - C	59.72 %
Agua	GLY79 - D	59.85 %
<i>Residuo - Residuo</i>		
GLY77 - A	VAL76 - C	20.13 %
GLY77 - B	VAL76 - D	17.98 %
GLY77 - C	VAL76 - B	18.92 %
GLY77 - D	VAL76 - A	19.21 %

Además, identificamos cuatro puentes de hidrógeno significativos, con respecto a la frecuencia más alta, que se formaron entre los residuos del FS. En estos participan los residuos GLY77 y VAL76 de las cuatro cadenas (Tabla 3.3). Estos enlaces se encontraron en la parte media del FS, como se muestra en la Figura 3.7(a), formando un anillo entre los donadores y aceptores que se localizan a esa misma distancia, en diferentes momentos de la dinámica. Estos puentes de hidrógeno se muestran en la Figura 3.7(b).

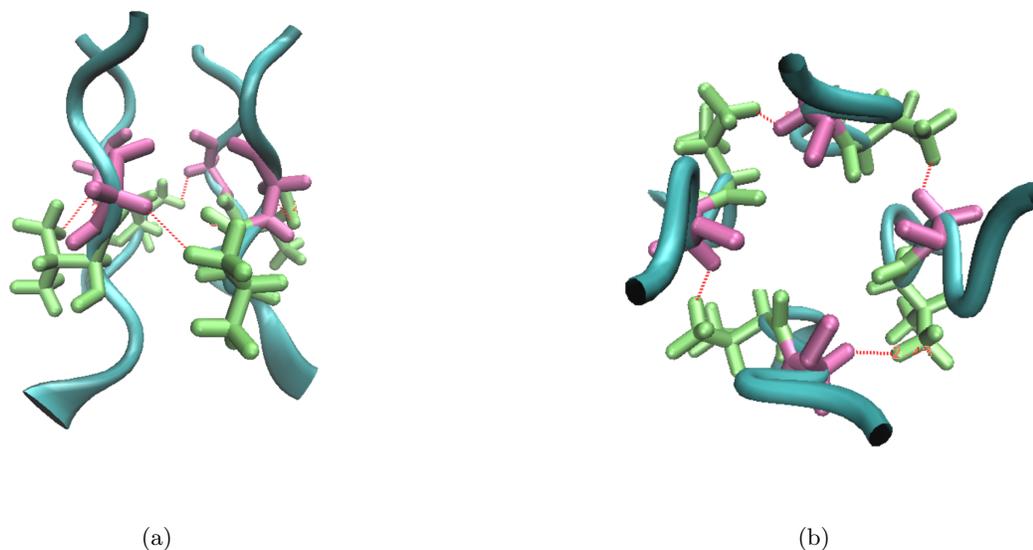


Figura 3.7: Puentes de hidrógeno entre los residuos GLY77 (color verde) y VAL76 (color rosa) del filtro de selectividad del canal KcsA. a) Vista lateral del filtro de selectividad del canal KcsA. b) Vista superior del filtro de selectividad donde se observa la formación de puentes de hidrógeno en forma de un anillo. Las líneas punteadas rojas representan los puentes de hidrógenos formados entre los residuos de las cuatro cadenas.

3.4.4. Análisis de puentes salinos

Otro factor que da estabilidad a las estructuras proteicas son los puentes salinos. Haciendo un análisis sobre ellos en la zona del filtro de selectividad, observamos que no se presenta ninguno durante los 500 ns de dinámica. Lo que tiene sentido ya que en el FS no hay residuos con cargas positivas o negativas que puedan producir un enlace de este tipo. Pero al ampliar el análisis a residuos más allá del FS, logramos advertir cuatro puentes salinos en la misma posición (Figura 3.8). Estos se forman entre el residuo cargado negativamente ASP80 y el residuo cargado positivamente ARG89, y se replica en las cuatro cadenas al ser simétrico el canal.

Sin embargo, en el análisis de la distancia del puente salino entre los residuos observamos que durante 500 ns esta oscila entre los 4 y 8 Å (Figura 3.9). Resulta-

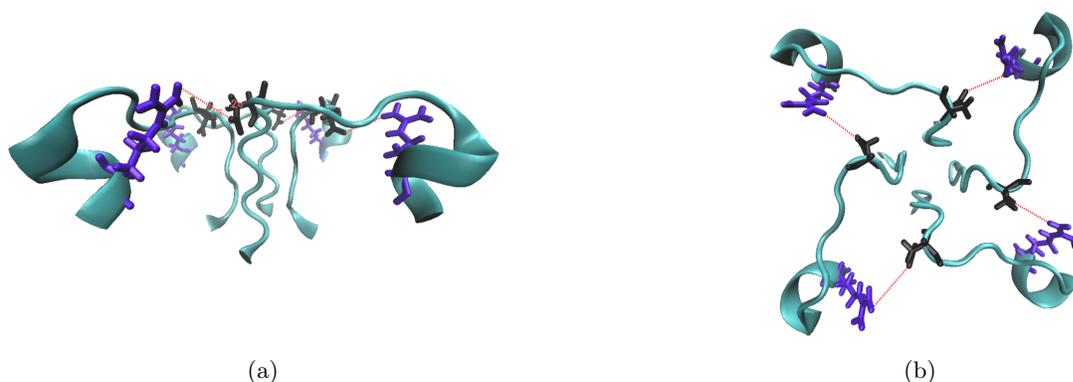


Figura 3.8: Puentes salinos entre los residuos ASP80 (color negro) y ARG89 (color azul rey) del filtro de selectividad del canal KcsA. a) Vista lateral del filtro de selectividad del canal KcsA. b) Vista superior del filtro de selectividad donde se observa la formación de los puentes salinos. Las líneas punteadas rojas representan los puentes salinos formados entre los residuos de las cuatro cadenas.

do que contradice con la definición que se mencionó en los Fundamentos Teóricos, puesto que para ser considerado formalmente como puente salino este tiene que tener una distancia menor a 4 Å. Este resultado es contrario a lo publicado por Bucher et al.¹³, quienes describen un puente salino entre ASP80 (en su estado desprotonado) y ARG89 el cual influye en la transferencia de protones durante 0.5 ns de dinámica QM/MM. Esta diferencia se puede deber a que en nuestro estudio el tiempo de DM es mayor además que nuestro enfoque es clásico mientras que el de ellos es un enfoque cuántico.

Por último, observamos que durante toda la dinámica los átomos de oxígenos de los grupo carbonilo del enlace peptídico en los residuos del filtro de selectividad estaban posicionados en dirección al interior del canal (Figura 3.10). Dejando a un lado las cadenas laterales de los aminoácidos, los cuales estaban dentro de la proteína y entre la membrana lipídica.

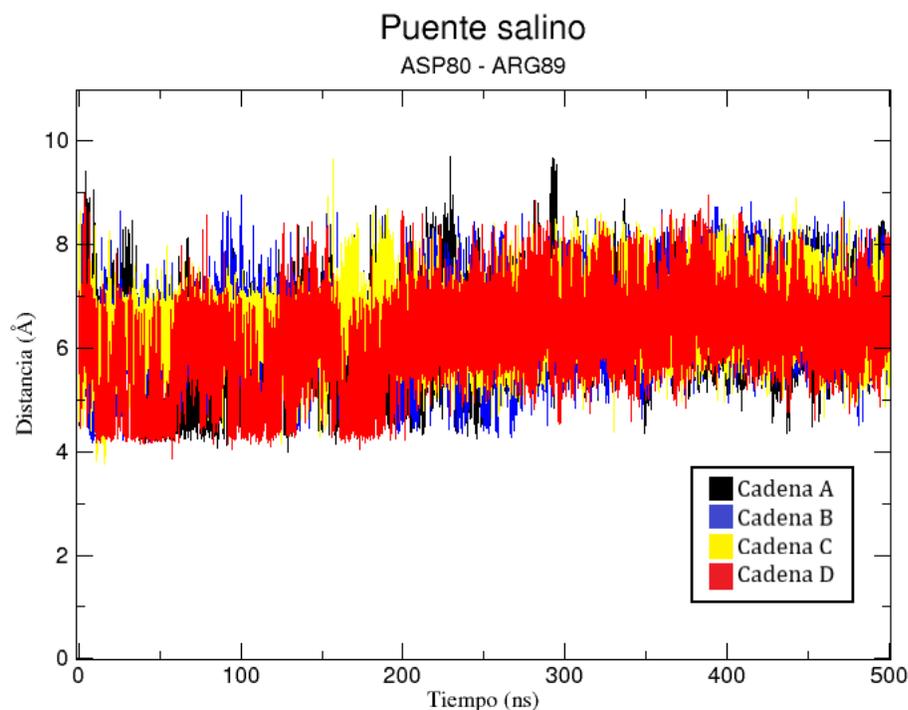


Figura 3.9: Fluctuación de la distancia del puente salino entre ASP80 y ARG89 durante 500 ns de dinámica molecular.

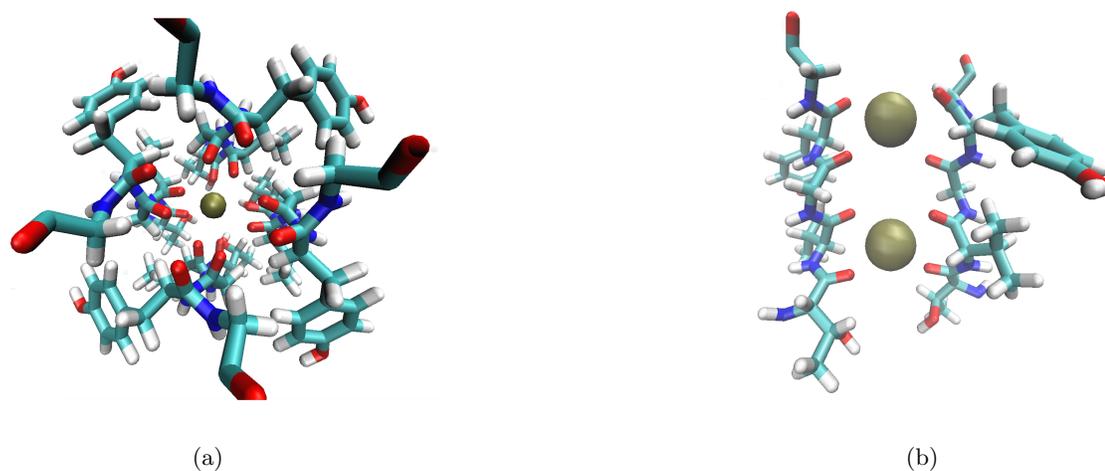


Figura 3.10: Representación de los oxígenos de los grupos carbonilos de los residuos del filtro de selectividad. a) Vista superior del filtro de selectividad donde se observan los átomos de oxígenos de los grupos carbonilos (átomos de color rojo) posicionados dentro del hueco del canal. b) Vista vertical de los residuos del filtro de selectividad. En esferas doradas se representan los iones K^+ .

3.5. Conclusiones

Durante 500 ns de dinámica molecular, el canal de potasio KcsA se mantuvo estable sin cambios energéticos ni conformacionales, resultados que analizamos en la energía total y el RMSD. Además, se observaron residuos de alta movilidad que corresponden a los aminoácidos que se encuentran en la parte externa de la membrana plasmática. Así como residuos de poca movilidad que se encontraban en las partes internas de las hélices alfa. Principalmente, algunos de esos residuos corresponden a las secciones del filtro de selectividad, lo que indicó que estos residuos no contribuyen a la movilidad interna del canal. Concluyendo así que el FS era estable estructuralmente durante 500 ns de dinámica, lo que podría contribuir a su selectividad.

Adicionalmente, la frecuencia de ocurrencia de puentes de hidrógeno en el filtro de selectividad fue mayor del 50 %, que se presentó la mayor parte del tiempo entre las moléculas de agua y el residuo GLY79. Además, otro puente de hidrógeno significativo se observó entre los residuos GLY77 y VAL76 de las cuatro cadenas, formando así un anillo en el FS en algunos momentos de la dinámica. Asimismo, se identificó el puente salino entre ASP80 y ARG89 que describen Bucher et al.¹³, sin embargo al tener distancias más grandes de 4 Å este ya no se considera como puente salino.

El comportamiento que notamos de los oxígenos de los grupos carbonilo dentro del FS, corresponde con muchas investigaciones del KcsA.^{5,22,28,59} Donde pareciera que estos oxígenos influyen en la distribución de los iones dentro del canal.

Capítulo 4

Dinámica de las especies moleculares dentro del filtro

4.1. Planteamiento del problema

El filtro de selectividad (FS) corresponde al dominio funcional del canal. Se cree que la permeabilidad de los iones potasio ocurre por una translocación de una sola fila de iones y moléculas de agua juntas.²² Sin embargo, los estudios que se han hecho al respecto aún no son concluyentes. No obstante, gracias a los avances en el análisis de datos masivos es posible hacer un rastreo de todas las especies reactivas que están dentro del filtro de selectividad. Es por esto que el objetivo de este capítulo es dilucidar la funcionalidad del FS del canal KcsA y las moléculas dentro de él.

4.2. Detalles Computacionales

Para rastrear las especies moleculares que entraron al filtro de selectividad durante la dinámica, adaptamos a nuestro canal el código que utilizaron Chakrabarti et al.⁶³ para estudiar la permeabilidad de un canal de sodio. Este código es de tipo abierto disponible en GitHub por Christopher Ing.⁶⁴ Lo que hace el código es monitorear el comportamiento de las especies en el sistema y asignar una etiqueta a cada una de ellas dependiendo de su orden de aparición en un momento dado de la dinámica.

Para nuestro sistema y una fácil identificación de las especies que entraron al filtro de selectividad, se creó un sistema de referencia en forma de cilindro que abarcaba toda la zona del FS (Figura 4.1). Por lo que así, se rastrearon las especies que entraron durante los 500 ns de dinámica asignándole un número cada vez que entrara a este sistema de referencia, el cual tiene origen en el centro de masa del FS.^a Además, para localizar a las especies, se definió una escala donde de 0 a -10 Å representa la dirección hacia la parte extracelular y de 0 a 10 Å representa la dirección hacia la parte intracelular.

Así, con este modelo de referencia, cada vez que un ion entraba a la región del FS, este se marcaba con un color específico en la posición encontrada (que se observa en las gráficas de este capítulo). Si encontraba un segundo ion en el mismo momento de la dinámica se marcaba con otro color, y así sucesivamente. El código se resume en el diagrama de flujo de la Figura 4.2 y se encuentra completamente detallado en el Apéndice A.

^aSi se quiere replicar el código a otro canal se podrá buscar el centro de masa de su filtro y así ubicar la posición de las especies.

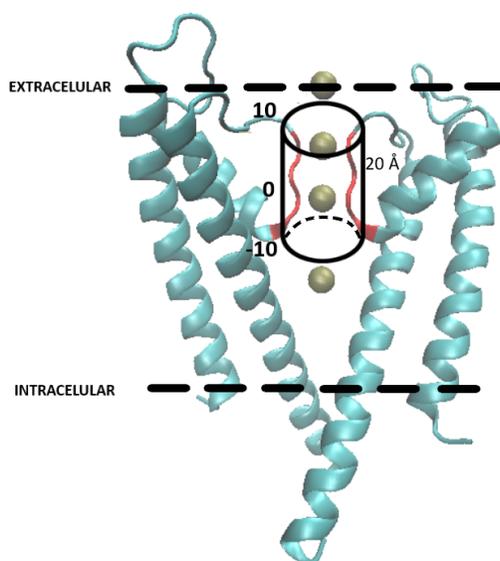


Figura 4.1: Canal de potasio KcsA. Se muestran dos cadenas del canal con los residuos del filtro de selectividad en rojo. El cilindro en negro corresponde al sistema de referencia usado para categorizar a las especies que entran al FS. Tiene una longitud de 20 Å y su centro representa el 0 en las gráficas de este capítulo. Del 0 al -10 Å representa la dirección intracelular del filtro. Del 0 a 10 Å del cilindro representa la dirección extracelular del filtro.

Para el uso de este código, decidimos seleccionar tres especies moleculares que eran más probable de estar presentes dentro del filtro de selectividad: los iones potasio, las moléculas de agua y los iones cloruro.

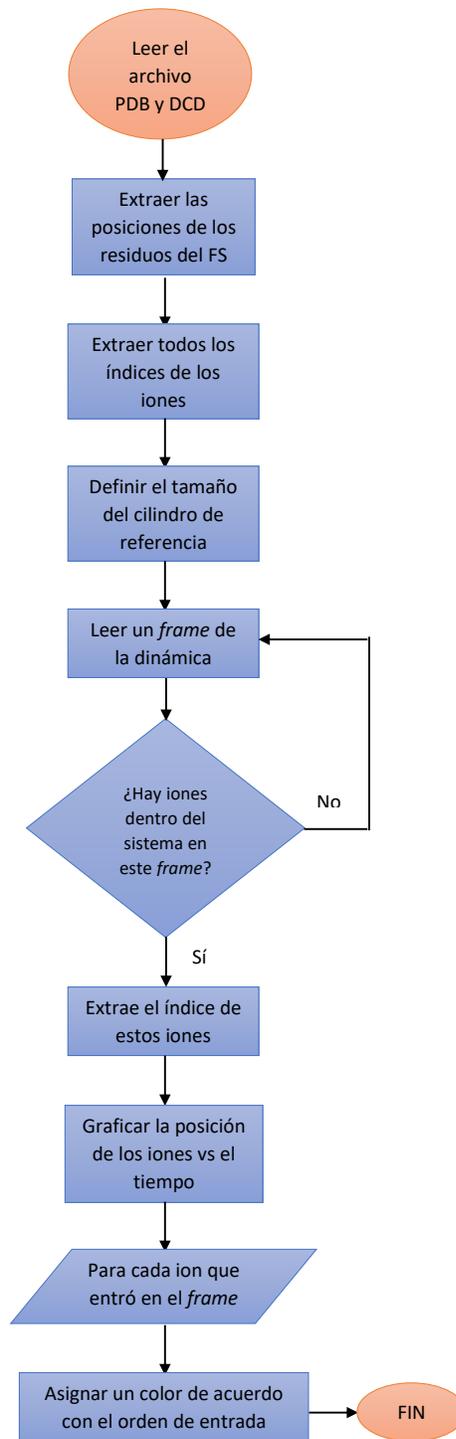


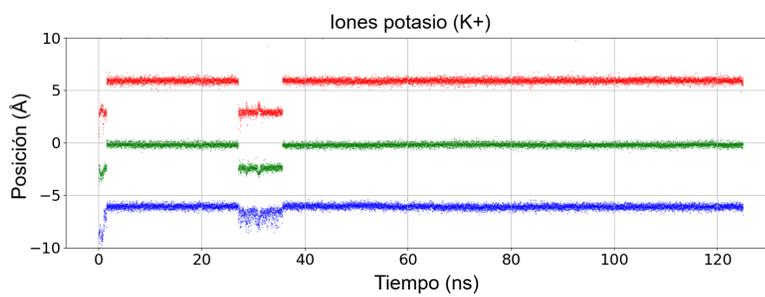
Figura 4.2: Diagrama de flujo del código para rastrear las especies que entran al filtro de selectividad del canal KcsA.

4.3. Resultados y Discusión

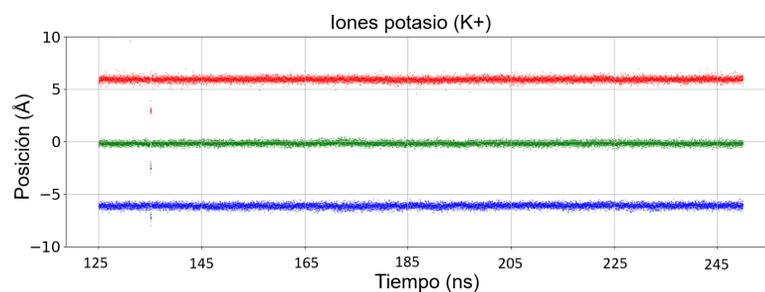
4.3.1. Iones K^+ dentro del filtro

Al hacer el análisis sobre los iones K^+ identificamos que tres iones se encontraban dentro del filtro por un tiempo de 290 ns. Los cuales observamos como tres regiones específicas en las gráficas construidas con el código, mostradas en las Figuras 4.3(a), 4.3(b), 4.3(c). En donde cada punto de color representó un ion dentro de una amplitud aproximada de 12 \AA (longitud del FS). En los primeros 40 ns, Figura 4.3(a), advertimos un pequeño desfase de las regiones debido a que el canal aún se estaba estabilizando en la etapa de producción.

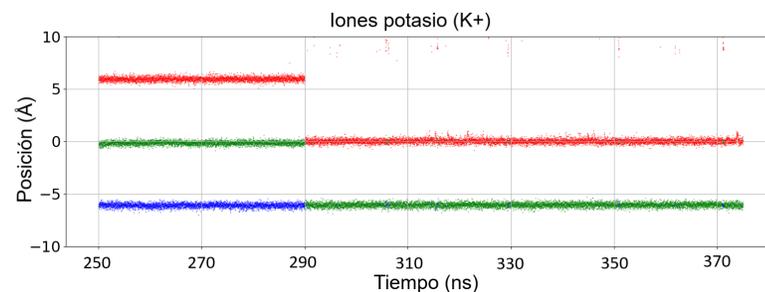
Además, observamos que después de los 290 ns hasta los 500 ns del total de la DM, ya no existían los tres regímenes de localización de los iones. Quedando así sólo dos regiones en donde solo existen dos iones dentro FS, mostrado en las Figuras 4.3(c) y 4.3(d). Únicamente en algunos momentos cortos de la dinámica se distingue un tercer ion, que se observa como algunos puntos rojos localizados en la parte extracelular del SF. Conocer la causa de este comportamiento abrupto en la desaparición del régimen de un ion queda como perspectiva debido a que no encontramos una razón evidente que lo esclarezca. En el siguiente análisis lo único que observamos es que en su lugar entran moléculas de agua para ocupar el espacio disponible.



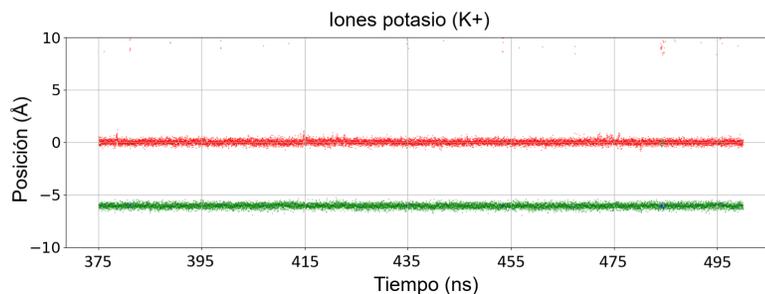
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.3: Comportamiento en la posición de los iones potasio (K^+) dentro del filtro de selectividad durante 500 ns de dinámica molecular. El tiempo total de la dinámica fue dividido en cuatro bloques para facilidad del análisis. (a) Del tiempo 0 a los 125 ns. (b) Del tiempo 125 ns a los 250 ns. (c) Del tiempo 250 ns a los 375 ns. (d) De los 375 ns a los 500 ns. En color rojo se representa el primer ion que entra al sistema, en color verde el segundo ion y en color azul el tercer ion.

Para comprobar que este comportamiento de iones realmente estaban en la región del FS y no fuera de él, se extrajeron las coordenadas de un momento de los 290 ns, las cuales observamos en un visualizador. Nos percatamos que efectivamente estos iones se encontraban dentro de la región del FS (Figura 4.4(a)), en el que los oxígenos de los residuos se colocaron internamente dentro el FS y mantenían a los iones en esa posición.

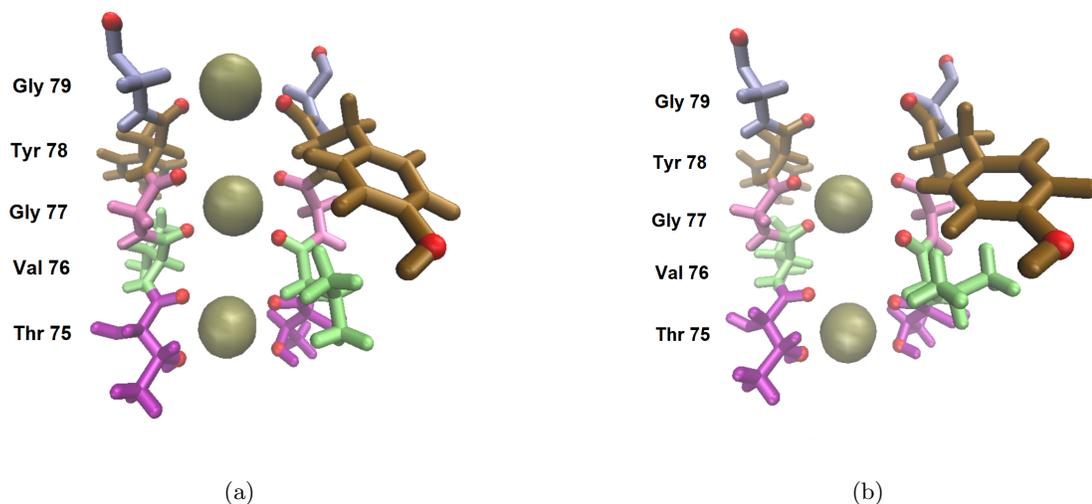


Figura 4.4: a) Se observan los cinco residuos que conforman el FS y dentro de él los tres iones encontrados durante 290 ns de dinámica. b) Se observan los cinco residuos que conforman el FS y dentro de él los dos iones encontrados después de los 290 ns de dinámica. Los iones están representados en forma de esferas doradas y los átomos de oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos se representan en esferas rojas.

El primer ion más cercano a la región extracelular del FS se centró entre los oxígenos de los grupos carbonilos del residuo TYR78 y GLY79, a una distancia de aproximadamente de 2.7 Å. El segundo ion se posicionó 5.6 Å abajo del primer ion entre los oxígenos de los grupos carbonilos de los residuos GLY77 y VAL76, a una distancia de 2.9 Å. Por último, el tercer ion se separa del segundo 6.1 Å, muy cercano a la región intracelular, que se posiciona entre los oxígenos del residuo THR75 (el del grupo carbonilo y de su grupo carboxilo), a una distancia de 2.8 Å. En la Tabla 4.1

se resumen las distancias de estos iones a los átomos de oxígenos de los residuos.

Adicionalmente, para comprobar que en el comportamiento de dos iones estos sí se encontraban dentro del FS, hicimos un análisis similar al anterior. En la Figura 4.4(b) se observa que estos iones estaban más cercanos a la parte intracelular del filtro. El primer ion se posicionó a la mitad del filtro entre los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos GLY77 y VAL76, a una distancia de 2.7 a 3 Å. El segundo ion se desplaza 6.7 Å debajo del primero y se posiciona entre los oxígenos del residuo THR75, a una distancia de 2.6 Å. Estas posiciones se resumen también en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Distancia de los residuos del filtro de selectividad a los iones dentro de él.

Residuo-Ion	Distancia (Å)
3 iones	
TYR78	2.7
GLY77	2.8
VAL76	2.9
THR75	2.7
THR75 (OH)	3.0
2 iones	
GLY77	2.8
VAL76	3.4
THR75	2.9
THR75 (OH)	2.8

Como se mencionó en los antecedentes, algunos estudios del canal KcsA^{10,12,18,20} además del estudio de MacKinnon⁵, muestran un ion dentro de su cavidad interna. Para comprobar esto, aumentamos la longitud del cilindro de referencia para que el código captara todos los iones en la parte extra e intracelular. Esto es, el cilindro corresponde a la dimensión total del eje Z.

En los 500 ns de dinámica, en el espacio que corresponde a la cavidad central no advertimos ningún ion dentro de él. Como el comportamiento es constante, en la Figura 4.5 solo mostramos un bloque de los resultados que corresponde al tiempo 250 ns a 370 ns, donde se logra ver el estado con tres y dos iones.^a Este análisis nos demuestra que la estructura que tenemos corresponde a la estructura del canal KcsA cerrada, puesto que no hay un flujo de iones en el que el FS permite el paso hacia la cavidad.

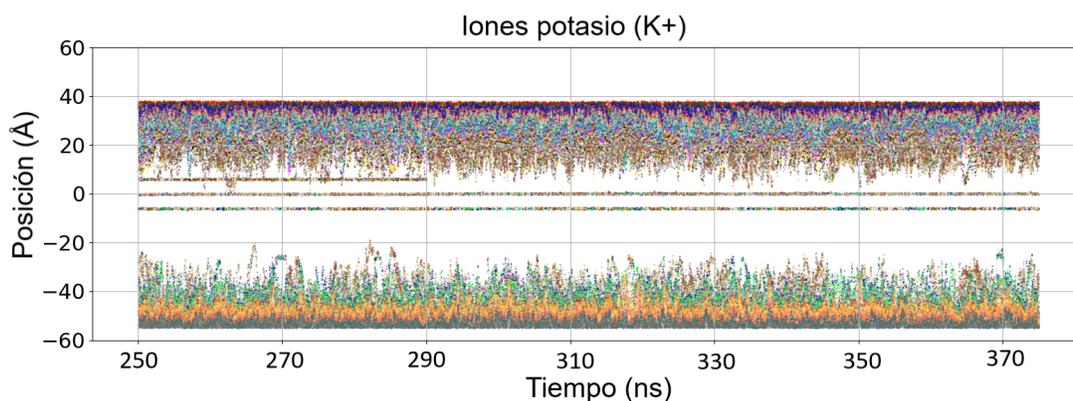


Figura 4.5: Comportamiento en la posición de los iones potasio (K^+) en el sistema total de estudio, durante los 250 a 370 ns de dinámica molecular.

Aí mismo, para cerciorarnos que no hay un recambio de iones dentro del filtro y que por lo tanto estos son los mismos en toda la dinámica, decidimos usar una gráfica tipo mapa de calor (heatmap, en inglés) para rastrear por los índices de los iones aquellos que entraron en un momento de la dinámica. En la Figura 4.6 se muestra este resultado en el que se indica que si el ion está dentro del sistema de referencia, en ese momento de la dinámica, será marcado de color blanco; en cambio si no se

^aYa no se observan los tres colores de las gráficas anteriores (rojo, verde y azul) ya que el código, al rastrear más iones, este les asigna un color conforme entran al sistema de referencia, siendo así que se vea una mezcla de colores.

encuentra será marcado de color negro. Como mencionamos, el comportamiento es simétrico en toda la dinámica, por lo que solo mostramos el bloque de tiempo que corresponde de los 250 a los 370 ns, donde cambia el régimen de tres iones a dos.

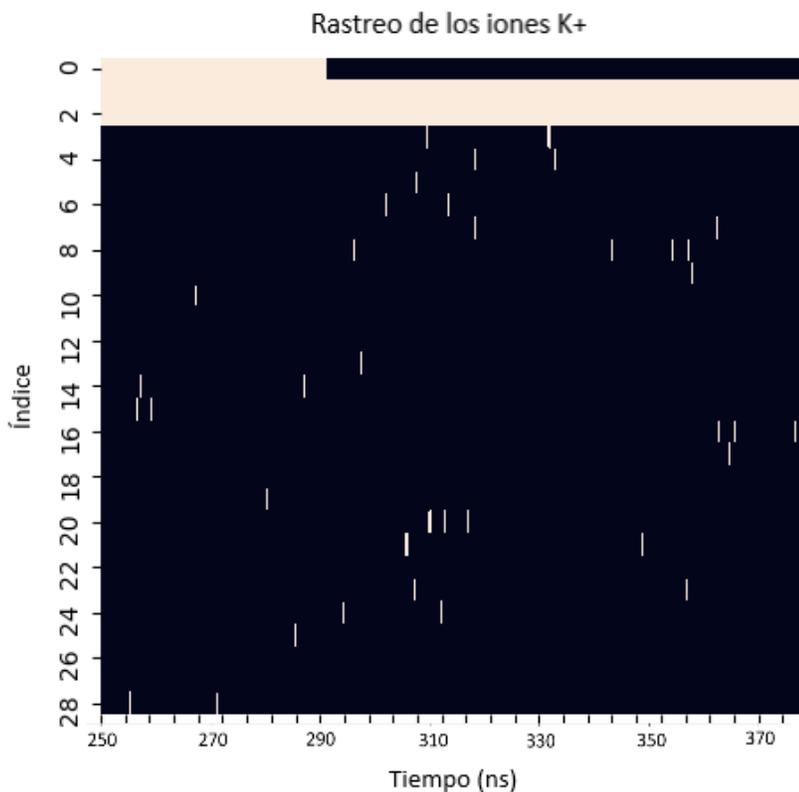


Figura 4.6: Comportamiento en la posición de los iones potasio (K^+) en el sistema total de estudio, durante los 250 a 370 ns de dinámica molecular.

Observamos que en realidad no hay un recambio de iones o cambio eléctrico debido al potencial de membrana; lo que quiere decir que son los mismos iones que se mantienen dentro del filtro de selectividad durante toda la dinámica: los iones 0, 1 y 2 para el comportamiento de tres iones y los iones 1 y 2 para el comportamiento con dos iones. Lo que se comprueba también con este análisis que en este estado cerrado del canal no hay un flujo de iones K^+ durante 500 ns de DM. Los otros iones que

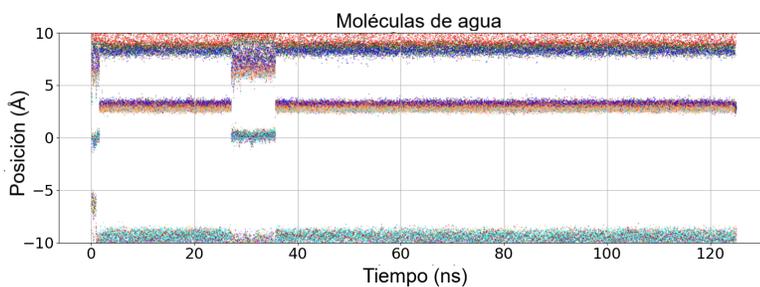
se advierten en menor cantidad en diferentes momentos de la dinámica, son aquellos que se acercaron al FS y por lo tanto al sistema de referencia, siendo así captados por el código y mostrados en la gráfica.

4.3.2. Moléculas de agua dentro del filtro

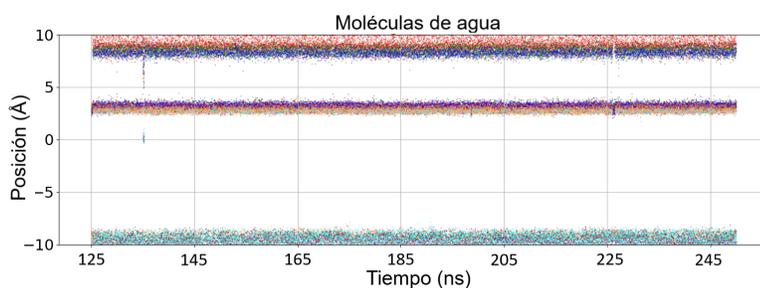
Los resultados del comportamiento de las moléculas de agua mostraron que estas se distribuyeron en tres regiones distintas. Una región en la dirección extracelular del sistema de referencia (antes de los 6 Å), una segunda región media entre dos iones potasio en una distancia de 3 a 4 Å y una tercera región en la dirección intracelular (después -6 Å). Mostrados en la Figuras 4.7(a), 4.7(b) y 4.7(c).

Este comportamiento se mantiene durante 290 ns, ventana de tiempo que corresponde al modelo en donde tres iones se encontraban dentro del FS (Figura 4.3(a), 4.3(b) y 4.3(c)). El desfase que se ve entre los 30 ns, fue debido a que el canal aún se estaba estabilizando en la etapa de producción. Los diferentes colores que se observan en la gráfica significan que no era una única molécula de agua la que entró al FS, sino que hay un recambio de moléculas.

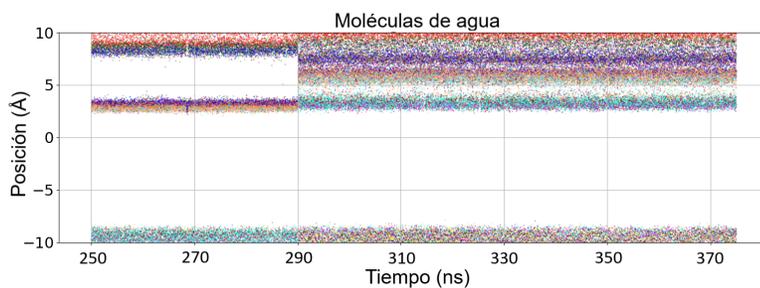
Después de los 290 ns y hasta los 500 ns de DM, el mismo tiempo en el que sólo dos iones se encontraban dentro del FS, se observaron más moléculas de agua dentro del filtro en la parte extracelular del canal (Figura 4.7(c) y 4.7(d)), lo que ocasionó que ya no se definieran sus zonas en las gráficas, sino que se ve como un conjunto de puntos acumulados en las regiones de la zona extracelular del filtro.



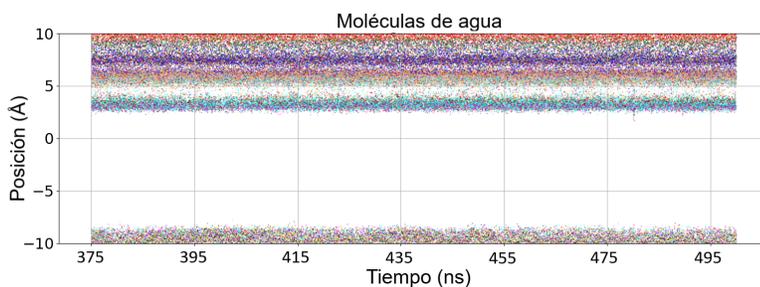
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.7: Identificación de las moléculas de agua dentro del filtro de selectividad durante 500 ns de dinámica molecular. El tiempo total de la dinámica fue dividido en cuatro bloques para facilidad del análisis. (a) Del tiempo 0 a los 125 ns. (b) Del tiempo 125 ns a los 250 ns. (c) Del tiempo 250 ns a los 375 ns. (d) De los 375 ns a los 500 ns

Para analizar más en detalle estos comportamientos hicimos un análisis similar el de los iones, que se observa en la Figura 4.8. En los primeros 290 ns, en el que sólo había una única molécula de agua dentro del FS, observamos que esta se posicionó entre los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos GLY77 y VAL76 de las cuatro cadenas (Figura 4.8(a)). Mientras que los iones potasio se posicionaron en los demás residuos, como se vio en los resultados anteriores.

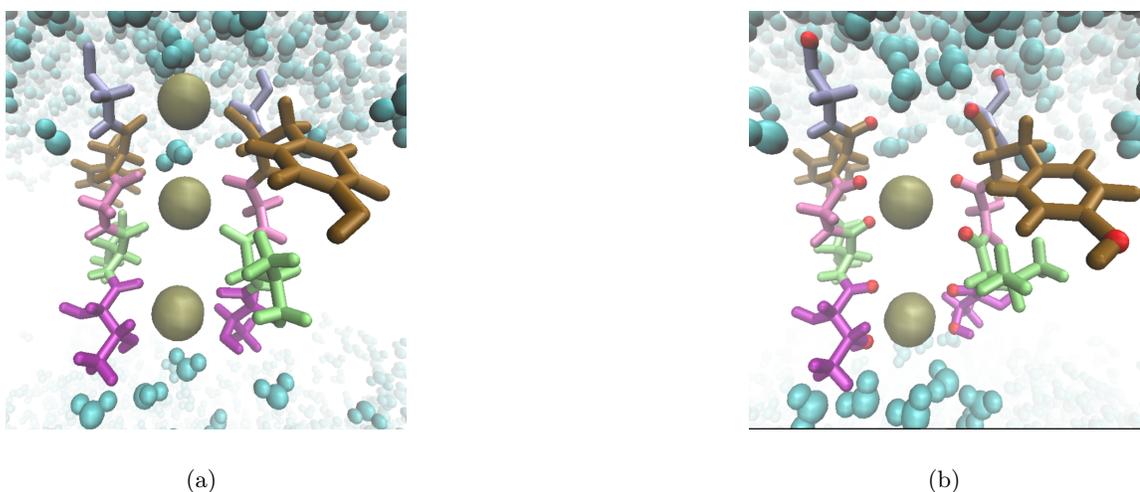


Figura 4.8: Moléculas de agua en el filtro de selectividad. Se observan los residuos que conforman al filtro, tres iones dentro de él (verde) y una molécula de agua dentro (esferas en color azul). Adicionalmente al rededor del FS hay más moléculas de agua.

Adicionalmente, después de 290 ns cuando se pierde el orden definido en las gráficas, vemos en la Figura 4.8(b) que ya no se encontraba la molécula de agua que se localizaba en el régimen de tres iones. En cambio, hay más moléculas de agua en la parte extracelular posicionadas de forma para entrar al FS.

4.3.3. Iones cloruro dentro filtro

En un estudio similar a los anteriores hicimos un análisis de los iones cloruro. Esto para comprobar que el canal KcsA solo permite el paso de los cationes dentro del

filtro en una solución KCl. En él observamos que no había iones Cl^- dentro del FS durante los 500 ns de DM. Comprobando así con este análisis que el canal KcsA no permite la entrada de los aniones cloruro.

4.4. Conclusiones

Contrario a lo que muestran muchas investigaciones del canal KcsA donde señalan que en la región del filtro de selectividad contiene solo dos iones,^{18,19,38} nosotros distinguimos tres iones en la región del filtro de selectividad durante 290 ns. Comprobando así que el FS tiene suficiente espacio y capacidad energética para mantener tres iones dentro de él durante un tiempo considerable. Después de 290 ns el filtro pierde un ion por el resto de los 500 ns.

Muchos estudios del canal KcsA han observado que en el filtro del canal se presenta una disposición de iones potasio y aguas como ion-agua-ion-agua-ion.^{6,12} Sin embargo, en este trabajo de tesis observamos que esto no es así. Puesto que en el análisis de moléculas de agua observamos que se distribuyen durante 290 ns en la parte extra e intracelular del FS y en medio de dos iones. Lo que corresponde a una disposición de ion-agua-ion-ion. Posteriormente de los 290 ns, la disposición cambia de agua-ion-ion a consecuencia de que las moléculas de agua de la parte extracelular estaban saturando esa parte del canal, en lo que podría haber sido un tapón que impedía que el tercer ion entrara.

El canal de potasio KcsA es selectivo solo a los iones K^+ , ya que no permitió el paso de los iones Cl^- durante 500 ns.

Capítulo 5

Propiedades electrónicas del filtro de selectividad

5.1. Planteamiento del problema

En este capítulo estudiamos las propiedades electrónicas de un modelo del filtro de selectividad con iones, esto por la dificultad de calcular el sistema completo. Con este modelo analizamos las interacciones de los residuos del filtro con las especies dentro de él.

5.2. Detalles computacionales

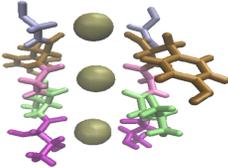
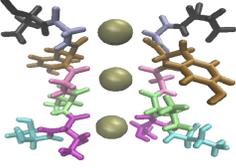
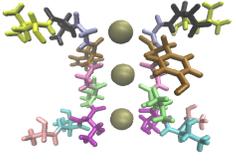
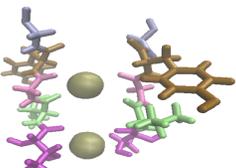
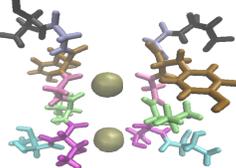
Para los cálculos de estructura electrónica extrajimos coordenadas de dos diferentes estados de la dinámica de acuerdo con el análisis de la funcionalidad del filtro. Una donde identificamos la presencia de tres iones y otra donde se encuentran solo dos iones. De estas coordenadas, por ser un sistema muy grande y al no tener la capacidad de cómputo, decidimos recortar la proteína para tener solo el filtro con los cinco residuos principales de las cuatro cadenas. Posteriormente, en otra estructura sumamos un residuo más (un residuo antes y uno después de la secuencia que forma el FS) para cada cadena y así obtener 28 residuos en el filtro. Al último modelo se le sumaron cuatro residuos por cadena (dos residuos antes y dos después de la secuencia que forma el FS), obteniendo un modelo de 36 residuos. Esta estrategia se aplicó a los sistemas de tres y dos iones.^a Los modelos se muestran en la Tabla 5.1, cabe destacar que todos ellos se pasivaron con hidrógenos en cada extremo.

Para estos análisis utilizamos el programa Orca.⁶⁵ Hicimos cálculos *single point* a un nivel de B3LYP/6311** con una carga de +2 para todos los modelos con dos iones explícitos y de +3 para todos los modelos de tres iones. Esta carga de se debe principalmente a los iones explícitos dentro del sistema.

Las imágenes de los orbitales moleculares las realizamos en el programa de visualización molecular gOpenMol.⁶⁶

^aPor falta de poder de cómputo, el modelo con 36 residuos donde el filtro tenía dos iones dentro no pudo realizarse.

Tabla 5.1: Modelos utilizados para el análisis. Se muestran solo dos cadenas del modelo.

Residuos totales	Modelo
3 iones	
20	 A molecular model showing two polypeptide chains, one colored in shades of purple and blue, and the other in shades of green and yellow. Three olive-green spheres representing ions are positioned between the two chains.
28	 A molecular model showing two polypeptide chains, one colored in shades of purple and blue, and the other in shades of green and yellow. Three olive-green spheres representing ions are positioned between the two chains.
36	 A molecular model showing two polypeptide chains, one colored in shades of purple and blue, and the other in shades of green and yellow. Three olive-green spheres representing ions are positioned between the two chains.
2 iones	
20	 A molecular model showing two polypeptide chains, one colored in shades of purple and blue, and the other in shades of green and yellow. Two olive-green spheres representing ions are positioned between the two chains.
28	 A molecular model showing two polypeptide chains, one colored in shades of purple and blue, and the other in shades of green and yellow. Two olive-green spheres representing ions are positioned between the two chains.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Comportamiento con tres iones dentro del filtro de selectividad

Las propiedades electrónicas de un sistema se pueden obtener a partir de los cálculos de estructura electrónica. En esta sección analizamos los orbitales moleculares frontera del filtro de selectividad. Así mismo, para comprender qué pasa cuando hay dos y tres iones dentro FS, decidimos hacer un análisis de la energía de estos comportamientos.

Como se muestra en la Figura 5.1 el filtro completo con sus 20 residuos principales, tuvo una gran diferencia de energía entre sus orbitales HOMO y LUMO. En cambio, cuando agregamos más residuos (un residuo antes y uno después de la secuencia), estas energías disminuyeron considerablemente, con un cambio de hasta 4 eV. Además, observamos que al seguir aumentando residuos en el FS, pasar de 28 residuos a 36 residuos, la variación en la energía es mínima. Lo que nos hace suponer que si se agregan más residuos esta tendencia se mantiene, sin embargo por la falta de recursos de cómputo queda como perspectiva del trabajo. Esto significa que a medida que la brecha energética entre el HOMO y LUMO se hace más pequeña, el modelo de estudio se comporta como un semiconductor de acuerdo con la clasificación de materiales de Paschotta;⁶⁷ quien declara que un material es semiconductor si la brecha energética es menor a 1 eV, en cambio un material es dieléctrico o aislante cuando su ancho de banda energética es arriba de los 4 eV. Siendo así que el modelo del filtro (de 20 residuos) pareciera ser un aislante, pero a medida que crece en residuos tiende a actuar como un semiconductor, que es el comportamiento que se esperaría de un canal: permitir el flujo de iones.

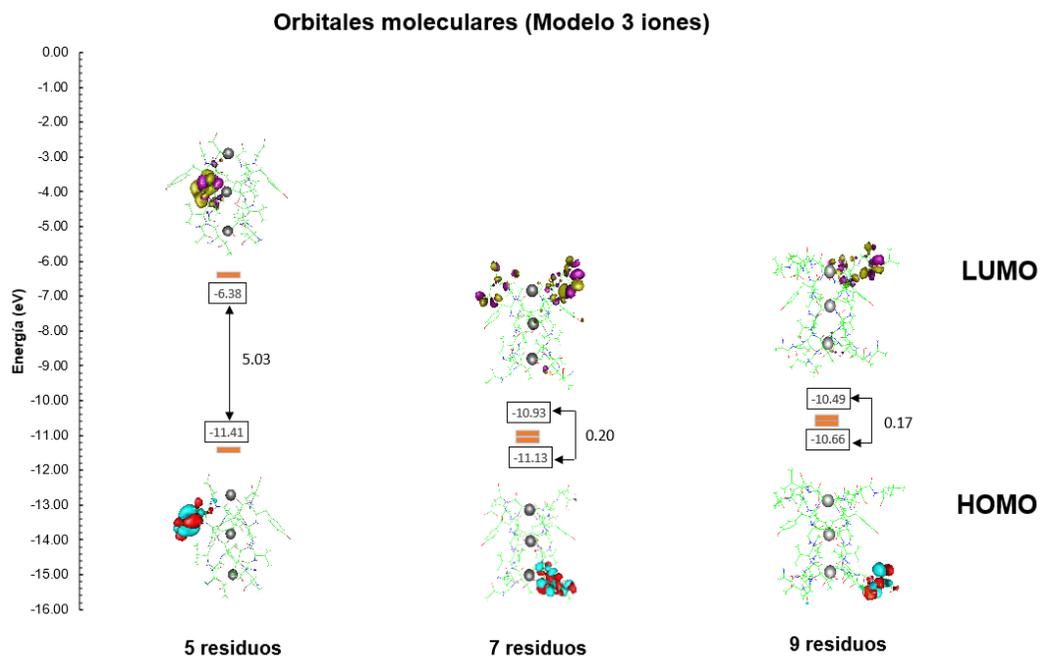


Figura 5.1: Energía de los orbitales moleculares frontera en el modelo de tres iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la energía (eV) de los orbitales HOMO y LUMO y la diferencia entre ellos señaladas por unas flechas. También se muestra la estructura tridimensional de las isosuperficies de los orbitales con valores de 0.02 y -0.02 U.A. Para los orbitales HOMO el color azul representa la parte de los valores positivos y el color rojo los valores negativos. Para los orbitales LUMO el color morado representa la parte los valores positivos y el color amarillo los valores negativos.

En este mismo análisis, nos percatamos que los orbitales HOMO y LUMO se localizaron en los átomos de la cadena polipeptídica que forma el filtro de selectividad, siendo así que los iones no contribuyen a estos estados.

Además, notamos que la distribución de los orbitales cambia cuando de los cinco residuos principales se aumentan dos o cuatro residuos más. Es decir, los orbitales HOMO en el modelo de 25 residuos se localizaban principalmente (de acuerdo a un valor de isosuperficie 0.02) en los residuos que corresponde al anillo aromático del

aminoácido tirosina. Cuando aumentamos en dos y cuatro residuos más por cadena, estos orbitales se localizaron en la parte intracelular del filtro. Dicho de otra forma, en el modelo de 28 residuos el orbital HOMO se ubicó sobre los residuos ASP80 y GLY79; en el modelo de 36 residuos se posicionó en el residuo LEU81 de una cadena. Estos sitios representan los lugares propensos a recibir ataques electrofílicos que favorecen la interacción con los iones de carga positiva. En cambio, los orbitales LUMO del modelo de 20 residuos se localizaron principalmente en la parte media del canal: en los GLY77. Cuando aumentamos en dos residuos más por cadena, estos orbitales cambiaron a una posición extracelular en la boca del filtro, entre la THR75 y THR74. Cuando se aumenta cuatro residuos por cadena, ahora se ubica en una sola cadena desde la THR75 hasta ALA73. Todos estos son los sitios susceptibles de ataques nucleofílicos.

Para comprobar que los iones no contribuían en los orbitales frontera, hicimos un análisis donde comparamos las posiciones de los últimos 6 orbitales más altos ocupados y los 6 orbitales más bajos desocupados. En la Figura 5.2 mostramos los seis orbitales más altos ocupados, en donde hay una alta simetría del canal y de los orbitales. En todos estos orbitales su posición fue la misma: en el anillo aromático del aminoácido TYR78. Haciendo el análisis de sus energías (Figura 5.3), nos percatamos que la diferencia energética entre ellos es menos de dos décimas de eV. Siendo así que esta diferencia de estos orbitales con el LUMO, es prácticamente constante. Esto implica así que esta zona del filtro de selectividad sea rica en electrones y pueda ser razón de la alta afinidad del canal con los iones K^+ .

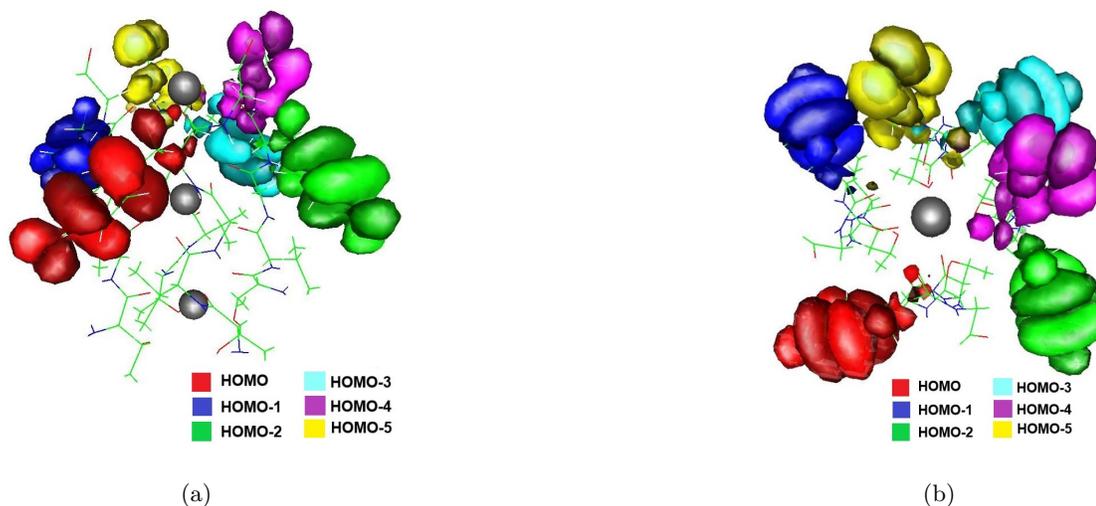


Figura 5.2: Isosuperficies de los últimos seis orbitales frontera más altos ocupados en el modelo con tres iones dentro del filtro. Se muestran en colores las isosuperficies (con valor 0.02 y -0.02 U.A.) de los orbitales HOMO, HOMO-1, HOMO-2, HOMO-3 y HOMO-4. a) Vista lateral del filtro con tres iones dentro. b) Vista superior del filtro con tres iones dentro. En esferas grises se representan los iones. La parte de arriba de las imágenes simboliza la sección extracelular y la de abajo la sección intracelular del canal.

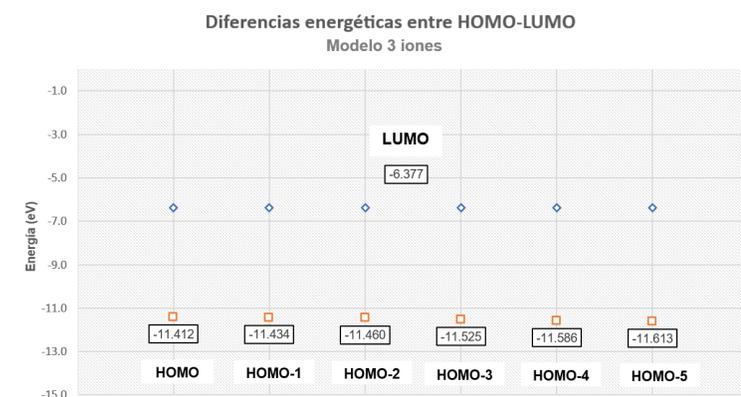


Figura 5.3: Energía de los orbitales moleculares más altos ocupados en el modelo de tres iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la diferencia de energía (eV) entre los últimos seis orbitales con respecto al orbital LUMO. En rombos azules está señalado el orbital LUMO para una fácil visualización de la comparación entre los otros.

Para los orbitales más bajos desocupados, mostrados en la Figura 5.4, observamos

que estos no se distribuyeron de manera simétrica. El LUMO se encontró a la mitad del filtro de selectividad en una parte externa al poro, en el residuo GLY77 de una sola cadena. Esta misma posición se mantuvo en los orbitales desocupados siguientes hasta el LUMO-4. Sin embargo el LUMO-5 se desplazó al residuo GLY79 de una cadena, en la parte extracelular del filtro. En el análisis de la energía de los orbitales (Figura 5.5) observamos que la diferencia entre ellos es solo de decimales, manteniéndose al rededor de -6 eV, y la brecha entre ellos con el HOMO es igualmente constante. Por lo que este modelo de la zona del filtro puede ser considerada como un atractor de electrones, lo que podría tener implicaciones en sus propiedades electrofílicas.

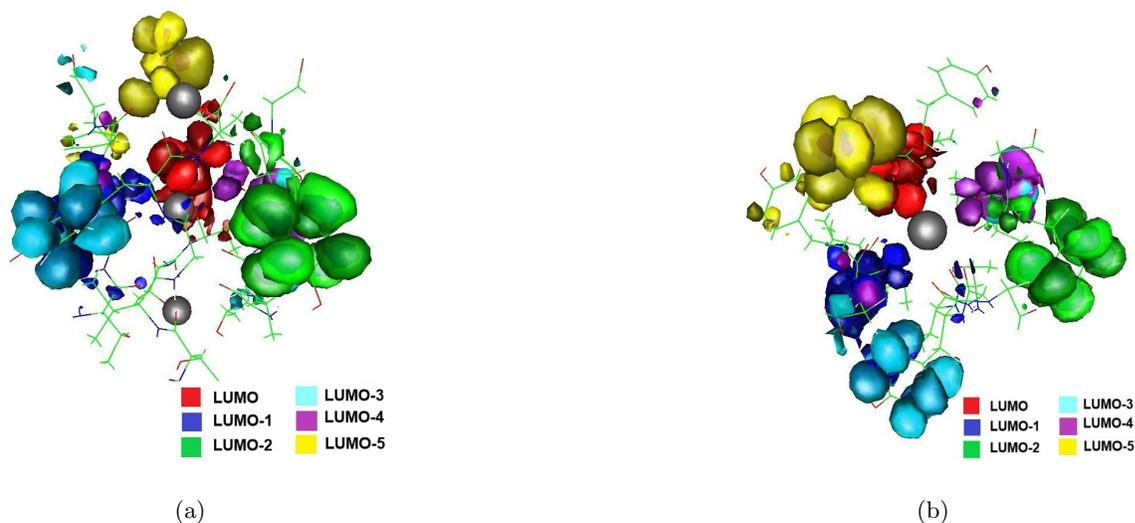


Figura 5.4: Isosuperficies de los últimos seis orbitales más bajos desocupados en el modelo con tres iones dentro del filtro. Se muestran en colores las isosuperficies (con valor 0.02 y -0.02 U.A.) de los orbitales LUMO, LUMO-1, LUMO-2, LUMO-3, LUMO-4 y LUMO-5. a) Vista lateral del filtro con tres iones dentro. b) Vista superior del filtro con tres iones dentro. En esferas grises se representan los iones. La parte de arriba de las imágenes simboliza la sección extracelular y la de abajo la sección intracelular del canal.

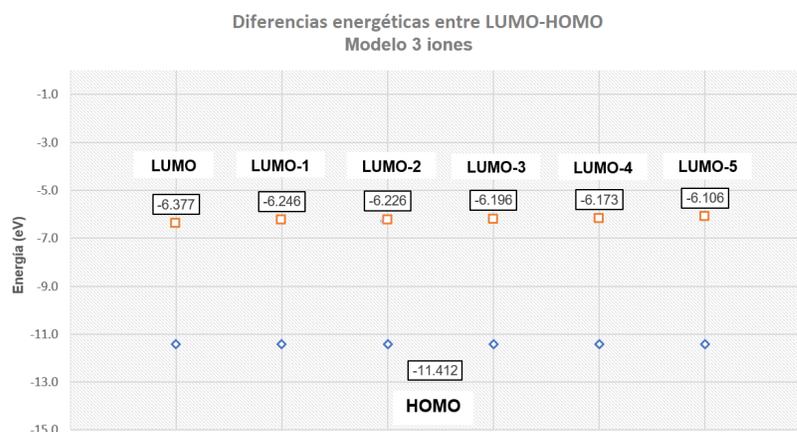


Figura 5.5: Energía de los orbitales moleculares más bajos desocupados en el modelo de tres iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la diferencia de energía (eV) entre los últimos seis orbitales con respecto al orbital HOMO original. En rombos azules está señalado el orbital HOMO para una fácil visualización de la comparación entre ellos.

5.3.2. Comportamiento con dos iones dentro del filtro de selectividad

Cuando en el análisis de la funcionalidad del filtro observamos el comportamiento del tercer ion desapareciendo del FS, después de los 290 ns, nos hicimos la pregunta de si las propiedades electrónicas cambiarían con respecto al modelo con tres iones, y si estas favorecen a que se pierda ese tercer ion. Los resultados que a continuación mostramos revelan estas diferencias.

En un análisis sobre el cambio en la energía de los orbitales frontera (Figura 5.6) notamos que, al igual que en el modelo de tres iones cuando están los 25 residuos principales del filtro de selectividad, hubo un gran salto de energía entre el orbital HOMO y LUMO de aproximadamente 4.40 eV. Lo que conlleva a que el sistema se comporte como un aislante. En cambio, cuando se incrementan dos residuos más por cadena al FS, este también baja drásticamente la brecha de la energía, siendo

ahora su comportamiento como el de un semiconductor al tener 0.25 eV de diferencia. Lo que podría estar relacionado con la naturaleza conductora o aislante del filtro de selectividad. Creemos que al tener esta tendencia, si se aumenta este modelo en cuatro residuos más por cadena, se mantendrá este fenómeno que es parecido a un tipo de semiconducción como en el modelo de tres iones.

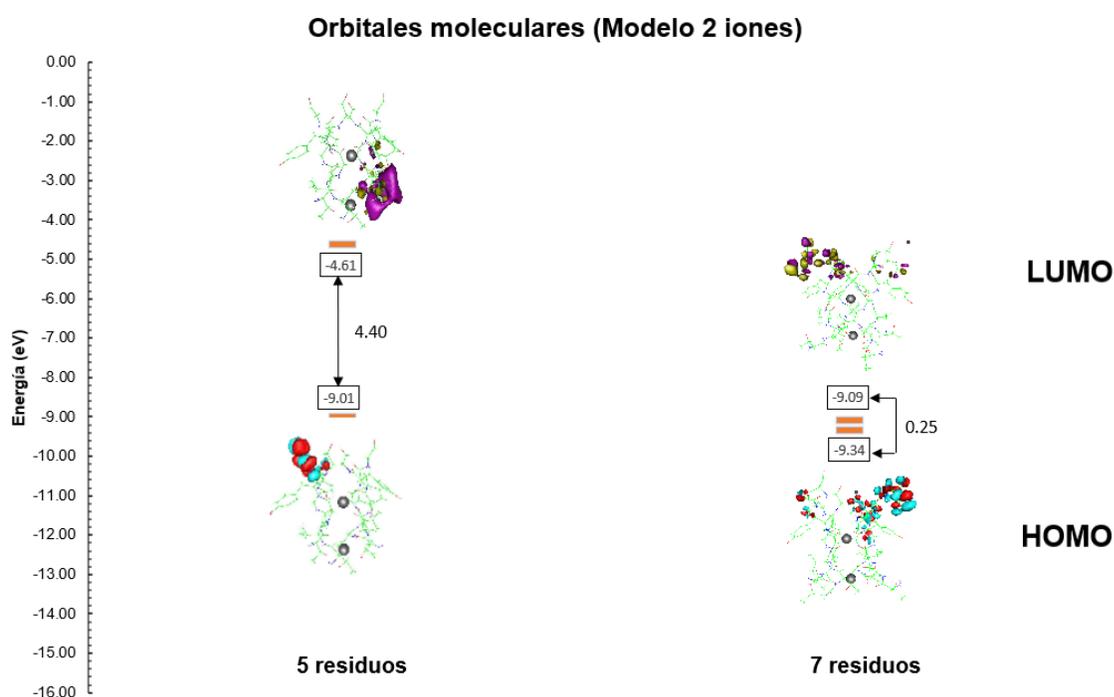


Figura 5.6: Energía de los orbitales moleculares frontera en el modelo de dos iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la energía (eV) de los orbitales HOMO y LUMO y la diferencia entre ellos señaladas por flechas. También se muestra la estructura tridimensional con los orbitales señalados por esferas de colores con valores de isosuperficie de 0.02 y -0.02 U.A. Para los orbitales HOMO el color azul representa la parte los valores positivos y el color rojo los valores negativos. Para los orbitales LUMO el color morado representa la parte los valores positivos y el color amarillo los valores negativos.

Así mismo, cuando analizamos la posición de los orbitales frontera nos percatamos que los iones tampoco contribuyeron a estos estados, sólo las cadenas polipeptídicas.

En el caso del modelo de 25 residuos, los orbitales HOMO se encontraron en GLY79, en la parte extracelular del filtro. En cambio, el orbital LUMO se localizó en THR75 en la parte interna del filtro a nivel intracelular. Cuando se aumentaron dos residuos por cadena el orbital LUMO cambia al residuo GLY79. El mismo residuo en el que se localizó su contraparte, el orbital HOMO, pero en otra cadena. Estableciendo así un comportamiento de simetría. Si esta condición es constante, creemos que también se verá en el modelo de 9 residuos. Este resultado nos indica que, al tener el filtro un espacio capaz de ser ocupado por otro ion, los sitios con propiedades electrofílicas y nucleofílicas se posicionan en el espacio extracelular para atraer núcleos y electrones. En el estudio sobre la posición de los últimos seis orbitales más bajos desocupados (Figura 5.7), observamos que de igual manera los iones no contribuyen a estos estados. La simetría se conserva en los primeros cuatro orbitales (HOMO, HOMO-1, HOMO-2 y HOMO-3). Mientras que en el modelo de tres iones los orbitales más altos ocupados están posicionados en el anillo aromático de la TYR78, aquí se posicionan en los residuos de GLY79, que corresponde a la entrada de la boca del filtro de selectividad en la parte extracelular. Esto tal vez se deba a que, al tener un espacio libre para un ion K^+ , la mejor manera para atraer más a los cationes es en esta zona rica en electrones, dándole una naturaleza nucleofílica. Cuando cambia la configuración a tres iones dentro, esta propiedad se intercambia al residuo TYR78 para mantener su condición de tipo aislante.

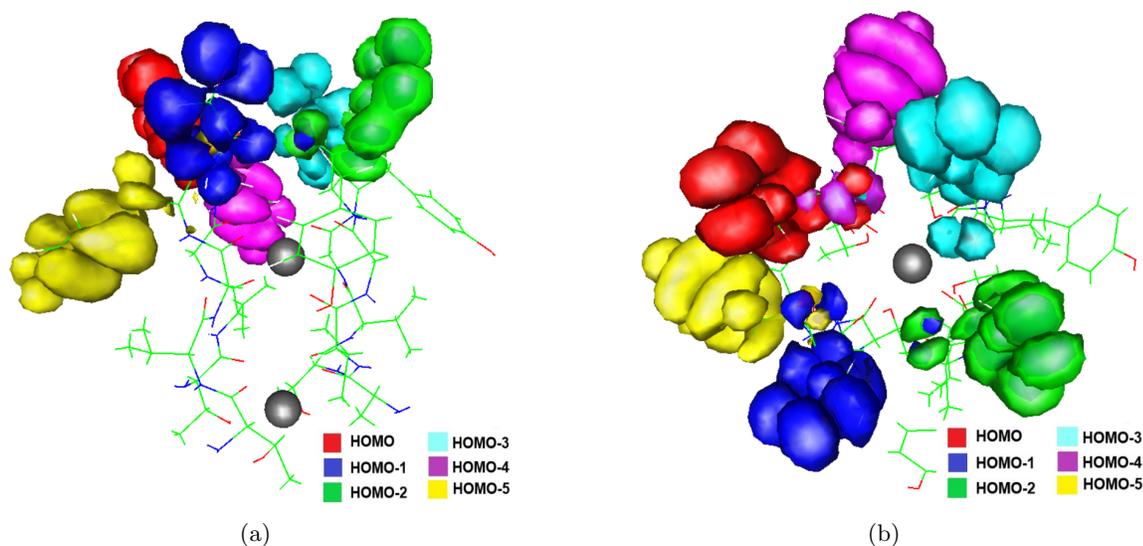


Figura 5.7: Isosuperficies de los últimos seis orbitales frontera más altos ocupados en el modelo con dos iones dentro del filtro. Se muestran en colores las isosuperficies (valores de 0.02 y -0.02 U.A.) de los orbitales HOMO, HOMO-1, HOMO-2, HOMO-3 y HOMO-4. a) Vista lateral del filtro con tres iones dentro en forma de esferas grises. b) Vista superior del filtro con tres iones dentro.

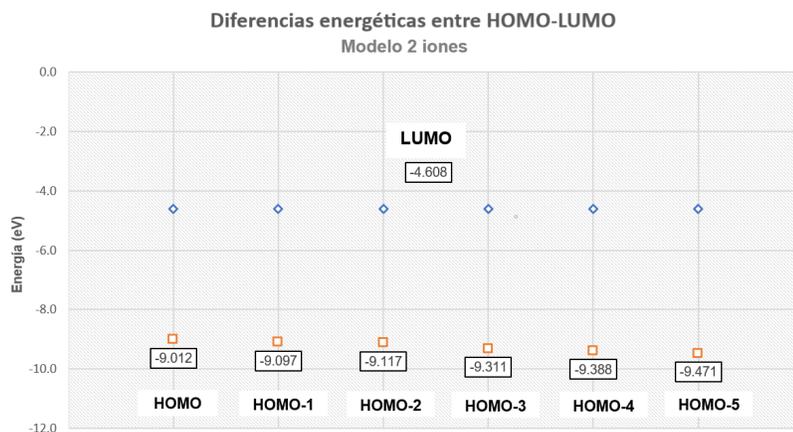


Figura 5.8: Energía de los orbitales moleculares más altos ocupados en el modelo de dos iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la diferencia de energía (eV) entre los últimos cinco orbitales con respecto al orbital LUMO. En rombos azules está señalado el orbital LUMO para una fácil visualización de la comparación entre los demás.

En el análisis de las energías de los orbitales más altos ocupados (Figura 5.8), nos percatamos que hay ligeras diferencias de energía entre ellos, pero manteniéndose en los -9 eV. Se observa una disminución de energía a medida que va cambiando hacia el orbital más interno. En comparación del modelo con tres iones, donde estos cambios en la energía son muy pequeñas y casi constantes.

En el caso de los seis orbitales más bajos desocupados (Figura 5.9) notamos que estos se encontraron en la parte más interna del filtro, hacia la zona intracelular en los residuos de la THR75. Manteniendo la simetría en los primeros cuatro orbitales (LUMO, LUMO-1, LUMO-2 y LUMO-3). Esto denota que esta zona es electrofílica, es decir, una zona más positiva. Lo que podría significar una tendencia del filtro para deshacerse de los cationes dentro de él hacia la zona intracelular.

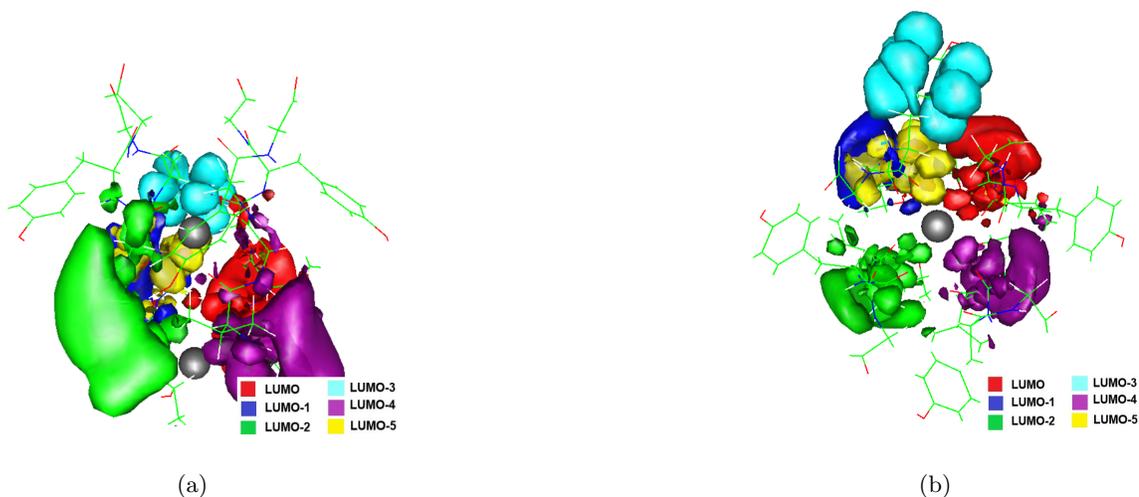


Figura 5.9: Isosuperficies de los últimos cinco orbitales más bajos desocupados en el modelo con dos iones dentro del filtro. Se muestran en colores las isosuperficies (valores 0.02 y -0.02 U.A.) de los orbitales LUMO, LUMO-1, LUMO-2, LUMO-3, LUMO-4 y LUMO-5. a) Vista lateral del filtro con tres iones dentro, representados en forma de esferas grises. b) Vista superior del filtro con tres iones dentro.

En cuanto a la diferencia de energías de estos orbitales (Figura 5.10), observamos

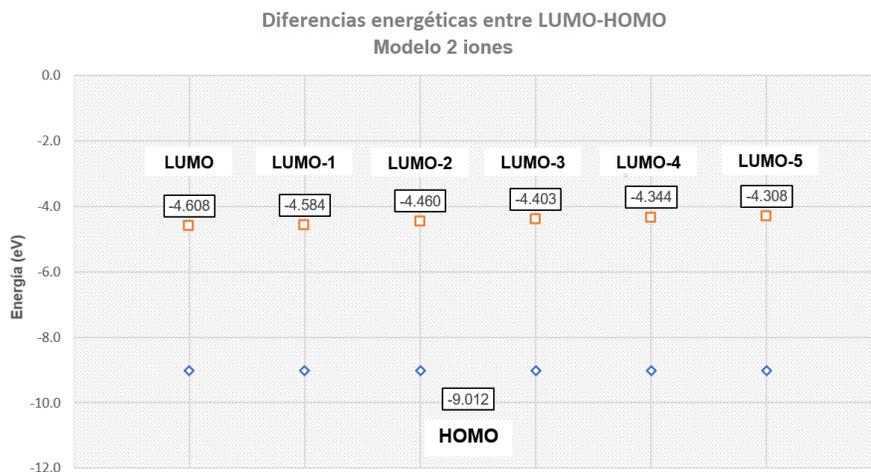


Figura 5.10: Energía de los orbitales moleculares más bajos desocupados en el modelo de dos iones dentro del filtro de selectividad. Se muestra la diferencia de energía (eV) entre los últimos seis orbitales con respecto al orbital HOMO. En rombos azules está señalado el orbital HOMO para una fácil visualización de la comparación entre los demás orbitales.

que igualmente la energía se mantiene entre los valores de -4 eV. Además notamos que hay una tendencia a incrementar la energía a medida que se va subiendo en los orbitales virtuales desocupados, en comparación con el modelo de tres iones donde este parece mantenerse constante. Siendo así un sitio de fácil ataque nucleofílico.

5.4. Conclusiones

Sabiendo que por los resultados de DM y la funcionalidad del filtro existen dos comportamientos importantes en el FS: una donde durante 290 ns hay tres iones y otra desde los 290 ns hasta los 500 ns hay dos iones; encontramos que estos dos casos tienen diferentes características al estudiarlos por sus propiedades electrónicas.

La diferencia en la energía de los orbitales frontera en estos dos modelos, cambia desde 4 y 5 eV a un valor aproximado a cero cuando se aumentan residuos a los principales del FS, que impacta indirectamente en la reactividad química del sistema. En el modelo con tres iones dentro, los orbitales frontera cambian su localización cuando se aumentan los residuos. En el caso de los orbitales HOMO se intercambian de una parte extracelular a una parte intracelular. Al contrario del modelo con dos iones, donde estos se mantienen en la parte extracelular. Siendo así que cuando hay un espacio disponible para un ion en el FS, la zona nucleofílica se encuentra en los residuos de la GLY79 en la parte extracelular para así captar a los cationes y puedan entrar al filtro (Figura 5.8).

Los orbitales frontera se encuentran en los residuos de la proteína y los iones no contribuyen a estos estados. Además, los últimos cuatro orbitales más altos ocupados y más bajos desocupados se posicionan en una forma simétrica del filtro al estar en el mismo residuo pero de diferente cadena. Estos últimos orbitales, para los dos modelos, mantienen el mismo nivel de energía, con solo diferencias de décimas de eV. Aunque se nota más el cambio en los valores de energía de los orbitales en el modelo de dos iones, con ligeras tendencias a la alza.

En conclusión, cuando en el modelo hay tres iones dentro del filtro es más estable al tener valores más negativos de energía. Pero cuando se pierde un ion, el filtro busca la manera de recuperarlo y compensar esa energía. Por lo que la zona rica en electrones se mueve a los residuos de la parte extracelular (GLY79 y TYR78) que están con mayor contacto a los cationes.

Conclusiones generales

Las conclusiones de esta tesis se pueden ubicar en tres campos: el primero corresponde a la estabilidad estructural del canal KcsA, el segundo a la funcionalidad de su filtro de selectividad y por último, a las propiedades electrónicas en el filtro.

El canal de potasio KcsA es estable estructuralmente durante 500 ns de dinámica molecular, con un RMSD de 1.4 Å. Además es estable energéticamente manteniéndose todo el tiempo de dinámica con una energía total promedio de -65,900 kJ/mol. El canal tiene alta movilidad en los aminoácidos que se encuentran en la parte extra e intracelular. Sin embargo, al ser una proteína transmembrana la mayor parte del canal es de baja movilidad, principalmente en aquellos aminoácidos que corresponden al filtro de selectividad. Adicionalmente, en el FS en diferentes momentos de la dinámica se forma un anillo entre los puentes de hidrógeno que conforman los residuos GLY77 y VAL76 de las cuatro cadenas y los oxígenos de los grupos carbonilo de los residuos del FS se posicionan dentro del hueco de conducción de los iones.

El FS tiene el espacio y la capacidad energética para alojar a tres iones durante 290 ns de dinámica, con una conformación ion-agua-ion-ion. Posterior a este tiempo hasta los 500 ns, solo dos iones se mantienen dentro del canal y en los residuos

cercanos a la parte extracelular (GLY79 y TYR78) entran moléculas de agua para compensar el espacio sobrante. Además, en una solución de KCl, el canal es selectivo solo a los iones K^+ , ya que no permite el paso a los iones Cl^- .

Estos dos comportamientos en los iones dentro del filtro presentan, en sus modelos representativos, propiedades electrónicas diferentes. Cuando hay tres iones, el *gap* de energía de los orbitales HOMO y LUMO es de 5.03 eV, mientras que cuando hay dos iones es de 4.40 eV. En ellos, cuando se aumentan residuos a sus cadenas, baja su brecha energética hasta aproximadamente los 0 eV. Lo que impacta indirectamente en la reactividad química del sistema. Estos orbitales frontera se posicionan en la parte proteica y los iones no contribuyen a estos estados. En el momento en que el FS pierde el tercer ion, los residuos de la parte extracelular (GLY79 y TYR78) se comportan como electrofílicos para atraer a los cationes y así ocupar el sitio disponible; puesto que el filtro es más estable energéticamente cuando tiene tres iones dentro de él.

Perspectivas

La primer perspectiva que surge de este estudio es reproducir la misma metodología en una estructura abierta del canal KcsA, para comparar en sus propiedades a estos dos estados. Así mismo, extender el tiempo de dinámica para identificar si las características aquí descritas se mantienen durante el tiempo.

Segundo, al observar que el canal es selectivo al paso de los iones K^+ en una solución de KCl, surge la pregunta de cómo se puede comportar en una solución de iones K^+ y Na^+ . Por lo que queda como perspectiva el análisis funcional del canal con una solución con otro tipo de iones.

Tercero, si el poder de cómputo lo permite, analizar las propiedades electrónicas del canal completo o al menos agrandar más los modelos con los que se representa el filtro de selectividad. Así como estudiar estas propiedades junto con los iones y las moléculas de agua que están dentro y al rededor del filtro.

Bibliografía

- [1] B. Alberts, J.H. Wilson, A. Johnson, T. Hunt, J. Lewis, K. Roberts, M. Raff, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2008.
- [2] L. Harvey, B. Arnold, Z. Lawrence, M. Paul, B. David, and D. James. *Molecular Cell Biology. 4th edition*. W. H. Freeman, 2000.
- [3] C. Domene. Molecular dynamics simulations of potassium channels. *Central European Journal of Chemistry*, 5(3), 2007.
- [4] S. Noskov and B. Roux. Ion selectivity in potassium channels. *Biophysical Chemistry*, 124(3):279 – 291, 2006.
- [5] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360):69–77, 1998.
- [6] Bernhard Egwolf and Benoît Roux. Ion Selectivity of the KcsA Channel: A Perspective from Multi-Ion Free Energy Landscapes. *Journal of Molecular Biology*, 401(5):831 – 842, 2010.
- [7] B. Hille, C. M. Armstrong, and R. MacKinnon. Ion channels: From idea to reality. *Nature Medicine*, 5(10):1105–1109, 1999.
- [8] R. MacKinnon, D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, and B. T. Chait. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360):69–77, 1998.
- [9] Benoit Roux and Roderick MacKinnon. The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: Electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, 285(5424):100–102, 1999.

- [10] Leonardo Guidoni, Vincent Torre, and Paolo Carloni. Potassium and sodium binding to the outer mouth of the K⁺ channel. *Biochemistry*, 38(27):8599–8604, 1999.
- [11] Wayne J. Becktel and John A. Schellman. Protein Stability Curves. *Biopolymers*, 26:1859–177, 1987.
- [12] Simon Bernèche and Benoît Roux. Molecular Dynamics of the KcsA K⁺ Channel in a Bilayer Membrane. *Biophysical Journal*, 78(6):2900 – 2917, 2000.
- [13] Denis Bucher, Leonardo Guidoni, and Ursula Rothlisberger. The Protonation State of the Glu-71/Asp-80 Residues in the KcsA Potassium Channel: A First-Principles QM/MM Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, 93(7):2315–2324, 2007.
- [14] Simone Furini, Francesco Zerbetto, and Silvio Cavalcanti. Role of the intracellular cavity in potassium channel conductivity. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(50):13993–14000, 2007.
- [15] Van Ngo, Darko Stefanovski, Stephan Haas, and Robert A. Farley. Non-Equilibrium Dynamics Contribute to Ion Selectivity in the KcsA Channel. *PLOS ONE*, 9(1):1–12, 2014.
- [16] Markus Weingarth, Elwin A.W. Van Der Cruisen, Jared Ostmeier, Sylke Lievestro, Benoit Roux, and Marc Baldus. Quantitative analysis of the water occupancy around the selectivity filter of a K⁺ channel in different gating modes. *Journal of the American Chemical Society*, 136(5):2000–2007, 2014.
- [17] Di Wu. Dynamic water patterns change the stability of the collapsed filter conformation of the KcsA K⁺ channel. *PLOS ONE*, 12(10):1–15, 2017.
- [18] I. H. Shrivastava and Mark S.P. Sansom. Simulations of Ion Permeation Through a Potassium Channel: Molecular Dynamics of KcsA in a Phospholipid Bilayer. *Biophysical Journal*, 78(2):557 – 570, 2000.
- [19] David A. Kopfer, Chen Song, Tim Gruene, George M. Sheldrick, Ulrich Zachariae, and Bert L. Groot. Ion permeation in K⁺ channels occurs by direct Coulomb knock-on. *Science*, 346(6207):352–355, 2014.
- [20] Leonardo Guidoni, Vincent Torre, and Paolo Carloni. Water and potassium dynamics inside the KcsA K⁺ channel. *FEBS Letters*, 477(1-2):37–42, 2000.
- [21] Y Zhou, J H Morais-Cabral, A Kaufman, and R MacKinnon. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414(6859):43–8, 2001.

- [22] L. Guidoni and P. Carloni. Potassium permeation through the KcsA channel: a density functional study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1563(1):1 – 6, 2002.
- [23] Denis Bucher, Simone Raugei, Leonardo Guidoni, Matteo Dal Peraro, Ursula Rothlisberger, Paolo Carloni, and Michael L. Klein. Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel. *Biophysical Chemistry*, 124(3):292–301, 2006.
- [24] Céline Boiteux and Simon Bernèche. Absence of Ion-Binding Affinity in the Putatively Inactivated Low-[K⁺] Structure of the KcsA Potassium Channel. *Structure*, 19(1):70 – 79, 2011.
- [25] V. Salari, M. Sajadi, H. Bassereh, V. Rezania, M. Alaei, and J. A. Tuszynski. On the classical vibrational coherence of carbonyl groups in the selectivity filter backbone of the KcsA ion channel. *Journal of Integrative Neuroscience*, 14(02):195–206, 2015.
- [26] Katherine Baker, Duan Chen, and Wei Cai. Investigating the Selectivity of KcsA Channel by an Image Charge Solvation Method in Molecular Dynamics Simulations. *Communications in Computational Physics*, 19(10), 2015.
- [27] Victoria Oakes, Simone Furini, and Carmen Domene. Insights into the Mechanisms of K⁺ Permeation in K⁺ Channels from Computer Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(1):794–799, 2020.
- [28] P.C. Biggin, G.R. Smith, I. Shrivastava, S. Choe, and M.S.P. Sansom. Potassium and sodium ions in a potassium channel studied by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1510(1):1 – 9, 2001.
- [29] Denis Bucher, Leonardo Guidoni, Paolo Carloni, and Ursula Rothlisberger. Coordination Numbers of K⁺ and Na⁺ Ions Inside the Selectivity Filter of the KcsA Potassium Channel: Insights from First Principles Molecular Dynamics. *Biophysical Journal*, 98(10):L47 – L49, 2010.
- [30] Indira H. Shrivastava, D. Peter Tieleman, Philip C. Biggin, and Mark S.P. Sansom. K⁺ versus Na⁺ ions in a K channel selectivity filter: A simulation study. *Biophysical Journal*, 83(2):633–645, 2002.
- [31] Sergei Yu Noskov, Simon Berneche, and Benoit Roux. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature*, 431(7010):830–834, 2004.
- [32] Bernhard Egwolf and Benoit Roux. Ion Selectivity of the KcsA Channel: A Perspective from Multi-Ion Free Energy Landscapes. *Journal of Molecular Biology*, 401(5):831–842, 2010.

- [33] N De March, S D Prado, and L G Brunnet. Coulomb interaction rules timescales in potassium ion channel tunneling. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 30(25):255101, 2018.
- [34] Zilong Song, Xiulei Cao, Tzyy Leng Horng, and Huaxiong Huang. Selectivity of the KcsA potassium channel: Analysis and computation. *Physical Review E*, 100(2):1–23, 2019.
- [35] Sudha Chakrapani, Julio F Cordero-Morales, Vishwanath Jogini, Albert C Pan, D Marien Cortes, Benoit Roux, and Eduardo Perozo. On the structural basis of modal gating behavior in K^+ channels. *Nature structural and molecular biology*, 18(1):67–74, 2011.
- [36] Shian Liu. *K^+ Channel's Equilibrium Preference Reveals the Origin of Its Conduction Selectivity and the Inactivated State of the Selectivity Filter*. PhD thesis, Texas A & M University, 2001.
- [37] Meredith LeMasurier, Lise Heginbotham, and Christopher Miller. KcsA : It's a Potassium Channel. *Journal of General Physiology*, 118(3):303–313, 2001.
- [38] Hendrick W. de Haan, Igor S. Tolokh, C. G. Gray, and Saul Goldman. Nonequilibrium molecular dynamics calculation of the conductance of the KcsA potassium ion channel. *Physical Review E*, 74(3), 2006.
- [39] E. Ippoliti. Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics: What is Molecular Dynamics? *Journal of Computational Physics*, 117(1):1–48, 2011.
- [40] Godehard Sutmann. Quantum Simulations of Complex Many-Body Systems: From Theory to Algorithms. *Classical Molecular Dynamics*, 10:211–254, 2002.
- [41] Mark E. Tuckerman and Glenn J. Martyna. Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(2):159–178, 2000.
- [42] Georg Kresse, Martijn Marsman, and Jurgen Furthmuller. *VASP the GUIDE*. Computational Materials Physics, Faculty of Physics, Universitat Wien, 29 de octubre de 2018. Desde: <http://cms.mpi.univie.ac.at/vasp/vasp.pdf>.
- [43] Yanxiang zhao. *Brief introduction to the thermostats*. Department of Mathematics, The University of California, San Diego, Recuperado el día: 3 de noviembre de 2020. Desde: <http://www.math.ucsd.edu/>.
- [44] R. Bernardi, M. Bhandarkar, A. Bhatele, E. Bohm, R. Brunner, R. Buch, F. Buelens, H. Chen, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, G. Fiorin, P. Freddolino, H. Fu, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, C. Harrison, J. Henin, W. Humphrey, D. Hurwitz, A. Hynninen, N. Jain, W. Jiang, N. Kraetz, S. Kumar, D. Kunzman, J. Lai, C. Lee, J. Maia, R. McGreevy, C. Mei,

- M. Melo, M. Nelson, J. Phillips, B. Radak, J. Ribeiro, T. Rudack, O. Sa-rood, A. Shinozaki, D. Tanner, P. Wang, D. Wells, G. Zheng, and F. Zhu. *NAMD User's Guide*. Theoretical and Computational Biophysics Group, Beckman Institute, University of Illinois., 2 de noviembre de 2020. Desde: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>.
- [45] Scott E. Feller, Yuhong Zhang, Richard W. Pastor, and Bernard R. Brooks. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11):4613–4621, 1995.
- [46] Daniel Herschlag and Margaux M. Pinney. Hydrogen Bonds: Simple after All? *Biochemistry*, 57(24):3338–3352, 2018.
- [47] G.A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997.
- [48] E. Arunan, G. R. Desiraju, R. A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D. C. Clary, R. H. Crabtree, J. J. Dannenberg, P. Hobza, H. G. Kjaergaard, A. C. Legon, B. Mennucci, and D. J. Nesbitt. Definition of the Hydrogen Bond. *Pure and Applied Chemistry*, 83(8):1619–1636, 2011.
- [49] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [50] Hans Rudolf Bosshard, Daniel N. Marti, and Ilian Jelesarov. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition*, 17(1):1–16, 2004.
- [51] Jason E. Donald, Daniel W. Kulp, and William F. DeGrado. Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(3):898–915, 2011.
- [52] D.J. Barlow and J.M. Thornton. Ion-pairs in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 168(4):867 – 885, 1983.
- [53] A. Karshikoff and I. Jelesarov. Salt Bridges and Conformational Flexibility: Effect on Protein Stability. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(1):606–611, 2008.
- [54] José L. Gázquez. Perspectives on the density functional theory of chemical reactivity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 52(1):3–10, 2008.
- [55] Robert Parr and Weitao Yang. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, 1995.
- [56] P. Geerlings, F. De Proft, and W. Langenaeker. Conceptual density functional theory. *Chemical Reviews*, 103(5):1793–1873, 2003.

- [57] Robert C. Morrison. The extended Koopmans' theorem and its exactness. *The Journal of Chemical Physics*, 96(5):3718–3722, 1992.
- [58] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235–242, 2000.
- [59] Yufeng Zhou, João H. Morais-Cabral, Amelia Kaufman, and Roderick Mackinnon. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K channel–Fab complex at 2 Å resolution. *Nature*, 414(6859):43–48, 2001.
- [60] James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, and Klaus Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1781–1802, 2005.
- [61] MacKerell Jr., Alexander D., Nilesh Banavali, and Nicolas Foloppe. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*, 56(4):257–265, 2000.
- [62] Boris A Reva, Alexei V Finkelstein, and Jeffrey Skolnick. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Folding and Design*, 3(2):141 – 147, 1998.
- [63] Nilmadhab Chakrabarti, Christopher Ing, Jian Payandesh, Ning Zheng, and William A. Catterall. Catalysis of Na⁺ permeation in the bacterial sodium channel NavAb. *PNAS*, 110(28):11331–11336, 2013.
- [64] Christopher Ing. *Hacking Structural Biology with Python and pandas*. GitHub repository, 2015. Desde: <https://github.com/cing/HackingStructBiolTalk>.
- [65] Frank Neese. The ORCA program system. *WIREs Computational Molecular Science*, 2(1):73–78, 2012.
- [66] L. Laaksonen. A graphics program for the analysis and display of molecular dynamics trajectories. *Journal of Molecular Graphics*, 10(1):33 – 34, 1992.
- [67] Rudiger Paschotta. *Band Gap*. RP Photonics Encyclopedia [En línea], Recuperado el día: 10 de septiembre de 2020. Desde: https://www.rp-photonics.com/band_gap.html.

Apéndice A

Código para el rastreo de especies en el filtro de selectividad

A continuación mostramos el código utilizado para rastrear las especies moleculares dentro del filtro de selectividad, el cual fue desarrollado por el grupo de investigación de Chakrabarti⁶³ para estudiar la catálisis de la permeabilidad del Na^+ en el canal de sodio bacteriano Na_vAb . La versión aquí utilizada fue adaptada al canal de potasio KcsA por el Mtro. José María Zamora en colaboración con la autora de la tesis.

```

#####
## Rastreo de las especies en KcsA          ##
##                                          ##
#####

#Librerías
from __future__ import print_function
import time
import numpy as np
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
plt.switch_backend('agg')
import matplotlib as mpl
mpl.rcParams.update({'font.size': 22})
import mdtraj as md
import sys

#Función para graficar
def plot_ts_by_order_points (coord_df, skip=5):
    f1, ax = plt.subplots(1)

    gdf = coord_df.sort_values(["Time", "Z"], ascending=(True, False))
    sizes = gdf.groupby(["Time"]).size().values
    gdf["Order"] = np.arange(sizes.sum()) - np.repeat(sizes.cumsum() - sizes
, sizes) # <-- Wizardry
    ordcolors=["red", "green", "blue", "purple", "orange", "pink", "aqua", "maroon"
]

    for ordatom, data in gdf.groupby("Order"):
        points = data[["Time", "Z"]].values
        ax.scatter(points[:,0][::skip], points[:,1][::skip], color=ordcolors
[ordatom], s=0.1)

    #ax.set_xlim([120,255])
    ax.set_title('Iones')
    ax.set_ylim([10, -10])
    ax.grid(True)
    ax.set_xlabel("Tiempo")
    ax.set_ylabel("Posición de iones")

    f1.gca().invert_yaxis()
    f1.set_size_inches(18.5, 5.5)
    plt.show()
    plt.savefig('ions.png')

```

```

## Leer la dinámica molecular

fdcd = sys.argv[1]
fpdb = sys.argv[2]
kcsa_traj = md.load(fdcd, top=fpdb)

##Extraer los iones

# Obtener el índice de los cinco residuos del filtro de selectividad
ref_residues = ['residue 79', 'residue 78', 'residue 77', 'residue 76', 'residue 75']
# Obtener todos los carbonos alpha de los residuos
ref_indices = kcsa_traj.topology.select("name CA and (" + " or ".join(ref_residues) + ")")
# Extraer la posición de todos los índices y sacar su media
ref_xyz = kcsa_traj.xyz[:,ref_indices,:].mean(axis=1)
print(ref_xyz.shape)

# Obtener el centro de masa
print('The center of mass is ',ref_xyz[0,:])

# Obtener una serie temporal de todos los iones
ion_indices = kcsa_traj.topology.select("name POT")

# Restarles el punto de referencia (cambio en los ejes)
ion_xyz = kcsa_traj.xyz[:,ion_indices,:].swapaxes(0,1) - ref_xyz

# Verificación booleana para determinar qué iones están dentro del cilindro de radio 0.165
ion_xyz2 = ion_xyz**2
inside_cylinder = (ion_xyz2[:,:,0]+ion_xyz2[:,:,1]) < 0.165**2 #Radio en angstroms
print(inside_cylinder.shape)
print("Total de iones en el cilindro en el frame 0: ", inside_cylinder[:,0].sum())

# Extraer el ID para cada ion
ion_index, time_index = np.where(inside_cylinder)
ion_index_in_whole_system = ion_indices[ion_index]
resids = [kcsa_traj.topology.atom(i).residue.resSeq for i in ion_index_in_whole_system]

## Construir un dataframe con estos datos

```

```

ion_positions_df = pd.DataFrame(ion_xyz[inside_cylinder]*10, columns=["X", "Y", "Z"])
ion_positions_df["ResidID"] = resid
ion_positions_df["Frame"] = time_index+1
ion_positions_df["Time"] =(time_index)*0.002
time_sorted_ions = ion_positions_df.sort_values('Time').reset_index(drop=True)
print(time_sorted_ions.count())
time_sorted_ions = time_sorted_ions[(time_sorted_ions["Z"] > -10) & (time_sorted_ions["Z"] < 10)]
print(time_sorted_ions.count())

# Crear los órdenes de entrada de los iones
gdf = time_sorted_ions.sort_values(["Time", "Z"], ascending=(True, False))
sizes = gdf.groupby("Time").size().values
gdf["TotalCount"] = np.arange(len(gdf))
gdf["RepeatCumSum"] = np.repeat(sizes.cumsum() - sizes, sizes)
gdf["Order"] = np.arange(len(gdf)) - np.repeat(sizes.cumsum() - sizes, sizes)
)
print(gdf)

## Graficar el dataframe
plot_ts_by_order_points(gdf)

```