INFORME FINAL

Simulación Computacional del Proceso de Conducción Iónica a través de Canales Iónicos Eucariotas

Autor: Francisco Javier Patiño López Curso: 2022/2023 Departamento: Química

Contenido

1.	. Abstract / Resumen						
2.	2. Introducción						
3.	3. Objetivos						
4.	Plan de trabajo						
5.	Μ	Marco teórico					
	5.1.	.1. Dinámica Molecular					
	5.2.	Campos de fuerza (Force Fields)					
	5.3.	ciones de contorno periódicas					
	5.4.	Termo	ostatos y baróstatos	11			
	5.5.	Teoría	a del funcional de densidad				
6.	R	Resultados					
	6.1. Montaje y descripción del sistema						
	6.2. Detalles computacionales						
	6.3.	Anális	sis de las Etapas de Minimización, Calentamiento y Equilibrado				
	6.4.	6.4. Análisis de la Etapa de Producción de la Simulación DEKAc					
		6.4.1.	Conductividad de iones				
		6.4.2.	Probabilidad de densidad y energía libre de Gibbs				
		6.4.3.	Coordinación del H2O				
	6.5.	Anális	sis de a Etapa de Producción de la Simulación DEKAp				
		6.5.1.	Conductividad de iones				
		6.5.2.	Análisis de la energía libre de Gibbs y de la probabilidad de densidad				
		6.5.3.	Análisis de la coordinación del H2O				
7.	7. Conclusiones						
8.	3. Bibliografía						

1. Abstract / Resumen

In this final degree project, the processes of ionic conduction in eukaryotic cells were explored, with a particular emphasis on the $hNa_V 1.4$ channel, through computational simulations using the classical Molecular Dynamics technique. This channel plays a crucial role in the propagation of action potentials in neurons and muscle cells. Therefore, a detailed investigation of its functioning can provide valuable information for the development of various therapeutic strategies aimed at treating pathologies associated with dysfunctions of this channel. Currently, the mechanism of ionic conduction through the channel is unknown, so the objective of this project is to investigate the relevant factors in the ion transport process, which will lead to a deeper understanding of the permeation processes that occur in this channel.

The channel modeling was performed using the CHARMM-GUI¹ and Pymol² programs. Subsequently, the Molecular Dynamics simulations were conducted using the NAMD³ program. The analysis of the data obtained from these simulations was carried out using analysis tools developed in Python by the research group. By utilizing these resources, the structural and dynamic properties of this channel were investigated by simulating realistic biological conditions. These analyses provided data on ion permeation rates and channel selectivity, among other parameters.

The results of this project revealed that the current theoretical model may not be completely accurate, as it predicts a higher conduction of potassium ions than of sodium ions, whereas the channel is known to be selective for sodium. One possible explanation for this discrepancy could lie in an imprecise description of ion-water interactions. Specifically, it was observed that potassium ions dehydrate more easily than sodium ions within the channel, facilitating their permeation.

En el trabajo de final de grado, se exploraron los procesos de conducción iónica en células eucariotas, haciendo especial énfasis en el canal hNav1.4 a través de simulaciones computacionales mediante la técnica de Dinámica Molecular clásica. Este canal tiene un rol muy importante en la propagación de potenciales de acción en neuronas y células musculares, por lo tanto, una investigación detallada de su funcionamiento puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de diversas estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento de patologías asociadas con las disfunciones de este canal. Actualmente el mecanismo de conducción iónica a través del canal se desconoce, por lo que el objetivo de este proyecto es investigar los factores relevantes en el proceso de transporte de iones, lo que permitirá adquirir un entendimiento más profundo sobre los procesos de permeación que ocurren en este canal.

La modelización del canal se realizó con los programas CHARMM-GUI¹ y Pymol². Posteriormente las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el programa NAMD³. El análisis de los datos obtenidos a partir de estas simulaciones fue realizado utilizando herramientas de análisis desarrolladas en Python por el grupo de investigación. Utilizando estos recursos se investigaron las propiedades estructurales y dinámicas de este canal simulando unas condiciones biológicas más realistas. Estos análisis permitieron obtener datos sobre los ratios de permeación de los iones o la selectividad del canal, entre otros.

Los resultados de este proyecto evidenciaron que el modelo teórico actual puede no ser completamente preciso, ya que predice una mayor conducción de iones de potasio, siendo dicho canal selectivo al sodio. Una posible explicación de esta discrepancia podría residir en una descripción imprecisa de las interacciones ion/agua. Específicamente, se observó que los iones de potasio se deshidratan más fácilmente que los de sodio dentro del canal, lo que facilitaba su permeación.

2. Introducción

En este trabajo se llevará a cabo la modelización y el estudio computacional del proceso de conducción iónica en canales iónicos eucariotas, concretamente en el canal de sodio humano, Nav1.4. Los procesos de conducción iónica son esenciales para el funcionamiento de los sistemas biológicos, ya que regulan la actividad neuronal, muscular y endocrina, entre otros procesos.⁴ Las simulaciones computacionales se han convertido en una herramienta importante para comprender la dinámica y el mecanismo de este proceso, lo que puede ayudar a desarrollar nuevas terapias y medicamentos para tratar enfermedades asociadas con el mal funcionamiento de los canales iónicos. En concreto, el canal que se estudia, el hNav1.4, está implicado en los trastornos musculares hereditarios y adquiridos, por lo que el estudio de sus mecanismos moleculares podría conducir a nuevas estrategias terapéuticas.⁵

La proteína de la membrana del canal Na_V1.4, representada en la Figura 1, es un canal iónico transmembrana activado por voltaje que juega un papel crucial en la generación y propagación de los potenciales de acción en las células musculares esqueléticas. Este canal se activa en respuesta a una despolarización del potencial de membrana, lo que implica un incremento en dicho potencial. Como resultado, se permite la entrada de iones de sodio en la célula, lo cual conduce a la generación de un potencial de acción y a una modificación en la distribución de carga eléctrica a lo largo de la membrana celular.⁶ Durante un potencial de acción, los canales iónicos se abren y permiten el flujo de iones a través de la membrana, lo que lleva a cambios rápidos en la polaridad de la membrana. En el caso de las neuronas, esto permite la propagación de señales eléctricas a lo largo del axón y, finalmente, la comunicación con otras células a través de las sinapsis.



Figura 1. A. Representación del sistema a estudio con la proteína con identificador 6AGF imbuida en una bicapa lipídica simulando un ambiente in-vivo. **B.** Corte transversal de la proteína en el que se representan los TM5 y TM6, se encuentra señalizados el filtro selectivo y la puerta del canal.

En el estudio de los canales iónicos de sodio es importante diferenciar entre los procariotas y los eucariotas. Ambos tipos de canales comparten la misma estructura básica, la cual está formada por cuatro dominios (DI-DIV), y cada uno de ellos está dividido en seis segmentos transmembrana (TM1-TM6), como se representa en la Figura 2. Sin embargo, su principal diferencia se encuentra en el filtro selectivo, ubicado en el P-Loop que conecta los segmentos transmembrana cinco y seis (TM5-TM6). En el caso de los canales iónicos procariotas, el filtro se encuentra compuesto por cuatro glutamatos (EEEE), mientras que, en los canales de sodio eucariotas, el filtro selectivo está formado por aspartato (D), glutamato (E), lisina (K) y alanina (A), también conocido como DEKA. Además, en los canales de sodio eucariotas, los dominios están unidos de forma covalente, mientras que en los canales procariotas la interacción entre los cuatro dominios es no covalente.⁷



Figura 2. Descripción esquemática de las distintas partes presentes en los canales eucariotas.

El mecanismo de apertura del canal hNa_V1.4, que se induce manualmente en las simulaciones de este trabajo para minimizar el tiempo de cálculo y acelerar el flujo iónico, transita a través de tres estados conformacionales distintos: estado de reposo (cerrado), estado activado (abierto) y estado inactivado (cerrado). El mecanismo subyacente que regula la transición entre la apertura y el cierre del canal involucra los siguientes pasos que han sido representados en la Figura 3:⁵

- (i) Tras la despolarización de la membrana, los sensores del voltaje en el TM4 se mueven hacia la superficie extracelular, la cual hace que el canal se abra brevemente (<1ms).
- (ii) Tras ello los iones de sodio permean al medio intracelular lo cual produce una despolarización de la membrana que provoca un aumento del potencial de acción.
- (iii) Tras unos milisegundos, los canales de sodio son rápidamente inactivados, lo cual es debido a la caída del potencial de acción tras la permeación de los sodios y que da lugar al estado de inactivación. Esta inactivación se da en una escala de tiempo de entre 1-5 ms. Esta rápida

inactivación se da cuando en el canal detiene la conducción iónica, mientras que los dominios sensibles al voltaje están en una conformación activa, lo cual es posible gracias al triplete IFM.

- (iv) El canal entra en un estado inactivación lenta en respuesta a la prolongada despolarización o a la rápida repetición del movimiento de apertura. Este proceso puede durar desde segundos a minutos.
- (v) Cuando los residuos del TM4 vuelven a su conformación original de descanso tras la repolarización de la membrana, el canal de sodio se recupera de la inactivación y se desactiva.

Los movimientos de apertura y cierre del canal están mediados por el movimiento hacia la superficie extracelular o intercelular de los segmentos TM4 de cada dominio.



Figura 3. Descripción esquemática del mecanismo de apertura y cierre de un canal iónico de sodio activado por voltaje.

En el caso de los canales eucariotas de sodio activados por voltaje, se cree que el principal motivo de la selectividad al sodio frente a otros cationes, como el potasio y el calcio, reside en la posición y el rol que toma la lisina en el filtro selectivo, pero aún no se ha podido demostrar o explicar el mecanismo en detalle. Sin embargo, se han postulado varias hipótesis con respecto a la importancia de la lisina del filtro selectivo:⁸

- La lisina disminuye el número de coordinación del metal ya que, al no ser un ligando metálico, no se coordina con el sodio. Así solo los otros tres residuos del filtro selectivo se coordinarán con el catión metálico.
- (ii) Su presencia reduce la carga negativa del filtro selectivo, lo que acentúa la selectividad del sodio frente al calcio al tener este último una mayor carga positiva.

- (iii) Ajusta y aumenta la rigidez del poro del filtro selectivo mediante interacciones tipo enlace de hidrógeno con los residuos próximos a ella. Esto optimiza la forma del poro para que se ajuste mejor al tamaño del sodio, aumentando así su selectividad frente a dicho ion.
- (iv) La posición de la lisina es crucial para la selectividad, ya que hace más rígido el DEKA. Por ejemplo, si mutamos el filtro y cambiamos la posición de la lisina (K) con el glutamato (E), obteniendo el filtro DKEA, perdemos toda la selectividad frente a los cationes de sodio, ya que en el DKEA la lisina interactúa con los oxígenos que no están coordinados con el sodio del aspartato (D) y del glutamato (E), mientras que en el DEKA lo hace con los oxígenos coordinados al sodio del glutamato (E) y la alanina (A), haciendo así más rígido el poro y acomodándose mejor al tamaño del sodio.

Una vez comentados los aspectos más importantes relativos a los motivos de la selectividad del canal frente al sodio y los principales aspectos en los que se ven involucrados los factores determinantes de la conductividad iónica, se procederá a la descripción de los objetivos de este trabajo: la modelización de la conducción iónica en el canal eucariota de sodio hNav1.4.

3. Objetivos

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es investigar el mecanismo de conducción iónica a través del canal iónico hNa_V1.4 mediante simulaciones de Dinámica Molecular clásica, de manera que se obtengan los factores que influyen en la selectividad del canal por el sodio frente a otros iones.

Los objetivos específicos son:

- Aprendizaje de los programas de visualización GaussView⁹, PyMol² y VMD¹⁰ ("Visual Molecular Dynamics") para mostrar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares; programa de generación de archivos de entrada y de configuración de sistemas biomoleculares para simulaciones de dinámica molecular CHARMM-GUI¹; programa de dinámica molecular NAMD³; programa para realizar cálculos cuánticos Gaussian09⁹; programa de análisis de datos CPPTRAJ en Amber¹¹ para el procesamiento de los archivos de trayectorias, además de códigos diseñados en el grupo de investigación en Bash y Python para el análisis de los resultados.
- Validación del campo de fuerzas usado en el cálculo de fuerzas durante la dinámica.
- Comparación de los análisis entre las diferentes simulaciones, las realizadas antes de la reparametrización de las cargas del DEKA y las posteriores.

4. Plan de trabajo

<u>-Semanas 1-3</u>: Se realizó la búsqueda bibliográfica y se aprendió el manejo de los programas de visualización Pymol², VMD¹⁰ y GaussView⁹; del programa de dinámica molecular NAMD³; y de los programas de análisis desarrollados en el grupo en Bash y Python y el programa CPPTRAJ¹². Los programas NAMD³ y CPPTRAJ¹² se aprendieron a través de tutoriales encontrados en su página web.

<u>-Semanas 4-6:</u> Preparación del sistema con los programas CHARMM-GUI¹ y Pymol², y realización de los primeros cálculos de dinámica que incluyen el minimizado, calentamiento y el equilibrado/producción realizados con NAMD³. De ahora en adelante la parte del trabajo en la que se utilizan las cargas proporcionadas por el campo de fuerza CHARMM36m¹³ se denominará DEKAc.

<u>-Semanas 7-8</u>: Se realizaron los análisis de los resultados del DEKAc, se procedió a terminar la escritura de este informe y se comenzaron los cálculos correspondientes a la reparametrización de las cargas del DEKA y la simulación de dinámica molecular de la misma, de ahora en adelante denominada DEKAp.

-Semanas 9-10: Reparametrización del campo de fuerzas del filtro DEKA media cálculos cuánticos.

<u>-Semanas 11-12</u>: Simulaciones de dinámica molecular con las nuevas cargas para el DEKA: minimización, calentamiento, apertura del "gate" y aplicación del campo eléctrico externo durante el equlibrado/producción, con la reparametrización del DEKA.

<u>-Semana 13:</u> Análisis de los resultados del DEKAp, comparación con los obtenidos en el DEKAc. El análisis de estos resultados incluye, la conductividad iónica, el análisis de la energía libre de Gibbs, de la densidad de probabilidad y del estudio de la coordinación de los iones con moléculas de agua, además también se realizaron estudios para asegurar que el sistema estaba en equilibrio durante todo el proceso (RMSD, evaluación de la energía a lo largo del proceso...)

-Semanas 14-16: Redacción del manuscrito final y preparación de la defensa oral.

5. Marco teórico

5.1. Dinámica Molecular

En este estudio se modelizó el transporte iónico a través de un canal iónico integrado en una membrana lipídica. La simulación de sistemas tan grandes formados por miles de átomos requiere el uso de métodos aproximados de mecánica clásica, como es el caso de la Dinámica Molecular clásica, esta metodología se basa en las ecuaciones de Hamilton. Estas ecuaciones describen cómo evoluciona el sistema de partículas a lo largo del tiempo, teniendo en cuenta tanto la energía cinética como la potencial de las partículas. La formulación de Hamilton proporciona un marco teórico sólido para simular el comportamiento de sistemas moleculares y permite predecir el movimiento de los átomos en función de las fuerzas que actúan sobre ellos:

$$\frac{\partial p_i}{\partial t} = -\frac{\partial V(q_i)}{\partial q_i} \tag{1}$$

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{\partial T_i(p_i)}{\partial p_i} \tag{2}$$

En estas Ecuaciones p_i es el momento lineal del átomo i; V es la energía potencial del sistema; t es el tiempo; T_i es la energía cinética asociada al movimiento del átomo y q_i son las coordenadas del átomo i.

La resolución de las ecuaciones requiere el cálculo del gradiente de la energía potencial como se ve en la Ecuación 1, este gradiente puede ser resuelto de tres maneras distintas:

- (i) Ecuación de Schrödinger, método ab initio Dinámica Molecular.
- (ii) Campos de fuerza de mecánica clásica, método de Dinámica Molecular clásica.
- (iii) Mezcla entre la resolución de la ecuación de Schrödinger y la resolución de los campos de fuerza de mecánica clásica dando lugar al método de Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM).

Las Ecuaciones 1 y 2 no pueden ser resueltas de manera exacta, sino que tienen que ser resueltas de manera aproximada, para conocer la evolución temporal de las coordenadas y momentos, mediante la utilización de series de Taylor truncadas hasta el tercer término (segundo orden), llegando así al algoritmo de velocidad de Verlet¹⁴, que se basa en las Ecuaciones 3 y 4:

$$q(t + \Delta t) = q(t) + \Delta t \cdot v(t) - \frac{\Delta t^2}{2m} \cdot \frac{dV(t)}{dq}$$
(3)

$$v(t + \Delta t) = v(t) - \frac{\Delta t}{2m} \left(\frac{dV(t + \Delta t)}{dq} + \frac{dV(t)}{dq}\right)$$
(4)

En las Ecuaciones 3 y 4 las variables son las siguientes, la evolución de las coordenadas y de la velocidad en un paso de tiempo muy pequeño denotadas respectivamente por $q(t + \Delta t)$ y $v(t + \Delta t)$, cabe destacar que el cálculo de coordenadas y momentos de un paso $t + \Delta t$ se hace a partir del cálculo de coordenadas y momentos del paso anterior, una iteración de dinámica molecular se compone de cinco etapas:

(i) Para calcular las posiciones con la evolución del tiempo primero se definen unas coordenadas $q_0(t)$ y velocidades iniciales $v_0(t)$. A partir de estos valores se determinan las coordenadas internas de cada átomo tales como distancias de enlace, ángulos de enlace o diedros.

Al principio de la simulación (t=0), las coordenadas iniciales se obtienen de un banco de datos de datos experimentales o de cálculos de mecánica cuántica. En nuestro caso han sido obtenidas del PDB (Protein Data Bank). Si no se especifican unas velocidades, estas se derivan utilizando probabilidades ρ (v_i) (Ecuación 6), de una distribución de velocidades de Boltzmann, v_i , elegidas a la temperatura a la que va a ser realizada la simulación, *T*. Los valores son elegidos tal que el momento total (Ecuación 5) sea igual 0.

$$p_i = \sum_i^N m_i v_i^2 \tag{5}$$

$$\rho\left(\nu_{i}\right) = \left(\frac{m_{i}}{2\pi k_{B}T}\right)^{3/2} \cdot 4\pi\nu^{2} \cdot e^{-\frac{m^{2}\nu}{k_{B}T}}$$
(6)

 (ii) En las simulaciones clásicas de Dinámica Molecular se emplean campos de fuerza para calcular la energía potencial total del sistema a partir de la suma de los términos potencial individuales. Una vez la superficie de energía potencial del sistema se conoce, se puede calcular su correspondiente fuerza.

- (iii) En base a la superficie de energía potencial hallada en el paso (ii) que corresponde solamente a un conjunto de coordenadas internas, la fuerza se puede calcular con la Ecuación 1.
- (iv) Al determinar las fuerzas, es posible calcular las aceleraciones correspondientes para cada átomo utilizando la Ecuación 3.
- (v) Conociendo el valor de la aceleración y empleando un integrador numérico se pueden actualizar las nuevas posiciones atómicas y sus velocidades para repetir el proceso.

5.2. Campos de fuerza (*Force Fields*)

En este trabajo hemos utilizado Dinámica Molecular clásica donde el gradiente de energía potencial se calcula mediante un campo de fuerza. Los campos de fuerza son un conjunto de ecuaciones y parámetros que describen las interacciones atómicas y determinan la energía potencial de un sistema. Estos modelos matemáticos incluyen términos potenciales representativos de interacciones enlazantes (enlaces, ángulos de enlace y torsiones diédricas) e interacciones no enlazantes (fuerzas de van der Waals y electrostáticas). El cálculo total de las interacciones para un sistema viene dado por la Ecuación 7:

$$V_{total} = \sum_{i=1}^{N_{enlazante}} V_{enlazante} + \sum_{i=1}^{N_{no enlaz.}} V_{no enlazante}$$
(7)

En las que las fuerzas enlazantes se definen según la Ecuación 8:

$$V_{enlazante} = \sum_{i=1}^{N_{enlace}} \frac{1}{2} k_B (r - r_o)^2 + \sum_{i=1}^{N_{angulo}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{i=1}^{N_{angulo}} k_t (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$
(8)

En los dos primeros términos de la energía potencial enlazante, se describen la energía potencial entre dos átomos enlazados directamente y entre dos átomos separados por dos enlaces (término angular) como potenciales armónicos, mientras que la interacción entre dos átomos separados por tres enlaces (término diedro) se describen empleando la ecuación de Fourier. La energía potencial de dos átomos enlazados directamente se compone por la constante de fuerza k_B , la distancia entre los átomos, r, y la distancia de equilibrio entre ellos, r_o . Para el segundo término, correspondiente a la energía potencial de dos átomos separados por dos enlaces es definida por, k_a que es la constante de fuerza, θ que es el ángulo entre los átomos a estudio, y θ_o , el ángulo de equilibrio entre ellos. En el tercer término, se encuentra definida la energía potencial de la función, k_t es la constante de fuerza del diedro y γ es el desplazamiento de fase.

Las fuerzas no enlazantes se describen en la ecuación 9:

$$V_{no\ enlaz.} = \sum_{i>j}^{N_{electróst}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{6} \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}}$$
(9)

Por definición, las fuerzas no enlazantes solo se aplican a pares de átomos separados por al menos tres enlaces, las energías de van der Waals (interacciones de corto alcance) se han calculado con un potencial de Lennard-Jones 12-6, mientras que las interacciones coulombicas (interacciones de largo alcance) corresponden al último término de la ecuación. El término $R_{min_{ij}}$ es el potencial de Lennard-Jones cuando cruza el eje x (cuando el potencial de Lennard-Jones es 0) ; el término r_{ij} corresponde a la distancia a la que se encuentran los átomos; $q_i y q_j$ se refiere a la carga de cada átomo, ϵ_{ij} es el mínimo de energía entre los átomos i y j y por último ϵ_0 es la permitividad eléctrica del medio en el que se trabaja.

Cada campo de fuerzas utiliza su propia función de energía potencial y la que se ha mostrado anteriormente es la empleada por CHARMM¹ y la utilizada en este trabajo. Existen otros términos enlazantes y no enlazantes en distintos campos de fuerzas, por ejemplo: torsiones impropias (ángulos fuera del plano que se utilizan para mantener la planaridad de ciertos grupos, como los anillos aromáticos) y términos cruzados o fuera del plano (enlace-ángulo, ángulo-ángulo, ángulo-diedro, etc.). Muchos campos de fuerzas no tienen en cuenta términos cruzados ya que el coste computacional aumenta considerablemente.

5.3. Condiciones de contorno periódicas

El entorno acuoso desempeña un papel crucial en el sistema, permitiendo el desarrollo de sus funciones biológicas bajo condiciones más realistas. Durante una simulación de Dinámica Molecular, se crea una caja de tamaño y configuración que dependen de la geometría del sistema, incluyendo moléculas de agua localizadas en los márgenes. El número máximo de átomos con el que se puede realizar un cálculo de Dinámica Molecular es entre 10⁵ y 10⁶ átomos, en una cedilla unidad cúbica como es la utilizada en este trabajo, solamente un 6% de los átomos se encuentran en la cara del cubo que se repetirá, por lo que la mayoría de las propiedades que se originan de las interacciones que ocurren en la superfície no se puede ignorar.

Para evitar interacciones entre el sistema y el vacío que lo rodea, las cuales podrían introducir problemas en la simulación, se emplean condiciones de contorno periódicas (*Periodic Boundary Conditions*, PBC), las cuales simulan un ambiente infinito a través de la replicación periódica del sistema en todas las direcciones. Estas condiciones de contorno ayudan a describir mejor un sistema macroscópico en donde hay un gran número de moléculas de agua, proporcionando una representación adecuada del entorno biológico y facilitando la comprensión de las propiedades y comportamientos de las moléculas en solución acuosa. Las PBC son un método para aproximar el sistema a uno "infinito" utilizando una "celdilla unidad".

Para simular de manera realista estas interacciones, se utilizan las condiciones de contorno periódico, construyendo así un sistema infinito. Las ecuaciones de dinámica (las ecuaciones de Hamilton) sólo son resueltas en el sistema principal y reproducidas en el resto de "copias", de manera que el coste computacional es reducido.

Para evitar el cálculo de infinitos términos en la energía de interacción, las interacciones no enlazantes de corto alcance solamente se calculan en un radio de corte especifico (*cutoff radii*, r_c) a partir del cual su contribución pasa a ser despreciable, pero las interacciones electroestáticas de largo alcance no son tratadas de la misma

manera ya que no se pueden truncar a distancias cortas porque su valor aún sigue siendo importante. Para estas interacciones utilizamos la aproximación de la suma de Ewald (*Ewald Summation Approach*¹⁵). Esta aproximación se basa en transformar las interacciones de largo alcance en interacciones de corto alcance, de manera que a cada átomo se le asigna una densidad electrónica del signo opuesto para apantallar su carga y transformar las interacciones de largo alcance en interacciones de la corto alcance.¹⁶ Después del cálculo de las interacciones, se añade una densidad electrónica de igual magnitud que la primera pero de signo contrario para deshacer el cambio hecho inicialmente.

5.4. Termostatos y baróstatos

Para realizar cálculos de Dinámica Molecular en sistemas biológicos, es muy importante reproducir las condiciones fisicoquímicas en las que se encontraría el sistema a estudio en un medio in-vivo de manera fidedigna. Para ello es necesario reproducir las condiciones de presión, volumen y temperatura, entre otros, que necesitemos de una manera realista. Para que esto sea posible se utilizan una serie de aproximaciones computacionales para controlar un conjunto de variables que queremos tener fijas a lo largo de la simulación: baróstatos, para mantener la presión constante y termostatos, para mantener la temperatura del sistema al valor deseado.

Las simulaciones en este trabajo se han llevado en dos entornos diferentes, en el proceso de calentamiento, el sistema se encontró bajo un conjunto NVT o conjunto canónico en el cual el número de partículas, el volumen y la temperatura se encuentran como parámetros constantes. El volumen se mantiene constante durante el calentamiento para evitar la expansión del sistema.

Mientras que en el proceso de equilibrado y producción se utilizó un conjunto NPT, en el cual los parámetros tratados como constantes han sido el número de partículas, la presión y la temperatura. El volumen no se ha tratado como un parámetro constante ya que de esta manera se puede equilibrar la densidad del sistema al valor deseado mediante el incremente o la disminución de las dimensiones de la caja de simulación en la etapa de equilibrado. Una vez la densidad ha tomado el valor deseado y las propiedades del sistema no van a sufrir cambios bruscos, se ha comenzado la etapa de producción en la cual se ha analizado la simulación.

En ambos se ha utilizado un termostato de Langevin¹⁷ para mantener la temperatura constante, es un termostato que utiliza un control estocástico, es decir, los valores de las variables son acoplados a ciertas propiedades termodinámicas de acuerdo con las ecuaciones de movimiento modificadas en las cuales se han añadido ciertos grados de libertad de manera estocástica para encontrar el valor adecuado a la función termodinámica a la que ha sido acoplado.

El termostato de Langevin¹⁷, que fue el utilizado a lo largo de este trabajo, para mantener la temperatura constante, utiliza partículas ficticias colisionando con las de nuestro sistema para controlar la temperatura. Este método se define según la Ecuación 10, la cual describe el movimiento de una partícula debido a la agitación en un baño térmico.

$$\frac{\partial p_i}{\partial t} = -\frac{\partial V}{\partial q_i} - \gamma p_i + F^+ \tag{10}$$

En donde γ es una constante de fricción, un mayor valor para esta variable incrementara las fluctuaciones de temperatura mientras que si se iguala a 0, el sistema se ve reducido a un conjunto microcanónico (NVE, cantidad de átomos, volumen y energía son constantes) y F^+ es una fuerza gaussiana aleatoria.

En la producción también se introdujo el baróstato de Nosè-Hoover Langevin^{18,19} en el cual se introduce un grado de libertad al Hamiltoniano el cual controla las fluctuaciones del volumen, la idea es incluir el volumen como un grado de libertad adicional.

El Hamiltoniano expandido por el cual se encuentra definida la energía total del sistema viene descrito en la Ecuación 11:

$$\mathcal{H}^* = E_K + E_P + \frac{1}{2}Q\frac{\partial q^2}{\partial t} + P_{md} \cdot q \tag{11}$$

En donde $E_K y E_P$ son la energía cinética y potencial del sistema, Q es la masa del pistón, q son las coordenadas y P_{md} es la presión externa del sistema. La evolución con el tiempo de estas variables es determinada por las ecuaciones de movimiento descritas por el Hamiltoniano expandido.

5.5. Teoría del funcional de densidad

En el estudio de los canales iónicos es muy importante un tratamiento adecuado de las cargas de los aminoácidos que se encuentran en la proteína (especialmente de los que se encuentran en el filtro selectivo), por ello es importante adecuar las cargas lo mejor posible a la realidad, para ello se ha realizado un reparametrización de la cargas del filtro DEKA, con un cálculo cuántico a un nivel de teoría del funcional de densidad. Un funcional es una expresión matemática que depende de una función que a su vez depende de varias variables. En la teoría del funcional de densidad (DFT por sus siglas en inglés, *Density Functional Theory*)²⁰, le energía electrónica se expresa como un funcional de la densidad electrónica:

$$E_e = F[\rho(q)] \tag{12}$$

El primer teorema de Hohenberg y Khon²¹ sostiene que cualquier propiedad del estado fundamental puede ser calculada a partir de la densidad electrónica, la cual siempre tiene que ser positiva y cuya integración en todo el espacio debe proporcionar el número de electrones total (Ecuaciones 13 y 14),

$$\rho(r) \ge 0 \tag{13}$$

$$N = \int \rho(q) \, dq \tag{14}$$

Esta densidad electrónica también determina el potencial externo al que están sometidos los electrones, este potencial externo, en el caso de sistemas moleculares aislados en ausencia de campos externos como en este estudio, se define como la energía de interacción entre los electrones y los núcleos. Así, la energía electrónica se puede escribir de la siguiente manera:

$$E_e(\rho) = F_{HK}(\rho) + E_{ext}(\rho) \tag{15}$$

La energía electrónica está formada por el potencial de Hohenberg y Kohn (Ecuación 16) y el potencial externo que sufren los electrones (Ecuación 17):

$$F_{HK}(\rho) = T_e(\rho) + E_{ee}(\rho) \tag{16}$$

$$E_{ext}(\rho) = \int V_{ext} \cdot \rho(r) \, dr \tag{17}$$

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn²¹ sostiene que la densidad electrónica exacta del estado fundamental es aquella que minimiza la energía. Esto es conocido como el teorema variacional (Ecuación 18)

$$\frac{\partial E_e(\rho)}{\partial \rho} = 0 \tag{18}$$

El problema del teorema variacional es que no se conoce la relación entre la $T_e(\rho)$ y la densidad electrónica, por lo tanto, no podemos obtener la energía de manera exacta. Debido a esto, nace el método de Kohn-Sham²², donde se supone que tenemos un sistema de referencia donde los electrones no interaccionan entre ellos, y donde su energía electrónica viene definida por la Ecuación 19:

$$E_{e,r}(\rho) = T_{e,r}(\rho) + E_{ext,r}(\rho)$$
⁽¹⁹⁾

En este sistema de referencia (Ecuación 19) la energía de referencia puede ser calculada de manera exacta. Gracias a ello podemos definir la energía de correlación e intercambio ($E_{xc}(\rho)$), la cual es definida como la diferencia energética entre el sistema de referencia y el sistema real (Ecuación 20):

$$E_{xc}(\rho) = E_e(\rho) - E_{e,r}(\rho)$$
⁽²⁰⁾

Las energías de correlación e intercambio son dos tipos de energías de naturaleza cuántica que son las que se ignoran en el sistema de referencia y que no se pueden calcular de manera exacta, pero se han desarrollado distintos funcionales para describirla, es decir, se han descrito funcionales para parametrizar esta energía de manera que reproduzcan propiedades calculadas de manera realista.

En resumen, el método DFT, sería variacional si se conociera de manera exacta la energía de correlación de intercambio, pero esta no se conoce de manera exacta, por lo que en la práctica el método DFT no es variacional, aún así, las ecuaciones en las que se basa este método, se resuelven buscando la densidad electrónica que minimice la energía, sabiendo así que se pueden obtener energías por debajo de la exacta, por lo que hay que ser especialmente cuidadoso cuando se trabaja con este método.

6. Resultados

6.1. Montaje y descripción del sistema

Para realizar el montaje del sistema, primero se partió de la estructura cristalográfica de la proteína correspondiente al canal hNav1.4 obtenida de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*), con el ID 6AGF²³. A la hora de preparar el sistema para el posterior cálculo de Dinámica Molecular, el primer paso que se hizo fue la realización de un corte al canal iónico, ya que el poro está formado por los fragmentos TM5-TM6, mientras que los fragmentos TM1-TM4 son los segmentos transmembrana que conforman el dominio sensible al voltaje, que son los responsables de la apertura y cierre del canal. Este proceso se realizó con el programa

Pymol². Tras la eliminación de los segmentos TM1-TM4, se procedió al montaje del sistema con ayuda del programa CHARMM-GUI¹.

Una vez se tuvieron los segmentos transmembrana de interés (TM5 y TM6) para el estudio, se realizó el montaje del sistema con la ayuda del programa CHARMM-GUI¹, donde se generaron los archivos para la simulación en los que se encuentra la información necesaria para realizar los cálculos de Dinámica Molecular (nombres de átomos, cargas parciales, enlaces, información de los campos de fuerza...). Los archivos más importantes generados por el programa CHARMM-GUI¹ han sido el archivo .pdb, en el cual se encuentran las coordenadas de todo el sistema, el archivo .psf en el que se encuentran los datos correspondientes a los campos de fuerza utilizados y los ficheros de entrada en los que se definen diversas variables como el número de pasos, el termostato y el baróstato que han sido utilizados, el radio de corte... Con el programa CHARMM-GUI¹ se añadió al sistema una bicapa lipídica constituida por lípidos POPC (Phosphatidylcoline) y los iones (Na⁺, K⁺, Cl⁻) que neutralizaron el sistema, con una concentración adicional de 0.150 M por cada electrolito (0.15 M para el KCl y 0.15 M para el NaCl) (Figura 1), simulando las condiciones iónicas encontradas en el cuerpo humano para aumentar la fidelidad de la simulación. Por último se introdujeron las moléculas de agua (descritas por el campo de fuerza TIP3P²⁴) al sistema para recrear las condiciones biológicas que se encontrarían en una membrana lipídica eucariota. Para mejorar los resultados de las simulaciones llevadas a cabo se sustituyeron los campos de fuerza utilizados en los iones con el programa CHARMM36m¹³, por los obtenidos en el artículo de investigación Joung, 2008²⁵ (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de Lennard-Jones para los iones Na, K y Cl en CHARMM36m y desarrollados por Joung.

	Radio de van der Waals/2 (Å)		ϵ_{ij} (kcal/mol)	
	Joung, 2008 ²⁵	CHARMM36m ¹³	Joung, 2008 ²⁵	CHARMM36m ¹³
Na ⁺	1.369	1.411	-0.0874	-0.0469
K ⁺	1.705	1.764	-0.1937	-0.0870
Cl-	2.513	2.270	-0.0355	-0.150

Debido a la eliminación de los segmentos transmembrana responsables de la apertura del canal (TM1-TM4), los cuales están compuestos por aminoácidos cargados positivamente y cumplen la función de regular la conformación (abierta, cerrada o inactivada) del sistema, se realizó la apertura manual del poro mediante la introducción de tres átomos fantasma a lo largo del poro hasta la puerta del canal. La introducción de estos tres átomos fantasma se realizó de la siguiente manera:

- (i) Se seleccionaron cuatro residuos enfrentados entre sí en la puerta del canal. Este proceso se hizo tres veces a lo largo del poro. Se realizó desde el poro hasta el *gate* para que la apertura del poro fuese gradual, evitando así la deformación de la proteína.
- (ii) Se calculó el centro geométrico de los cuatro residuos enfrentados y se situaron en él los átomos fantasma.

Los átomos fantasma no tienen carga, solamente interaccionan con los demás mediante el potencial de Lennard-Jones, variando el radio de van der Waals, el cual se fue aumentando (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0Å) para realizar la apertura durante el proceso de producción (los detalles computacionales de este proceso

son mencionados posteriormente), bajo un entorno NPT sin la influencia de un campo eléctrico externo sobre el canal.

6.2. Detalles computacionales

Para la realización de los cálculos de Dinámica Molecular el trabajo se dividió en dos simulaciones, en la primera simulación las cargas del DEKA con las que se realizó el cálculo son las proporcionadas por el campo de fuerzas CHARMM36m¹³ (DEKAc), mientras que en la segunda simulación se calcularon las cargas mediante la realización de un cálculo cuántico a nivel DFT para la obtención de las cargas de Merz-Singh-Kollman, que son las cargas que reproducen el potencial electroestático cuántico (DEKAp).

Para la realización del cálculo de dinámica molecular se llevaron a cabo las siguientes etapas²⁶:

- (i) Minimización: en este proceso se utiliza el método del gradiente conjugado con el cual se buscó el estado de mínima energía del sistema, o al menos un mínimo local, variando las posiciones de los átomos siguiendo el gradiente de energía. Para la realización de este proceso se fijaron los siguientes parámetros en el input: la minimización se realizó en 10000 pasos, en esta etapa ya estaban presentes los átomos fantasma congelados a lo largo del poro; se utilizó la aproximación de la suma de Ewald¹⁵ para el cálculo de las interacciones electrostáticas de largo alcance, y la interacciones electrostáticas de corto alcance fueron calculadas con un radio de corte de 12Å.
- (ii) Calentamiento: proceso para llevar a nuestro sistema a un conjunto termodinámico concreto, en esta parte de la dinámica se utilizará un conjunto NVT, utilizando el termostato de Langevin¹⁷. En nuestro caso se dividió el proceso de calentamiento en tres etapas para conseguir la temperatura final deseada. La primera etapa del calentamiento consistió en llevar el sistema de cero a 100 K; la segunda etapa del calentamiento de 100K a 200K; y la tercera y última etapa de 200K a 303.15K. Cada etapa del calentamiento fue llevada a cabo durante 5 ns con un tamaño de paso de 2 fs, lo cual lleva a un número total de pasos para cada etapa de 2 500 000 pasos. Se utilizó la aproximación de la suma de Ewald¹⁵ para el cálculo de las interacciones electrostáticas de largo alcance, y las interacciones de corto alcance (interacciones de van de Waals) fueron descritas con el potencial de Lennard-Jones aplicando un radio de corte (*cutoff*) de 12Å.
- (iii) Equilibrado/Producción: en esta etapa se equilibró la densidad y la estructura del sistema utilizando el conjunto NPT, en donde la presión y la temperatura se controlaron con el baróstato de Nosè-Hoover Langevin^{18,19} y el termostato de Langevin,¹⁷ respectivamente. El proceso de producción se dividió en las siguientes partes:
 - Equilibrado de la densidad y apertura del canal. Se realizaron siete simulaciones en donde el radio de van der Waals se fue incrementando de manera paulatina para abrir el canal: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 Å. En las 2 primeras simulaciones el movimiento de los átomos de la proteína se ha restringido mediante un potencial armónico con una constante de fuerza de 2.5 N·m⁻¹. En la tercera y cuarta simulación el valor de la constante de fuerza se disminuyó a 0.5 N·m⁻¹ y en las dos últimas el potencial armónico se eliminó. Cada una de estas simulaciones se lanzaron en el conjunto NPT en donde la presión y la temperatura

se controlaron mediante el barostato de Nosè-Hoover y el termostato de Langevin. Puesto que en el conjunto NPT el volumen puede cambiar, y por tanto la densidad también, estas etapas también se utilizaron para equilibrar el valor de la densidad del sistema hasta alcanzar el valor de 1 g/cm³. Cada una de las 7 etapas se llevó a cabo durante 5 ns con un tamaño de paso de 2 fs. Las interacciones intermoleculares se calcularon usando los mismos detalles computacionales ya descritos arriba.

Equilibrado de la estructura de la proteína y producción. Después de la apertura del canal, se realizó una simulación de 200 ns con un tamaño de paso de 2 fs en el conjunto NPT aplicando un campo eléctrico de 1V a lo largo del poro del canal iónico para favorecer el transporte de los iones. Los primeros instantes de esta simulación se utilizaron para equilibrar la estructura de la proteína (el análisis de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) se discute más abajo). Una vez que la estructura se equilibró, el resto de la simulación se utilizó para el análisis de la conducción iónica (etapa de producción).

6.3. Análisis de las Etapas de Minimización, Calentamiento y Equilibrado

Durante las distintas etapas de minimización, calentamiento, equilibrado y producción se han monitorizado distintas propiedades del sistema para comprobar que las simulaciones transcurrían de manera correcta. En las diversas etapas de la simulación se utilizaron diversos métodos de análisis:

(i) Durante la fase de minimización, se evaluaron las energías (kcal/mol) frente al tiempo (ns). Como puede observarse en la Figura 4, la energía disminuye hasta estabilizarse en un valor constante. Este comportamiento indica que se ha alcanzado un mínimo en la superficie de energía potencial. La etapa de minimización corresponde a los primeros 0.01 ns de la Figura 4.



Figura 4. Representación de la energía potencial, cinética y total frente al tiempo (ns) en la etapa de minimización y calentamiento para las simulaciones A) DEKAc y B) DEKAp.

(ii) En la etapa de calentamiento se realizaron diversos análisis para controlar que las simulaciones transcurren de manera correcta y el sistema se comporta bien. El primer análisis, similar al realizado en la etapa de minimización, implicó la monitorización de la evolución de la energía, como se ilustra en la Figura 4. En la Figura 5, se observa que la energía se estabiliza después de cada etapa.. Estos dos análisis (Figura 4 y Figura 5) garantizaron que tanto la energía como la temperatura fueron estabilizadas antes de pasar al siguiente paso de la simulación y que por tanto el sistema es estable.



Figura 5. Representación de la evolución de la temperatura frente al tiempo en las etapas de minimización y calentamiento durante las simulaciones **A**) DEKAc y **B**) DEKAp.

(iii) En la etapa de la producción final con campo eléctrico, se evaluó el valor de la raíz de la desviación cuadrática media (*Root Mean Square Deviation, RMSD*) de la proteína en función del tiempo (Figura 6). El RMSD es una medida numérica que calcula el cambio de la estructura de la proteína a lo largo del tiempo con respecto a la estructura inicial. La Figura 6 muestra que el RMSD de la proteína en la simulación DEKAc aumenta durante los primero 80 ns de simulación y despúes oscila alrededor de un valor constante, indicando que la estructura de la proteína se ha estabilizado. En el caso de la simulación DEKAp el equilibrado ocurre más rápido puesto que el RMSD se hace constante después de 50 ns. En los análisis que se discuten a continuación, solamente se analizó la parte de la dinámica para la cual la estructura de la proteína está equilibrada.



Figura 6. Representación del RMSD en la etapa final de producción en la que la proteína se encuentra bajo la influencia de un campo eléctrico para las simulaciones A) DEKAc y B) DEKAp.

6.4. Análisis de la Etapa de Producción de la Simulación DEKAc

A continuación se muestran los resultados correspondientes a la parte de la simulación DEKAc, en los cuales se realizó el análisis de la conductividad de iones, de la energía libre de Gibbs, la densidad de probabilidad y el análisis de la esfera de solvatación de los iones a medida que difunden a lo largo del canal.

6.4.1. Conductividad de iones

El análisis de la conductividad de iones es fundamental a la hora de estudiar la selectividad en los canales iónicos ya que es el que nos proporciona la información de la cantidad de iones que han permeado a través del poro, y por tanto, que iones discrimina el canal frente a otros.⁷

En la Figura 7 vienen representados los eventos de conducción para los iones de sodio y potasio a lo largo de la coordenada Z (Å) frente al tiempo (ns), los puntos que se ven en el gráfico representan a los sodios o potasios que están sufriendo el fenómeno de permeación. La zona extracelular corresponde a los valores de Z que son iguales a +60Å > Z > +20Å, por lo que todos los puntos que se ven corresponden a los iones situados en la zona extracelular. La zona correspondiente a +20Å > Z > -20Å se encuentra el dominio del poro, en Z=0Å se encuentra localizado el filtro DEKA y por último comprendido entre -20Å > Z > -40Å se encuentra la zona intracelular.

Como se puede ver el número de iones que permean en la Figura 7 corresponden a los puntos (iones) que han traspasado de la superficie extracelular a la superficie intracelular, en la Figura 7A se puede observar que los eventos de conducción correspondientes a los iones de sodio son igual a 9 iones, mientras que en la Figura 7B, en la que vienen representados los eventos de conducción de potasio, el número total de iones que consiguen traspasar la membrana celular es de un total de 16 iones.

El canal estudiado presente selectividad a los iones de sodio, por lo que, en teoría, se debería observar un mayor número de permeaciones de iones de sodio que de potasio. Sin embargo, ocurre lo contrario, lo cual sugiere que el modelo teórico utilizado no funciona de manera adecuada. En respuesta a esta discrepancia, se procedió a realizar un análisis adicional: el cálculo de la energía libre del proceso a lo largo de la coordenada Z. Esta coordenada es relevante dado que corresponde a la dirección que atraviesa el poro del canal y es a través de la cual los iones se desplazan. Con este análisis se busca determinar si los resultados obtenidos concuerdan.



Figura 7. Representación de los eventos de conducción del sodio (A) y del potasio (B) en la simulación DEKAc.

6.4.2. Probabilidad de densidad y energía libre de Gibbs

El análisis de la energía libre de Gibbs y de la probabilidad de densidad son también estudios análisis fundamentales para comprender el funcionamiento y la selectividad en los canales iónicos ya que son magnitudes que nos aportan información valiosa sobre el comportamiento de los iones y sobre el porqué el canal es selectivo a un ion frente a otro. Dado que la conducción de potasio ocurre de manera más sencilla, se esperaría que el perfil de la energía libre presentara energías más bajas para el potasio o mínimos muy profundos para el sodio. Estos mínimos profundos sugerirían que los iones de sodio quedan atrapados en estos puntos de baja energía durante largos periodos de tiempo. Cualquiera de estas dos situaciones proporcionaría una explicación plausible de por qué la conducción de potasio resulta más favorable.

En el caso del análisis de la probabilidad de densidad se pueden estudiar los sitios de interacción más estables dentro del canal para cada ion, esto proporciona un mayor conocimiento de como el canal interactúa con estos. Es decir en la Figura 8, se pueden observar máximos que corresponden con los sitios de unión favoritos de cada ión. Los iones de sodio deberían tener una probabilidad relativamente mayor de encontrarse en estos sitios que los iones de potasio (debido a que estamos en un canal selectivo al sodio), lo que podría estar relacionado con una unión más estrecha entre el ion y la proteína.



Figura 8. Representación de la densidad de probabilidad de ambos iones frente a la coordenada Z en la simulación DEKAc.

Como se puede observar en la Figura 8, se ven representados la densidad de probabilidad frente a la coordenada Z, el valor de Z=0Å corresponde al filtro DEKA, mientras que valores positivos de Z, indican que estamos por encima del DEKA, es decir en la parte extracelular, por lo que los valores negativos de Z indican que estamos por debajo del DEKA, es decir en la parte intracelular. Por tanto, el movimiento de los iones en la gráfica se representa de derecha a izquierda (desde el medio extracelular al medio intracelular).

El estudio de la probabilidad de densidad en ambos iones en la etapa DEKAc sigue la misma tendencia para ambos iones, por lo que con este estudio no se pueden sacar conclusiones relevantes sobre los sitios de interacción favoritos de un ion frente al otro. No obstante, se puede observar en la Figura 8 que los sitios de unión más estables para ambos iones a lo largo del canal se encuentran en Z=10Å, el cual corresponde con aminoácidos situados justo por encima del DEKA y en Z=0Å, que es el DEKA.

Con el análisis de la energía relativa libre de Gibbs se puede obtener información adicional sobre los aspectos termodinámicos y los mecanismos de transporte de los iones a través del canal. Además la energía relativa de Gibbs se obtiene a partir de la probabilidad de densidad en Z según la Ecuación 21.

$$\Delta G(z) \propto \ln(\rho(z)) \tag{21}$$

Nos permite identificar barreras de energía que pueden impedir o facilitar el paso de los iones a través del canal, esto proporciona información para una mejor comprensión de como el canal regula el flujo de iones y cómo se logra la selectividad de un ion frente a otro. Como se mencionó anteriormente, el canal hNav1.4 es selectivo al sodio pero los resultados hallados en el estudio de la conductividad iónica muestran que permean un mayor número de potasios. Por tanto, en el estudio de la energía libre de Gibbs, se debería encontrar una barrera energética más pequeña para el potasio, o por el contrario que los iones de sodio se encontrarán



Figura 9. Representación de la energía libre de Gibbs frente a la coordenada Z en la simulación DEKAc.

En la Figura 9, las barreras que se observan en nuestro caso son prácticamente iguales para ambos iones, por lo que no se puede explicar con esta magnitud que la conducción de un ion sea mayor a la del otro, o que sea selectivo el canal a un ion frente a otro. En este caso, las energías libres que tienen valores negativos corresponden a los interacciones proteína-ion fuerte. A la luz de los resultados obtenidos en el análisis de la conducción iónica la barrera de energía para el potasio debería ser menor que la del sodio ya que acontecen un mayor número de eventos de conducción, o por el contrario se podría observar también un "pozo" de energía en el cual los iones de sodio se estancasen y por ello permearan un mayor número de potasios.

6.4.3. Coordinación del H₂O

En la sección anterior se vio que el perfil de energía libre a lo largo del poro es el mismo para los dos iones. Sin embargo, en el análisis de la conducción iónica se observó que el potasio se conduce mejor. Esto significa que la coordenada de reacción que se escogió (eje Z) no es adecuada, puesto que no describe el proceso de conducción. Otro factor a estudio sería la desolvatación (pérdida de moléculas de agua) de los iones cuando atraviesan el canal, puesto que esta puede ser distinta para los dos iones cuando entran en el canal. Por tanto, en esta sección vamos a analizar el comportamiento de la esfera de solvatación de los iones de sodio y potasio a lo largo del proceso del transporte iónico a través del poro. Los iones al entrar en el filtro selectivo (DEKA), tienen que desolvatarse debido a que la parte del filtro DEKA es más estrecho y para pasar a través tienen que perder moléculas de agua, y a su vez, coordinarse con los carboxilos de los aminoácidos para compensar la energía necesaria en el proceso de deshidratación entre el ion permeante y el DEKA⁸. Este tipo de análisis ha sido crucial para esclarecer los mecanismos de otros canales procariotas, como el canal de sodio NavAb²⁷.

En la Figura 10, se puede observar que el sodio tiene una esfera de solvatación media de 5.5 moléculas de agua cuando está en la parte extracelular (Z>20 Å). Cuando entra en contacto con los aminoácidos de la proteína, se va desolvatando poco a poco hasta que pierde una molécula de agua. En el DEKA (Z=0 Å) vuelve a completar la capa de solvatación gracias a la coordinación de los carboxilos. Al pasar el DEKA vuelve a recuperar esa molécula de agua ya que la proteína se ensancha (Z=-10 Å), y cuando sale del canal atravesando la puerta intracelular tiene que desolvatarse de nuevo, perdiendo en promedia 1.5 moléculas de agua. Finalmente, cuando el sodio abandona el canal vuelve a recuperar su esfera de solvatación de 5.5 moléculas de agua.



Figura 10. Representación del número de aguas coordinadas a los iones a lo largo del proceso de permeación en la simulación DEKAc.

El comportamiento del potasio es similar, pero su esfera de solvatación inicial es más grande, con un promedio de 6.5 moléculas de agua. Una diferencia importante con respecto al sodio es que en la primera etapa de desolvatación cuando el ion se aproxima al DEKA (z = 0), el potasio pierde 1.5 moléculas de agua, mientras que el sodio perdía solo una. Este hecho indica que el potasio se desolvata con mayor facilidad y, por tanto, pasa a través del canal más fácilmente, cuando debería ser el sodio el que atraviese el canal con mayor facilidad.

Por tanto, parece que el modelo empleado en las simulaciones no describe bien la desolvatación de los iones. Esto puede deberse a que las interacciones ión/agua o ión/proteína están mal descritas. En este trabajo se analizaron simplemente las interacciones ión/proteína. En concreto, las cargas del filtro DEKA se calcularon a nivel cuántico y se llevaron a cabo nuevas simulaciones con las nuevas cargas. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

6.5. Análisis de a Etapa de Producción de la Simulación DEKAp

A continuación, se muestran los análisis realizados tras la reparametrización de las cargas de los aminoácidos del filtro DEKA mediante un cálculo cuántico a nivel DFT con el cual se han obtenido las cargas de Merz-Singh-Kollman. Esta reparametrización se ha realizado para adecuar mejor las cargas del filtro a la realidad, para discernir de esta manera si el motivo por el cual permeaban más potasios que sodios con el campo de fuerza CHARMM36m era una mala descripción de las cargas del filtro.

6.5.1. Conductividad de iones

Como se ha mencionado anteriormente el análisis de la conductividad de iones es clave para el entendimiento de los canales iónicos y para confirmar si la modelización computacional de estos se ha realizado de manera fidedigna. En la Figura 11, vienen representados los eventos de conducción para los iones de sodio y potasio a lo largo de la coordenada Z (Å) frente al tiempo (ns). Los puntos que se ven en el gráfico representan a los sodios o potasios que están sufriendo el fenómeno de permeación. La zona extracelular corresponde a los valores de Z que son iguales a +60Å > Z > +20Å, por lo que todos los puntos que se ven corresponden a los iones situados en la zona extracelular. La zona correspondiente a +20Å > Z > -20Å se encuentra el dominio del poro, en Z=0Å se encuentra localizado el filtro DEKA y por último comprendido entre -20Å > Z > -40Å se encuentra la zona intracelular.

En la Figura 11 se muestran los eventos de conducción que sufren ambos iones tras la reparametrización de las cargas de los residuos que conforman el del DEKA. El canal a estudio, debería ser selectivo a los iones de sodio. Como se puede observar en la Figura 11A, el número de eventos de conducción que sufren los iones de sodio es de 19, mientras que en la Figura 11B, se muestran el número de potasios que traspasaron del medio extracelular al medio intracelular que fueron un total de 29 iones.

De nuevo, tras la reparametrización de las cargas del filtro selectivo, el número de iones de potasio que han permeado ha sido superior al de sodio. Esto se traduce en que la nueva descripción de las cargas no es el motivo principal. Sin embargo, ha mejorado en el número de eventos de ambos iones. El siguiente análisis que se realizó muestra el estudio de la probabilidad de densidad y de la energía libre de Gibbs a lo largo de la

coordenada Z, por lo que el resultado del análisis ha de concordar con los resultados obtenidos en la conductividad.



Figura 11. Representación de los eventos de conducción del sodio (A) y del potasio (B) en la simulación DEKAp.

6.5.2. Análisis de la energía libre de Gibbs y de la probabilidad de densidad

El estudio de la conducción iónica tras la reparametrización de las cargas del DEKA resultó en una mayor permeación de iones de potasio que de sodio. Por lo que en el estudio de la probabilidad de densidad se tendría que encontrar una mayor probabilidad de encontrar iones potasio en los sitios de unión más estable que iones sodio. Como se puede observar en la Figura 12, la interacción del potasio a la entrada del canal (Z=15Å) es más favorable que la del sodio. Sin embargo, el sodio interacciona más con el DEKA que el potasio. Por tanto, hay un ligero cambio con respecto a las simulaciones anteriores para las cuales el perfil de probabilidad de ambos iones era prácticamente el mismo.



Figura 12. Representación de la densidad de probabilidad de ambos iones frente a la coordenada Z en la simulación DEKAp.

En el análisis de la energía libre de Gibbs de un canal selectivo al sodio, se esperarían unas barreras energéticas menores a las de otros iones. En cambio lo que se observa en la Figura 13 es lo siguiente, en la entrada del canal (Z=15Å) se aprecia una mayor interacción con los residuos situados por encima del DEKA, lo cual contrasta los resultados obtenidos en la densidad de probabilidad donde el potasio tenía una mayor probabilidad de encontrarse interaccionando con estos residuos.

Mientras que en la posición en la que se encuentra el DEKA (Z=0 Å), se ve que la interacción proteína-ion más fuerte la están sufriendo los iones de sodio, lo cual esta correlacionado con los resultados obtenidos en el análisis de la densidad de probabilidad. Tras la modificación de las cargas del filtro DEKA se observan ciertas diferencias los resultados obtenidos anteriormente, pero no explican el motivo de la conducción. De nuevo el motivo de esto podría ser a que la coordenada de reacción (Coordenada Z), por si sola, pudiera no ser la adecuada para describir la conducción.



Figura 13. Representación de la energía libre de Gibbs frente a la coordenada Z en la simulación DEKAp.

6.5.3. Análisis de la coordinación del H₂O

Uno de los principales motivos por los que los análisis que se realizaron con anterioridad no han otorgado resultados concluyentes sobre el por qué de una mayor permeación de potasios frente a los sodios ha sido, que solamente se han estudiado las interacciones ion-proteína en la coordinada Z, omitiendo las interacciones causadas en las coordenadas X e Y. El análisis del número de aguas coordinadas alrededor de los iones, sin embargo, se encuentran principalmente en el eje Z, por lo que el análisis de esta propiedad podría otorgar información sobre el porqué el canal muestra una mayor selectividad frente al potasio cuando la debería mostrar el sodio.

En la Figura 14 se observa que en la zona extracelular (Z>20Å) la esfera desolvatación para el ion de sodio cuenta con 5.5 moléculas de agua mientras que el potasio cuenta con 6.5 moléculas de agua. Una vez los iones interaccionan con los residuos que están por encima del DEKA (Z=15Å) ambos iones sufren un proceso de desolvatación. No obstante, en el caso del potasio es más fuerte, por lo que esto se correlaciona con la mayor interacción proteína-ion que ha mostrado en ese sitio durante los análisis anteriores. La última desolvatación sufrida por ambos iones tiene lugar en los residuos que se encuentran situados por debajo del DEKA (Z=-15Å)

La principal diferencia con los resultados encontrados en la simulación DEKAc, es que en la simulación DEKAp, tienen lugar tres procesos de desolvatación y no solo dos. La primera desolvatación sigue siendo más significativa para el potasio que para el sodio, ya que este pierde alrededor de 1.3 moléculas de agua de su esfera de solvatación mientras que el sodio solamente pierde 1. A la luz de estos resultados parece clave que el potencial ion/agua debe ser revisado ya que la capacidad del potasio para desprender parcialmente su esfera de solvatación facilita en gran medida su transporte a través del canal.



Figura 14. Representación del número de aguas coordinadas a los iones a lo largo del proceso de permeación en la simulación DEKAc.

7. Conclusiones

Los canales iónicos eucariotas, en concreto el hNav1.4, tienen una importancia biológica fundamental en la propagación de potenciales de acción en neuronas y células musculares por lo que el estudio de su funcionamiento mediante simulaciones computacionales a nivel de Dinámica Molecular clásica podría ayudar a descubrir diversos métodos terapéuticos para el tratamiento de patologías que estén relacionadas con el mecanismo y la estructura de este tipo de canales.

Como se ha observado en el apartado de resultados, el análisis del canal $hNa_V 1.4$ no ha proporcionado los resultados esperados, ya que hay un mayor número de eventos de conducción de potasio frente a los de sodio tanto en la simulación DEKAc como en la simulación DEKAp.

En el análisis de la energía libre de Gibbs y de la densidad de probabilidad a lo largo del eje Z (dirección de transporte de los iones), se ha observado que el potasio tiene una mayor tendencia a mantener interacciones con los residuos que se encuentran en la parte superior al DEKA (Z=15 Å), mientras que el sodio mantiene interacciones más estable con el propio filtro DEKA (Z=0 Å). Aunque estos resultados no han explicado el

fenómeno de conducción se puede deducir en que la coordenada de reacción no es solamente la dirección Z, es decir habría que realizar el estudio con el resto de coordenadas.

En el análisis no se han observado cambios relevantes en la conducción iónica del canal, pero se ha visto que el potasio permea con mayor facilidad que el sodio por la facilidad que tiene de perder parcialmente parte de su esfera de solvatación, lo que hace que su transporte fuese más sencillo y por lo que el potencial ion-agua y quizás el ion-proteína debe ser revisado.

En el análisis del DEKAp, se han reparametrizado las cargas del DEKA mediante cálculos cuánticos. Esta simulación ha dado de nuevo una mayor conducción al potasio y ha expuesto la misma tendencia encontrada en el DEKAc. Por lo que es posible que tanto el potencial proteína-ion como el ion-agua tenga que ser revisado. Esta posibilidad se estudiará en trabajos futuros.

8. Bibliografía

- Brooks, B. R.; Brooks III, C. L.; Mackerell Jr., A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* 2009, *30* (10), 1545–1614. https://doi.org/10.1002/jcc.21287.
- (2) Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1, 2010.
- (3) Phillips, J. C.; Hardy, D. J.; Maia, J. D. C.; Stone, J. E.; Ribeiro, J. V.; Bernardi, R. C.; Buch, R.; Fiorin, G.; Hénin, J.; Jiang, W.; McGreevy, R.; Melo, M. C. R.; Radak, B. K.; Skeel, R. D.; Singharoy, A.; Wang, Y.; Roux, B.; Aksimentiev, A.; Luthey-Schulten, Z.; Kalé, L. V.; Schulten, K.; Chipot, C.; Tajkhorshid, E. Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD. J. Chem. Phys. 2020, 153 (4), 044130. https://doi.org/10.1063/5.0014475.
- (4) Catterall, W. A. Sodium Channels, Inherited Epilepsy, and Antiepileptic Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54* (1), 317–338. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232.
- (5) Xu, L.; Ding, X.; Wang, T.; Mou, S.; Sun, H.; Hou, T. Voltage-Gated Sodium Channels: Structures, Functions, and Molecular Modeling. *Drug Discov. Today* **2019**, *24* (7), 1389–1397. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.014.
- (6) Corry, B.; Thomas, M. Mechanism of Ion Permeation and Selectivity in a Voltage Gated Sodium Channel. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (3), 1840–1846. https://doi.org/10.1021/ja210020h.
- (7) Nogueira, J. J.; Corry, B. Ion Channel Permeation and Selectivity. In *The Oxford Handbook of Neuronal Ion Channels*; Bhattacharjee, A., Ed.; Oxford University Press, 2019. https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190669164.013.22.
- (8) Dudev, T.; Lim, C. Ion Selectivity Strategies of Sodium Channel Selectivity Filters. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (12), 3580–3587. https://doi.org/10.1021/ar5002878.
- (9) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Caricato, M.; Hratchian, H. P.; Li, X.; Barone, V.; Bloino, J.; Zheng, G.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Petersson, G. A.; Scuseria, G. E.; Schlegel, H. B.; Nakatsuji, H.; Izmaylov, A. F.; Martin, R. L.; Sonnenberg, J. L.; Peralta, J. E.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Robb, M. A.; Mennucci, B.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Rendell, A.; Gomperts, R.; Zakrzewski, V. G.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H. Gaussian 09.
- (10)Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. J Mol Graph. 1996, 14 (1), 33-.
- (11) CASE, D. A.; CHEATHAM, T. E.; DARDEN, T.; GOHLKE, H.; LUO, R.; MERZ, K. M.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.; WANG, B.; WOODS, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. J. Comput. Chem. 2005, 26 (16), 1668–1688. https://doi.org/10.1002/jcc.20290.

- (12)Roe, D. R.; Cheatham, T. E. I. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. J. Chem. Theory Comput. 2013, 9 (7), 3084–3095. https://doi.org/10.1021/ct400341p.
- (13)Huang, J.; Rauscher, S.; Nawrocki, G.; Ran, T.; Feig, M.; de Groot, B. L.; Grubmüller, H.; MacKerell, A. D. CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nat. Methods* 2017, *14* (1), 71–73. https://doi.org/10.1038/nmeth.4067.
- (14)Grubmüller, H.; Heller, H.; Windemuth, A.; Schulten, K. Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-Range Interactions. *Mol. Simul.* 1991, 6 (1–3), 121–142. https://doi.org/10.1080/08927029108022142.
- (15) Wells, B. A.; Chaffee, A. L. Ewald Summation for Molecular Simulations. J. Chem. Theory Comput. 2015, 11 (8), 3684–3695. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00093.
- (16)Bracewell, R. N.; Bracewell, R. N. *The Fourier Transform and Its Applications*; McGraw-Hill New York, 1986; Vol. 31999.
- (17)Davidchack, R.; Handel, R.; Tretyakov, M. Langevin Thermostat for Rigid Body Dynamics. J. Chem. Phys. 2009, 130, 234101. https://doi.org/10.1063/1.3149788.
- (18)Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant Pressure Molecular Dynamics Simulation: The Langevin Piston Method. J. Chem. Phys. 1995, 103 (11), 4613–4621. https://doi.org/10.1063/1.470648.
- (19) Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant Pressure Molecular Dynamics Algorithms. J. Chem. Phys. **1994**, 101 (5), 4177–4189. https://doi.org/10.1063/1.467468.
- (20)Kohn, W.; Becke, A. D.; Parr, R. G. Density Functional Theory of Electronic Structure. J. Phys. Chem. **1996**, 100 (31), 12974–12980. https://doi.org/10.1021/jp9606691.
- (21) The Hohenberg-Kohn Theorems. In *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*; 2001; pp 33–40. https://doi.org/10.1002/3527600043.ch4.
- (22) The Kohn-Sham Approach. In A Chemist's Guide to Density Functional Theory; 2001; pp 41–64. https://doi.org/10.1002/3527600043.ch5.
- (23)Bank, R. P. D. *RCSB PDB 6AGF: Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with beta1*. https://www.rcsb.org/structure/6AGF (accessed 2023-05-10).
- (24)MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (18), 3586–3616. https://doi.org/10.1021/jp973084f.
- (25) Joung, I. S.; Cheatham, T. E. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations. J. Phys. Chem. B 2008, 112 (30), 9020–9041. https://doi.org/10.1021/jp8001614.
- (26)Braun, E.; Gilmer, J.; Mayes, H. B.; Mobley, D. L.; Monroe, J. I.; Prasad, S.; Zuckerman, D. M. Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. *Living J. Comput. Mol. Sci.* 2019, 1 (1), 5957. https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5957.
- (27)Bank, R. P. D. *RCSB PDB 6MWA: NavAb Voltage-gated Sodium Channel, residues 1-239.* https://www.rcsb.org/structure/6MWA (accessed 2023-05-16).