



Universidad Nacional Autónoma De México  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Matemáticas y de la  
Especialización en Estadística Aplicada

***“APERTURA DE CANALES IÓNICOS DE POTASIO  
DEPENDIENTES DE VOLTAJE: UNA PERSPECTIVA DE LA  
MECÁNICA DE CONTINUOS”***

Tesis  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta  
**MANUEL TEJEDA WRIEDT**

TUTOR:  
ANTONMARIA MINZONI ALESSIO, IIMAS, UNAM

COMITÉ TUTORIAL  
JORGE GILBERTO FLORES GALLEGOS, IIMAS, UNAM  
MARÍA DE LA LUZ JIMENA DE TERESA DE OTEYZA, IMATE, UNAM

México, D.F.

Marzo de 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MATEMÁTICAS Y DE LA ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA  
APLICADA

APERTURA DE CANALES IÓNICOS DE POTASIO  
DEPENDIENTES DE VOLTAJE: UNA PERSPECTIVA DE LA  
MECÁNICA DE CONTINUOS

PRESENTA:

MANUEL TEJADA WRIEDT

DIRECTOR:

ANTONMARÍA MINZONI ALESSIO, IIMAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

ANTONMARÍA MINZONI ALESSIO, IIMAS, UNAM

JORGE GILBERTO FLORES GALLEGOS, IIMAS, UNAM

MARÍA DE LA LUZ JIMENA DE TERESA DE OTEYZA, IMATE, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2015



*A Karin y Enrique*  
*A María, Santiago, Carlos y Andrea*  
*A Jorge Ize*



## Resumen

En este trabajo estudiamos el proceso de apertura de dos canales iónicos sensibles a voltaje, el Kv1.2 y el Kv1.2/2.1 quimera. Para ello, proponemos una representación bidimensional del poro de éstos, donde consideramos sus paredes como barras elásticas empotradas en un extremo y libres en el otro, sujetas a potenciales que actúan de forma puntual sobre éstas. Elaboramos un modelo reducido donde las barras se encuentran bajo la acción de dos potenciales de tipo Lennard-Jones, uno actuando en el centro de éstas y otro en el extremo libre. La forma de cada potencial está modulada por un parámetro cuyo valor representa la posición del sensor de voltaje del canal, y que se modifica de acuerdo al estado conformacional del mismo. Una vez establecido el sistema, determinamos su Lagrangiano, calculamos las ecuaciones de movimiento, encontramos todas las soluciones estacionarias y analizamos su comportamiento con respecto al parámetro. Al construir el diagrama de bifurcación del sistema mostramos que éste es biestable: existen dos estados estables que representan al poro en sus conformaciones abierta y cerrada. Entendido el modelo simple, lo extendemos a un número arbitrario de potenciales y planteamos dos ejemplos donde se observa multiestabilidad. Posteriormente, hacemos un estudio detallado de las estructuras disponibles de los dos canales y establecemos cuáles son las interacciones relevantes en el proceso de apertura, así como su forma. Con dichas interacciones determinadas, adaptamos el modelo a las estructuras y construimos los diagramas de bifurcación correspondientes, concluyendo que el proceso de apertura se lleva a cabo de forma biestable. Por último, validamos el modelo al incluir mutaciones y reproducir con éste los resultados observados experimentalmente.

## Abstract

In this work, we study the gating process of the voltage sensitive potassium channels Kv1.2 and Kv1.2/2.1 chimera. To this end, we propose a bidimensional representation of the pore, where we consider its walls as elastic beams hinged in one end and free on the other, under the action of pointwise potentials. We elaborate a reduced model where two Lennard-Jones potentials are acting on the beams, one near the middle and the other on the free end. Each potential is modulated by a parameter, whose value represents the position of the voltage sensor of the channel, and varies depending on its conformational state. Once the system is established, we determine its Lagrangian, calculate its equations of motion, find all the stationary solutions, and compute its bifurcation diagram, which shows that the system is bistable: there are two stationary states representing the pore in its open and closed conformations. We then extend the system to an arbitrary number of potentials and apply it to two examples where multistability is exhibited. Later, we do a detailed study of the available channel structures and establish the relevant interactions of the gating process, determining their shapes. Next, we adapt the model to these structures and construct the corresponding bifurcation diagrams, concluding that the gating process is bistable. Finally, we validate the model by including mutations and reproducing some experimental observations.

# Contenido

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>V</b>
<b>Introducción</b>	<b>VII</b>
<b>1 Un modelo simple</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura y función . . . . .	1
1.2. El proceso de apertura . . . . .	3
1.3. El modelo . . . . .	5
1.4. Soluciones estacionarias . . . . .	11
1.5. Análisis numérico de soluciones estacionarias: Bifurcaciones y biestabilidad . . . . .	16
1.6. Consecuencias del modelo . . . . .	21
<b>2 Extensión del modelo</b>	<b>27</b>
2.1. Ecuaciones de Euler-Lagrange . . . . .	28
2.2. Soluciones estacionarias . . . . .	29
2.3. Dinámica y estabilidad lineal . . . . .	34
<b>3 La estructura y el modelo</b>	<b>43</b>
3.1. El poro, su estructura y sus interacciones . . . . .	43
3.2. El modelo aplicado al canal Kv1.2/2.1 quimera . . . . .	61
3.3. Mutaciones . . . . .	68
<b>4 Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>Apéndice A Métodos y material suplementario</b>	<b>75</b>
A.1. Las estructuras . . . . .	75
A.2. Diagrama de bifurcación del canal Kv1.2 . . . . .	76

A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2 . . . . .	76
<b>Bibliografía</b>	<b>111</b>

# Prefacio

Los canales iónicos son proteínas excitables de la membrana celular. Entre sus funciones, producen y moldean las señales eléctricas en las células. Su sola existencia en neuronas, miocitos, células gliales, espermatozoides, conos y fagocitos, nos da una idea de la importancia que tienen en los seres vivos. Su presencia en nosotros es, vale decirlo, poética: miles de canales en concierto propagan los impulsos que generan las células que inervan nuestra piel, comunicándonos un abrazo, el calor de primavera o la presencia del mar.

Su descubrimiento y estudio no han sido distintos: peces diseccionados hechos batería y galvanómetros compuestos de patas de rana; hombres de bata haciendo latir corazones inmersos en soluciones salinas y científicos extrayendo nervios de calamares adquiridos en el mercado. Y así la historia.

Con esta tesis, acercamiento matemático único, modestamente me adhiero a las honrosas filas de poetas y científicos locos, esperando que algún lector encuentre en la metáfora, las patas de una rana.

MTW, Noviembre 2014



# Agradecimientos

Este trabajo fue elaborado bajo la dirección del Dr. Antonmaría Minzoni, a quien le debo el más profundo reconocimiento; aquél que lo conozca podrá encontrar sus huellas en cada página. Mucho es el tiempo que ha dedicado a atender mis dudas e inquietudes. Su invaluable consejo, tanto en el ámbito académico como en el personal, lo llevaré por siempre con gratitud, aprecio y alegría.

Inmensa es también la deuda que guardo con el Dr. Gilberto Flores, cuyo apoyo categórico permitió que llevara a buen término mi formación como matemático. Ser su alumno es toda una distinción.

Si el lector encuentra este texto libre de errores, se debe a la minuciosa lectura que del mismo han hecho los Dres. León Islas, David Sanders, Victor Breña, Jorge Velasco y Panagiotis Panayotaros. Agradezco mucho su labor al comentar y evaluar este escrito, enriqueciéndolo en todos sus rincones. También quisiera agradecerle a la Dra. Luz de Teresa el haber revisado año con año la investigación en que está sustentado este documento.

Al Dr. Andrés Jara le tengo una especial obligación. Es él quien, con inagotable paciencia, me ayudó a construir el primer modelo y posteriormente contribuyó al mejoramiento del mismo. El breve conocimiento que tengo de la fisiología del problema aquí estudiado, es por Andrés, que con su incesante sonrisa atendió todos mis cuestionamientos, sin importar lo elementales que pudieran ser.

De mis padres Karin y Enrique, y de Carlos mi hermano, son las palabras. Todo esto existe gracias a la inmensa base de afecto que me han construido. Igualmente, espero algún día corresponder, aunque sea de manera ínfima, la atención y el cariño de Nadia, Federico, Martí, Damián, Carlos, Katsumi, María, Juan, Mario, Andrea, Teresa y Nicolás.



# Introducción

No hay en la condición humana nada más desconcertante  
que el hecho de que se pueda significar y/o decir *algo*.

GEORGE STEINER

La célula es considerada la unidad fundamental de la vida. El cuerpo de un humano adulto está compuesto por entre  $10^{12}$  y  $10^{14}$  células [12], y la capacidad de éstas para medir su entorno y comunicarse es primordial en el funcionamiento del organismo. Hablamos de unidad fundamental ya que la célula está envuelta en una capa delgada que la separa del ambiente, conocida como membrana celular. Si bien esta capa le provee estructura y protección, también impide el libre acceso de sustratos ionizados y la salida de productos de desperdicio. Para lidiar con este problema, se han ido desarrollando distintos mecanismos de transporte a la par de la evolución de la membrana celular. Por ejemplo, las bacterias Gram-negativas cuentan con unas proteínas llamadas *porinas*, que son canales suficientemente grandes para dejar pasar metabolitos pequeños y suficientemente pequeños para impedir la salida de macromoléculas [96].

Con más de tres billones de años de evolución, las células cuentan con una complejidad asombrosa. En particular, la membrana celular ha pasado de ser una simple capa de plasma a una película dinámica poblada de numerosas proteínas, cada una de intrincada estructura y función específica [108]; aquéllas encargadas del transporte están tradicionalmente divididas en dos tipos: transportadores y poros [48]. Los transportadores se encuentran fijos en la membrana y sus sitios de acoplamiento están expuestos alternadamente al interior o exterior de la célula; cuando el soluto se acopla al transportador, éste sufre un cambio conformacional que lo traslada al interior (o exterior) de la célula. Por otro lado, los poros son túneles angostos, llenos de agua y altamente selectivos, permeables a una reducida clase de iones pequeños; dependiendo de estímulos específicos, los poros se abren o cierran, permitiendo el paso de iones a través de la membrana celular.

Prácticamente toda actividad que llevan a cabo los animales involucra el trabajo en concierto de miles de canales iónicos, algunos sensibles a la temperatura, otros a la presión, otros más al voltaje. Por medio de éstos, la membrana celular es capaz de regular el flujo de iones que entran o salen de la célula, y son piezas clave para producir y propagar señales eléctricas en el tejido cardíaco, muscular y en el sistema nervioso. Trabajando en conjunto con proteínas transportadoras, permiten a la célula establecer una diferencia de potencial entre ella y su entorno y modificar este potencial para provocar una acción: la generación y propagación de una señal eléctrica en un axón; la contracción y dilatación en una célula cardíaca; la deformación mecánica en un espermatozoide.

La membrana celular cuenta con un núcleo hidrofóbico delgado, compuesto de una capa aceitosa que la provee de una permeabilidad inherente. La tendencia de los solutos a moverse de un lado a otro de la membrana obedece las leyes de difusión de Fick [37], que establecen que el flujo difusivo de solutos va de una región de mayor concentración a una de menor concentración en dirección de su gradiente, y que la razón de concentración que entra en un volumen es igual a la que sale. Si el único mecanismo de transporte de iones fuera la difusión pasiva se esperaría que, en condiciones de equilibrio, la concentración de solutos de un lado y otro de la membrana fuera la misma. Sin embargo, la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) dentro de la célula de un mamífero es de entre 5 y 15 mM y 145 mM fuera de ella, es decir, hay entre diez y treinta veces más  $\text{Na}^+$  fuera de la célula que dentro de ella. Para el potasio ( $\text{K}^+$ ) ocurre lo contrario: hay entre diez y treinta veces más  $\text{K}^+$  en el interior de la célula que en el exterior [5]. Existen dos proteínas fundamentales que mantienen esta diferencia de concentraciones: unos canales conocidos como *canales de fuga de potasio* [41, 42] y una bomba llamada  *$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$*  [105]. Los primeros siempre están abiertos y permiten el libre flujo de  $\text{K}^+$ , hasta que la tendencia de los cationes a abandonar la célula es balanceada por la atracción a los aniones dentro de ella, y la segunda, por medio de ATP, saca tres  $\text{Na}^+$  y mete dos  $\text{K}^+$  en contra de sus gradientes de concentración.

El exceso de iones positivos sobre iones negativos entre un lado y otro de la membrana establece un potencial conocido como potencial membranar. Las únicas moléculas que pueden cruzar la membrana por difusión pasiva son el agua, pequeños solutos con carga neutra y gases [108]; el resto necesita de proteínas específicas como la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La condición de que la suma de todos los flujos de iones sea cero define el *potencial de reposo* de la célula. Este potencial es del orden de  $-50$  a  $-80$  mV [5], y establece la conformación de las proteínas transmembranales sensibles a voltaje.

En la membrana celular existen diversos tipos de canales iónicos. Cada ca-

---

nal es una molécula excitable y actúa de manera específica ante algún estímulo: un canal sensible al voltaje detecta el cambio en el potencial membranal; uno sensible a ligandos responde a la presencia de un mensajero químico, por ejemplo un neurotransmisor. Como respuesta, el canal se abre o cierra, permitiendo o bloqueando el flujo de iones por su poro. El poro tiene permeabilidad selectiva, por lo que sólo una clase restringida de iones lo atraviesa [48]. Numerosos sucesos se desarrollan explotando la diversidad y el funcionamiento de los canales iónicos. Por ejemplo, el proceso bioquímico de fotorecepción empieza cuando moléculas del pigmento visual, llamadas opsinas, que se encuentran dentro de la membrana de los conos y bastones, absorben luz a ciertas longitudes de onda [113]. La estimulación de las opsinas provoca el cambio conformacional de una parte de ellas, llamada retinal, que da lugar a una cascada de eventos que culmina con la creación de una molécula llamada guanosín monofosfato cíclico (cGMP). Los fotoreceptores tienen una colección de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNG) que, en la presencia de cGMP, se abren para permitir que iones positivos de  $\text{Na}^+$  entren a la célula, haciéndola más positiva en carga. En la oscuridad, estos canales de sodio activados por cGMP se encuentran abiertos; al ser estimulados por la luz, los fotoreceptores se tornan más negativamente cargados. Este cambio en el potencial membranal es la primera señal eléctrica de que hemos visto la luz, y es comunicada a otras células de la retina [113].

La membrana de todas las células eléctricamente excitables cuenta con canales iónicos sensibles al voltaje. Cuando un estímulo causa la suficiente despolarización de la célula –esto es, un cambio en el potencial membranal a un valor menos negativo dentro de ella–, provoca que canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje se abran repentinamente, permitiendo un influjo de  $\text{Na}^+$ . El aumento en la carga positiva despolariza la membrana aún más, abriendo un mayor número de canales de  $\text{Na}^+$ , incrementando la despolarización. Este proceso de amplificación continúa hasta que el potencial eléctrico cambia localmente, del potencial en reposo (cerca de  $-70\text{mV}$ ) hasta casi el potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  (alrededor de  $+50\text{mV}$ ). Para prevenir que la célula alcance un nuevo estado en reposo con todos sus canales de  $\text{Na}^+$  abiertos, éstos se inactivan, bloqueando un mayor influjo de  $\text{Na}^+$ ; adicionalmente, otro tipo de canales sensibles a voltaje, los canales de  $\text{K}^+$ , se activan permitiendo el eflujo de  $\text{K}^+$ , repolarizando rápidamente la célula [48]. Este mecanismo es explotado por las neuronas para propagar potenciales de acción: un estímulo lo suficientemente grande para despolarizar la región del cono axónico provoca que los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje se abran, permitiendo la difusión de  $\text{Na}^+$  hacia el axón; el aumento de  $\text{Na}^+$  despolariza la siguiente sección del axón, induciendo la apertura de más canales, el influjo de más  $\text{Na}^+$  y su difusión a la siguiente

región. El proceso se repite generando un frente que se propaga unidireccionalmente a lo largo del axón. Localmente, los canales de  $\text{Na}^+$  se inactivan impidiendo un mayor influjo y entonces los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje se activan, posibilitando el eflujo de  $\text{K}^+$ , hiperpolarizando esta región del axón; así, el potencial de acción es un pulso eléctrico que se propaga hasta la terminal axónica por medio de cientos de canales iónicos [63].

En una serie de artículos publicados en el *Journal of Physiology*, Alan Hodgkin y Andrew Huxley establecieron un marco en el cuál es posible describir estructural y funcionalmente los canales iónicos [49–53], incluyendo los mecanismos de permeación de iones, selectividad y apertura. En su trabajo, Hodgkin y Huxley fueron capaces de explicar y describir la generación y propagación del potencial de acción. Estudios subsecuentes mostraron que los canales iónicos son proteínas que cuentan con un poro conductor de iones con una compuerta intracelular y una región extracelular con selectividad a cierto tipo de iones [3, 47]. Por medio de clonación molecular, fue posible obtener la secuencia de aminoácidos de las subunidades del receptor Ach [86], el canal de  $\text{Na}^+$  de la anguila [84] y la secuencia primaria del canal *Shaker* de  $\text{K}^+$  [65, 91, 111]. Estas secuencias mostraron que los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  están compuestos de seis segmentos transmembranales, que están repetidos cuatro veces en el mismo polipéptido en los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y ensamblados de cuatro polipéptidos iguales en los canales de  $\text{K}^+$ ; patrones en las secuencias revelaron que el segmento S4 funciona como sensor y que el lazo de retorno entre los segmentos S5 y S6 constituye la base de conducción y activación de los canales de  $\text{K}^+$  [45, 46],  $\text{Na}^+$  [85] y  $\text{Ca}^+$  [121].

Hasta antes de 1998, toda la información estructural sobre los canales había sido alcanzada de manera indirecta. Haciendo un trabajo asombroso, Roderick MacKinnon y sus colaboradores fueron los primeros en obtener la estructura cristalizada de un canal de  $\text{K}^+$  [33]. Usando el canal bacterial KcsA, el grupo de MacKinnon fue capaz de determinar la posición de casi todos los átomos que lo conforman. Este resultado marca un hito en el estudio de los canales iónicos; por primera vez es posible examinar la relación entre estructura y función.

La estructura cristalizada obtenida por MacKinnon muestra las cuatro subunidades entrelazadas por segmentos transmembranales que cierran el poro en el lado intracelular. En el centro del poro reside una cavidad acuosa y en la parte superior se encuentra el filtro de selectividad, corroborando las predicciones biofísicas hechas décadas anteriores. Numerosas estructuras se resolvieron posteriormente [11], pero fue de nuevo el grupo de MacKinnon el que obtuvo por primera vez la de un canal sensible a voltaje, el KvaP [62]. La estructura causó mucha controversia, pues aunque la región del poro era muy

---

similar a la del KcsA, el dominio sensible al voltaje se encontró en una conformación que contradecía las observaciones experimentales [11]. Cuando el grupo obtuvo la estructura del Kv1.2, un homólogo mamífero del *Shaker* [75], ésta mostró al dominio sensible al voltaje en una conformación acorde a los datos biofísicos, sugiriendo que la estructura del KvaP no se encontraba en su conformación nativa [11]. Todo este trabajo hizo a MacKinnon acreedor del premio Nobel en el 2003.

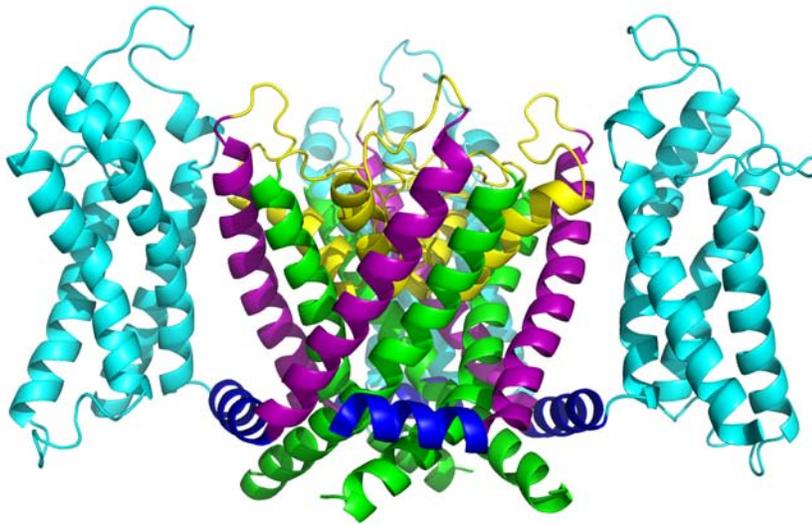


Figura 1: Estructura cristalizada del canal iónico sensible a voltaje Kv1.2/2.1 quimera en su estado abierto. El canal está compuesto por cuatro subunidades, y cada subunidad por seis  $\alpha$ -hélices. En azul claro, el sensor de voltaje, en azul oscuro, el *linker*, en morado el poro exterior, en verde el poro interior, y en amarillo el filtro de selectividad. El sensor de voltaje de una subunidad adyacente no se muestra.

El mecanismo de activación de los canales iónicos dependientes de voltaje sigue siendo elusivo. Numerosos estudios experimentales y computacionales han dado mucha información al respecto. Se sabe que el canal cuenta con un segmento cargado (el segmento S4) que es sensible al cambio en el potencial membranal. Cuando éste se modifica, el sensor se mueve, lo que permite al poro abrirse o cerrarse [16]. La manera en que el movimiento del sensor resulta en la

apertura del poro es un tema de amplio debate, y es el problema fundamental que aborda este trabajo.

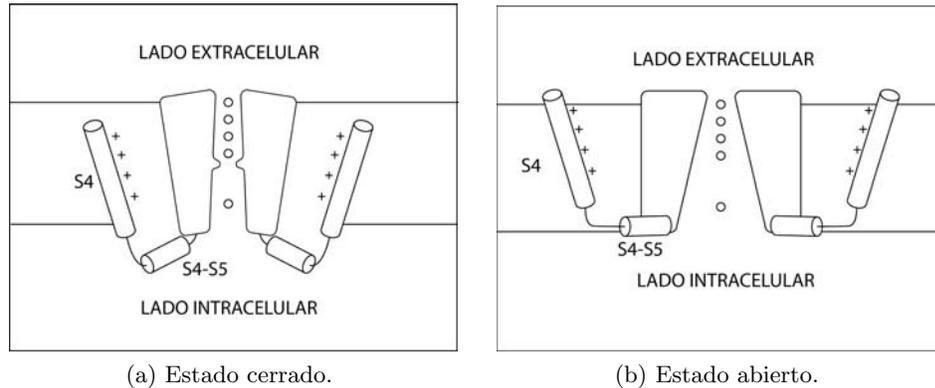


Figura 2: Caricatura del proceso de apertura de un canal iónico sensible al voltaje. En el potencial de reposo, el sensor de voltaje se encuentra en una posición que mantiene cerrado al canal. Cuando el sensor se mueve, el canal se abre.

En la actualidad existe mucho trabajo en la modelación de canales iónicos. La cinética iniciada por Hodgkin y Huxley ha sido extendida con procesos de Markov, teoría de transiciones de fase y modelos discretos, entre otros [104]. Se conocen estructuras cristalizadas que proveen un punto de partida para las simulaciones de dinámica molecular [109] y física estadística [32], enfoques utilizados para estudiar la permeabilidad y apertura. Estos métodos han sido muy exitosos para explicar innumerables experimentos, así como algunos mecanismos de acción en la apertura de los canales [104], pero no han sido capaces de determinar la manera en que el dominio sensible al voltaje se acopla con el poro y cuál es la relación entre la activación del sensor y la apertura de éste [115].

En este trabajo, proponemos un modelo de mecánica de medios continuos, con la finalidad de describir la transición que lleva a cabo el poro para ir del estado cerrado al abierto. Este enfoque nos permite estudiar las posiciones de equilibrio del poro como un problema de bifurcación.

En el primer capítulo, basados en la literatura disponible tanto en fisiología, como en dinámica molecular, establecemos la estructura y funcionamiento de los canales iónicos de potasio sensibles a voltaje. Posteriormente, planteamos un modelo matemático unidimensional que reduce la dinámica del poro del canal a la ecuación de una barra empotrada en un extremo y libre en el otro, sujeta a dos potenciales de Lennard-Jones que actúan de forma puntual en la misma, uno en el centro de la barra y el otro en el ex-

---

tremo libre. Proponemos la forma en que estos potenciales varían conforme el voltaje en la membrana cambia, estableciendo las ecuaciones de movimiento para el sistema. Usando consideraciones experimentales, calibramos dichos potenciales y estudiamos el problema estacionario. Para ésto, encontramos las soluciones estacionarias y establecemos una equivalencia entre la ecuación diferencial parcial y un sistema de dos ecuaciones trascendentes acopladas. Una vez reformulado el problema, estudiamos la estabilidad lineal de las soluciones estacionarias y derivamos un conjunto de condiciones suficientes que la garantizan. Posteriormente, estudiamos el problema estacionario usando la teoría de bifurcaciones, determinamos cuándo el sistema es biestable o multiestable, y relacionamos estos resultados con las observaciones experimentales.

En el segundo capítulo, extendemos el modelo a un número arbitrario de potenciales que actúan de manera puntual en la barra. De forma detallada, encontramos las soluciones estacionarias y establecemos la equivalencia entre la ecuación diferencial parcial que rige el sistema y un sistema de ecuaciones trascendentes acopladas. Con dos ejemplos, exhibimos que los potenciales de tipo Lennard-Jones generan multiestabilidades. De nuevo, establecemos condiciones suficientes para la estabilidad lineal de las soluciones estacionarias y, aplicando un esquema de Crank-Nicolson adecuado, obtenemos un algoritmo para encontrar soluciones numéricas al problema dinámico.

En el tercer capítulo, usando las estructuras conocidas para los canales en cuestión, estudiamos el tipo de interacciones entre las diferentes componentes del poro. Establecemos una configuración de referencia en coordenadas adecuadas para reducir el problema tridimensional a uno unidimensional y, en este marco, aplicamos el modelo. Para determinar la forma del potencial que ha de actuar sobre él, enunciamos las ecuaciones de la dinámica molecular y hacemos un análisis de las interacciones entre las diferentes componentes del poro. Haciendo uso de la fórmula de Poisson, determinamos el comportamiento de sumas de potenciales tipo Lennard-Jones y proponemos los potenciales que actúan sobre el modelo. Después, aplicamos el mismo en tres escenarios diferentes, obteniendo los diagramas de bifurcación de cada uno y establecemos bajo qué condiciones hay biestabilidad. Para probar el modelo, incorporamos la noción de mutaciones y vemos cómo se comporta bajo éstas, comparándolo con resultados experimentales. Por último, analizamos una región específica del poro y, a través del modelo, hacemos una predicción de su función en el proceso de apertura.



# Capítulo 1

## Un modelo simple

Los canales iónicos sensibles a voltaje constituyen la base molecular y mecánica de la actividad eléctrica de las células excitables; son responsables de la comunicación neuronal, contracción muscular, secreción hormonal y detección sensorial, entre otros procesos. De estos canales, los sensibles a potasio ( $K^+$ ) contribuyen mayoritariamente a mantener el potencial en reposo de la célula, a repolarizarla después la generación de un potencial de acción, y a la determinación de la frecuencia de generación de estos potenciales en las células excitables [48].

### 1.1. Estructura y función

Los canales iónicos de potasio sensibles a voltaje (Kv) están compuestos de cuatro subunidades, cada una con un dominio dentro de la membrana que contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6), y términos amino y carboxil en el lado intracelular [75]. Cada subunidad dentro del tetrámero cuenta con un dominio sensible a voltaje (VSD, por sus siglas en inglés), formado por los segmentos S1 a S4, mientras que el poro está compuesto por los segmentos transmembranales S5 y S6. Los dominios están ligados covalentemente por una pequeña  $\alpha$ -hélice denominada *linker* S4-S5, como se muestra en la figura 1.1. Curiosamente, tanto el VSD como el poro son módulos proteicos que pueden, en principio, funcionar independientes el uno del otro; variantes de éstos aparecen de manera separada en otras proteínas donde experimentan cambios conformacionales muy similares a los que sufren en los canales sensibles a voltaje [4, 77, 82, 93].

La manera en que se acoplan los dominios de los canales Kv no está completamente entendida [13, 115]. Se ha mostrado que dos interfaces distintas son

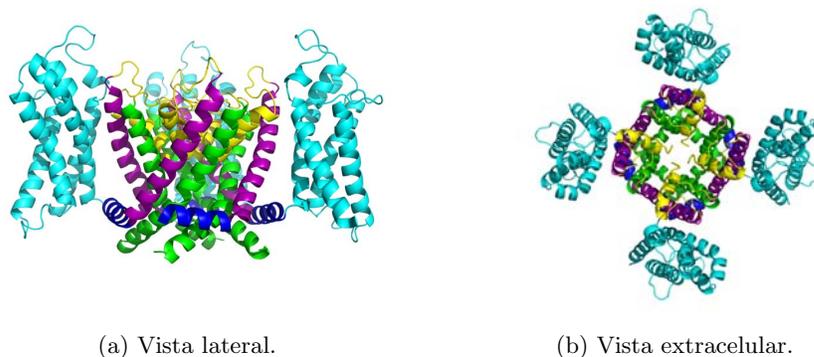


Figura 1.1: Representación de lazo del VSD y el poro del canal Kv1.2/2.1 quimera (PDB 2R9R) en estado abierto [76]. En azul claro se muestran los segmentos S1 a S4 correspondientes al VSD. En amarillo, el filtro de selectividad. En azul oscuro, el *linker* S4-S5. En magenta el poro exterior formado por los segmentos S5 y en verde el poro interior formado por los segmentos S6.

importantes entre el VSD y el poro; la primera involucra un conjunto estático de interacciones entre el S1 en el VSD y la porción extracelular del S5, y se cree que da soporte para la transferencia efectiva entre los dominios [72]. La otra es una superficie de contacto que se encuentra entre unidades adyacentes, e involucra un conjunto de interacciones entre regiones intracelulares del S5, el S4-S5 y la parte baja del S6 [69, 73, 78, 107, 114]. De estas regiones, el *linker* S4-S5 parece ser especialmente importante: interacciones específicas entre el *linker* y la porción C-terminal de los segmentos S6 de su misma subunidad, así como de una de las subunidades adyacentes, han mostrado ser necesarias para la apertura dependiente de voltaje en el poro [23, 69, 78, 82, 114]. El planteamiento general es que un pequeño giro y rotación del *linker* S4-S5, causada por el movimiento dependiente de voltaje del S4, jala o empuja los extremos intracelulares del S6 para abrir o cerrar el poro [69, 78, 82]. La función del *linker* S4-S5 parece ser la misma entre otros canales, como los canales Kv tipo *Shaker* [69, 78, 82], canales activados por hiperpolarización (HCN) [19, 28], hERG [36, 114], KCNQ1 [23, 79] y los canales permeables a  $\text{Na}^+$  [83] y  $\text{Ca}^{2+}$  [117] sensibles a voltaje.

Si bien el papel que juegan el *linker* S4-S5 y el S6 en los procesos de acoplamiento y apertura está bien establecido, la naturaleza del mecanismo por el cual el *linker* “empuja” o “jala” al S6 no se ha comprendido. Las simulaciones en dinámica molecular han mostrado ser herramientas útiles para estudiar este problema [35, 38, 60, 67, 115], pero son técnicamente demandantes y requieren de mucho tiempo de cómputo. Más aún, contienen tanta información

que puede ser difícil extraer los parámetros físicos más relevantes si no se sabe dónde mirar.

## 1.2. El proceso de apertura

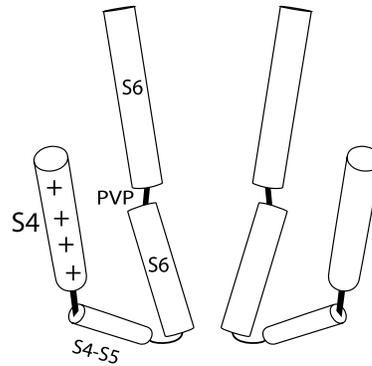
Durante más de veinte años, una gran cantidad de datos tanto funcionales como estructurales ha sido obtenida para los canales Kv. Esta información ha dado un panorama general de cómo funcionan estas proteínas: la habilidad del VSD para cambiar de conformación como función del potencial transmembranal depende principalmente del segmento transmembranal S4, que contiene un conjunto de aminoácidos cargados positivamente que interactúan directamente con el campo eléctrico transmembranal [2, 97, 102]. En un cambio de voltaje, el segmento S4 lleva a cabo una serie de movimientos que resulta en la translocación de sus cargas a través del campo eléctrico transmembranal, cambiando de un estado activado a potenciales de despolarización a un estado desactivado a potenciales negativos [10]. Información funcional indica que cuando la membrana se despolariza, los sensores de voltaje alcanzan la posición de activación de manera independiente [40, 80]. Cuando todos los sensores han alcanzado el estado de activación, el canal sufre un último conjunto de transiciones conformacionales concertadas que llevan a la apertura del poro, y que están asociadas con la translocación de alrededor del 15 % de la carga total del canal [71, 88].

La apertura del poro involucra un cambio en su diámetro interno que requiere la reorganización de los cuatro segmentos que lo componen, y que forman un sello hidrofóbico en la porción más intracelular del estado cerrado del canal [29, 54]. En los canales Kv tipo *Shaker*, estos cambios conformacionales están relacionados con la torsión del segmento S6 en un punto de rompimiento cerca de la mitad de éste, generado por el motivo Prolina-Valina-Prolina (PVP) [60, 75, 118]; en esta región, la flexibilidad de la  $\alpha$ -hélice cambia notablemente, pues es incrementada por las prolinas [8, 22, 25, 34, 66], haciendo que el motivo funcione como una bisagra. Cuando la membrana se repolariza, el canal primero sufre un conjunto de transiciones concertadas que lo cierran y, finalmente, cada sensor de voltaje regresa a su posición de reposo de manera independiente.

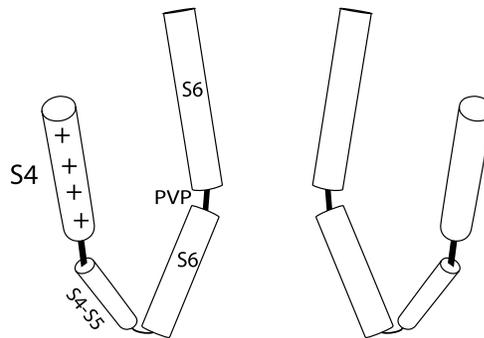
El mecanismo de acoplamiento entre el VSD y el poro depende básicamente del balance de fuerzas entre las interacciones de los segmentos S6 y los *linkers*. A diferencia de los movimientos intrínsecos del VSD, los cambios conformacionales de las regiones responsables del mecanismo de acoplamiento, así como las contribuciones energéticas de las interacciones resultantes han permane-

## 1. UN MODELO SIMPLE

---



(a) Poro en el estado cerrado.



(b) Poro en el estado abierto.

Figura 1.2: Caricatura del proceso de apertura del poro. Cuando el potencial membranal está en equilibrio, el sensor de voltaje (S4) se encuentra en una posición tal que el poro interior (formado por los segmentos S6) está cerrado. En presencia de un campo eléctrico lo suficientemente grande, el sensor de voltaje se reacomoda de tal forma que, por medio del *linker* S4-S5, ejerce una fuerza sobre el poro interno, provocando que éste se doble en su motivo PVP, que actúa como una bisagra, efectivamente abriéndolo.

cido fuera del alcance experimental. Para entender los principios físicos más relevantes que pueden ser responsables en el acoplamiento en los canales Kv, y predecir el movimiento a escalas mayores a las de la dinámica molecular, se ha construido el modelo matemático que se expone a continuación.

### 1.3. El modelo

Con el objetivo de encontrar los mecanismos subyacentes al proceso de apertura y cerrado del canal, se estudiará una representación unidimensional del movimiento de los segmentos S6, responsables de la apertura y cierre del poro, donde se consideran sus principales características.

El segmento S6 puede ser modelado como una estructura elástica, pues la longitud  $L$  del S6 en los canales Kv es de  $\sim 30 \text{ \AA}$  [75], que es mucho menor que la longitud de persistencia  $l_p \approx 100 \text{ nm}$  de una  $\alpha$ -hélice [1,21]. Así, el segmento S6 puede ser considerado una barra elástica con energía de deformación  $W$  dada por

$$W(u(x,t)) = \frac{k_B T l_p}{2} \int_0^L \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx, \quad (1.1)$$

donde  $u(x,t)$  es la posición del punto  $x$  del segmento S6 al tiempo  $t$ ,  $k_B$  la constante de Boltzman, y  $T$  la temperatura, como se muestra en la figura 1.3. Esta ecuación representa la energía de deformación de una viga con módulo de flexión  $B = k_B T l_p$  [112], donde el segmento S6 sólo realiza movimientos en el plano. Se presume que la porción del S6 localizada arriba de la bisagra formada

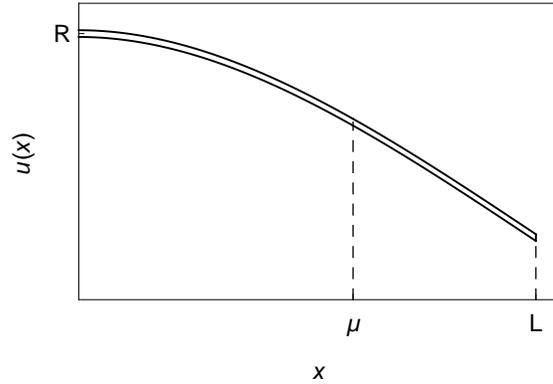


Figura 1.3: Representación del segmento S6 como una barra unidimensional empotrada, donde  $\mu$  es la posición de la bisagra y  $L$  la longitud de la barra.

por el motivo PVP es relativamente rígida ante la apertura del canal [61, 123]. Consistentemente, la distancia entre subunidades opuestas en el motivo PVP varía entre 1 y 2  $\text{\AA}$  entre los estados abierto y cerrado [67]. En cambio, la porción inferior de la hélice lleva a cabo una amplia translación al pasar de un estado al otro. Una manera simple de modelar este comportamiento es considerar que las interacciones que preservan la estructura están concentradas en el motivo PVP, mientras que las interacciones que abren y cierran el poro

actúan en el C-terminal del S6 (la punta de la viga). Las interacciones de tipo estructural representan principalmente interacciones hidrofóbicas atractivas entre las hélices S6, y las interacciones de apertura y cerradura son aquellas entre la porción C-terminal del S6 y el *linker* S4-S5. Si suponemos que las interacciones estructurales y de apertura/cerradura dependen sólo de la posición del S6, entonces la energía potencial del segmento está dada por

$$V(u(x, t)) = W(u(x, t)) + U_s(u(\mu, t)) + U_g(u(L, t)), \quad (1.2)$$

donde  $\mu$  es la posición de la bisagra sobre el S6,  $U_s$  es el potencial que preserva la estructura, que asumimos está concentrado en  $x = \mu$ , y  $U_g$  es el potencial de compuerta, que suponemos actúa en el extremo libre del segmento. Los estados estacionarios del poro pueden ser determinados al extremizar el Lagrangiano del sistema, que está dado por

$$\mathcal{L}(u(x, t)) = -U_s(u(\mu, t)) - U_g(u(L, t)) - \frac{B}{2} \int_0^L \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx. \quad (1.3)$$

Para describir las soluciones estacionarias del sistema, es necesario proporcionar las condiciones de frontera para los posibles extremales. Así, suponemos que el extremo extracelular del S6 está empotrado [75], mientras que el extremo intracelular está libre.

De este modo, podemos encontrar las ecuaciones de Euler-Lagrange del sistema para funciones en el espacio  $X = \{u(x) \in C^0[0, L] \mid u(0) = R, u'(0) = 0\}$ , donde  $R$  es el valor del radio extracelular del poro (ver figura 1.3). Sea  $h(x) \in X$  una variación, tenemos que

$$\begin{aligned} \mathcal{L}(u+h) - \mathcal{L}(u) &= \left[ U'_s(u(\mu)) - Bu''''(\mu^-) + Bu''''(\mu^+) \right] h(\mu) + Bu''(\mu^-)h'(\mu^-) \\ &\quad - Bu''(\mu^+)h'(\mu^+) + \left[ U'_g(u(L)) - Bu''''(L) \right] h(L) + Bu''(L)h(L) \\ &\quad + B \int_0^\mu u^{(4)}(x)h(x)dx + B \int_\mu^L u^{(4)}(x)h(x)dx + o(|h|^2). \end{aligned} \quad (1.4)$$

donde  $\mu^\pm = \lim_{x \rightarrow \mu^\pm} x$ , y  $|\cdot|$  es la norma del supremo [59].

Extremizando el funcional y determinando las condiciones naturales de la barra [59], las configuraciones de ésta en el estado estacionario están dadas por las soluciones del problema

$$u^{(4)}(x) = 0, \quad \begin{cases} 0 < x < \mu, \\ \mu < x < L, \end{cases} \quad (1.5a)$$

$$u(0) = 1, \quad u'(0) = 0, \quad u''(1) = 0, \quad u'''(1) - \lambda_g U'_g(u(1)) = 0, \quad (1.5b)$$

$$u''(\mu^-) = 0, \quad u''(\mu^+) = 0, \quad u'''(\mu^+) - u'''(\mu^-) + \lambda_s U'_s(u(\mu)) = 0, \quad (1.5c)$$

donde hemos introducido las variables adimensionales

$$\begin{aligned} x &\rightarrow Lx, & \mu &\rightarrow L\mu & u(x) &\rightarrow Ru(x), & U_s(u(x)) &\rightarrow E_s U_s(u(x)), \\ & & & & & & U_g(u(x)) &\rightarrow E_g U_g(u(x)), \end{aligned}$$

$E_s, E_g$  son valores característicos de las energías potenciales estructural y de compuerta, y

$$\lambda_{s,g} = \frac{L^3 E_{s,g}}{BR^2} \quad (1.6)$$

son dos constantes adimensionales que contienen la información física del sistema. Notemos que para admitir soluciones  $C^1[0, L]$ , debemos modificar las condiciones (1.5c) por

$$\begin{aligned} u'(\mu^-) - u'(\mu^+) &= 0, & u''(\mu^-) - u''(\mu^+) &= 0, \\ u'''(\mu^+) - u'''(\mu^-) &+ \lambda_s U'_s(u(\mu)) &= 0. \end{aligned} \quad (1.5c^*)$$

Así, sólo falta determinar la forma de las energías  $U_s$  y  $U_g$  para investigar el tipo de conformaciones que puede adquirir el sistema.

### 1.3.1. Los potenciales estructural y de compuerta

Las ecuaciones gobernantes del sistema son válidas para cualquier tipo de potenciales diferenciables. Una forma apropiada y simple de los mismos está dada por el potencial de Lennard-Jones, que es usado para describir las interacciones de van der Waals [58, 64],

$$U(r) = 4\epsilon \left( \frac{\sigma^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma^6}{r^6} \right), \quad (1.7)$$

donde  $2^{1/6}\sigma$  determina la posición del mínimo de potencial y  $\epsilon$  su magnitud, como se muestra en la figura 1.4. Podemos suponer que el potencial estructural está dado por

$$U_s(r) = 4\lambda_s \left( \frac{\sigma_s^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma_s^6}{r^6} \right), \quad (1.8)$$

donde  $\lambda_s = L^3 E_s / BR^2$ ,  $E_s$  es valor mínimo de  $U_s$  y  $\sigma_s$  ha sido propiamente adimensionalizado, y que el potencial de compuerta es, de hecho, dos potenciales de Lennard-Jones superpuestos: el primero estabiliza al S6 en su estado

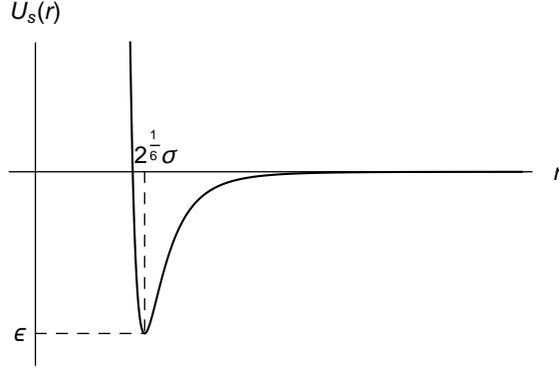


Figura 1.4: Potencial de Lennard–Jones dado por la ecuación 1.7. El parámetro  $\epsilon$  determina el valor del potencial en el mínimo y  $\sigma$  la posición donde ocurre.

cerrado, y el segundo lo hace en el estado abierto. La manera en que interactúan estos potenciales debe depender de la posición del sensor de voltaje y del *linker* S4-S5, pues determinan el estado del poro. Ciertamente, lo mismo podría decirse del potencial estructural, pero dado que el radio del poro en la bisagra es similar en ambas conformaciones, no lo tomaremos en cuenta; en el capítulo 3 discutiremos la validez y consecuencias de esta suposición.

Aún con la forma de las interacciones determinada, seguimos enfrentando un problema: cómo relacionar la posición del *linker* S4-S5 con el cambio conformacional del poro. Pensándolo de otra manera, tenemos el potencial en el estado abierto y en el estado cerrado, y la pregunta es ¿qué pasa entre uno y otro? Un método para estudiar la transición del sistema de un estado a otro es proponer una interpolación entre ambos, introduciendo un parámetro de acoplamiento  $k \in [0, 1]$ , tal que el sistema tenga la energía de un estado cuando  $k = 0$  y del otro cuando  $k = 1$ . Este método ha sido ampliamente implementado en la dinámica molecular [39] y lo usamos para proponer el potencial de compuerta

$$U_g(r; k) = 4k\lambda_o \left[ \frac{\sigma_o^{12}}{(r - H)^{12}} - \frac{\sigma_o^6}{(r - H)^6} \right] + 4(1 - k)\lambda_c \left( \frac{\sigma_c^{12}}{r^{12}} - \frac{\sigma_c^6}{r^6} \right), \quad (1.9)$$

donde  $\lambda_{o,c} = L^3 E_{o,c} / BR^2$ ,  $E_{o,c}$  son los valores del mínimo del potencial de compuerta en las conformaciones abierta y cerrada respectivamente,  $H$  establece una barrera repelente en el lado opuesto del poro, y todos los parámetros han sido adimensionalizados. El parámetro  $k$  se determina por la posición del *linker* S4-S5. Este aspecto del modelo puede ser visualizado de la siguiente manera: el potencial que estabiliza al estado cerrado representa interacciones

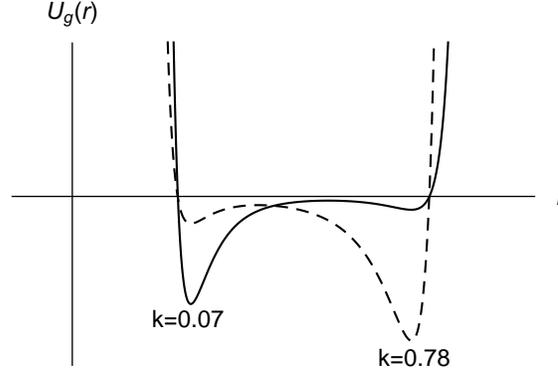


Figura 1.5: Potencial de compuerta dado por la ecuación 1.9. Para  $k = 0.07$ , el mínimo corresponde a la componente que estabiliza el estado cerrado. Cuando  $k = 0.78$ , el mínimo corresponde a la componente que estabiliza el estado abierto.

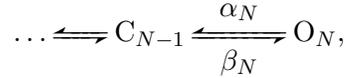
hidrofóbicas y dipolares entre la parte inferior del S6 y el *linker* S4-S5 en el estado cerrado, así como con los S6 de las otras subunidades. Sujeto a despolarización, el *linker* se mueve y reorienta respecto al S6, de tal manera que los puntos de interacción cambian, causando que las interacciones que estabilizan el cerrado se debiliten y se formen nuevas interacciones.

Cuando el sensor de voltaje está en estado desactivado, y por lo tanto el *linker* S4-S5 está en tal posición que la energía de cerradura es predominante sobre la energía de apertura, tomamos  $k = 0$ . Cuando  $k = 1$ , el sensor de voltaje está acomodado de tal manera que la energía de apertura es predominante. En otras palabras,  $k$  es una función de la posición del sensor de voltaje, tomando valores entre 0 y 1. Bajo esta construcción, el potencial  $U_g$  es *biestable*, lo que da origen a una estructura muy especial a las soluciones del sistema (1.5).

El último paso para definir los potenciales es determinar estimados realistas de los parámetros. Las estructuras disponibles para los canales Kv [33, 75, 76] y los modelos refinados de dinámica molecular [60, 67], nos dan un estimado de la longitud del poro  $L \sim 30 \text{ \AA}$ , un radio extracelular de  $R \sim 7.5 \text{ \AA}$  y un diámetro de  $\sim 12 \text{ \AA}$  en el lado intracelular del poro cuando está abierto y de  $\sim 4 \text{ \AA}$  cuando está cerrado. En la bisagra, localizada cerca de  $\mu \sim 18 \text{ \AA}$  sobre el S6, el diámetro del poro es de  $\sim 10 \text{ \AA}$ . Usando estos valores como referencia, determinamos que  $\sigma_s = 0.59$ ,  $\sigma_c = 0.21$ ,  $\sigma_o = 0.29$ ,  $\mu = 0.6$  y  $H = 1$ , para los parámetros adimensionales.

Para estimar los valores de  $\lambda_{o,c}$ , hemos usado los datos de la teoría cinética asociados con la última transición del esquema de apertura  $3 + 2'$ , propuesto

por Shoppa y Sigworth [99]. El esquema  $3 + 2'$  asume que cada subunidad en el tetrámero pasa por tres transiciones independientes en las que el sensor de voltaje alcanza el estado de activación, seguidas por dos transiciones concertadas que llevan a la apertura del poro. En este contexto, las constantes de transición asociadas al último movimiento concertado a 0 mV,  $\alpha_N$  y  $\beta_N$ , reflejan la barrera energética necesaria para abrir o cerrar al canal, de acuerdo con el siguiente esquema:



donde  $C_{N-1}$  es el último estado cerrado y  $O_N$  es el estado abierto. Para el *Shaker* silvestre, las constantes de transición  $\alpha_N$  y  $\beta_N$  a 0 mV están estimadas en  $\alpha_N(0) \approx 7000 \text{ s}^{-1}$  y  $\beta_N(0) \approx 240 \text{ s}^{-1}$  [99]. Usando la ecuación de Arrhenius [70], tenemos que la constante de transición  $k$  está dada en términos de la energía libre  $G$  por

$$k = A e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}.$$

El cambio  $\Delta G$  es la altura de la barrera para la transición ( $= E_{c,o}$ ), y el prefactor  $\nu$ , que representa la tasa límite de difusión, ha sido estimado por  $A \sim 2 \mu\text{s}^{-1}$  para proteínas [17, 122]. Juntando toda esta información, determinamos que  $\lambda_o \sim 1.25$  y  $\lambda_c \sim 0.75$ .

En el caso del parámetro estructural  $\lambda_s$ , no se conoce ninguna medición experimental o estructural que lo estime. Para determinarlo, usamos el siguiente razonamiento: si  $\lambda_s$  fuera órdenes de magnitud mayor que  $\lambda_{o,c}$ , el sistema (1.5) acoplaría débilmente la parte superior del segmento con la parte inferior del mismo, como se verá en el apartado siguiente; este fenómeno no es observado en la realidad, pues la interacción del S6 con el *linker* S4-S5 no es el único factor que determina la activación y apertura del canal; se ha mostrado que interacciones del S5 y el S6 con el sensor de voltaje S4 y otras regiones del VSD también son importantes en el proceso de apertura [73, 99, 103, 107]. Adicionalmente, se ha observado que la hélice del poro, el filtro de selectividad y la parte superior del S6 tienen una influencia en la apertura por medio de comunicación alostérica, posiblemente por transmisión de estrés mecánico [7, 125, 126]. Para asegurar el acoplamiento de la porción inferior con el estado mecánico de la porción superior del S6, necesitamos que  $\lambda_s$  sea del mismo orden que  $\lambda_{o,c}$ . De este modo, cambios en la energía potencial estructural pueden llevar a la apertura o cerradura del poro, sin importar la configuración conformacional del sensor de voltaje. Así, tomaremos  $\lambda_s \sim 1$ .

## 1.4. Soluciones estacionarias

Una vez decidido el potencial, podemos resolver el sistema (1.5). Estas soluciones son interpretadas como las posibles configuraciones de equilibrio del poro, y serán interpretadas más adelante como las conformaciones cerrada y abierta. La solución de la ecuación (1.5a) está dada por el polinomio de tercer orden

$$u(x) = \begin{cases} u_1(x) = a_1(x - \mu)^3 + b_1(x - \mu)^2 + c_1(x - \mu) + u_1(\mu), & 0 < x < \mu, \\ u_2(x) = a_2(x - 1)^3 + b_2(x - 1)^2 + c_2(x - 1) + u_2(1), & \mu < x < 1, \end{cases} \quad (1.10)$$

donde las constantes del polinomio están determinadas por las condiciones de salto y frontera (1.5b) y (1.5c) ó (1.5c\*).

### 1.4.1. Soluciones clase $C^0$

Al evaluar las condiciones lineales, se pueden determinar los coeficientes de los polinomios. Así

$$u(x) = \begin{cases} \frac{1 - u_1(\mu)}{2\mu^3}(x - \mu)^3 - \frac{3(1 - u_1(\mu))}{2}(x - \mu) + u_1(\mu), & 0 < x < \mu, \\ \frac{u_1(\mu) - u_2(1)}{\mu - 1}(x - 1), & \mu < x < 1. \end{cases} \quad (1.11)$$

Las constantes  $u_1(\mu)$  y  $u_2(1)$  las determinamos con las condiciones no lineales

$$-\frac{3(1 - u_1(\mu))}{\mu^3} + U'_s(u_1(\mu)) = 0, \quad (1.12a)$$

$$U'_g(u_2(1); k) = 0. \quad (1.12b)$$

La primera ecuación siempre tiene una solución  $0 < u_s^* < 2^{1/6}\sigma_s$ ; la segunda tiene como soluciones  $u_c^* = 2^{1/6}\sigma_c$  y  $u_o^* = 2^{1/6}\sigma_o$  para  $k = 0$  y  $k = 1$ , respectivamente. Para  $0 < k < 1$ , sea  $u_{c,o}^*(k) = u_{c,o}^* + \delta_{c,o}(k)$  donde  $\delta_{c,o}(k)$  es pequeño. Entonces

$$\begin{aligned} U'_g(u_c^*(k)) &= kU'_o(u_c^*) + \delta_c U''_g(u_c^*; k) + o(\delta_c^2(k)), \\ U'_g(u_o^*(k)) &= (1 - k)U'_c(u_o^*) + \delta_o U''_g(u_o^*; k) + o(\delta_o^2(k)), \end{aligned}$$

por lo que existen dos soluciones

$$u_c^*(k) \approx u_c^* - \frac{kU'_o(u_c^*)}{U''_g(u_c^*; k)}, \quad u_o^*(k) \approx u_o^* - \frac{(1 - k)U'_c(u_o^*)}{U''_g(u_o^*; k)}; \quad (1.13)$$

de hecho, siendo que  $U_g''(u_{c,o}^*(k)) > 0$ , existe entre ellas una tercera solución  $u_i^*(k)$ .

En resumen, si  $k = 0$  o  $k = 1$ , sólo existe una solución, y si  $0 < k < 1$  hay, al menos, tres soluciones. En la siguiente sección estudiaremos el comportamiento de las soluciones conforme el parámetro  $k$  varía y determinaremos su significado en términos del poro.

### 1.4.2. Soluciones clase $C^1$

Del mismo modo que para las soluciones clase  $C^0$ , las soluciones continuamente diferenciables son polinomios dados por la ecuación (1.10). En este caso y por razones que resultarán más evidentes en el siguiente capítulo, vamos a evaluar las condiciones lineales paso por paso, con la finalidad de dejar todas las incógnitas en términos de  $u_1(\mu)$  y  $u_2(1)$ . Así, en  $x = 0$  tenemos que

$$\begin{pmatrix} a_1 \\ b_1 \\ c_1 \end{pmatrix} = a_1 \begin{pmatrix} 1 \\ 2\mu \\ \mu^2 \end{pmatrix} + [1 - u_1(\mu)] \begin{pmatrix} 0 \\ -\frac{1}{\mu^2} \\ -\frac{2}{\mu} \end{pmatrix}; \quad (1.14)$$

en  $x = \mu$ ,

$$\begin{pmatrix} a_2 \\ b_2 \\ c_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{1}{\mu-1} & -\frac{1}{(\mu-1)^2} \\ 0 & -2 & \frac{3}{\mu-1} \\ 0 & \mu-1 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_1 \\ b_1 \\ c_1 \end{pmatrix} + [u_1(\mu) - u_2(1)] \begin{pmatrix} \frac{1}{(\mu-1)^3} \\ -\frac{3}{(\mu-1)^2} \\ \frac{3}{\mu-1} \end{pmatrix} \quad (1.15)$$

y en  $x = 1$ ,  $b_2 = 0$ .

Sean  $\mathbf{v}_i = (a_i, b_i, c_i)^T$ ,  $\mathbf{w}_1 = (0, -\frac{1}{\mu^2}, -\frac{2}{\mu})^T$ ,  $\mathbf{w}_2 = (\frac{1}{(\mu-1)^3}, -\frac{3}{(\mu-1)^2}, \frac{3}{\mu-1})^T$ ,  $\mathbf{A}$  la matriz dada en la ecuación (1.15) y  $\mathbf{e}_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) los vectores unitarios en la dirección correspondiente. Entonces podemos determinar  $a_1$  resolviendo

$$\mathbf{A}\mathbf{v}_1 \cdot \mathbf{e}_2 + [u_1(\mu) - u_2(1)]\mathbf{w}_2 \cdot \mathbf{e}_2 = 0 \quad (1.16)$$

y todas las constantes quedan determinadas como funciones lineales de  $u_1(\mu)$  y  $u_2(1)$ :

$$\begin{aligned} a_1 &= \frac{2(-2\mu^2 + \mu + 1)}{(\mu-4)(\mu-1)\mu^3} + \frac{(\mu-2)\mu-2}{(\mu-4)(\mu-1)\mu^3}u_1(\mu) + \frac{3}{(\mu-4)(\mu-1)\mu}u_2(1), \\ b_1 &= -\frac{9(\mu-1)}{(\mu-4)(\mu-1)\mu} + \frac{3(\mu-3)}{(\mu-4)(\mu-1)\mu}u_1(\mu) + \frac{6}{(\mu-4)(\mu-1)}u_2(1), \\ c_1 &= -\frac{6(\mu-1)}{(\mu-4)\mu} + \frac{3((\mu-4)\mu+2)}{(\mu-4)(\mu-1)\mu}u_1(\mu) + \frac{3\mu}{(\mu-4)(\mu-1)}u_2(1), \\ a_2 &= -\frac{3}{(\mu-4)(\mu-1)\mu} + \frac{\mu-3}{(\mu-4)(\mu-1)^2\mu}u_1(\mu) + \frac{2}{(\mu-4)(\mu-1)^2}u_2(1), \\ b_2 &= 0, \\ c_2 &= \frac{3(\mu-1)}{(\mu-4)\mu} - \frac{3}{(\mu-4)(\mu-1)\mu}u_1(\mu) + \frac{3(2-\mu)}{(\mu-4)(\mu-1)}u_2(1). \end{aligned} \quad (1.17)$$

Para encontrar los valores de  $u_1(\mu)$  y  $u_2(1)$ , usamos las condiciones no lineales del problema,

$$\mathbf{P}\mathbf{z} + \mathbf{y} = \mathbf{f}(\mathbf{z}), \quad (1.18)$$

donde

$$\mathbf{z} = \begin{pmatrix} u_1(\mu) \\ u_2(1) \end{pmatrix}, \quad \mathbf{y} = \begin{pmatrix} \frac{6((\mu-3)\mu^2+2)}{(\mu-4)(\mu-1)^2\mu^3} \\ \frac{18}{(\mu-4)(\mu-1)\mu} \end{pmatrix}, \quad (1.19)$$

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} -\frac{12}{(\mu-4)(\mu-1)^2\mu^3} & \frac{6(3-\mu)}{(\mu-4)(\mu-1)^2\mu} \\ -\frac{6(\mu-3)}{(\mu-4)(\mu-1)^2\mu} & -\frac{12}{(\mu-4)(\mu-1)^2} \end{pmatrix}, \quad \mathbf{f}(\mathbf{z}) = \begin{pmatrix} -U'_s(z_1) \\ -U'_g(z_2) \end{pmatrix}.$$

Así, hemos mostrado que encontrar soluciones del problema (1.5) es equivalente a encontrar soluciones del sistema de ecuaciones trascendentes (1.18).

Notemos que hay una gran diferencia entre encontrar soluciones  $C^0$  y  $C^1$ , pues en el último caso el sistema de ecuaciones trascendentes sí está acoplado. Afortunadamete, la estructura del sistema nos permite ver de manera directa sus soluciones. El conjunto de ecuaciones (1.18) se puede escribir como

$$\begin{aligned} u_1(\mu) &= h_{11} + h_{12}u_2(1) + \lambda_s h_{13}U'_g(u_2(1)), \\ u_2(1) &= h_{22} + h_{23}u_1(\mu) + \lambda_g h_{23}U'_s(u_1(\mu)), \end{aligned} \quad (1.20)$$

donde

$$\begin{aligned} h_{11} &= \frac{3(\mu-1)}{\mu-3}, & h_{12} &= -\frac{2\mu}{\mu-3}, & h_{13} &= \frac{\mu(\mu-1)^2(\mu-4)}{6(\mu-3)}, \\ h_{21} &= \frac{\mu^3-3\mu^2+2}{\mu^2(\mu-3)}, & h_{22} &= -\frac{2}{\mu^2(\mu-3)}, & h_{23} &= \frac{\mu(\mu-1)^2(\mu-4)}{6(\mu-3)}, \end{aligned}$$

expresiones en las que  $u_1(\mu)$  está en función de  $u_2(1)$  y viceversa. Esta estructura nos permite encontrar soluciones al modelo al determinar intersecciones entre curvas. En la siguiente sección se estudiará con detalle el significado de todas estas afirmaciones.

### 1.4.3. Dinámica y estabilidad lineal

Si queremos estudiar la dinámica del segmento S6, necesitamos agregar un término de inercia y otro de arrastre de Stokes a las ecuaciones (1.5), pero la masa del segmento es muy pequeña comparada con el arrastre de Stokes y por lo tanto hay sobreamortiguamiento, por lo que el término inercial se puede despreciar. Así, la dinámica está dada por las ecuaciones adimensionalizadas

$$u_t(x, t) + u_{xxxx}(x, t) = 0, \quad \begin{cases} 0 < x < \mu, \\ \mu < x < 1. \end{cases} \quad (1.22a)$$

$$\begin{aligned} u(0, t) = 1, \quad u_x(0, t) = 0, \quad u_{xx}(1, t) = 0, \\ u_{xxx}(1) - U'_g(u(1, t)) = 0, \end{aligned} \quad (1.22b)$$

$$\begin{aligned} u_{xx}(\mu^-, t) = 0, \quad u_{xx}(\mu^+, t) = 0, \\ u_{xxx}(\mu^+, t) - u_{xxx}(\mu^-, t) + U'_s(u(\mu, t)) = 0, \end{aligned} \quad (1.22c)$$

$$\begin{aligned} u_x(\mu^-, t) - u_x(\mu^+, t) = 0, \quad u_{xx}(\mu^-, t) - u_{xx}(\mu^+, t) = 0, \\ u_{xxx}(\mu^+, t) - u_{xxx}(\mu^-, t) + U'_s(u(\mu, t)) = 0, \end{aligned} \quad (1.22c^*)$$

y una condición inicial  $u(x, 0) = u_0(x)$ .

Si definimos el funcional de energía como

$$E(t) = U_s(u(\mu, t)) + U_g(u(1, t); k) + \frac{1}{2} \int_0^1 \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx, \quad (1.23)$$

tenemos que

$$\begin{aligned} \frac{dE}{dt} = u_t(\mu, t) [U'_s(u(\mu, t)) + u_{xxx}(\mu^+, t) - u_{xxx}(\mu^-, t)] \\ + u_t(1, t) [U'_g(u(1, t)) - u_{xxx}(1, t)] + \int_0^1 \frac{\partial^4 u}{\partial x^4} \frac{\partial u}{\partial t} dx, \end{aligned} \quad (1.24)$$

por lo que si  $u$  es solución de (1.22),

$$\frac{dE}{dt} = \int_0^1 \left( \frac{\partial u}{\partial t} \right)^2 dx \leq 0, \quad (1.25)$$

la energía es decreciente sobre las soluciones y el teorema de Lyapunov [106] garantiza que los únicos elementos del conjunto  $\omega$ -límite son los estados estacionarios.

Se puede usar un esquema simple de Crank-Nicolson [26] aplicado a las ecuaciones 1.22 para encontrar soluciones numéricas. En la siguiente sección mostraremos algunas de éstas.

Para finalizar este apartado, estudiamos las ecuaciones que determinan la estabilidad lineal del sistema (1.5). Supongamos que  $u_0(x)$  es una solución de éste y que  $u(x, t) = u_0(x) + \delta v(x, t)$  donde  $\delta \ll 1$ . Las ecuaciones que debe satisfacer la función  $v(x, t)$  son

$$v_t(x, t) + v_{xxxx}(x, t) = 0, \quad \begin{cases} 0 < x < \mu, \\ \mu < x < 1. \end{cases} \quad (1.26a)$$

$$\begin{aligned} v(0, t) = 0, \quad v_x(0, t) = 0, \quad v_{xx}(1, t) = 0, \\ v_{xxx}(1) - v(1, t)U''_g(u_0(1)) = 0, \end{aligned} \quad (1.26b)$$

$$\begin{aligned} v_{xx}(\mu^-, t) &= 0, & v_{xx}(\mu^+, t) &= 0, \\ v_{xxx}(\mu^+, t) - v_{xxx}(\mu^-, t) + v(\mu, t)U_s''(u_0(\mu)) &= 0, \end{aligned} \quad (1.26c)$$

$$\begin{aligned} v_x(\mu^-, t) - v_x(\mu^+, t) &= 0, & v_{xx}(\mu^-, t) - v_{xx}(\mu^+, t) &= 0, \\ v_{xxx}(\mu^+, t) - v_{xxx}(\mu^-, t) + v(\mu, t)U_s'(u_0(\mu)) &= 0. \end{aligned} \quad (1.26c^*)$$

Notemos que las ecuaciones (1.26) son separables, por lo que escribiendo  $v(x, t) = X(x)T(t)$ , obtenemos el sistema de ecuaciones lineales acopladas

$$T'(t) + \omega T(t) = 0, \quad 0 < t < \infty, \quad (1.27a)$$

$$X^{(4)}(x) - \omega X(x) = 0, \quad \begin{cases} 0 < x < \mu, \\ \mu < x < 1, \end{cases} \quad (1.27b)$$

$$X(0) = 0, \quad X'(0) = 0, \quad X''(1) = 0, \quad X'''(1) - X(1)U_g''(u_0(1)) = 0, \quad (1.27c)$$

$$\begin{aligned} X''(\mu^-) &= 0, & X''(\mu^+) &= 0, \\ X'''(\mu^+) - X'''(\mu^-) + X(\mu)U_s''(u_0(\mu)) &= 0, \end{aligned} \quad (1.27d)$$

$$\begin{aligned} X'(\mu^-) - X'(\mu^+) &= 0, & X''(\mu^-) - X''(\mu^+) &= 0, \\ X'''(\mu^+) - X'''(\mu^-) + X(\mu)U_s'(u_0(\mu)) &= 0. \end{aligned} \quad (1.27d^*)$$

Las soluciones estables serán pues, aquéllas con valor propio principal  $\omega > 0$ . Las ecuaciones diferenciales (1.27b) arrojan cuatro incógnitas cada una; al evaluar las condiciones de frontera y de salto, nos queda un sistema de ecuaciones lineales homogéneo de  $8 \times 8$ ; los valores propios son los valores para los cuales dicho sistema tiene soluciones no triviales. Sabemos que el espectro del problema es real, discreto, ordenado y acotado por abajo [94]. Si multiplicamos las ecuaciones (1.27b) por  $X(x)$  e integramos, el valor principal  $\omega_0$  está dado por

$$\omega_0 = \min \frac{X^2(\mu)U_s''(u_0(\mu)) + X^2(1)U_g''(u_0(1)) + \|X''(x)\|_2^2}{\|X(x)\|_2^2}, \quad (1.28)$$

donde  $\|\cdot\|_2$  es la norma en  $L^2(0, 1)$ . Si  $\omega_0 > 0$ ,  $u_0(x)$  es estable. Ahora bien, sabemos que para funciones  $C^1$  por pedazos tales que  $X(0) = X'(0) = 0$ , las desigualdad de Opial-Wirtinger garantiza que [44, 87]

$$X^2(c) \leq \frac{4\pi}{c^2} \|X''(x)\|_2^2, \quad (1.29)$$

por lo que si  $u_0(x)$  es una solución estacionaria y

$$\begin{aligned} -\frac{\pi^2}{4\mu} < U_s''(u_0(\mu)), & \quad -\frac{\pi^2}{4} < U_g''(u_0(1)), \\ \mu U_s''(u_0(\mu)) + U_g''(u_0(1)) & > -\frac{\pi^2}{4}, \end{aligned} \quad (1.30)$$

entonces  $u_0(x)$  es linealmente estable.

## 1.5. Análisis numérico de soluciones estacionarias: Bifurcaciones y biestabilidad

A continuación presentamos el estudio numérico de las soluciones al sistema (1.5). Las ecuaciones (1.12) y (1.18) pueden tener múltiples soluciones, que representan las posibles configuraciones del poro. La dependencia de estas soluciones al parámetro  $k$ , que controla la posición del sensor de voltaje, será estudiada por medio de diagramas de bifurcación.

### 1.5.1. Soluciones clase $C^0$

Como se vio en el apartado 1.4.1, para  $k = 0$  y  $k = 1$  existe una solución del problema, mientras que para  $0 < k < 1$  hay al menos tres soluciones. En la figura 1.6, presentamos el diagrama de bifurcación del problema.

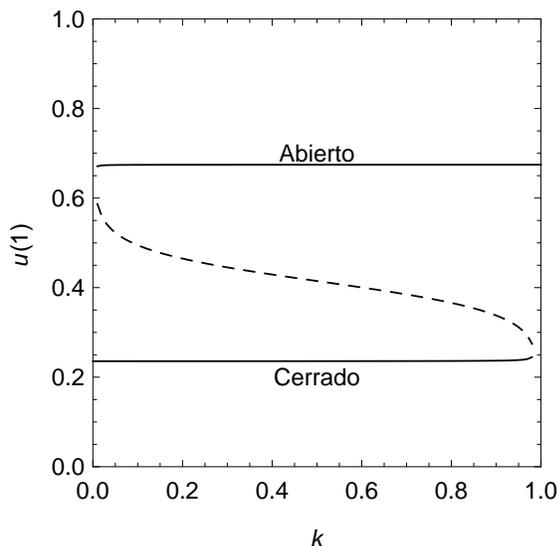


Figura 1.6: Diagrama de bifurcación del problema (1.5) para soluciones clase  $C^0$ . Para  $k = 0$  y  $k = 1$  hay una solución, mientras que para  $0 < k < 1$  hay tres. La rama punteada es inestable.

Del diagrama podemos observar que las dos soluciones derivadas de las raíces  $u_{c,o}^*(k)$  representan el estado cerrado y abierto del poro, respectivamente. Cuando  $k = 0$ , el poro está en estado cerrado y permanece cerrado hasta que

$k \sim 1$ . Entonces la raíz  $u_c^*(k)$  cesa de existir y el poro brinca al estado abierto, representado por la rama superior. De manera análoga, cuando el parámetro decrece, el poro permanece abierto hasta que  $k \sim 0$ ; la rama superior deja de existir y el segmento brinca a la solución representada por la rama inferior, es decir, el estado cerrado.

Si bien el modelo presenta biestabilidad, tiene un gran problema: las soluciones clase  $C^0$  no exhiben acoplamiento entre un lado y otro de la bisagra. Sabemos que éste no es el caso para las soluciones  $C^1$ , como veremos a continuación.

### 1.5.2. Soluciones clase $C^1$

Las múltiples raíces del sistema (1.18) representan los posibles estados del poro. Geométricamente, éstas pueden ser interpretadas como intersecciones de las funciones implícitas de  $(u(\mu), u(1))$  dadas por las ecuaciones (1.20). Toda intersección entre las curvas es una raíz del sistema y determina una solución estacionaria de (1.5). Conforme el parámetro  $k$  varía, el número, localización y naturaleza de las raíces cambia, como se muestra en la figura 1.7: si el potencial estructural es modificado, nuevos estados estables pueden ser creados y viejos estados desaparecer o volverse inestables; aún si no hay cambios en el número y naturaleza de los estados, algunos pueden volverse permanentemente inaccesibles, resultando en la inhabilidad del poro de abrir o cerrar. Graficando los punto  $(k, u(1; k))$ , donde  $u(1; k)$  son las soluciones del sistema (1.18) conforme  $0 < k < 1$ , obtenemos el diagrama de bifurcación de la figura 1.7

Al estudiar el diagrama de bifurcación mostrado en la figura 1.7, podemos entender el comportamiento del sistema. Supongamos que el estado en reposo del poro corresponde a la conformación cerrada (C). Entonces  $k = 0$  y  $u(1) \approx 0.22$ . Un cambio en el potencial membranal produce un movimiento en el sensor de voltaje, incrementando el valor de  $k$ . El poro permanecerá cerrado hasta que el potencial membranal mueva al sensor en una posición tal que  $k > k_*$ . Pasando este umbral, la rama inferior del diagrama de bifurcación –correspondiente a las configuraciones cerradas– desaparece y el poro comienza a abrirse. Cuando  $u(1)$  alcanza la rama superior, el poro se encuentra completamente abierto (O). Conforme la membrana se repolariza, el sensor de voltaje se mueve a su estado de reposo, manteniendo el poro abierto hasta que  $k < k^*$ ; entonces la rama de soluciones abiertas desaparece y el poro empieza a cerrar, hasta que alcanza la rama inferior y cierra por completo, completando el ciclo de histéresis. En la figura 1.8 observamos los estados cerrado y abierto correspondientes a las soluciones estacionarias de la ecuación (1.5).

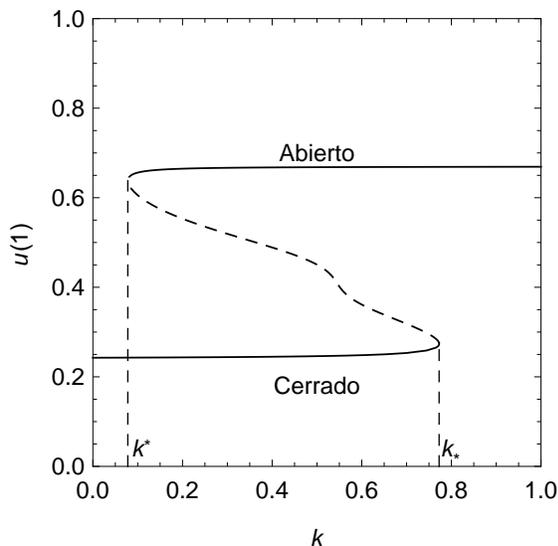


Figura 1.7: Diagrama de bifurcación del problema (1.5) para soluciones clase  $C^1$ , donde  $\lambda_s = 1.25$ ,  $\lambda_c = 0.75$ ,  $\lambda_o = 1.20$ . Si  $0 < k < k^*$ , existe una única solución estacionaria, correspondiente al estado cerrado del canal; para  $k = k^*$ , hay dos soluciones, correspondientes al estado cerrado y abierto. Para  $k^* < k < k_*$ , existen tres soluciones; cuando  $k_* < k < 1$ , existe una sólo solución, correspondiente al estado abierto del canal. Las ramas punteadas representan soluciones inestables.

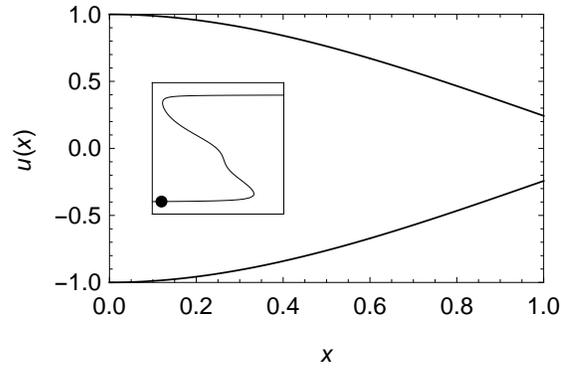
Sorprendentemente, bajo ciertas condiciones, la bifurcación muestra estados parcialmente abiertos (PO). Éste es un fenómeno notable, pues es consecuencia únicamente de la forma de los potenciales  $U_s$  y  $U_g$ , y los estados parcialmente abiertos para los canales Kv han sido reportados [18, 55, 57, 98]. En la figura 1.9, podemos ver tres diagramas de bifurcación diferentes exhibiendo estados semiconductivos, mostrando que el poro puede llevar a cabo diferentes ciclos histérisis, dependiendo del valor de los parámetros:

$$C \rightarrow PO \rightarrow O \rightarrow C, \quad (\text{figura 1.9a})$$

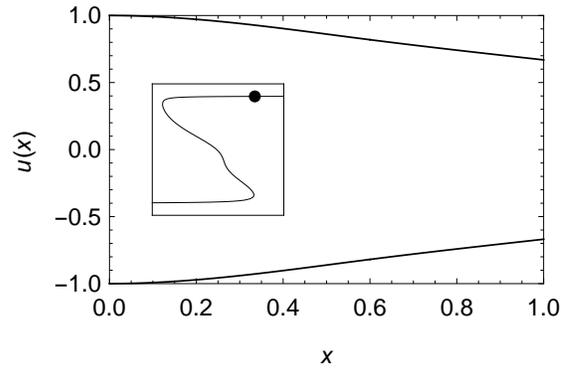
$$C \rightarrow O \rightarrow PO \rightarrow C, \quad (\text{figura 1.9b})$$

$$C \rightarrow PO \rightarrow O \rightarrow PO \rightarrow C. \quad (\text{figura 1.9c})$$

De la figura 1.9 podemos deducir el ciclo de histérisis de un canal que pasa por un estado parcialmente activado. Por ejemplo, en 1.9a, cuando  $0 < k < k_*$ , el poro está cerrado. Conforme  $k$  pasa el punto de bifurcación  $k_*$ , el poro se abre parcialmente; así, cuando  $k > k_{**}$  el poro se abre por completo. Bajo repolarización, el poro cierra sin pasar por el estado de apertura parcial. En



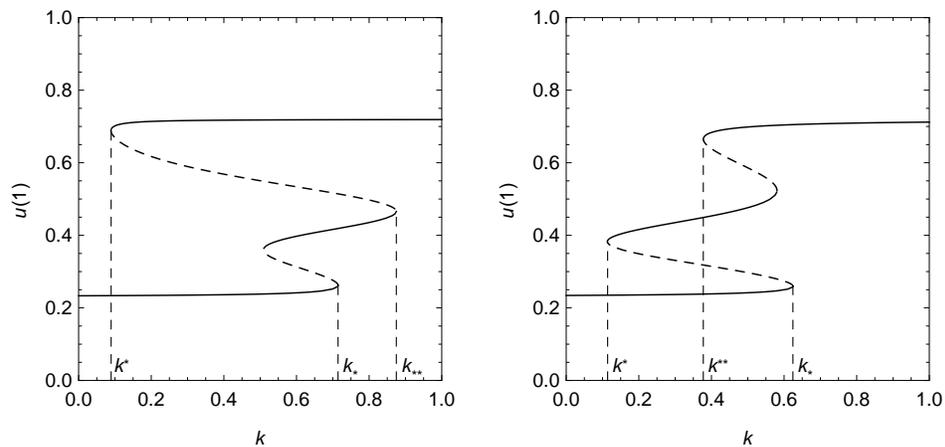
(a) Estado cerrado,  $k = 0.07$ .



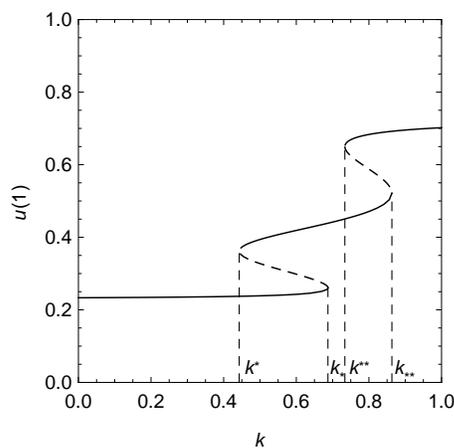
(b) Estado abierto,  $k = 0.78$ .

Figura 1.8: Conformaciones estables del poro. Suponiendo que partimos del estado cerrado, cuando el parámetro  $k \in (0, k_*)$ , el poro permanece cerrado, como se muestra en (a). Una vez que  $k > k_*$ , las soluciones estacionarias correspondientes al estado cerrado cesan de existir y el poro se abre, lo que se puede observar en (b).

## 1. UN MODELO SIMPLE



(a)  $\lambda_s = 1.30$ ,  $\lambda_c = 0.60$ ,  $\lambda_o = 1.00$ ,  $\sigma_s = 0.60$ ,  $\sigma_c = 0.20$ ,  $\sigma_o = 0.29$ ,  $H = 1.05$ .  
 (b)  $\lambda_s = 2.00$ ,  $\lambda_c = 0.70$ ,  $\lambda_o = 1.10$ ,  $\sigma_s = 0.62$ ,  $\sigma_c = 0.20$ ,  $\sigma_o = 0.43$ ,  $H = 1.20$ .



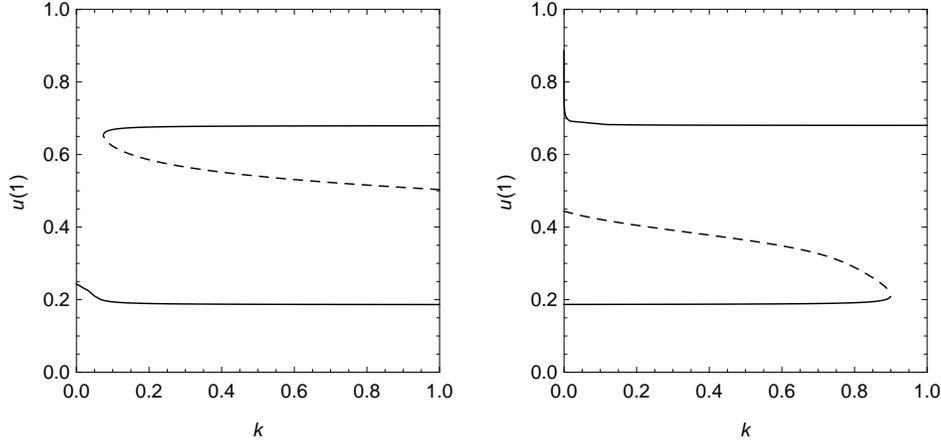
(c)  $\lambda_s = 2.50$ ,  $\lambda_c = 0.70$ ,  $\lambda_o = 1.10$ ,  $\sigma_s = 0.61$ ,  $\sigma_c = 0.20$ ,  $\sigma_o = 0.60$ ,  $H = 1.40$ .

Figura 1.9: Diagramas de bifurcación de estados parcialmente abiertos.

1.9b, el estado parcialmente abierto sólo es accesible desde el abierto, y en 1.9c el poro pasa por un estado parcialmente abierto, tanto en despolarización, como en repolarización.

Otro fenómeno que se puede observar es que pequeñas variaciones en los valores de los parámetros del sistema conducen a la desconexión entre ramas del diagrama de bifurcación, rompiendo el ciclo de histéresis del poro, dejándolo abierto o cerrado de manera permanente. En la figura 1.10 podemos ver

diagramas de bifurcación de poros con funcionalidad rota. En todos los casos, los parámetros se encuentran en la escala del comportamiento biestable descrito en la figura 1.7. Esta alta sensibilidad puede explicar por qué mutaciones específicas en el S6 o en el *linker* S4-S5 pueden llevar a la rotura en la funcionalidad del poro [43, 68, 110].



(a)  $\lambda_s = 2.00$ ,  $\lambda_c = 0.70$ ,  $\lambda_o = 1.20$ ,  $\sigma_s = 0.53$ ,  $\sigma_c = 0.16$ ,  $\sigma_o = 0.29$ ,  $H = 1.00$ . (b)  $\lambda_s = 1.00$ ,  $\lambda_c = 0.70$ ,  $\lambda_o = 1.20$ ,  $\sigma_s = 0.53$ ,  $\sigma_c = 0.16$ ,  $\sigma_o = 0.29$ ,  $H = 1.00$ .

Figura 1.10: Diagramas de bifurcación de poros con funcionalidad rota. En (a), si el poro está cerrado, el estado abierto es inalcanzable; en (b) la situación opuesta sucede.

En las figuras 1.11 a 1.14, presentamos los ciclos de histéresis de los diagramas de bifurcación.

## 1.6. Consecuencias del modelo

Es notable que un modelo basado en el acoplamiento entre fuerzas mecánicas y de van der Waals a escala mesoscópica exhiba las características principales de la apertura de los canales Kv. Con este enfoque, los principios físicos principales han sido considerados como la base de un sistema inherentemente complejo. Como resultado, un modelo con un comportamiento muy rico ha sido desarrollado, donde es claro cómo las interacciones entre las componentes del canal afectan el estado conformacional del poro.

Es bien sabido que la estructura de las proteínas está determinada por interacciones dipolares e hidrofóbicas, más que interacciones eléctricas localizadas. Las interacciones entre el S6 y el *linker* S4-S5 en los canales Kv dependen altamente de los vectores de hidrofobicidad de cada región [69], más

## 1. UN MODELO SIMPLE

---

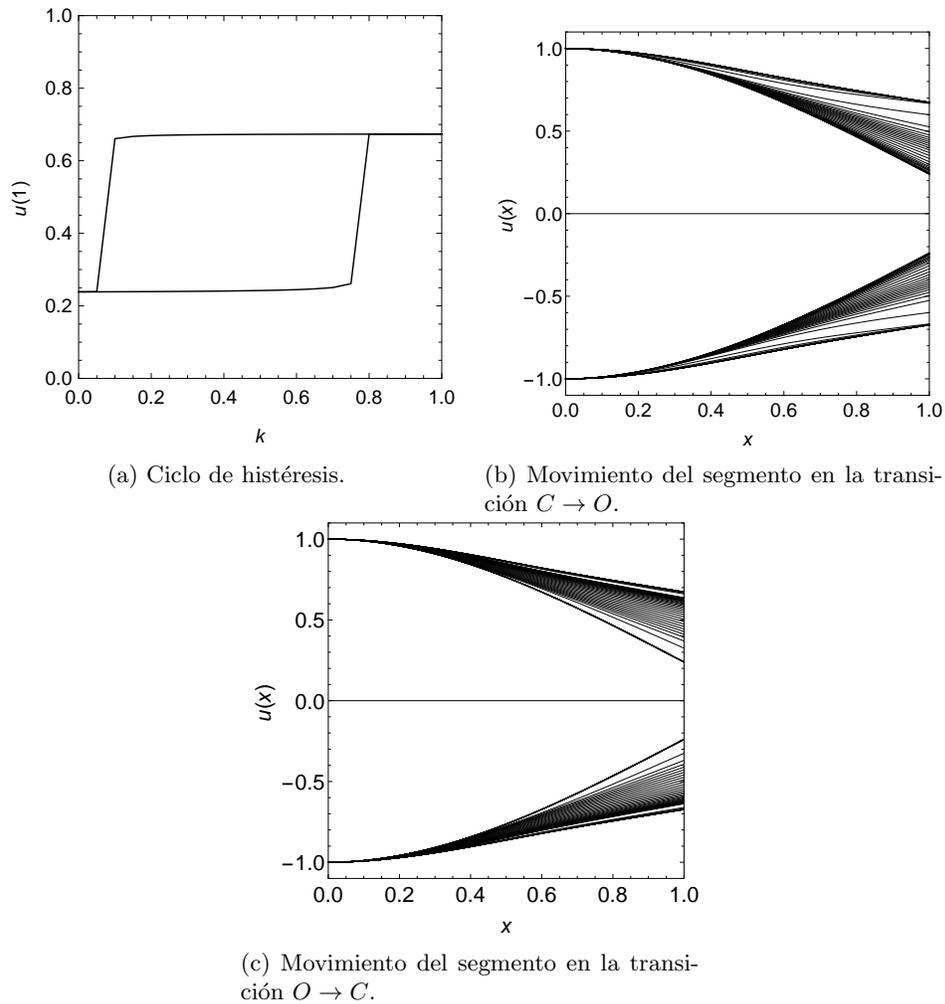


Figura 1.11: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 1.7.

que, por ejemplo, la formación de un puente salino, por lo que el potencial de Lennard-Jones es una aproximación adecuada de las interacciones. Por supuesto, las interacciones pudieran no ser exactamente de la forma propuesta para  $U_s$  y  $U_g$ ; si un diferente panorama de energía fuera presentado, podemos seguir utilizando las ecuaciones (1.5) para determinar los posibles estados estacionarios con el mismo enfoque, como se verá en los siguientes capítulos, lo que muestra lo robusto de nuestro acercamiento. Por ejemplo, la apertura del S6 en el canal de  $K^+$  sensible a pH, KscA, ha mostrado depender del estado

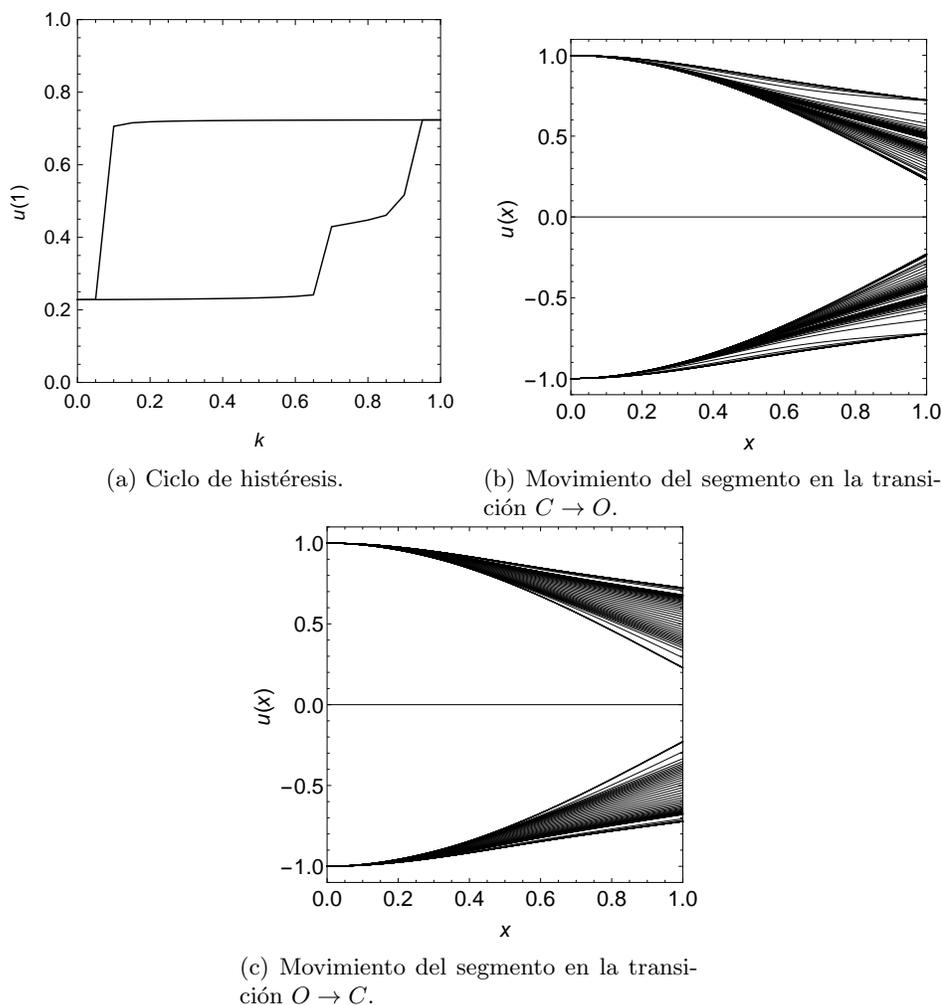


Figura 1.12: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 1.9a. Se observa el estado semiabierto en la dirección de hiperpolarización.

de protonación de los residuos ácidos localizados en la porción interior de la hélice S6 [27]. El modelo puede ser modificado para incluir una fuerza de Coulomb repulsiva que dependa del valor del pH en la punta de la hélice, en vez de los potenciales de Lennard-Jones.

Un aspecto que puede ser integrado al modelo es la posible interacción del S6 con el S5 y las regiones del VSD que rodean al poro, cuyos efectos se cree que son importantes en la mediación de las interacciones cooperativas durante la transición concertada que abre el poro [73, 107]. Este problema

## 1. UN MODELO SIMPLE

---

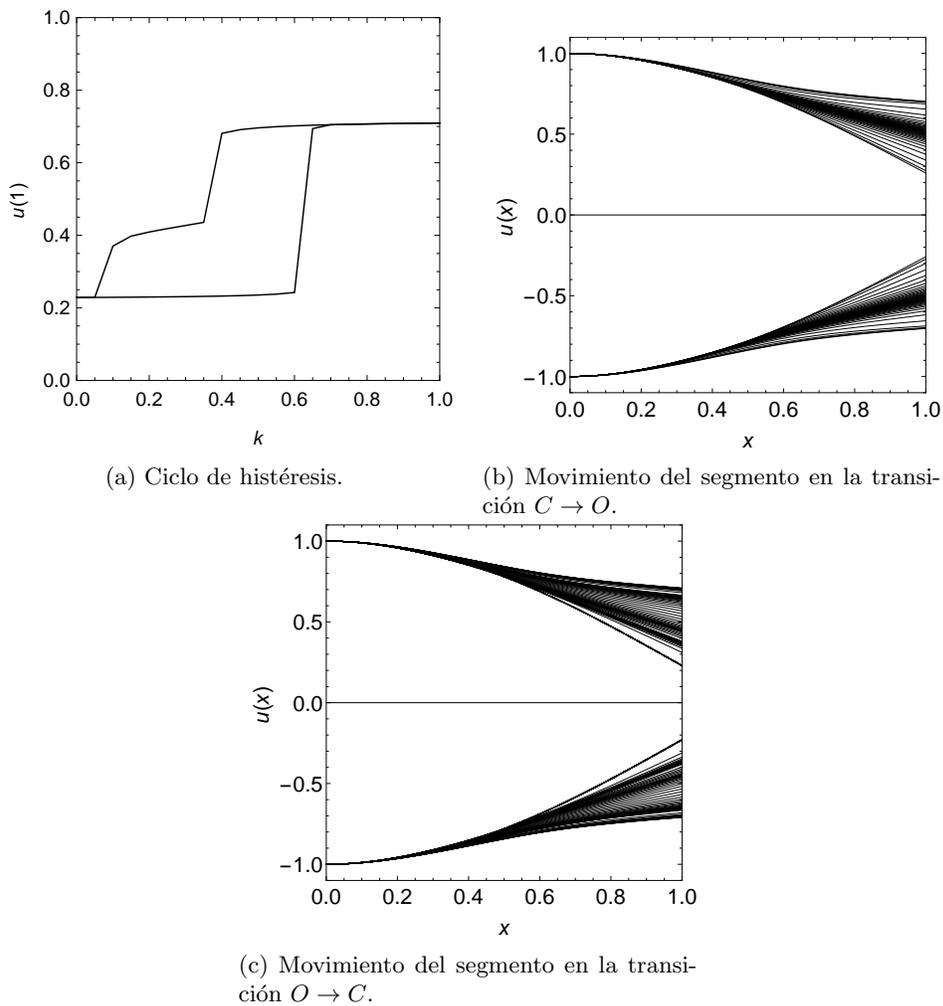


Figura 1.13: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 1.9b. En este caso, el estado semiabierto se da en la dirección de repolarización.

también será abordado en los siguientes capítulos.

Un resultado del modelo es que el comportamiento del poro puede cambiar drásticamente con cambios relativamente pequeños en la energía de los potenciales estructural y de compuerta, de tal forma que se pueden generar estados de subconductividad o producir fenotipos permanentemente abiertos o cerrados. Por ejemplo, los cambios en el potencial estructural necesarios para eliminar los estados abierto o cerrado (figura 1.10), reflejados en los valores de  $\lambda$ , corresponden a cambios en la energía de  $3.42 k_B T$  ó  $1.13 k_B T$ , respecti-

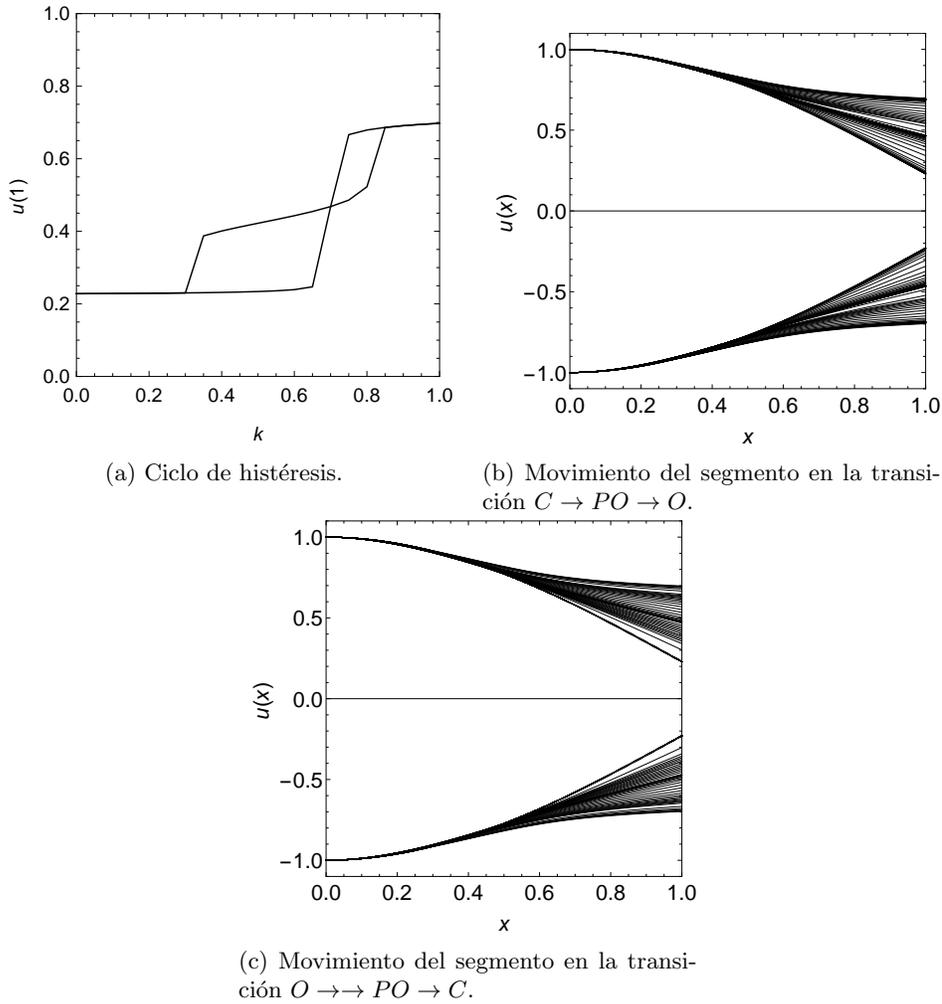


Figura 1.14: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 1.9c. Hay dos estados semiabiertos, en ambas direcciones del ciclo de histéresis.

vamente. Estos cambios son equivalentes a 0.34 y 0.11 kcal/mol a 25 °C, que son bastante similares a los cambios medidos experimentalmente, causados por mutaciones en el S6, cuyos valores absolutos se encuentran entre 0.1 y 0.8 kcal/mol en promedio [124]. Este hecho refleja que pequeñas perturbaciones, correspondientes a mutaciones puntuales, pueden resultar en grandes cambios en el comportamiento de los canales, como se observa en los experimentos [27, 68, 110]. Ciertamente, no todas las mutaciones puntuales en el S6 tienen grandes efectos en el comportamiento del canal, y la alta sensibili-

dad parece ser una consecuencia de que todas las interacciones posibles están agrupadas en unas pocas muy significativas.

Sin duda, pueden hacerse numerosas objeciones al modelo; la más evidente es la aproximación bidimensional a un fenómeno tridimensional; otra más es la reducción de las interacciones a dos, pues es sabido que hay otras que pueden jugar un papel importante en el funcionamiento del poro. Por ejemplo, se cree que hay dos puntos que actúan como bisagra en el segmento S6, el motivo PXP (presente en las superfamilias Kv1 a Kv4), y una glicina altamente conservada (G398 en el Kv1.2 de la rata), que también han sido implicadas en el proceso de acoplamiento [30, 61, 100]. La misma forma de las interacciones pudiera ser considerada como una arbitrariedad. En el capítulo 2 investigaremos la manera en que el modelo se modifica al considerar más interacciones, y en el capítulo 3 estudiaremos la forma de las interacciones, el alcance del enfoque bidimensional, y aplicaremos el modelo a las estructuras cristalizadas de los canales Kv1.2 y al quimera Kv1.2/2.1.

## Capítulo 2

# Extensión del modelo

En este capítulo hacemos una extensión del modelo planteado anteriormente, con el objetivo de ampliar su alcance. Este acercamiento nos permitirá, en el capítulo siguiente, estudiar con libertad la estructura y funcionamiento de los canales Kv en el contexto del mismo.

Consideremos pues, una barra empotrada en un extremo y sujeta a la acción de potenciales en puntos arbitrarios  $\mu_i$  de la misma. Entre cada uno de estos puntos, su módulo de elasticidad  $B_i$  puede tomar un valor constante distinto, como se muestra en la figura 2.1. Esta consideración nos permitirá obtener soluciones  $C^1$  para una barra con cambios en su flexibilidad, como ocurre para el segmento S6 en el motivo PVP.

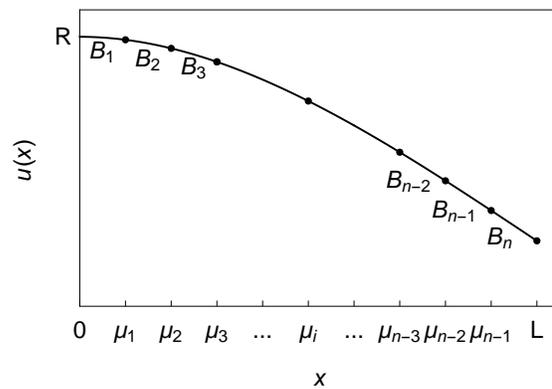


Figura 2.1: Barra empotrada con diferentes módulos de elasticidad entre los puntos  $\mu_i$ .

## 2.1. Ecuaciones de Euler-Lagrange

El Lagrangiano de la barra está dado por

$$\mathcal{L}(u(x, t)) = \sum_{i=1}^n U_i(u(\mu_i, t)) + \frac{B_i}{2} \int_{\mu_{i-1}}^{\mu_i} \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx, \quad (2.1)$$

donde  $0 = \mu_0 < \mu_1 < \dots < \mu_{n-1} < \mu_n = L$  y  $U_i$  son los potenciales que actúan sobre estos puntos, y hemos despreciado los términos inerciales. Además, como en el modelo simple, consideraremos la barra empotrada en un extremo y libre en el otro, es decir

$$u(0, t) = R, \quad u_x(0, t) = 0. \quad (2.2)$$

Calculando la derivada de Fréchet, obtenemos

$$\begin{aligned} D\mathcal{L}(u)h &= \sum_{i=1}^n \int_{\mu_{i-1}}^{\mu_i} \partial_x^4 u(x, t) h(x, t) dx \\ &+ B_n u_{xx}(\mu_n, t) h_x(\mu_n, t) + \{-B_n u_{xxx}(\mu_n, t) + U'_n(u(\mu_n, t))\} h(\mu_n, t) \\ &+ \sum_{i=1}^{n-1} \{B_{i+1} u_{xxx}(\mu_i^+, t) - B_i u_{xxx}(\mu_i^-, t) + U'_i(u(\mu_i, t))\} h_x(\mu_i, t) \\ &+ \sum_{i=1}^{n-1} \{B_i u_{xx}(\mu_i^-, t) - B_{i+1} u_{xx}(\mu_i^+, t)\} h_x(\mu_i, t) \end{aligned} \quad (2.3)$$

Como se mencionó en el capítulo anterior, la barra, como representación de los segmentos S6, tiene muy poca masa comparada con el arrastre de Stokes debido a las aguas que se encuentran dentro del poro, por lo que supondremos que la dinámica de la barra está bien representada por un flujo gradiente. Así, introduciendo un término disipativo, obtenemos las ecuaciones de movimiento

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{\partial^4 u}{\partial x^4} = 0, \quad \mu_{i-1} < x < \mu_i, \quad (i = 1, \dots, n) \quad (2.4a)$$

$$u(x, 0) = u_0(x), \quad (2.4b)$$

$$u(\mu_0, t) = u_0(\mu_0) = R, \quad u_x(\mu_0, t) = 0, \quad (2.4c)$$

$$\begin{aligned} u(\mu_i^+, t) - u(\mu_i^-, t) &= 0, \quad u_x(\mu_i^+, t) - u_x(\mu_i^-, t) = 0, \quad (1 \leq i \leq n-1) \\ B_{i+1} u_{xx}(\mu_i^+, t) - B_i u_{xx}(\mu_i^-, t) &= 0, \end{aligned} \quad (2.4d)$$

$$B_{i+1} u_{xxx}(\mu_i^+, t) - B_i u_{xxx}(\mu_i^-, t) + U'_i(u(\mu_i, t)) = 0, \quad (1 \leq i \leq n-1) \quad (2.4e)$$

$$u_{xx}(\mu_n, t) = 0, \quad -B_n u_{xxx}(\mu_n, t) + U'_n(u(\mu_n, t)) = 0, \quad (2.4f)$$

donde  $u_0(x)$  es la configuración inicial de la barra. Por conveniencia, no adimensionalizaremos las ecuaciones.

## 2.2. Soluciones estacionarias

En el capítulo anterior, calculamos las soluciones estacionarias para el caso  $n = 2$ . Como se verá a continuación, el caso  $n > 2$  no es diferente. Así, dado que las soluciones estacionarias de (2.4) son polinomios cúbicos  $C^1$  por pedazos, los proponemos de la forma

$$u(x, t) = \begin{cases} a_1(x - \mu_1)^3 + b_1(x - \mu_1)^2 + c_1(x - \mu_1) + u_1, & \mu_0 < x < \mu_1, \\ a_2(x - \mu_2)^3 + b_2(x - \mu_2)^2 + c_2(x - \mu_2) + u_2, & \mu_1 < x < \mu_2, \\ \vdots & \\ a_i(x - \mu_i)^3 + b_i(x - \mu_i)^2 + c_i(x - \mu_i) + u_i, & \mu_{i-1} < x < \mu_i, \\ \vdots & \\ a_n(x - \mu_n)^3 + b_n(x - \mu_n)^2 + c_n(x - \mu_n) + u_n, & \mu_{n-1} < x < \mu_n, \end{cases} \quad (2.5)$$

donde  $u_i = u(\mu_i)$ .

En el modelo simple, al expresar las constantes  $a_i$ ,  $b_i$  y  $c_i$  en función de la posición de la barra en la bisagra y el extremo libre, establecimos una equivalencia entre la ecuación diferencial para las condiciones estacionarias, y un sistema de ecuaciones trascendentes acopladas. De la misma forma podemos proceder aquí. Primero, consideremos las condiciones de frontera en  $x = \mu_0 = 0$ ,  $u(0) = u_0$  y  $u'(0) = 0$ ,

$$-a_1\mu_1^3 + b_1\mu_1^2 - c_1\mu_1 + u_1 = u_0, \quad (2.6)$$

$$3a_1\mu_1^2 - 2b_1\mu_1 + c_1 = 0. \quad (2.7)$$

Despejando  $b_1$  y  $c_1$ , escribimos la identidad

$$\mathbf{v}_1 = \begin{pmatrix} a_1 \\ b_1 \\ c_1 \end{pmatrix} = a_1 \begin{pmatrix} 1 \\ 2\mu_1 \\ \mu_1^2 \end{pmatrix} + [u_0 - u_1] \begin{pmatrix} 0 \\ -\frac{1}{\mu_1^2} \\ -\frac{2}{\mu_1} \end{pmatrix} = a_1 \mathbf{v}_0 + [u_0 - u_1] \mathbf{w}_0, \quad (2.8)$$

donde  $\mathbf{v}_0 = (1, 2\mu_1, \mu_1^2)^T$  y  $\mathbf{w}_0 = (0, -\frac{1}{\mu_1^2}, -\frac{2}{\mu_1})^T$ . La razón de escribir así las condiciones se volverá aparente más adelante.

En  $x = \mu_1$ , las condiciones lineales de salto establecen que

$$a_2(\mu_1 - \mu_2)^3 + b_2(\mu_1 - \mu_2)^2 + c_1(\mu_1 - \mu_2) + u_2 = u_1, \quad (2.9)$$

$$3a_2(\mu_1 - \mu_2)^2 + 2b_2(\mu_1 - \mu_2) + c_2 = c_1, \quad (2.10)$$

$$6a_2(\mu_1 - \mu_2) + 2b_2 = \frac{2B_1}{B_2}b_1 \quad (2.11)$$

## 2. EXTENSIÓN DEL MODELO

---

o, expresando  $a_2$ ,  $b_2$  y  $c_2$  en términos de  $a_1$ ,  $b_1$  y  $c_1$ ,

$$\begin{aligned} \mathbf{v}_2 = \begin{pmatrix} a_2 \\ b_2 \\ c_2 \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} 0 & \frac{B_1}{B_2(\mu_1-\mu_2)} & -\frac{1}{(\mu_1-\mu_2)^2} \\ 0 & -\frac{2B_1}{B_2} & \frac{3}{(\mu_1-\mu_2)} \\ 0 & \frac{B_1(\mu_1-\mu_2)}{B_2} & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_1 \\ b_1 \\ c_1 \end{pmatrix} + [u_1 - u_2] \begin{pmatrix} \frac{1}{(\mu_1-\mu_2)^3} \\ -\frac{3}{(\mu_1-\mu_2)^2} \\ \frac{3}{(\mu_1-\mu_2)} \end{pmatrix} \\ &= \mathbf{A}_1 \mathbf{v}_1 + [u_1 - u_2] \mathbf{w}_1. \end{aligned} \quad (2.12)$$

Las condiciones lineales de salto son las mismas para todos los  $\mu_i$ , por lo que podemos escribir la relación de recurrencia

$$\begin{aligned} \mathbf{v}_{i+1} = \begin{pmatrix} a_{i+1} \\ b_{i+1} \\ c_{i+1} \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} 0 & \frac{B_i}{B_{i+1}\Delta_i} & -\frac{1}{\Delta_i^2} \\ 0 & -\frac{2B_i}{B_{i+1}} & \frac{3}{\Delta_i} \\ 0 & \frac{B_i\Delta_i}{B_{i+1}} & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_i \\ b_i \\ c_i \end{pmatrix} + [u_i - u_{i+1}] \begin{pmatrix} \frac{1}{\Delta_i^3} \\ -\frac{3}{\Delta_i^2} \\ \frac{3}{\Delta_i} \end{pmatrix} \\ &= \mathbf{A}_i \mathbf{v}_i + [u_i - u_{i+1}] \mathbf{w}_i, \end{aligned} \quad (2.13)$$

donde  $\Delta_i = \mu_i - \mu_{i+1}$ ,  $i = 1, \dots, n-1$ .

Si definimos

$$\mathbf{Q}_m^n = \begin{cases} \mathbf{A}_n \mathbf{A}_{n-1} \cdots \mathbf{A}_m, & m < n, \\ \mathbf{A}_n, & m = n, \\ \mathbf{I}, & m > n, \end{cases} \quad (2.14)$$

entonces, usando la relación de recurrencia (2.13),

$$\mathbf{v}_k = a_1 \mathbf{Q}_1^{k-1} \mathbf{v}_0 + \sum_{i=0}^{k-1} (u_i - u_{i+1}) \mathbf{Q}_{i+1}^{k-1} \mathbf{w}_i, \quad (2.15)$$

y la condición natural  $u_{xx}(\mu_n, t) = 0$  nos dice que  $b_n = 0$ , por lo que  $\mathbf{v}_n \cdot \mathbf{e}_2 = 0$ , donde  $\mathbf{e}_2 = (0, 1, 0)^T$ , y entonces

$$\begin{aligned} a_1 &= - \sum_{i=0}^{n-1} \frac{(u_i - u_{i+1}) \mathbf{Q}_{i+1}^{n-1} \mathbf{w}_i \cdot \mathbf{e}_2}{\mathbf{Q}_1^{n-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2}, \\ &= \alpha_1 u_0 + \mathbf{p}_1 \cdot \mathbf{z}, \end{aligned} \quad (2.16)$$

donde  $\mathbf{p}_1 = (p_{11}, p_{12}, \dots, p_{1n})^T$ ,  $\mathbf{z} = (u_1, u_2, \dots, u_n)$ ,

$$\alpha_1 = - \frac{\mathbf{Q}_1^{n-1} \mathbf{w}_0 \cdot \mathbf{e}_2}{\mathbf{Q}_1^{n-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2}, \quad (2.17a)$$

$$p_{1j} = \begin{cases} \frac{(\mathbf{Q}_j^{n-1} \mathbf{w}_{j-1} - \mathbf{Q}_{j+1}^{n-1} \mathbf{w}_j) \cdot \mathbf{e}_2}{\mathbf{Q}_1^{n-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2}, & 1 \leq j < n, \\ \frac{\mathbf{Q}_n^{n-1} \mathbf{w}_{n-1} \cdot \mathbf{e}_2}{\mathbf{Q}_1^{n-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2}, & j = n. \end{cases} \quad (2.17b)$$

De este modo, los coeficientes de la solución (2.5) están dados por

$$b_1 = \beta_1 u_0 + \mathbf{q}_1 \cdot \mathbf{z}, \quad (2.18a)$$

$$c_1 = \gamma_1 u_0 + \mathbf{r}_1 \cdot \mathbf{z}, \quad (2.18b)$$

donde  $\mathbf{q}_1 = (q_{11}, q_{12}, \dots, q_{1n})$ ,  $\mathbf{r}_1 = (r_{11}, r_{12}, \dots, r_{1n})$ ,

$$\beta_1 = (\alpha_1 \mathbf{v}_0 + \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_2, \quad (2.19a)$$

$$\gamma_1 = (\alpha_1 \mathbf{v}_0 + \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_3, \quad (2.19b)$$

$$q_{1j} = \begin{cases} (p_{11} \mathbf{v}_0 - \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_2, & j = 1, \\ p_{1j} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2, & 1 < j \leq n, \end{cases} \quad (2.19c)$$

$$r_{1j} = \begin{cases} (p_{11} \mathbf{v}_0 - \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_3, & j = 1, \\ p_{1j} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_3, & 1 < j \leq n. \end{cases} \quad (2.19d)$$

Del mismo modo,

$$a_i = \alpha_i u_0 + \mathbf{p}_i \cdot \mathbf{z}, \quad (2.20a)$$

$$b_i = \beta_i u_0 + \mathbf{q}_i \cdot \mathbf{z}, \quad (2.20b)$$

$$c_i = \gamma_i u_0 + \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{z}, \quad (2.20c)$$

donde

$$\alpha_i = \mathbf{Q}_1^{i-1} (\alpha_1 \mathbf{v}_0 + \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_1, \quad (2.21a)$$

$$\beta_i = \mathbf{Q}_1^{i-1} (\alpha_1 \mathbf{v}_0 + \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_2, \quad (2.21b)$$

$$\gamma_i = \mathbf{Q}_1^{i-1} (\alpha_1 \mathbf{v}_0 + \mathbf{w}_0) \cdot \mathbf{e}_3, \quad (2.21c)$$

$$p_{im} = \begin{cases} (p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 + \mathbf{Q}_{m+1}^{i-1} \mathbf{w}_m - \mathbf{Q}_m^{i-1} \mathbf{w}_{m-1}) \cdot \mathbf{e}_1, & 1 < m < i, \\ (p_{1i} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 - \mathbf{Q}_i^{i-1} \mathbf{w}_{i-1}) \cdot \mathbf{e}_1, & m = i, \\ p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_1, & i < m \leq n, \end{cases} \quad (2.21d)$$

$$q_{im} = \begin{cases} (p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 + \mathbf{Q}_{m+1}^{i-1} \mathbf{w}_m - \mathbf{Q}_m^{i-1} \mathbf{w}_{m-1}) \cdot \mathbf{e}_2, & 1 < m < i, \\ (p_{1i} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 - \mathbf{Q}_i^{i-1} \mathbf{w}_{i-1}) \cdot \mathbf{e}_2, & m = i, \\ p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_2, & i < m \leq n, \end{cases} \quad (2.21e)$$

$$r_{im} = \begin{cases} (p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 + \mathbf{Q}_{m+1}^{i-1} \mathbf{w}_m - \mathbf{Q}_m^{i-1} \mathbf{w}_{m-1}) \cdot \mathbf{e}_3, & 1 < m < i, \\ (p_{1i} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 - \mathbf{Q}_i^{i-1} \mathbf{w}_{i-1}) \cdot \mathbf{e}_3, & m = i, \\ p_{1m} \mathbf{Q}_1^{i-1} \mathbf{v}_0 \cdot \mathbf{e}_3, & i < m \leq n, \end{cases} \quad (2.21f)$$

y, como en el caso de dos puntos, todos los coeficientes de las soluciones (2.5) son funciones lineales del vector  $\mathbf{z}$ . Así, usando las condiciones de salto no lineales, las soluciones estacionarias del sistema (2.4) están dadas por las soluciones

del sistema de ecuaciones trascendente

$$\mathbf{P}\mathbf{z} + \mathbf{y} = \mathbf{f}(\mathbf{z}), \quad (2.22)$$

donde

$$\frac{1}{6}\mathbf{P} = (\mathbf{p}_2 - \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_3 - \mathbf{p}_2, \dots, \mathbf{p}_n - \mathbf{p}_{n-1}, -\mathbf{p}_n)^T, \quad (2.23)$$

$$\mathbf{y} = u_0 \begin{pmatrix} \alpha_2 - \alpha_1 \\ \alpha_3 - \alpha_2 \\ \vdots \\ \alpha_n - \alpha_{n-1} \\ -\alpha_n \end{pmatrix}, \quad \mathbf{f}(\mathbf{z}) = \begin{pmatrix} -U'_1(u_1) \\ -U'_2(u_2) \\ \vdots \\ -U'_{n-1}(u_{n-1}) \\ -U'_n(u_n) \end{pmatrix}.$$

Podemos ver que no hay mayor diferencia entre trabajar con dos o  $n$  potenciales, más allá de aumentar la dimensionalidad del sistema de ecuaciones trascendentes. Ésto va a ser de gran utilidad en el siguiente capítulo, donde aprovecharemos la simplicidad del modelo para estudiar de manera más detallada el proceso de apertura de los canales Kv.

### 2.2.1. Ejemplo: $n = 5$

Como ejemplo, vamos a considerar el sistema con tres potenciales y un cambio en la elasticidad de la barra, como se muestra en la figura 2.2. Este sistema servirá de punto de partida en el análisis que realizaremos en el capítulo 3.

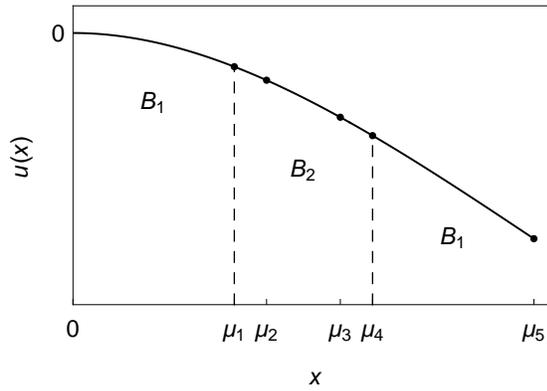


Figura 2.2: Barra con dos diferentes módulos de elasticidad  $B_1$  y  $B_2$  entre los puntos  $\mu_1$  y  $\mu_4$ .

Tomaremos los potenciales  $U_i$  de la siguiente forma:

$$U_1(u_1; k) = 0, \quad (2.24a)$$

$$U_2(u_2; k) = 4\lambda_{2,o} \left( \frac{\sigma_{2,o}^{12}}{(u_2 - H_{2,o})^{12}} - \frac{\sigma_{2,o}^6}{(u_2 - H_{2,o})^6} \right) + 4\lambda_{2,c} \left( \frac{\sigma_{2,c}^{12}}{(u_2 - H_{2,c})^{12}} - \frac{\sigma_{2,c}^6}{(u_2 - H_{2,c})^6} \right), \quad (2.24b)$$

$$U_3(u_3; k) = 4\lambda_{3,o} \left( \frac{\sigma_{3,o}^{12}}{(u_3 - H_{3,o})^{12}} - \frac{\sigma_{3,o}^6}{(u_3 - H_{3,o})^6} \right) + 4\lambda_{3,c} \left( \frac{\sigma_{3,c}^{12}}{(u_3 - H_{3,c})^{12}} - \frac{\sigma_{3,c}^6}{(u_3 - H_{3,c})^6} \right), \quad (2.24c)$$

$$U_4(u_4; k) = 0, \quad (2.24d)$$

$$U_5(u_5; k) = 4\lambda_5 \left( \frac{\sigma_{5,o}^{12}}{(u_5 - H_{5,o} - k)^{12}} - \frac{\sigma_{5,o}^6}{(u_5 - H_{5,o} - k)^6} + \frac{\sigma_{5,c}^{12}}{(u_5 - H_{5,c} - k)^{12}} - \frac{\sigma_{5,c}^6}{(u_5 - H_{5,c} - k)^6} \right). \quad (2.24e)$$

En términos del poro, los puntos  $\mu_1$  y  $\mu_4$  sólo indican el cambio en la elasticidad del segmento S6, mientras que la acción del *linker* S4-S5, así como el resto de los componentes del poro, se lleva a cabo en los puntos  $\mu_2$ ,  $\mu_3$  y  $\mu_5$ . Ahora bien, sobre  $\mu_2$  y  $\mu_3$  los potenciales son biestables y no dependen del parámetro  $k$ , lo que querría decir que hay componentes del poro generando dos mínimos, uno que quiere cerrar el poro, y otro que lo quiere abrir. El potencial sobre  $\mu_5$  representa una interacción en el extremo libre del segmento, que mueve el mínimo del potencial dependiendo del valor del parámetro  $k$ . Este tipo de potencial lo explicamos como una interacción entre el extremo libre y alguna componente del poro que se mueve conforme el sensor de voltaje lo hace; dicha interacción no se rompe y trata de jalar al S6 de un lugar a otro. Además de los parámetros de Lennard-Jones usuales, hemos incluido las constantes  $H$ , que nos ayudan a ajustar el diámetro que ha de tener el poro en ambas conformaciones. En la figura 2.3 se muestra como se modifica el potencial conforme el parámetro  $k$  varía.

Con la forma de los potenciales dada en (2.24), podemos resolver el sistema (2.22) y deducir el comportamiento de éste usando diagramas de bifurcación. En la figura 2.4 mostramos algunos de éstos para distintos valores de los parámetros.

Observemos que, en esta configuración, también se pueden generar sistemas biestables o multiestables, dependiendo de los valores de los parámetros. A diferencia del modelo simple, donde todos los valores de  $\lambda$  son del mismo

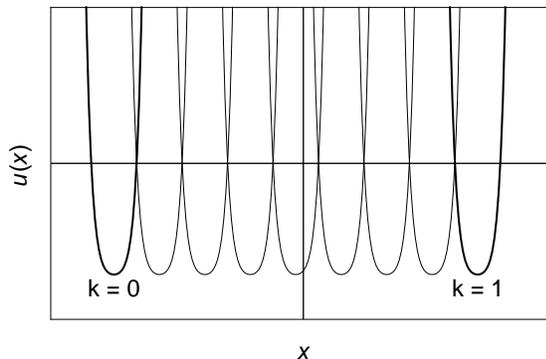


Figura 2.3: Potencial  $U_5$  conforme  $k$  varía. En este caso, la biestabilidad se encuentra en los potenciales  $U_2$  y  $U_3$ .

orden de magnitud, aquí hemos explorado valores que dan mayor importancia a algún potencial sobre otro. En el capítulo siguiente, veremos que ésta suposición viene del experimento.

### 2.3. Dinámica y estabilidad lineal

Del mismo modo que para el modelo simple, tomando el funcional de energía

$$E(t) = \sum_{i=1}^n \left( U_i(u(\mu_i, t)) + \int_{\mu_{i-1}}^{\mu_i} \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^4} \right)^2 dx \right), \quad (2.25)$$

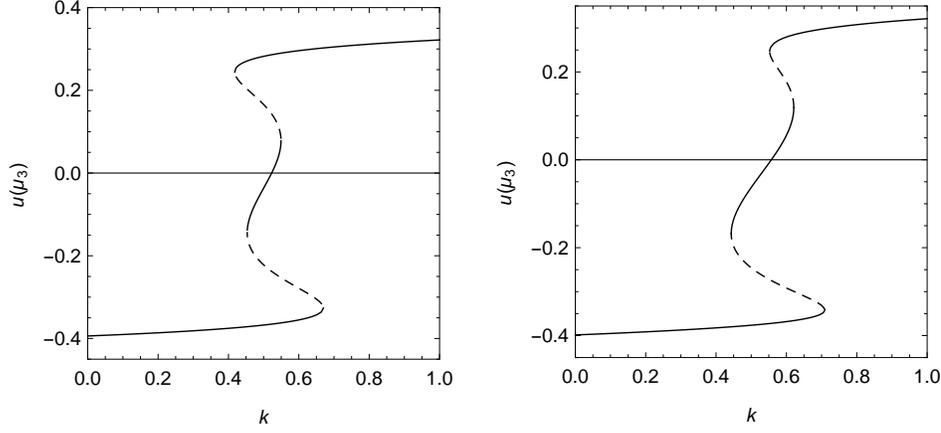
podemos ver que, sobre las soluciones de (2.4),

$$\frac{dE}{dt} \leq - \int_0^1 u_t^2 dx, \quad (2.26)$$

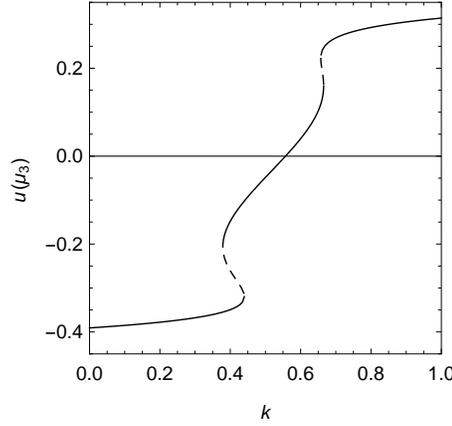
por lo que los únicos elementos del conjunto  $\omega$ -límite son los estados estacionarios.

Como en el modelo simple, tomando  $u(x, t) = u_s(x) + \delta v(x, t)$ , donde  $\delta \ll 1$ , es posible determinar la estabilidad lineal del sistema. De nuevo, el sistema que satisface  $v(x, t)$  es similar a (1.26a), y se puede resolver usando separación de variables, es decir  $v(x, t) = X(x)T(t)$ . El valor propio principal  $\omega_0$  está dado por

$$\omega_0 = \min \frac{\|X''(x)\|_2^2 + \sum_{i=1}^n X^2(\mu_i) U_i''(u_s(\mu_i))}{\|X(x)\|_2^2} \quad (2.27)$$



(a)  $\lambda_{2,c} = 1.19$ ,  $\lambda_{2,o} = 1.47$ ,  $\lambda_{3,c} = 5.35$ ,  $\lambda_{3,o} = 5.75$ ,  $\lambda_5 = 0.80$ .  
 (b)  $\lambda_{2,c} = 4.76$ ,  $\lambda_{2,o} = 5.88$ ,  $\lambda_{3,c} = 3.745$ ,  $\lambda_{3,o} = 4.025$ ,  $\lambda_5 = 0.80$ .



(c)  $\lambda_{2,c} = 2.38$ ,  $\lambda_{2,o} = 2.94$ ,  $\lambda_{3,c} = 3.531$ ,  $\lambda_{3,o} = 3.795$ ,  $\lambda_5 = 0.8$ .

Figura 2.4: Diagramas de bifurcación para una barra con dos elasticidades,  $B_1 = k_b T l_p$  y  $B_2 = \frac{1}{2} k_b T l_p$ , en los puntos  $\mu_1 = 0.35$ ,  $\mu_2 = 0.40$ ,  $\mu_3 = 0.60$ ,  $\mu_4 = 0.65$ ,  $\mu_5 = 1.00$ , tomando  $u(0, t) = 0$ . El resto de los parámetros son  $\sigma_{2,c} = 0.50$ ,  $\sigma_{2,o} = 0.46$ ,  $\sigma_{3,c} = 0.53$ ,  $\sigma_{3,o} = 0.59$ ,  $\sigma_{5,c} = \sigma_{5,o} = 0.50$ ,  $H_{2,c} = -1$ ,  $H_{2,o} = 1$ ,  $H_{3,c} = -1$ ,  $H_{3,o} = 1$ ,  $H_{5,c} = -1.18$ ,  $H_{5,o} = -0.05$ .

donde  $\|\cdot\|_2$  es la norma en  $L^2(0, L)$ . De nuevo, usando la desigualdad [44, 87]

$$X^2(c) \leq \frac{4\pi}{c^2} \|X''(x)\|_2^2, \quad (2.28)$$

obtenemos las condiciones suficientes

$$-\frac{\pi^2}{4\mu_i} < U_s''(u_s(\mu_i)) \quad \text{y} \quad -\frac{\pi^2}{4} < \sum_{i=1}^n \mu_i U_i''(u_s(\mu_i)), \quad (2.29)$$

que garantizan la estabilidad lineal de las soluciones estacionarias.

### 2.3.1. El esquema de Crank–Nicolson

De manera breve, expondremos el esquema usado para obtener soluciones numéricas al problema (2.4), pues, además de permitirnos resolver la dinámica, da una perspectiva de cómo actúan las condiciones de salto y frontera, acopladas con la ecuación parabólica.

Para la ecuación diferencial parcial, usaremos la discretización

$$u_t(x_j, t_i) \approx \frac{u_j^{i+1} - u_j^i}{h} \quad (2.30)$$

$$u_{xxxx}(x_j, t_i) \approx \frac{u_{j-2}^i - 4u_{j-1}^i + 6u_j^i - 4u_{j+1}^i + u_{j+2}^i}{k^4}, \quad (2.31)$$

donde  $u(x_j, t_i) = u_j^i$ ,  $i = 1, \dots, n$ ,  $j = 0, \dots, m$ ,  $h = \frac{T}{n}$ ,  $k = \frac{L}{m}$ ,  $t_i = ih$  y  $x_j = mj$ .

Para las condiciones de salto y frontera, usaremos

$$u_x(x_j^+, t_i) = \frac{u_{j+1}^i - u_j^i}{k}, \quad (2.32)$$

$$u_{xx}(x_j^+, t_i) = \frac{u_{j+2}^i - 2u_{j+1}^i + u_j^i}{k^2}, \quad (2.33)$$

$$u_{xxx}(x_j^+, t_i) = \frac{u_{j+3}^i - 3u_{j+2}^i + 3u_{j+1}^i - u_j^i}{k^3}, \quad (2.34)$$

para las derivadas por la derecha, y

$$u_x(x_j^-, t_i) = \frac{u_j^i - u_{j-1}^i}{k}, \quad (2.35)$$

$$u_{xx}(x_j^-, t_i) = \frac{u_j^i - 2u_{j-1}^i + u_{j-2}^i}{k^2}, \quad (2.36)$$

$$u_{xxx}(x_j^-, t_i) = \frac{u_j^i - 3u_{j-1}^i + 3u_{j-2}^i - u_{j-3}^i}{k^3}, \quad (2.37)$$

para las derivadas por la izquierda.





$$\tilde{\mathbf{F}} = - \begin{pmatrix} 0 & 1 & -2 & 1 \\ B_l & -3B_l & 3B_l & -B_l + k^3 f'_m(u_m^i) \end{pmatrix}, \quad (2.47)$$

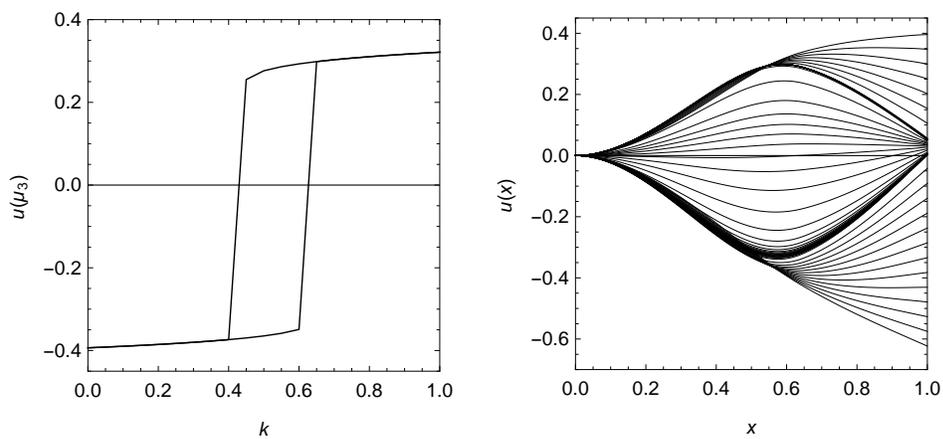
$\mathbf{u} = (u_0, u_1, \dots, u_m)$  y  $\mathbf{f}(\mathbf{u}) = (2R, 2R, \dots, 0, f_{j_s}(u_{j_s}), \dots, f_{j_{s+1}}(u_{j_{s+1}}), \dots)$  y  $u_0^0 = u_1^0 = R$ ,

Tener a la mano un método numérico efectivo es de suma utilidad. Además de permitirnos observar la dinámica del problema, nos da oportunidad de estimar tiempos de apertura y cierre del canal.

En las figuras 2.5 a 2.7 mostramos los ciclos de histéresis junto con las dinámicas correspondientes a los diagramas de bifurcación construidos en la sección 2.2.1.

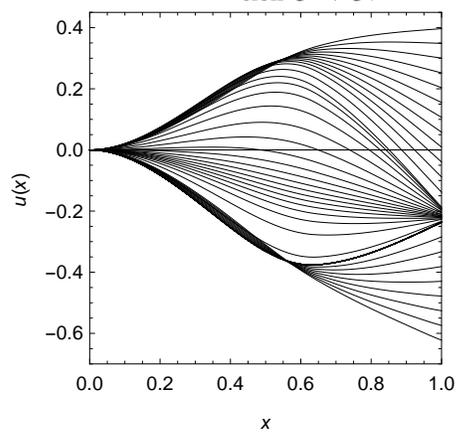
## 2. EXTENSIÓN DEL MODELO

---



(a) Ciclo de histéresis.

(b) Movimiento del segmento en la transición  $C \rightarrow O$ .



(c) Movimiento del segmento en la transición  $O \rightarrow C$ .

Figura 2.5: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 2.4a. Podemos observar la asimetría del proceso.

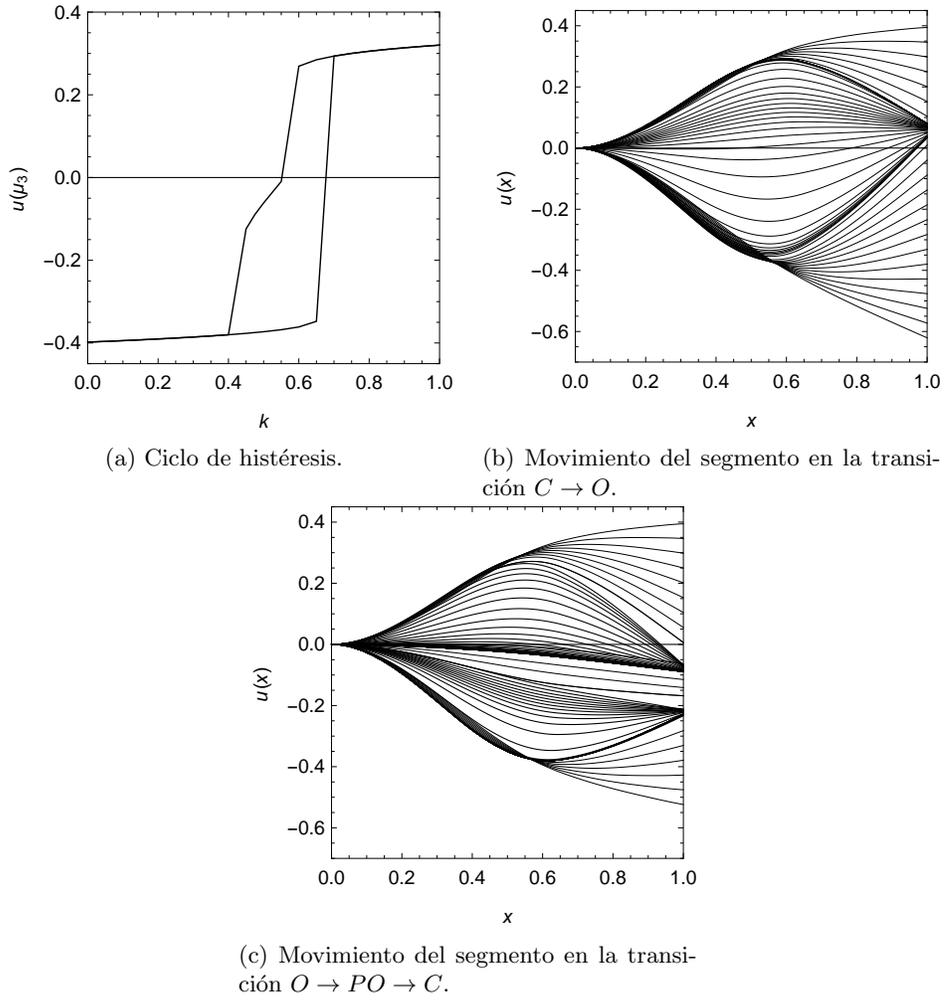
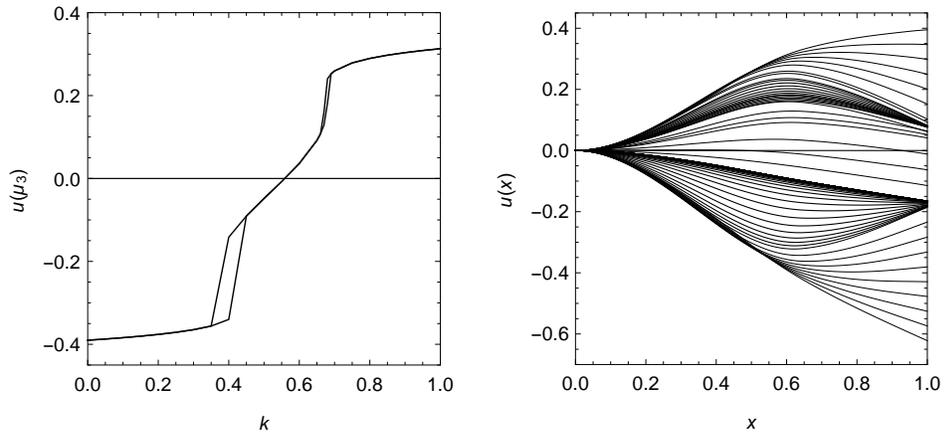


Figura 2.6: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 2.4b. En este caso, un estado parcialmente abierto es alcanzado en la dirección de repolarización, como se puede observar en (c).

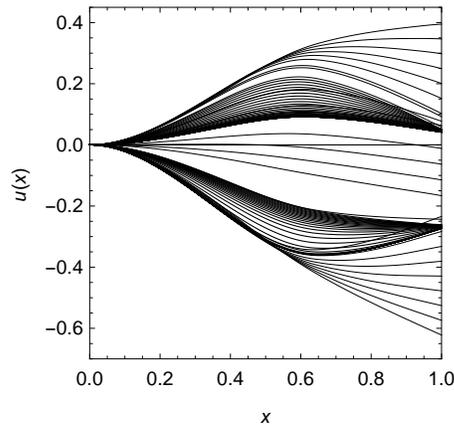
## 2. EXTENSIÓN DEL MODELO

---



(a) Ciclo de histéresis.

(b) Movimiento del segmento en la transición  $C \rightarrow PO \rightarrow O$ .



(c) Movimiento del segmento en la transición  $O \rightarrow PO \rightarrow C$ .

Figura 2.7: Dinámica del segmento correspondiente a la figura 2.4b. En este caso, hay dos estados parcialmente abiertos distintos, uno en dirección de hiperpolarización, y el otro en dirección de repolarización.

## Capítulo 3

# La estructura y el modelo

Existen dos canales iónicos dependientes de voltaje de los cuales se han obtenido sus estructuras cristalizadas en el estado abierto [75, 76], a partir de las cuales, por medio de métodos en la dinámica molecular, se han modelado sus estados cerrados [60, 67, 89]. Con dos perspectivas, la mecánica y la electrostática, haremos un análisis detallado de ambas y veremos que, con las simplificaciones adecuadas, el modelo es capaz de capturar el mecanismo de apertura de los canales y reproducir características observadas experimentalmente. Todos los cálculos de este capítulo han sido elaborados usando las estructuras obtenidas en [60, 67, 75, 76].

### 3.1. El poro, su estructura y sus interacciones

Si queremos adaptar el modelo a las estructuras disponibles, tenemos que determinar una forma de energía potencial con la cual podamos describir el sistema electromecánico, que sea válida a escalas moleculares. Éste es un problema fundamental en la dinámica molecular, y ha sido resuelto con el concepto de *campo de fuerza* [81]. En este contexto, un campo de fuerza es la energía potencial propuesta para un sistema de partículas que contiene los tipos de interacciones entre ellas, así como los parámetros físicos de éstas. Una gran variedad de campos se pueden encontrar en la literatura [81], y muchos de éstos están diseñados para estudiar sistemas específicos. En la mayoría de los campos se consideran cinco interacciones con una interpretación física simple: las asociadas a la deformación de enlaces y cambio de ángulos entre átomos, las asociadas a la rotación alrededor de ciertos ángulos diédricos (torsiones) entre éstos, y las asociadas a interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals de aquellas partículas suficientemente separadas, referida como interacción de

pares no ligados [81].

### 3.1.1. La energía potencial de un sistema molecular

La expresión de la energía potencial de un sistema molecular que se usa frecuentemente para moléculas orgánicas es [81]

$$\begin{aligned}
 U(r) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_b}{2} (d - d_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{diédricos}} \frac{k_\phi}{2} (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) + \sum_{\text{impropios}} \frac{k_\psi}{2} (\psi - \psi_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{no ligados}} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{no ligados}} \frac{q_i q_j}{4\epsilon_D r_{ij}}. \quad (3.1)
 \end{aligned}$$

El primer término representa la energía de los enlaces, donde  $k_b$  es la constante de fuerza del enlace, que es usualmente muy grande, lo que indica que se necesita una gran cantidad de energía para estirar o comprimir un enlace químico;  $d_0$  representa la longitud de referencia del enlace.

El segundo término representa los cambios en la energía potencial debido a la deformación de ángulos. Los valores de  $k_\theta$  son típicamente menores que los de  $k_b$ , indicando que se necesita menor energía para desviar el ángulo del enlace de su valor de referencia.

El tercer término es torsional y representa la energía potencial del sistema molecular como función de la rotación alrededor de los ángulos diédricos, e incluye átomos que están separados por tres enlaces, y están en las posiciones 1-4 relativas entre ellos.

El cuarto término es introducido para preservar la planaridad de ciertos grupos de átomos, así como la quiralidad de otros. En el primer caso, el término provee una función de penalización para doblamientos fuera del plano.

El quinto y sexto términos representan las llamadas interacciones no ligadas, que se calculan para átomos separados por tres o más enlaces, y entre átomos de diferentes moléculas. Las fuerzas de van der Waals son representadas por el ya conocido potencial de Lennard-Jones, donde el término atractivo se debe a las fuerzas dispersivas generadas entre dipolos instantáneos que surgen de fluctuaciones en la distribución de carga electrónica de las moléculas, y el término repulsivo refleja la repulsión electrostática de las nubes electrónicas de éstas, donde  $\sigma_{ij} = (\sigma_i + \sigma_j)/2$  y  $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$ . Las interacciones electrostáticas son calculadas usando el potencial de Coulomb.

Nuestro sistema molecular es una  $\alpha$ -hélice con una longitud menor que la longitud de persistencia  $l_p$ , por lo que lo podemos representar por una barra elástica [21]. En términos de la energía potencial dada por la ecuación (3.1), podemos aproximar los primeros cuatro términos por la energía potencial de una barra elástica, que en una dimensión está dada por la ecuación (1.1).

### 3.1.2. El segmento S6 como barra elástica

El poro de los canales Kv está formado por los segmentos S5 y S6 de las cuatro unidades del tetrámero, y se liga covalentemente con el VSD por medio del *linker* S4-S5. Cuando los sensores de voltaje están en una posición desactivada, el poro se reconfigura moviendo los cuatro segmentos S6 y formando un sello hidrofóbico en el lado intracelular del canal. Estos cambios conformacionales están íntimamente relacionados con una parte del segmento S6, la secuencia Prolina-Valina-Prolina (PVP), que es un punto de rompimiento de la hélice, como se muestra en la figura 3.1. Algunos canales de potasio no cuentan con el motivo PVP, en éstos es una glicina el residuo que genera la bisagra [33,95].

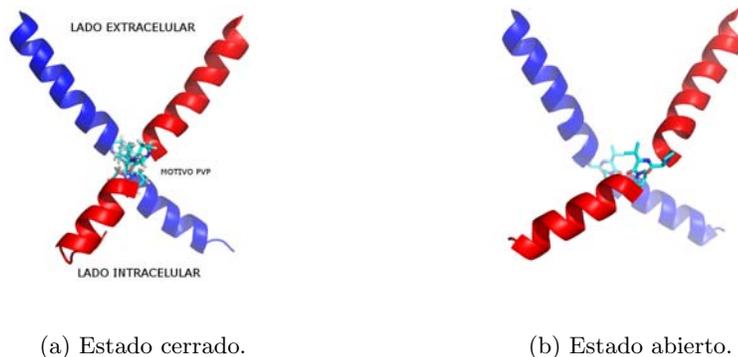


Figura 3.1: Representación de lazo de los segmentos S6<sub>III</sub> y S6<sub>IV</sub>. El comienzo de la hélice se da en el residuo G387 (lado extracelular) y el final en el residuo T421 (lado intracelular). En el centro se encuentra el motivo PVP (residuos P405, V406 y P407) en su representación de líneas, que debilita los enlaces de la  $\alpha$ -hélice, proveyendo un punto de doblez en las mismas.

Para producir una aproximación de los segmentos S6, alineamos las estructuras disponibles de los canales Kv en sus estados abiertos [75, 76], y algunos modelos correspondientes a sus estados cerrados [60, 67], en los primeros tres átomos  $C_\alpha$  de los cuatro segmentos. Usando el método de mínimos cuadrados, aproximamos el esqueleto protéico de cada S6 por tres cilindros: el primero va del residuo G387 al P405, el segundo del P405 al P407 (motivo PVP), y

el tercero del P407 al T421, usando la numeración del canal *Shaker*, como se muestra en la figura 3.2a. Al unir los vectores directores de los tres cilindros, consideramos la estructura Cilindro-bisagra-Cilindro (CbC) como una representación de “grano grueso” del segmento S6, donde asociamos cada residuo con la proyección de su átomo  $C_\alpha$  sobre el eje principal en el cilindro correspondiente; la representación se muestra en la figura 3.2b. Siendo que la estructura del segmento S6<sub>II</sub> del canal Kv1.2/2.1 en su estado cerrado se encuentra desordenada en su extremo C-terminal [60], hemos ajustado el cilindro hasta el residuo H418. Tratar el motivo PVP como una estructura separada nos da dos ventajas, la primera es que podemos modelar a todo el S6 como una barra elástica sin perder las propiedades de la bisagra, y la segunda es que la comunicación entre el cilindro superior y el inferior no está rota: lo que pasa arriba del motivo se siente abajo y viceversa. En esta representación, el movimiento principal del segmento es capturado por el desplazamiento de los puntos correspondientes a los residuos P405, P407 y T421 proyectados en los ejes principales de sus cilindros correspondientes.

Para establecer un sistema de coordenadas del problema elástico, fijamos la configuración de referencia [6] en la bisectriz formada por las posiciones abierta y cerrada de la representación CbC, como se muestra en la figura 3.2b, y consideramos  $x$  la coordenada a lo largo de esta configuración. El movimiento de los tres residuos se debe llevar a cabo muy cerca de los planos ortogonales a la configuración de referencia, donde el plano que pasa por P405 se encuentra en ángulo con respecto a los que pasan por P407 y T421; así, restringimos el movimiento de cada uno de los residuos a su respectivo plano. En cada plano, tomamos la coordenada  $y_i(x)$  ( $i = 1, 2, 3$ ) ortogonal a la coordenada  $x$  de la configuración de referencia, y en la dirección que une las conformaciones abierta y cerrada, como se muestra en la figura 3.2c. Dado que el máximo desplazamiento del segmento S6 es muy pequeño con respecto a su longitud total, lo describiremos usando ecuaciones lineales en  $y_i$  en sus planos respectivos.

Modelamos la energía elástica de las barras con la energía

$$U_{\text{elástica}}(y_i(x, t)) = \frac{k_b T l_p}{2} \int_0^{l_i} \left( \frac{\partial^2 y_i(x, t)}{\partial x^2} \right)^2 dx \quad (3.2)$$

donde  $l_i$  es la longitud del cilindro,  $l_p \approx 100$  nm la longitud de persistencia [21],  $k_b$  y  $T$  son la constante de Boltzmann y la temperatura, respectivamente.

Es un hecho conocido que la glicina y la prolina aumentan la elasticidad de las hélices, y son prevalentes en los dobleces de éstas [8, 22, 25, 34, 66]. Se ha sugerido que cuando hay prolinas en una  $\alpha$ -hélice, ésta exhibe un comportamiento elástico no lineal [20]. En vez de proponer un modelo elástico no lineal,

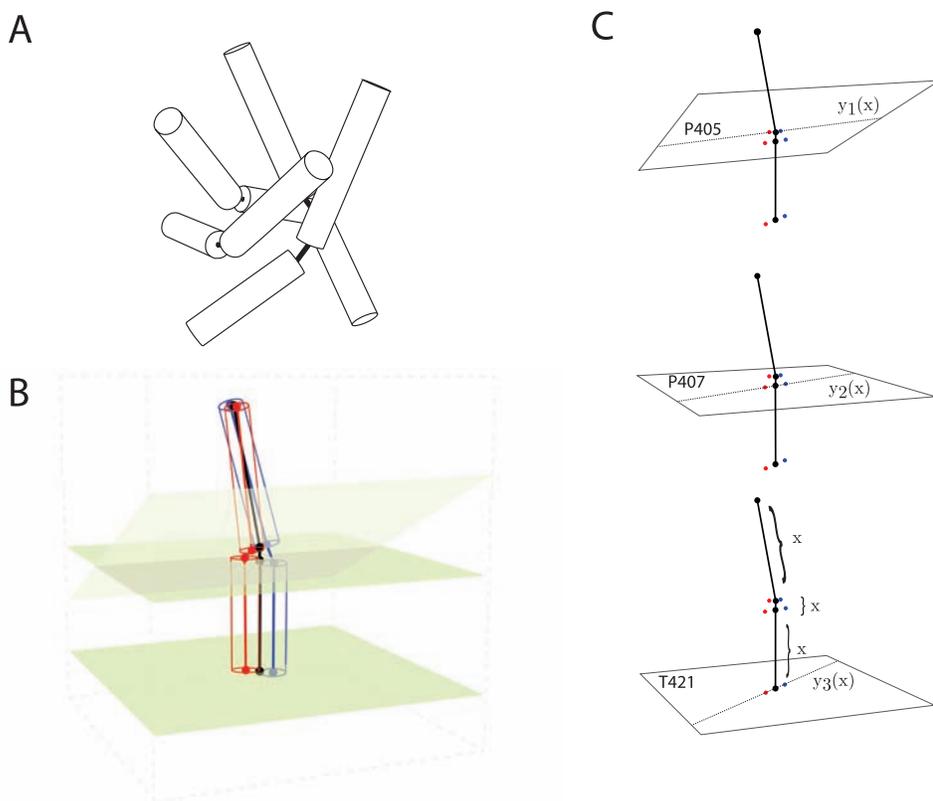


Figura 3.2: (a) Representación CbC de los segmentos S6 del canal Kv1.2/2.1 quimera. El cilindro superior va del residuo G387 al P405; la bisagra es el cilindro pequeño y negro y comprende los residuos P405 a P407; el cilindro inferior va del P407 al T421. (b) Representación CbC que bisecta a las conformaciones abierta y cerrada. En azul, la representación en el estado abierto y en rojo en el estado cerrado. Los puntos corresponden, de arriba a abajo, a los residuos G387, P405, P407 y T421. El primer plano es ortogonal al cilindro superior y los otros dos son ortogonales al inferior. Cada plano se encuentra localizado en las representaciones de P405, P407 y T421 de la estructura que bisecta, respectivamente. (c) Sistema coordenado establecido. La coordenada  $x$  es tomada a lo largo de la representación; las coordenadas  $y_i$  son tomadas como las rectas que unen los estados abierto y cerrado del segmento S6, cada una sobre su plano respectivo, localizado en la representación del residuo correspondiente. La configuración de referencia es la estructura que bisecta.

consideramos un valor distinto para la longitud de persistencia en la bisagra. Dado que no se conoce el valor de  $l_p$  para cadenas que contienen prolinas, utilizaremos aquélla de una cadena de glicinas, pues éstas juegan el papel de la bisagra en canales carentes del motivo PXP [61]; ésta es aproximadamente la mitad del valor de  $l_p$  [20]. La energía elástica total es entonces la suma de

las energías individuales.

### 3.1.3. Interacciones de Coulomb y van der Waals

Para modelar la energía potencial a la que están sujetos los segmentos S6, usamos el campo de fuerzas CHARMM27 [14], que tiene la forma de la ecuación (3.1), con el cual podemos calcular las interacciones de Coulomb y van der Waals entre los segmentos S6 y sus componentes vecinos, incluyendo los *linkers* S4-S5, tanto en el estado cerrado como en el abierto. Al determinar la magnitud de las diferentes interacciones entre los componentes del poro, estaremos en la posibilidad de extraer cuáles son relevantes, y construir un potencial que refleje esta información. Por ejemplo, consideremos el residuo P405<sub>I</sub>; éste se compone de catorce átomos y podemos calcular la energía potencial que ejerce sobre él cada residuo del poro, al sumar las energías potenciales que siente cada átomo que lo conforma. Así, la energía potencial que ejerce el residuo E327<sub>I</sub>, que cuenta con 15 átomos, sobre el P405<sub>I</sub> en el estado abierto es

$$\begin{aligned} U_{\text{P405}_I\text{-E327}_I} &= \sum_{i=1}^{15} \sum_{j=1}^{14} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\epsilon_D r_{ij}}, \\ &= -4.62 \text{kJ/mol}, \end{aligned} \quad (3.3)$$

donde hemos tomado las posiciones del canal Kv1.2/2.1 de la estructura 2R9R del *Protein Databank* [76], y los valores de  $\epsilon_{ij}$ ,  $\sigma_{ij}$ , y  $q_i$  son los calculados para el campo de fuerzas CHARMM27 [14] que se implementan en la paquetería de dinámica molecular GROMACS [92].

Al hacer el mismo cálculo para cada uno de los residuos del segmento, tendremos un “mapa de contactos”, que es la representación gráfica de la matriz de interacciones entre residuos, cuya entrada  $ij$  está dada por la intensidad del potencial de pares no ligados entre los residuos  $i$  y  $j$ . El mapa para las interacciones entre el segmento S6<sub>I</sub> y los *linkers* S4-S5 en ambos estados se muestra en la figura 3.3. De esta representación, también conocida como mapa de calor, podemos ver las interacciones relevantes entre el segmento y los *linkers*. En el contexto del modelo y la estructura, el renglón  $i$  está asociado con el residuo  $i$  de la representación CbC. En el apéndice se pueden encontrar los mapas de interacciones entre todas las componentes del Kv1.2 y el Kv1.2/2.1 quimera.

En la figura 3.3 es posible identificar distintas interacciones, como la llamada interacción RELY [9,90] y las interacciones I316-F413 e I316-F416 entre subunidades [9], que se ha observado afectan la eficiencia del acoplamiento

### 3.1. El poro, su estructura y sus interacciones

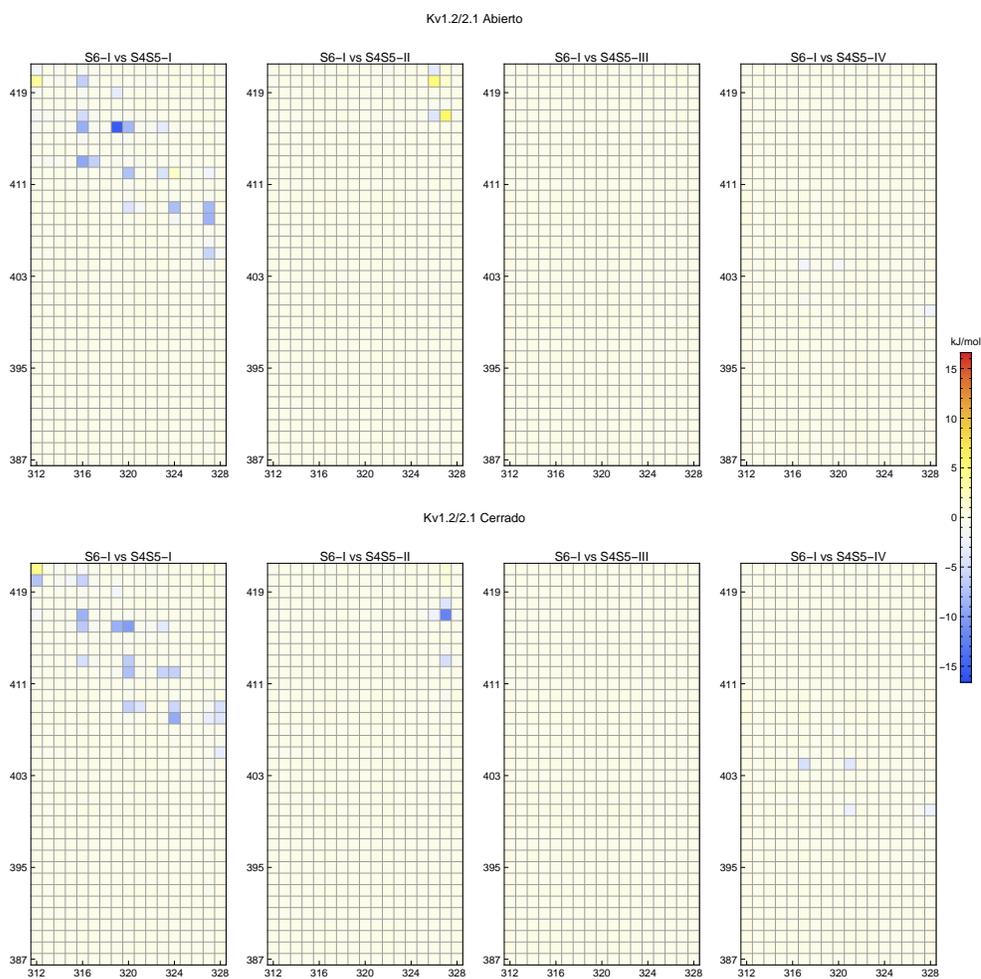


Figura 3.3: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del  $S6_I$  contra el *linker* S4-S5. Se pueden observar de manera clara las interacciones  $I316_I - F413_I$  e  $I316_I - F416_I$ , así como dos de las interacciones RELY ( $Y417_I - R326_{II}$  y  $Y417_I - E327_{II}$ ).

electromecánico cuando son perturbadas por mutaciones. Además, revela que las interacciones entre pares no ligados son de naturaleza localizada: la mayoría de los residuos del segmento S6 son sujetos a interacciones muy débiles en ambos estados; en contraste, otros son sujetos a interacciones más fuertes, por lo que juegan un papel muy importante en la estabilización. Para reproducir este comportamiento, modelamos las interacciones de van der Waals y Coulomb como un potencial localizado en ciertos residuos del segmento S6.

### 3. LA ESTRUCTURA Y EL MODELO

---

El mapa de calor de la figura 3.3, junto con los mostrados en el apéndice, enseña que no todos los residuos interactúan de la misma manera en el estado abierto y en el cerrado. Hay residuos que ejercen un potencial muy grande en un estado y muy débil en el otro. Para determinar qué residuos se comportan de esta manera, filtramos todas las interacciones menores a 3 kJ/mol, y construimos nuevos mapas de contacto, donde diferenciamos entre los residuos que sólo interactúan en el estado abierto, los que sólo interactúan en el cerrado, y los que interactúan en ambos. Uno de estos mapas se muestra en la figura 3.4.

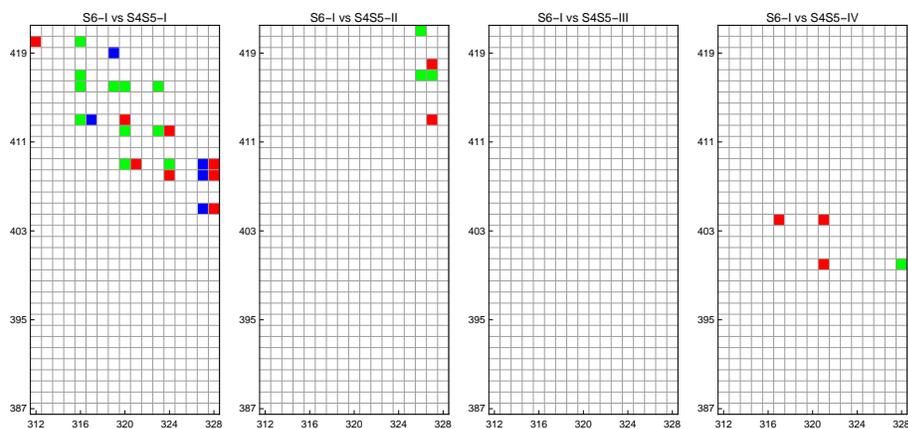


Figura 3.4: Mapa de contactos de residuos cuyas interacciones son mayores a 3 kJ/mol, para el canal Kv1.2/2.1 quimera. En azul, los residuos que sólo interactúan en la conformación abierta. En rojo, los residuos que sólo interactúan en la conformación cerrada. En verde, los residuos que interactúan en ambas conformaciones.

De todos los residuos, hemos filtrado los que no son importantes en el acoplamiento electromecánico de los segmentos con el resto del poro, y hemos identificado tres tipos de interacciones entre los que sí juegan un papel: aquéllas que estabilizan los estados abierto y cerrado, y aquéllas que transportan al segmento S6 de una configuración a otra. Por supuesto, puede que haya interacciones importantes en alguna configuración intermedia, pero siendo que sólo conocemos los estados inicial y final, no somos capaces de observarlas.

En términos de la estructura, los mapas nos ayudan a determinar los lugares del poro que vale la pena mirar. En la figura 3.5 mostramos una de estas regiones, revelada por los mapas de contacto correspondientes al segmento S6<sub>III</sub> (figuras A.4, A.8 y A.12 en el apéndice) donde se ve que el residuo I402 es estabilizado por regiones del poro diferentes en cada conformación: residuos

del S5<sub>III</sub> en el estado abierto, y residuos de los segmentos S6<sub>II,IV</sub> en el estado cerrado; se infiere que el segmento S6<sub>III</sub> siente dos mínimos distintos de potencial entre un estado y otro, tres residuos arriba del motivo PVP. En términos

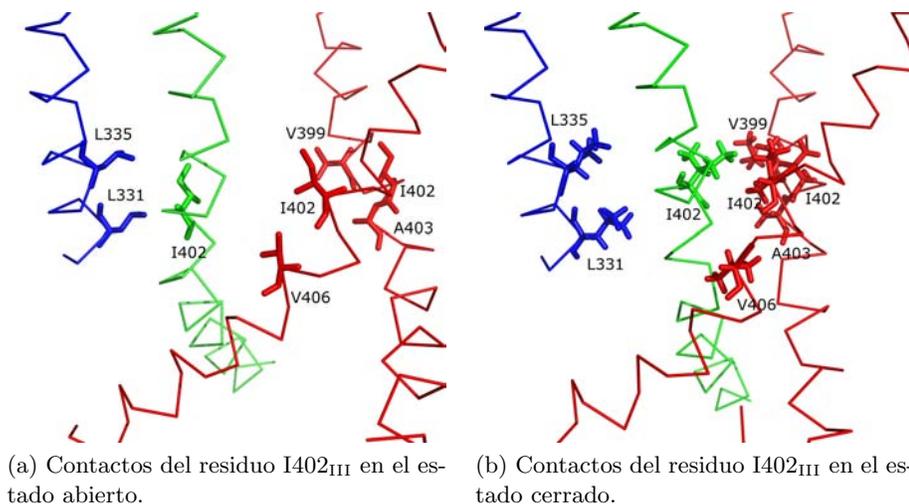


Figura 3.5: Interacciones dominantes entre el residuo I402<sub>III</sub> y sus vecinos. En verde el segmento S6<sub>III</sub>, en azul el segmento S5<sub>III</sub> y en rojo los segmentos S6<sub>II</sub> y S6<sub>IV</sub>. En el estado abierto, la interacción dominante se da entre el residuo I402<sub>III</sub> y los residuos L331<sub>III</sub> y L335<sub>III</sub>, mientras que en el cerrado la interacción es entre el residuo I402<sub>III</sub> y los residuos I402<sub>II</sub>, V406<sub>II</sub>, V399<sub>IV</sub>, I402<sub>IV</sub> y A403<sub>IV</sub>.

del modelo, debemos ser capaces de reflejar esta situación. Para hacerlo, vamos a estudiar las equipotenciales generadas por los residuos involucrados en el plano ortogonal a la representación CbC, que pasa por el carbono C<sub>α</sub> del residuo I402<sub>III</sub>, las cuales se muestran en la figura 3.6.

El módulo de elasticidad de una  $\alpha$ -hélice en su dirección principal es mucho mayor al de su dirección transversal [21], por lo que la restricción del potencial al plano es una buena aproximación del panorama energético que siente el residuo I402.

Para hacer la reducción unidimensional, podríamos pensar de la misma manera y restringir el potencial a una línea recta, por ejemplo, aquélla que une los centros de los cilindros proyectados en el plano, como se muestra en la figura 3.7. Si bien en principio esto parece una buena idea, hay un problema: la restricción del potencial a esta recta no reproduce de manera adecuada las características del potencial bidimensional, pues en la dirección del estado abierto el mínimo es muy pequeño, debido a que la recta no captura bien las equipotenciales del estado abierto. Pensemos en la recta que une las pro-

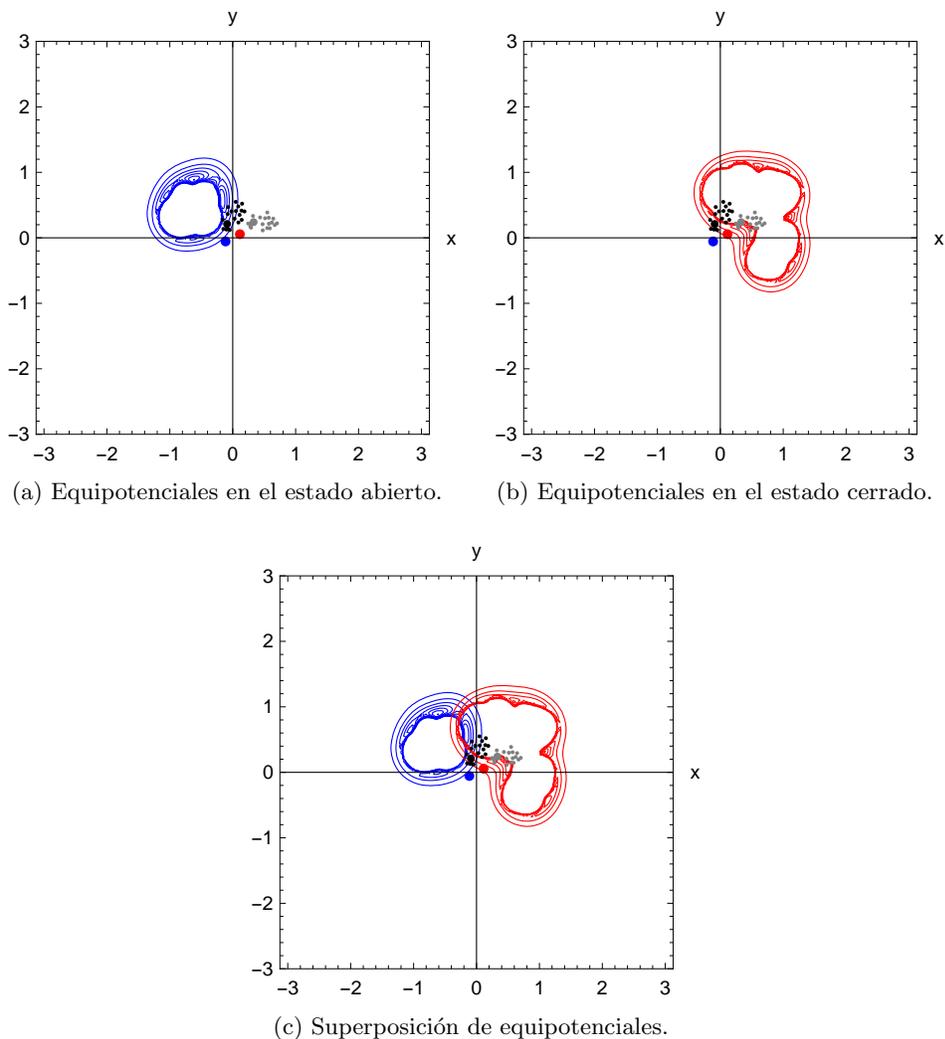


Figura 3.6: Equipotenciales generadas por los residuos L331<sub>III</sub>, L335<sub>III</sub>, I402<sub>II</sub>, V406<sub>II</sub>, V399<sub>IV</sub>, I402<sub>IV</sub> y A403<sub>IV</sub> (ver figura 3.5), restringidas al plano que pasa por el promedio de las posiciones del carbono  $C_\alpha$  del residuo I402<sub>III</sub> en la configuración de referencia, ortogonal al cilindro que lo contiene. El punto azul es la proyección del carbono  $C_\alpha$  del residuo I402<sub>III</sub> en el estado abierto, y los puntos negros los átomos del residuo. El punto rojo y los puntos grises son las proyecciones en el estado cerrado.

yecciones de los carbonos  $C_\alpha$  en las configuraciones abierta y cerrada, en vez de los cilindros de la representación CbC, como se muestra en la figura 3.8. En este caso, la elección de la recta parece ser mejor, lo que nos lleva al si-

guiente problema: cómo hacer la interpolación entre un estado y el otro. Si proponemos una homotopía entre ambos estados, como lo hicimos en el primer capítulo, inmediatamente se presenta otro problema: el estado cerrado tiene dos mínimos, así como una barrera de potencial bastante alta. Es prudente preguntarnos si esta situación es física o se debe a la elección de la recta. En el espacio tridimensional, las barreras de potencial generadas por el término repulsivo de la energía de van der Waals son en realidad superficies que rodean a los átomos, y una restricción bidimensional puede generar barreras espurias, por ejemplo, un plano que pasa muy cerca de un átomo que nada tenga que ver con la interacción operante tiene una barrera de potencial muy alta, si no infinita, cerca de éste. Otro problema es que la homotopía deja fijos los mínimos del potencial en la coordenada independiente, no reflejando el movimiento de los residuos que están provocando la interacción. Además, en el caso de que la restricción unidimensional tenga barreras, éstas aparecen de manera instantánea, lo cual no es plausible. Un problema aún mayor es que un criterio que puede funcionar muy bien para un residuo, puede no hacerlo para otro. En particular, la estructura cerrada no es simétrica; como consecuencia, una recta que funcione bien para uno de los segmentos, puede no hacerlo para otro.

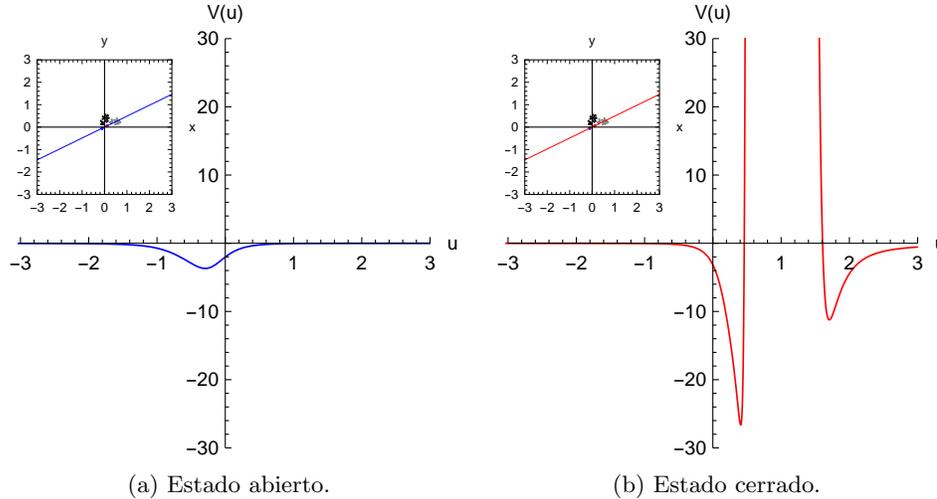


Figura 3.7: Potencial restringido a la recta que une las representaciones CbC en los estados abierto y cerrado, sobre el plano que pasa por la representación del residuo I402<sub>III</sub> en el CbC de referencia, ortogonal, cuya normal es el vector director del cilindro correspondiente.

Notemos que las dos rectas propuestas, cercanas entre sí, generan potenciales muy distintos. Por sí sola, esta observación basta para comprender que

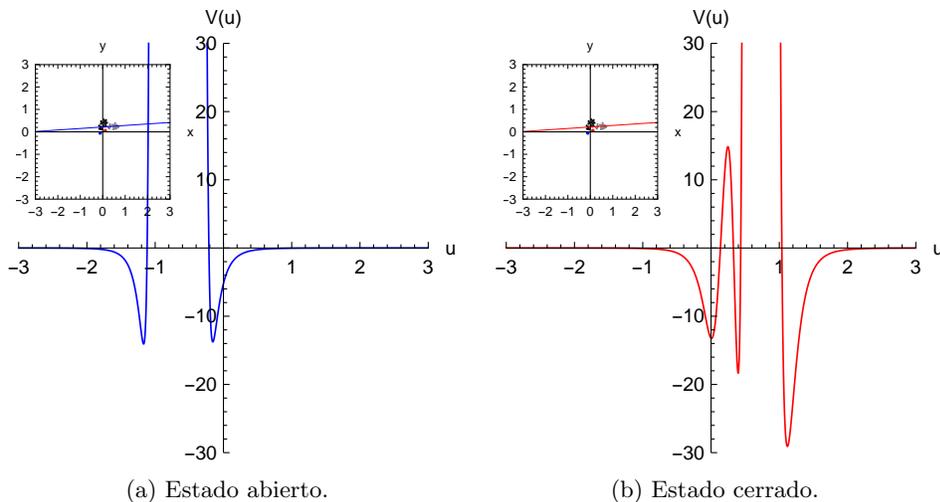


Figura 3.8: Potencial restringido a la recta que une las proyecciones de los carbonos  $C_\alpha$  en los estados abierto y cerrado, sobre el plano que pasa por la representación del residuo I402<sub>III</sub> en el CbC de referencia, ortogonal, cuya normal es el vector director del cilindro correspondiente.

la restricción a una recta no es una buena idea y que no seremos capaces de reproducir de manera adecuada la acción del potencial tridimensional con meras restricciones. Habrá que determinar, de manera cualitativa, la forma en que actúa el potencial generado por una  $\alpha$ -hélice.

### 3.1.4. Suma de potenciales de Lennard-Jones en una dimensión

Para entender de qué manera el potencial de Lennard-Jones actúa sobre el segmento, consideremos una colección de átomos iguales colocados en una línea recta, cada uno generando un potencial de este tipo. Queremos determinar la forma del potencial total en un punto  $(x, y)$  de la recta, como se muestra en la figura 3.9.

Tomando cada uno de los átomos en los puntos  $(n, 0)$  con  $n$  un entero, el potencial que genera la cadena es

$$U(x, y) \approx 4\epsilon \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left( \frac{\sigma^{12}}{((x-n)^2 + y^2)^6} - \frac{\sigma^6}{((x-n)^2 + y^2)^3} \right). \quad (3.4)$$

Éste es un potencial periódico, lo que nos permite usar la fórmula de la suma

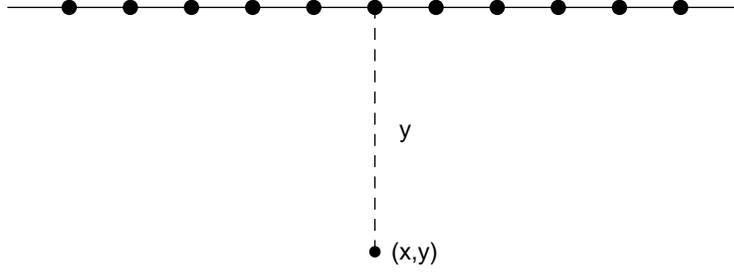


Figura 3.9: Cadena de átomos en una línea recta, actuando sobre una partícula a distancia  $y$ .

de Poisson [119]

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} f(x-n) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} \tilde{f}(k) e^{-2\pi i k x} \quad (3.5)$$

para calcularlo, donde

$$\tilde{f}(k) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i k n} f(n) dn \quad (3.6)$$

es la transformada de Fourier.

Usando la fórmula integral de Cauchy [119]

$$f^{(m)}(z_0) = \frac{m!}{2\pi i} \oint_{\gamma} \frac{f(z)}{(z-z_0)^{m+1}} dz, \quad (3.7)$$

con  $f(z)$  analítica en el interior de  $\gamma$ , y ésta una trayectoria que encierra a  $z_0$ , podemos calcular la transformada de  $(n^2 + y^2)^{-m}$  con  $m$  un entero positivo pues, si  $k < 0$ ,

$$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n^2 + y^2)^m} dn = \lim_{R \rightarrow \infty} \oint_{\gamma_R} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n + iy)^m (n - iy)^m} dn, \quad (3.8)$$

donde  $\gamma_R$  es un semicírculo de radio  $R$  sobre el eje real con el punto  $x + iy$  en su interior (para el polo  $x - iy$  tomamos  $k \geq 0$ ). Por lo tanto,

$$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n^2 + y^2)^m} dn = \begin{cases} \frac{2\pi i}{(m-1)!} \left. \frac{d^{m-1}}{dn^{m-1}} \right|_{n=iy} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n + iy)^m}, & k < 0, \\ \frac{2\pi i}{(m-1)!} \left. \frac{d^{m-1}}{dn^{m-1}} \right|_{n=-iy} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n - iy)^m}, & k \geq 0, \end{cases} \quad (3.9)$$

identidad que es válida para  $y > 0$  (en el caso negativo, las desigualdades en  $k$  se invierten). Entonces, despreciando los modos mayores a uno,

$$\begin{aligned}
 U(x, y) \approx & 4\epsilon \left( \frac{63\pi\sigma^{12}}{256y^{11}} - \frac{3\pi\sigma^6}{8y^5} \right) \\
 & + 4\epsilon\sigma^{12}e^{-2\pi y} \cos(2\pi x) \left( \frac{63\pi}{128y^{11}} + \frac{63\pi^2}{64y^{10}} + \frac{7\pi^3}{8y^9} + \frac{7\pi^4}{16y^8} + \frac{\pi^5}{8y^7} + \frac{\pi^6}{60y^6} \right) \\
 & - 4\epsilon\sigma^6e^{-2\pi y} \cos(2\pi x) \left( \frac{3\pi}{4y^5} + \frac{3\pi^2}{2y^4} + \frac{\pi^3}{y^3} \right). \quad (3.10)
 \end{aligned}$$

En la figura 3.10, podemos ver lo buena que es la aproximación.

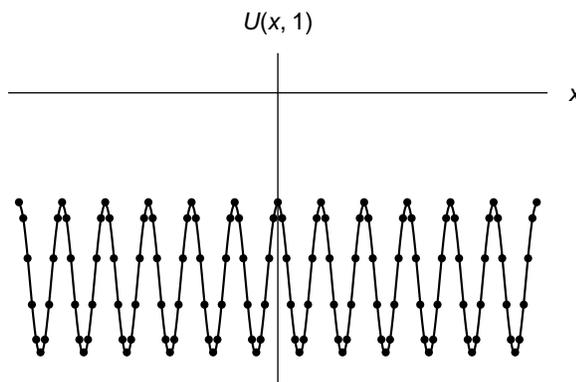


Figura 3.10: Comparación entre la función (3.4) (puntos) y la aproximación dada por (3.10) (curva), donde hemos tomado veinte términos en la suma y  $y = \sigma = 1$ .

Un par de cosas se pueden decir de la fórmula (3.10). Las oscilaciones transversales en la dirección  $x$  muestran que la elección de los planos ortogonales a los cilindros CbC es una buena idea, pues el potencial es más pronunciado en esa dirección. También, notamos que en la dirección radial, el término dominante es de tipo Lennard-Jones, sólo que más suave (efecto similar al que ocurre con el potencial electrostático) por lo que tiene mayor alcance, y hay una corrección de tipo polinomial que se debe a los demás residuos, que señala una pequeña oscilación en la cola del potencial. La fórmula de Poisson reproduce el comportamiento de las equipotenciales mostradas en las figuras 3.7 y 3.8.

Este ejercicio nos permite ver que, pensando en el segmento S6 como una cadena lineal de átomos, el potencial es periódico en la dirección de la cadena y tiene un decaimiento tipo Lennard-Jones en la dirección radial. Ahora bien, en el problema tridimensional, la cadena pudiera no ser una buena representación

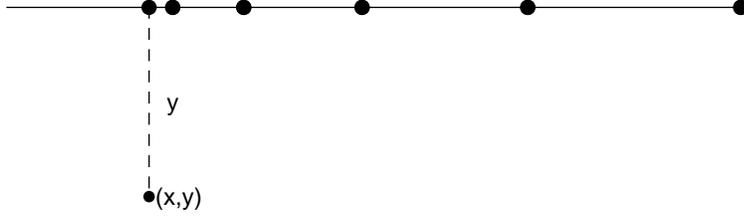


Figura 3.11: Cadena de átomos en una línea recta, distribuidos en los puntos  $(n^2, 0)$ , actuando sobre una partícula a distancia  $y$ .

de una  $\alpha$ -hélice. Para mejorar la comprensión de cómo suman los potenciales de Lennard-Jones, consideremos la cadena como en el caso anterior, pero ahora vamos a distribuir los átomos en los puntos  $(n^2, 0)$ . Entonces

$$U(x, y) \approx 4\epsilon \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left( \frac{\sigma^{12}}{((x - n^2)^2 + y^2)^6} - \frac{\sigma^6}{((x - n^2)^2 + y^2)^3} \right) \quad (3.11)$$

y, a diferencia del cálculo anterior, hay un comportamiento diferente para  $x < 0$  que para  $x \geq 0$ . Esto se debe a la función  $U(x, y)$  no es periódica. Para evaluar la suma, notemos que

$$\frac{1}{((x - n^2)^2 + y^2)} = \frac{1}{(n + z^{1/2})(n - z^{1/2})(n + \bar{z}^{1/2})(n - \bar{z}^{1/2})}, \quad (3.12)$$

donde  $z = x + iy$ . La transformada de Fourier está dada por

$$\begin{aligned} \tilde{f}_m(x, y; k) &= \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-2\pi i k n}}{((x - n^2)^2 + y^2)^m} dn = \\ &= \frac{2\pi i}{(m-1)!} \left. \frac{d^{m-1}}{dn^{m-1}} \right|_{n=-z^{1/2}} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n - z^{1/2})^m (n^2 - \bar{z})^m} \\ &\quad + \frac{2\pi i}{(m-1)!} \left. \frac{d^{m-1}}{dn^{m-1}} \right|_{n=\bar{z}^{1/2}} \frac{e^{-2\pi i k n}}{(n^2 - z)^m (n + \bar{z}^{1/2})^m} \end{aligned} \quad (3.13)$$

donde hemos usado la fórmula integral de Cauchy para  $k \geq 0$ ; para  $k < 0$ ,  $\tilde{f}_m(x, y; k) = \tilde{f}_m(x, y; -k)$ . Así, si  $k \geq 0$ ,

$$\begin{aligned} \tilde{f}_3(x, y; k) &= \frac{\pi^3 k^2}{8y^3} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{3/2}} + \frac{3\pi^2 k}{8y^4} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z} - \frac{3\pi^2 k}{32y^3} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^2} \\ &\quad + \frac{12\pi}{32y^5} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{1/2}} - \frac{3\pi}{16y^4} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{3/2}}}{z^{3/2}} - \frac{3\pi}{32y^3} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{5/2}} \end{aligned} \quad (3.14)$$

y

$$\begin{aligned}
 \tilde{f}_6(x, y; k) = & \frac{\pi^6 k^5}{3840 y^6} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^3} + \frac{\pi^5 k^4}{256 y^7} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{5/2}} - \frac{\pi^5 k^4}{512 y^6} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{7/2}} \\
 & + \frac{7\pi^4 k^3}{256 y^8} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^2} - \frac{5\pi^4 k^3}{256 y^7} \Im \frac{e^{-\pi i k z^{1/2}}}{z^3} - \frac{7\pi^4 k^3}{1024 y^6} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^4} \\
 & + \frac{7\pi^3 k^2}{64 y^9} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{3/2}} - \frac{21\pi^3 k^2}{256 y^8} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{5/2}} - \frac{45\pi^3 k^2}{1024 y^7} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{7/2}} \\
 & + \frac{7\pi^3 k^2}{512 y^6} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{9/2}} + \frac{63\pi^2 k}{256 y^{10}} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z} - \frac{21\pi^2 k}{128 y^9} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^2} \\
 & - \frac{105\pi^2 k}{1024 y^8} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^3} + \frac{105\pi^2 k}{2048} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^4} + \frac{63\pi^2 k}{4096 y^7} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^5} \\
 & + \frac{63\pi}{256 y^{11}} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{1/2}} - \frac{63\pi}{512 y^{10}} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{3/2}} - \frac{21\pi}{256 y^9} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{5/2}} \\
 & + \frac{105\pi}{2048 y^8} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{7/2}} + \frac{105\pi}{4096 y^7} \Re \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{9/2}} - \frac{63\pi}{8192 y^6} \Im \frac{e^{2\pi i k z^{1/2}}}{z^{11/2}}. \quad (3.15)
 \end{aligned}$$

donde  $\Re z$  e  $\Im z$  son las partes reales e imaginarias de  $z$ .

Una vez calculadas las transformadas,

$$U(x, y) \approx 4\epsilon \sum_{-\infty}^{\infty} (\sigma^{12} f_6(x, y; k) - \sigma^6 f_3(x, y; k)). \quad (3.16)$$

En la figura 3.12 se muestra la aproximación dada por la fórmula de la suma de Poisson.

Cualitativamente, el potencial decae exponencialmente para  $x < 0$ , y conforme  $x$  crece hay picos dobles cada vez más espaciados, con decaimiento exponencial en ambos lados de los picos; los regímenes están separados por una región de transición. Los picos son dobles pues para  $x > 0$  hay dos soluciones al problema  $(x - n^2) = 0$ .

La fórmula de la suma de Poisson es una valiosa herramienta para entender el comportamiento de las sumas de tipo Lennard-Jones. Pensando en la cadena como una aproximación de una  $\alpha$ -hélice, planteamos que el potencial efectivo que genera es una suma de mínimos con un comportamiento exponencial en ambos lados, cada uno generado por el residuo correspondiente, y con un decaimiento de tipo Lennard-Jones en la dirección transversal al eje principal de la hélice. Así, es correcto pensar que los potenciales actúan de manera localizada sobre los segmentos y que, dependiendo del número de residuos

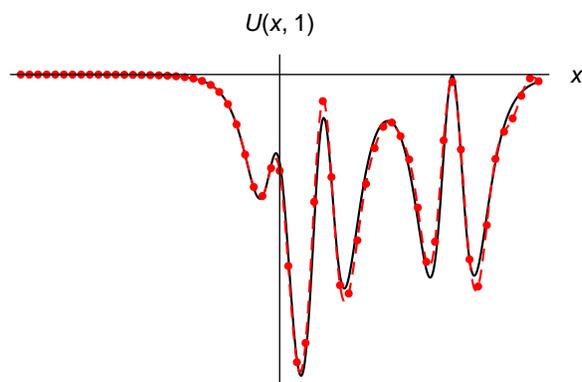


Figura 3.12: Comparación entre la función (3.11) (en negro) y la aproximación dada por (3.10) (en rojo), donde hemos tomado cuarenta términos en la suma, cinco modos en la fórmula de la suma de Poisson y  $y = \sigma = 1$ .

involucrados y la intensidad con la que interactúan, la cantidad de mínimos que habrá en la dirección transversal a éstos.

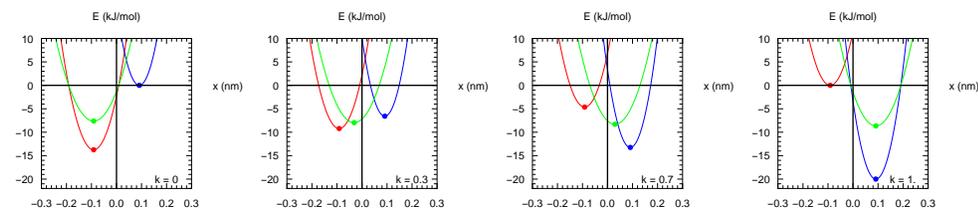
### 3.1.5. Construcción del potencial

Como se mostró en la sección anterior, la suma de potenciales de Lennard-Jones tiene una forma muy específica. Basados en este hecho y en la imposibilidad de reducir de manera directa el potencial de van der Waals y Coulomb a una dimensión, nos apoyamos en los mapas de contacto como el mostrado en la figura 3.4, para proponer el potencial unidimensional que actúa sobre la barra.

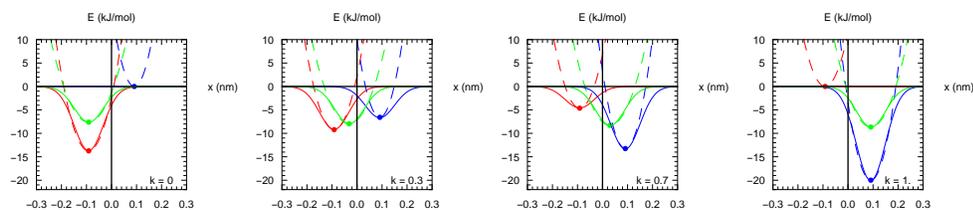
Como ya hemos mencionado, suponemos que existen dos tipos de interacciones entre residuos: de arrastre y de estabilización. Las interacciones de estabilización son aquéllas que sólo se dan en uno de los dos estados (roja o azul en la figura 3.4), y las de arrastre son las que se dan en ambos (verde). Pensamos que el estado cerrado y el abierto corresponden a mínimos de los potenciales que actúan sobre cada residuo, y que su profundidad es la suma de interacciones con sus contactos. Cuando el poro está en el estado cerrado, el potencial sólo tiene un mínimo, correspondiente a este estado; conforme el sensor de voltaje se mueve, ese mínimo comienza a desaparecer y el mínimo que corresponde al estado abierto comienza a aparecer. Una vez que el sensor está en su conformación abierta, el mínimo del cerrado no existe más y sólo queda el mínimo correspondiente al estado abierto. Un mínimo más lo asociamos con los residuos de arrastre; éste, en vez de desaparecer, viaja de

### 3. LA ESTRUCTURA Y EL MODELO

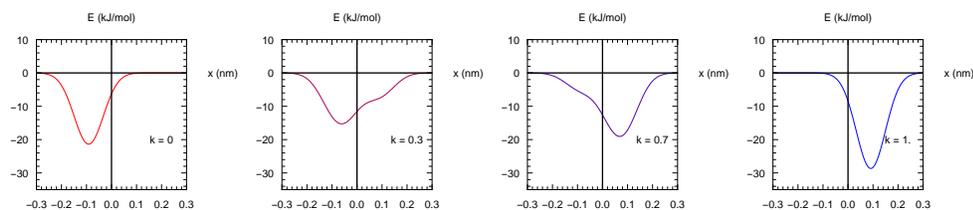
la posición del mínimo correspondiente al cerrado, al mínimo del abierto. La construcción se muestra en la figura 3.13. De este modo, tomando  $E_{ij,o}$ ,  $E_{ij,c}$ ,



(a) Los puntos representan los valores de las energías  $E_{o,c,a}$  calculados usando el campo de fuerza CHARMM27. Las parábolas son aquellas que pasan por los puntos  $(x_s - 0.1, 0)$ ,  $(x_s, -E_s)$  y  $(x_s + 0.1, 0)$ .



(b) Ajuste de gaussianas a las parábolas.



(c) Potencial final.

Figura 3.13: Construcción del potencial que actúa sobre el residuo P405<sub>I</sub>. Primero calculamos el valor de la energía para los residuos de estabilidad y arrastre. Luego construimos las parábolas mostradas en (a). Después ajustamos las gaussianas a las parábolas, y por último las sumamos, obteniendo así los potenciales dados por la ecuación (3.17).

$E_{ij,ao}$  y  $E_{ij,ac}$  los valores de la energía de pares no ligados entre el residuo  $i$  del segmento S6 y el residuo  $j$  del resto del poro, para los residuos estabilizadores en los estados abierto y cerrado ( $o$  y  $c$ ), y para los residuos de arrastre en el

abierto y en el cerrado ( $ao$  y  $ac$ ), proponemos el potencial

$$U_i(x) = k \sum_j E_{ij,o} U_o(x; x_o) + \sum_j (kE_{ao} + (1-k)E_{ac}) U_a(x; kx_o + (1-k)x_c) + (1-k) \sum_j E_{ij,c} U_c(x; x_c). \quad (3.17)$$

Aquí,  $x_o$  y  $x_c$  son las posiciones de los mínimos de potencial en los estados abierto y cerrado respectivamente, que tomaremos como los valores de los cortes de las representaciones CbC con los planos ortogonales que pasan por cada carbono  $C_\alpha$  de la representación CbC de referencia, y  $k \in [0, 1]$  como siempre. En la sección anterior vimos que la forma que debieran tener los potenciales generados es de tipo Lennard-Jones; sin embargo, ajustar numéricamente los potenciales es un problema, pues hay que eliminar las barreras infinitas que tienen, ya que generan soluciones espurias, lo que hace poco práctico trabajar con potenciales de esa forma. Por simplicidad, cada una de las funciones  $U_{o,c,a}$  las aproximamos por la gaussiana

$$U_s = -e^{-\frac{(x-x_s)^2}{2\sigma_s^2}},$$

donde  $\sigma_s$  la hemos determinado ajustando la gaussiana a la parábola que pasa por los puntos  $(x_s - 0.1, 0)$ ,  $(x_s, -E_s)$  y  $(x_s + 0.1, 0)$ . Así, tendremos un comportamiento cualitativo idéntico al problema original, sin los inconvenientes que inducen las barreras.

La ecuación (3.17) combina la información cuantitativa derivada de los campos de fuerza de la dinámica molecular aplicada a las estructuras conocidas en ambos estados, con una descripción cualitativa de la manera en que el poro abre y cierra, a través de los residuos de arrastre y estabilidad. Es pues, un híbrido para probar nuestro modelo y determinar el tipo de movimiento que lleva a cabo el poro en el proceso de apertura. Finalmente, la energía potencial del modelo extendido es

$$U(u(x, t)) = \sum_i \left\{ U_i(u(\mu_i, t)) + \frac{B_i}{2} \int_{\mu_{i-1}}^{\mu_i} \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right)^2 dx \right\}. \quad (3.18)$$

### 3.2. El modelo aplicado al canal Kv1.2/2.1 quimera

Usando el potencial (3.18) y los resultados del capítulo 2, podemos de manera inmediata analizar la dinámica de los canales Kv1.2 y Kv1.2/2.1 quimera

por medio de diagramas de bifurcación. A continuación presentaremos un estudio detallado del canal. El análisis del canal Kv1.2 se puede encontrar en el apéndice.

### 3.2.1. Dos potenciales: P405 y Y417

Para nuestro primer experimento numérico, consideramos el escenario del capítulo 1: dos potenciales, uno actuando en el extremo superior de la bisagra (residuo P405), y el otro en el residuo Y417. La razón por la cual consideramos el segundo potencial en el residuo Y417 en vez del T421 (extremo libre) es la malformación que presenta el segmento S6<sub>II</sub> en el estado cerrado a partir del H418; además, el Y417 ha sido señalado recientemente como pieza fundamental del acoplamiento entre el sensor de voltaje y el poro [24].

Como se mencionó anteriormente, la asimetría del estado cerrado nos permite considerar cada segmento como un experimento independiente, por lo que tenemos cuatro configuraciones distintas a las cuales aplicar el modelo. Así, resolviendo las ecuaciones (2.4) para el problema estacionario con los potenciales construidos en la sección 3.1.5, obtenemos los diagramas de bifurcación mostrados en la figura 3.14. De los cuatro segmentos, el único que

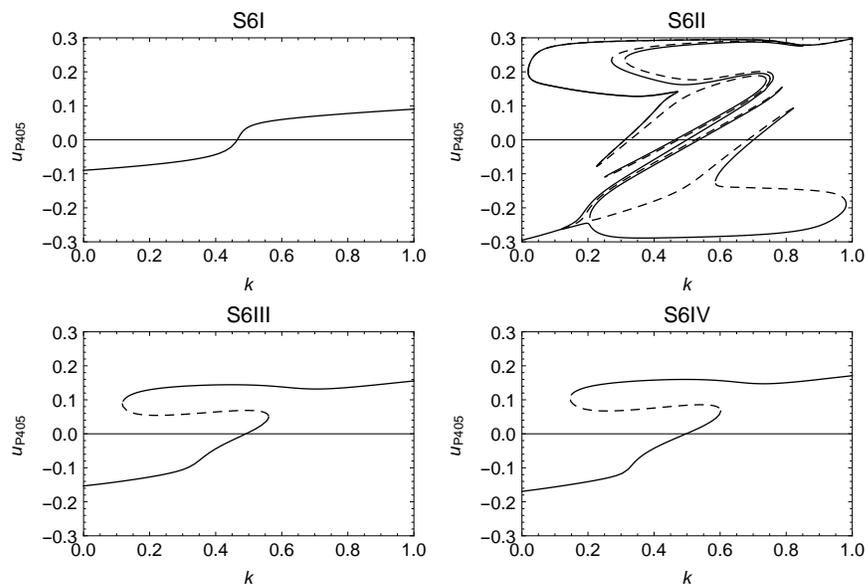


Figura 3.14: Diagramas de bifurcación para el caso de dos potenciales, uno actuando sobre el residuo P405 y el otro sobre el Y417.

no exhibe biestabilidad es el S6<sub>I</sub>. Para explicar este fenómeno, comparemos

los potenciales que actúan sobre el S6<sub>I</sub> con aquéllos que actúan sobre el S6<sub>II</sub>. Como se observa en la figura 3.15, en el segmento S6<sub>I</sub> el potencial del Y417 es muy sencillo, puesto que los residuos que interactúan con el Y417<sub>I</sub> son el I316<sub>I</sub>, el R326<sub>II</sub>, G327<sub>II</sub>, L330<sub>II</sub> y V408<sub>II</sub>, de los cuales los cuatro primeros son de arrastre, y el último es muy débil; en el P405<sub>I</sub> se dan los tres tipos de interacciones, pero no son lo suficientemente pronunciadas para generar biestabilidad. En cambio, el segmento S6<sub>II</sub> tiene todo tipo de interacciones, tanto en el P405 como en el Y417, lo que genera muchos estados estacionarios.

#### 3.2.2. Tres potenciales: P405, P407 y Y417

Con el ejemplo anterior a la mano, es natural preguntarnos qué pasa si “encendemos” otro residuo, por ejemplo el P407, localizado en el otro extremo de la bisagra. En este caso, como se puede observar en la figura 3.16, el estado cerrado se vuelve mucho más duradero para segmentos I, III, y IV, y para el II obtenemos un diagrama más estructurado.

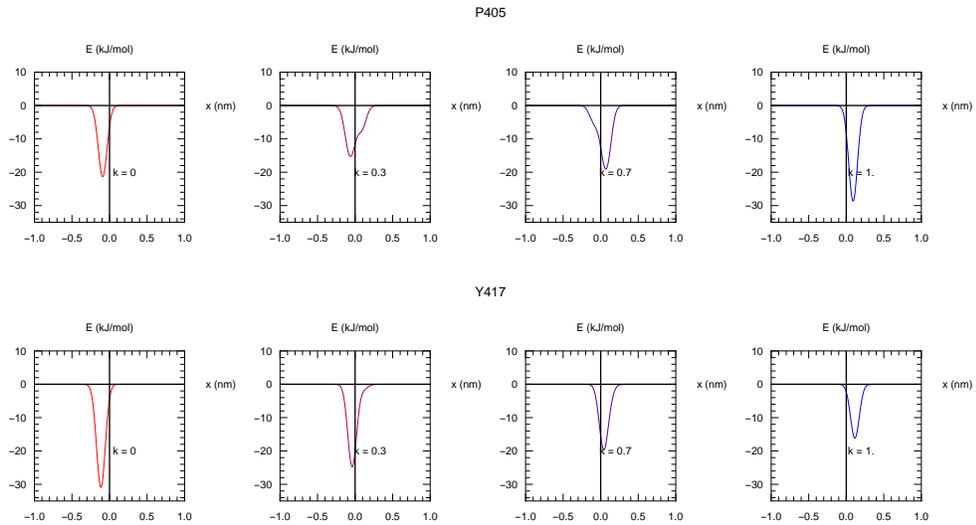
#### 3.2.3. Cinco potenciales: V399, P405, P407, N414 y Y417

Hasta el momento la evidencia funcional de los canales Kv es muy escasa. Con excepción del papel que juega el residuo Y417 y de la clara importancia del motivo PVP, poco se sabe de la actuación de otros residuos del S6 en el proceso de apertura y cerradura. Esta situación nos da mucha libertad para escoger cuáles hemos de considerar en el estudio del canal.

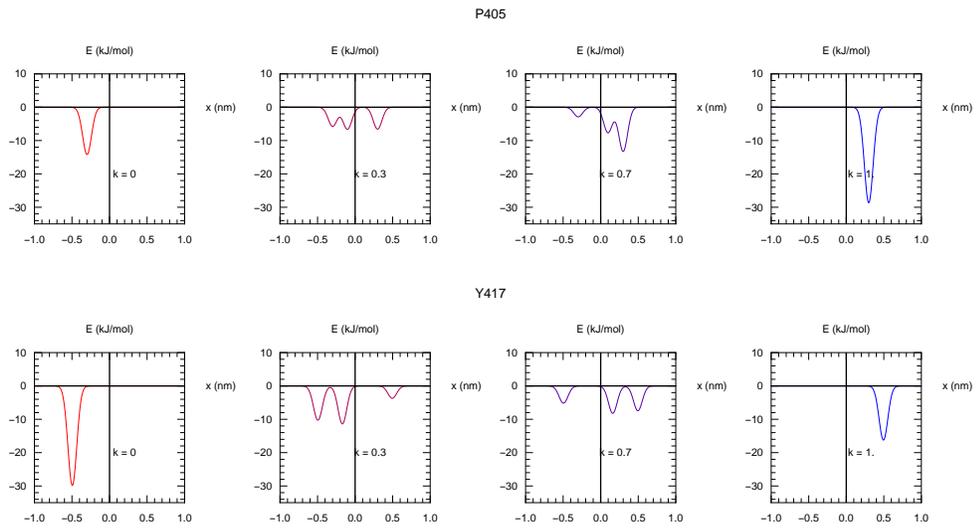
La relación entre la representación continua de los segmentos S6 con los potenciales discretos, sin ayuda de datos experimentales concretos, sólo puede ser determinada por los experimentos numéricos. No es correcto tomar todos los residuos, pues esto conlleva sobrestimar las interacciones de pares no ligados, además de que contradice la suposición de que muchos residuos son pasivos en el proceso de apertura. Los residuos que en esta sección tomamos en cuenta, son aquéllos que los experimentos numéricos han señalado ser importantes. Los criterios que nos llevaron a considerarlos se mencionan a continuación.

Como primer criterio, ignoramos cualquier residuo cuyas interacciones de arrastre sean dominantes. Proponemos que dichas interacciones no determinan el proceso de cambio conformacional y más bien responden a él. El segundo criterio es considerar residuos que tengan las mismas características para todos los segmentos del canal, es decir, si un residuo tiene una interacción biestable en el S6<sub>I</sub>, también la tenga para los tres segmentos restantes. De este modo tenemos consistencia en los mecanismos de apertura, y homogeneidad en los experimentos numéricos. El tercer criterio es escoger los residuos que,

### 3. LA ESTRUCTURA Y EL MODELO



(a) Potenciales actuando sobre los residuos P405 y Y417 en el segmento S6<sub>I</sub>.



(b) Potenciales actuando sobre los residuos P405 y Y417 en el segmento S6<sub>II</sub>.

Figura 3.15: Potenciales construidos para los segmentos S6<sub>I</sub> y S6<sub>IV</sub> del Kv1.2/2.1 quimera.

cumpliendo la característica anterior, sólo actúen en el estado cerrado o en el abierto, y el cuarto es mantener el número de residuos lo más pequeño posible, para evitar los problemas ya mencionados.

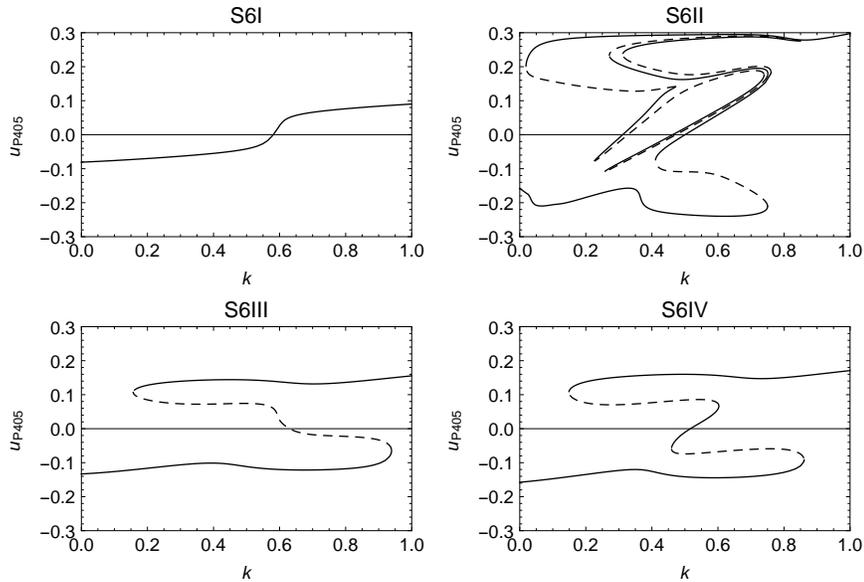


Figura 3.16: Diagramas de bifurcación para tres potenciales, actuando sobre los residuos P405, P407 y Y417.

Bajo estos criterios, vamos a considerar cinco residuos: V399, P405, P407, N414 y T417. En el primero, el potencial sólo está presente en el estado cerrado, y se debe a la interacción con el segmento S6 de una subunidad adyacente (I con IV, II con I, III con II, IV con III), entre el residuo V399 y los residuos T401, I402 y P405. En el segundo, hay biestabilidad y la interacción es con múltiples residuos de todos los segmentos. El tercero sólo tiene interacciones en el estado cerrado y se debe a la interacción del P407 con los residuos I409, V410 y F413 de la subunidad adyacente (en el mismo orden que para el residuo V399). En el cuarto, el potencial actúa sólo en el estado abierto, y las interacciones se dan con el V408 de la subunidad adyacente (I con IV, etc). El residuo Y417 es biestable y de particular interés, pues no sólo interactúa con el residuo V408 del S6 adyacente, también lo hace con los residuos K312 e I316 del *linker* de su misma subunidad, y con los residuos R326 y G327 de *linker* de la subunidad adyacente.

Una vez determinados los residuos a considerar, podemos calcular las soluciones estacionarias del sistema, y construir el diagrama de bifurcación. Éste se muestra en la figura 3.17. Como podemos observar, tres de los segmentos exhiben biestabilidad, y el que no lo hace tiene una transición casi biestable; hay que recordar que el segmento S6<sub>II</sub> en el estado cerrado no está bien con-

formado, y ésta puede ser la razón por la cuál el  $S6_I$  no alcance una transición biestable. Además, considerar más residuos ha eliminado esas ramas dudosas de los diagramas, lo que nos da certidumbre respecto a la validez de las configuraciones encontradas.

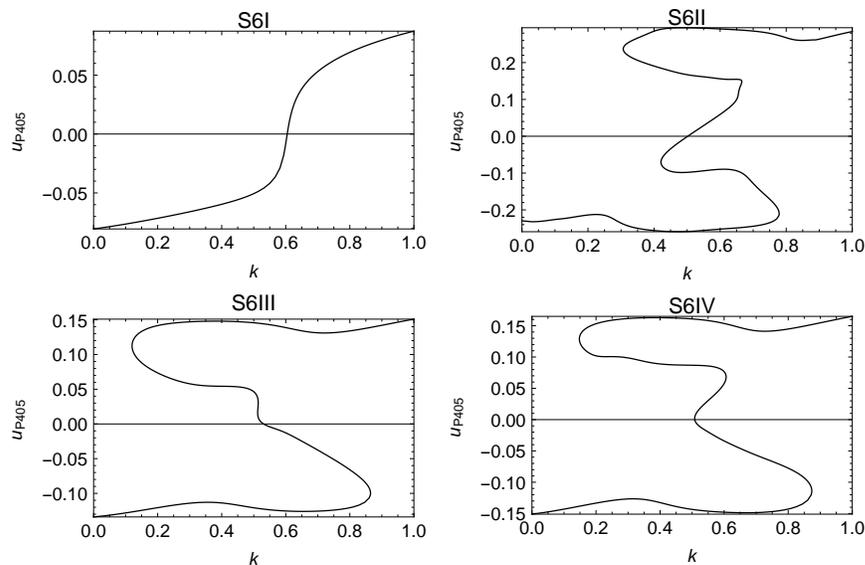


Figura 3.17: Diagramas de bifurcación para los cinco potenciales actuando sobre los residuos V399, P405, P407, N414 y Y417.

Con el modelo bien establecido, podemos “apagar” los diferentes residuos para determinar su función. En la figura 3.18, mostramos los diagramas de bifurcación resultantes de apagar cada uno de los residuos considerados. Como se puede ver, cada uno cumple un papel importante en el cambio conformacional, siendo el más característico el Y417. Si lo apagamos, para todos los segmentos excepto el  $S6_I$ , el estado cerrado se vuelve enteramente dominante, tanto que el  $S6_{II}$  no alcanza a abrir, y los  $S6_{III}$  y  $S6_{IV}$  apenas abren hasta el final, cosa que es inherente al modelo; el estado abierto se da casi cuando  $k = 1$ , lo que sugiere que el estado es inaccesible. Este resultado es sorprendente, pues va de acuerdo con las observaciones experimentales [24].

La reproducción de los experimentos respecto a la función del residuo Y417 en el proceso de apertura nos da certeza del modelo, por lo que procederemos a interpretar el papel del resto de los residuos considerados. Por ejemplo, el N414 le da mayor accesibilidad y permanencia al estado abierto, lo que se podría observar en experimentos fisiológicos. Del mismo modo y como ya habíamos señalado, el P407 hace más estable el estado cerrado. El P405 no sólo

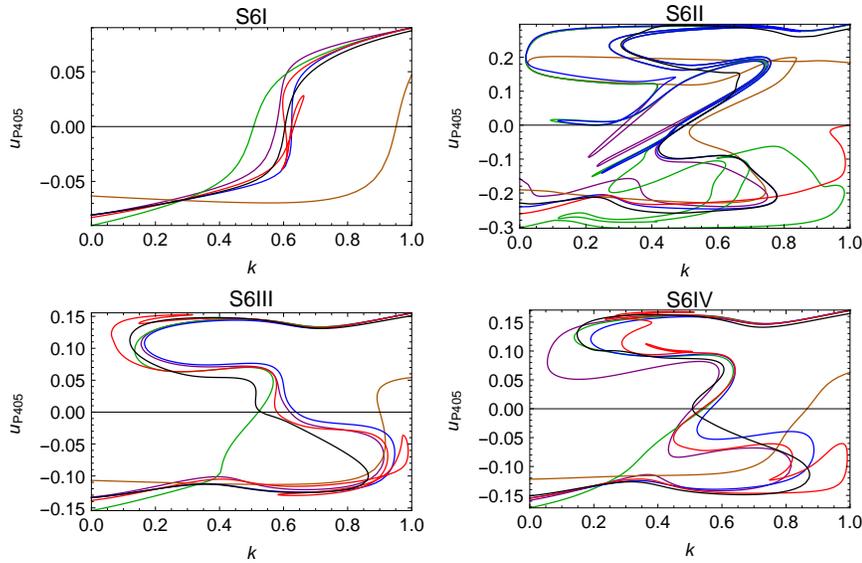


Figura 3.18: Comparación entre los diagramas de bifurcación cuando se “apaga” un residuo. En negro, el diagrama con todos los residuos. En rojo, con el Y417 apagado. En azul, con el N414 apagado. En verde, con el P407 apagado. En naranja, con el P405 apagado. En violeta, con el V399 apagado.

hace más accesible el estado abierto, también es fundamental en la biestabilidad del proceso. El V399 contribuye a que ambos estados sean más accesibles a través del ciclo de histéresis.

Estas observaciones dan un criterio matemático que determina los residuos importantes y su funcionamiento en el proceso de apertura. A partir de ésta, los fisiólogos tienen una guía para diseñar experimentos donde se puedan observar los resultados que predice el modelo, esclareciendo la manera en que el canal opera. Cabe señalar que éstos se han conseguido a un costo computacional muy bajo, todo gracias a la simplicidad del modelo. Una de las características más importantes del modelo es que “apagar” residuos corresponde a realizar *mutaciones* en el canal. Esta noción es muy importante para explotar el modelo y comprender sus alcances. El lector atento ya ha pensado que el apagar los residuos P405 o P407 no es inteligente o factible, pues el modelo está enteramente fundamentado en la existencia e interacción de la bisagra y, experimentalmente, mutar alguno de estos dos residuos alterará de manera drástica las propiedades mecánicas de los segmentos, situación que hará confusa la interpretación de resultados. Para contrarrestar este problema, volvamos a la figura 3.4. En ésta podemos ver qué residuo interactúa con cuál;

entonces, en vez de apagar los residuos en los segmentos S6, los podemos apagar en el resto del poro, generando potenciales donde no se tome en cuenta su contribución.

### 3.3. Mutaciones

Para culminar nuestro estudio, vamos a analizar el modelo cuando se modifican los potenciales que actúan sobre los segmentos S6. En particular, tomaremos en cuenta dos casos de los cuales se tiene información funcional y uno más que se puede extraer del análisis que hemos hecho en las secciones anteriores.

#### 3.3.1. Interacciones RELY

Las interacciones RELY se dan entre el residuo Y417 del segmento S6 y los residuos R326 y E327 del *linker* y el L330 del S5 de la subunidad adyacente (I con II, II con III, III con IV y IV con I). Se ha propuesto que estos residuos estabilizan el estado abierto del canal [9, 90]. Al eliminar las interacciones RELY de nuestro modelo, obtenemos el mismo resultado en la dirección de repolarización, como se puede ver en la figura 3.19. Cabe mencionar que el

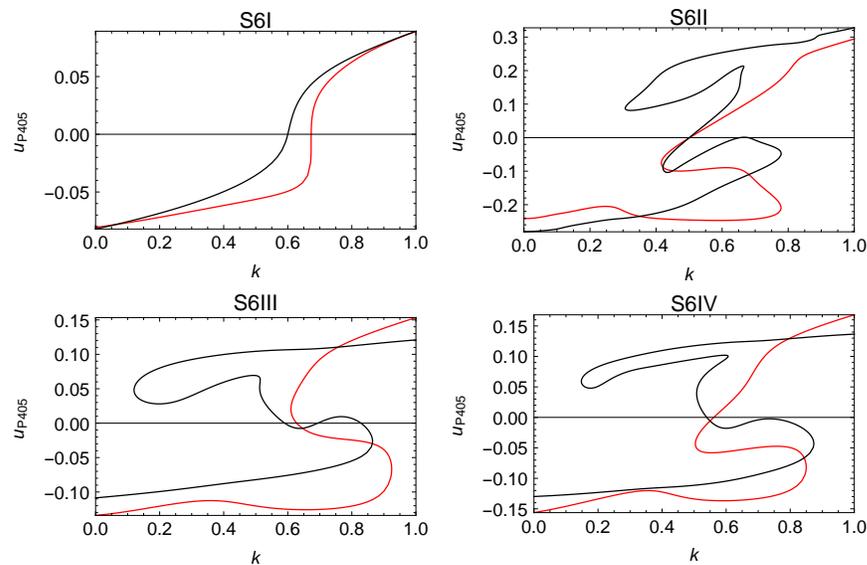


Figura 3.19: Comparación entre los diagramas de bifurcación cuando se elimina la interacción RELY. En negro considerando todos los residuos y en rojo con la interacción RELY apagada. Como se puede observar, el estado abierto pierde estabilidad en dirección de repolarización.

resido E327 y el L330 también interactúan con el P405 en el estado abierto, lo que también contribuye a la desestabilización del estado.

### 3.3.2. Los residuos I409, V410 y F413

Como ya mencionamos, el residuo P407 contribuye de manera considerable a la estabilización del estado cerrado en el modelo. Las interacciones más importantes de éste se dan con los residuos I409, V410 y F413. El residuo F413

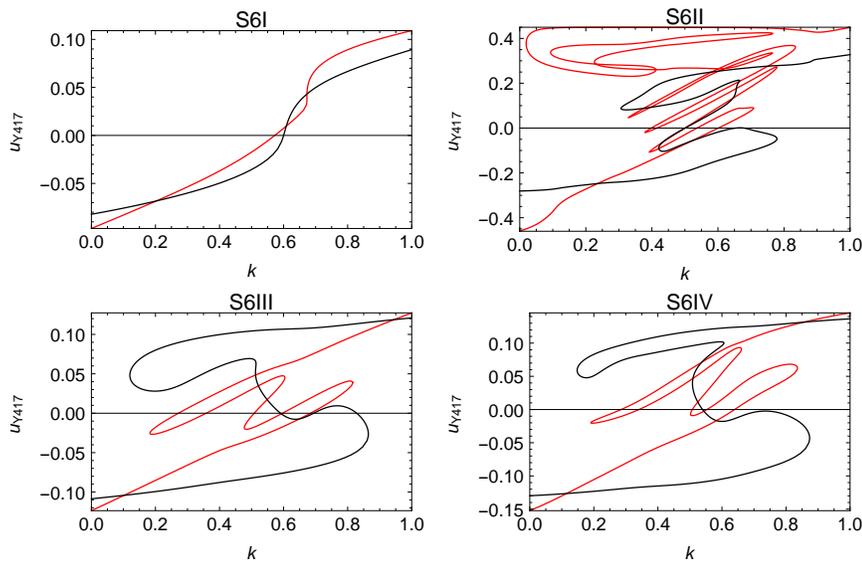


Figura 3.20: Comparación entre los diagramas de bifurcación. En negro, el diagrama con todos los residuos. En rojo, con el F413 apagado. Como se puede observar, la biestabilidad se reduce considerablemente. La diferencia que se observa en el S6I se debe a la malformación del S6II en el estado cerrado.

interactúa con el P405 en el estado abierto, lo que sugiere que es de particular importancia en la biestabilidad. Al apagar las interacciones IVF, vemos que el comportamiento del poro cambia de manera considerable, reduciendo la estabilidad de ambos estados y haciendo la transición entre ellos casi reversible, como se observa en la figura 3.20.

El modelo, bajo las simplificaciones adecuadas, ha sido implementado de manera exitosa a una estructura tridimensional en sus dos conformaciones. Con él hemos sido capaces de reproducir resultados experimentales, y nuestro análisis ha permitido determinar nuevas regiones que pueden ser exploradas. Además, después de múltiples experimentos numéricos bajo distintas condiciones, tanto mecánicas como electrostáticas, creemos que es acertado concluir

### 3. LA ESTRUCTURA Y EL MODELO

---

que el mecanismo de apertura es inherentemente biestable, que ésta es una característica intrínseca del fenómeno, y que las mutaciones aumentan o disminuyen el grado de biestabilidad, pudiendo generar estados semiabiertos o incluso romper el funcionamiento del canal.

## Capítulo 4

# Conclusiones

Desde el descubrimiento de los canales iónicos y su descripción fisiológica por Hodgking y Huxley, numerosos estudios han sido realizados con la finalidad de explicar el proceso de apertura de los mismos. En los canales sensibles al voltaje, la visión prevalente es que el sensor de voltaje, por medio del *linker* S4-S5, ejerce al moverse una fuerza sobre los segmentos S6 que conforman el poro interior del canal, efectivamente abriéndolo y cerrándolo cuando el potencial de membrana alcanza cierto umbral.

Nuestro modelo, desde una perspectiva innovadora, ha sido capaz de reproducir estas observaciones, yendo más lejos, mostrando que el mecanismo de transición de un estado del poro al otro se da de manera biestable, con la claridad provista por una formulación matemática simple. Por supuesto, dicha sencillez se deriva de un estudio muy profundo de la estructura de los canales, así como de la forma en que las componentes del mismo interactúan. Una vez determinados los mecanismos dominantes en el proceso de apertura, hemos sido capaces de construir un modelo mínimo del problema que reproduce de manera exitosa las propiedades conocidas del sistema, y señala la importancia de ciertas regiones en la estabilidad conformacional, información antes desconocida.

La dinámica molecular y los métodos de energía libre han sido parcialmente exitosos en la descripción del proceso de apertura de los canales, pero todavía no han logrado llegar a la resolución temporal requerida para estudiar el problema completo. Además, son inherentemente costosos y la información que proveen está limitada por la formulación de los mismos. En el primer caso, el gran número de ecuaciones, así como las consideraciones que de manera artificial han de ser introducidas a la simulación, como las condiciones de frontera o la preservación del ensamble, hacen estos métodos ineficientes,

difíciles de implementar, y requieren una suerte de *artesanía* en su interpretación; hace falta mucha experiencia y conocimiento para discriminar los efectos reales de la información espuria. En el segundo caso, la formulación energética pierde mucha información sobre la dinámica, pues ésta sólo trabaja en regiones energéticamente favorables, en las que numerosas consideraciones y constricciones son agregadas.

Desde esta perspectiva, nuestro acercamiento al problema es complementario. Dando prioridad a la información cualitativa, hemos establecido una correspondencia entre el fenómeno y las matemáticas de un sistema muy simple, una barra empotrada en un extremo y libre en el otro que está sujeta a la acción de potenciales concentrados en los residuos que regulan el proceso. Nuestro acercamiento es complementario al de la dinámica molecular.

A través de la analogía entre el sistema mecánico y el sistema biológico, pudimos enfocar el estudio en dos áreas: el análisis estructural del sistema y el proceso dinámico de apertura. El análisis estructural nos permitió entender por qué ciertos residuos juegan un papel mayor que otros, a diferenciarlos entre activos y pasivos, lo que dio pie a la propuesta de un potencial efectivo actuante sobre las regiones del S6, respaldada por un resultado matemático muy simple, la fórmula de la suma de Poisson. Al implementar el análisis estructural al modelo, haciendo las reducciones dimensionales apropiadas, concluimos que el proceso de apertura se da de forma mayoritariamente biestable, y corroboramos esta aseveración no sólo en uno, sino en los dos canales disponibles, el Kv1.2 y el Kv1.2/2.1 quimera. Más aún, el estudio es independiente del canal; de éste sólo requiere la estructura. El análisis es, en sí mismo, un acercamiento novedoso al problema de apertura, y se puede aplicar a otro tipo no sólo de canales, sino de estructuras biológicas.

### **El canal TRPV1**

En dos trabajos recientes, la estructura de un canal TRP (*transcient receptor potencial*, en inglés), el TRPV1 (PDB 3J5P y 3J5Q), ha sido determinada en diferentes estados conformacionales [15, 74]. A diferencia de los canales Kv, los canales TRP responden a otros estímulos, como la presencia de capsaicina (agente responsable de la sensación de ardor del picante), y los cambios en la temperatura; el TRPV1 es pues, un canal termosensitivo.

Estructuralmente, el canal TRPV1 es un tetrámero que, como los canales Kv, tiene un dominio parecido al sensor de voltaje formado por cuatro segmentos (S1 a S4), un pequeño filtro de selectividad y un poro formado por dos segmentos transmembranales (S5 y S6), como se muestra en la figura 4.1. Los dos dominios están concetados por el *linker* S4-S5. Como característica única,

---

el canal cuenta con una hélice interfacial que le sigue al segmento S6, conocida como el “dominio TRP”, que se encuentra estratégicamente localizada de tal forma que interactúa con el *linker* S4-S5 y el principio de la hélice S1, y probablemente provee los mecanismos físicos para el cambio conformacional de la estructura.

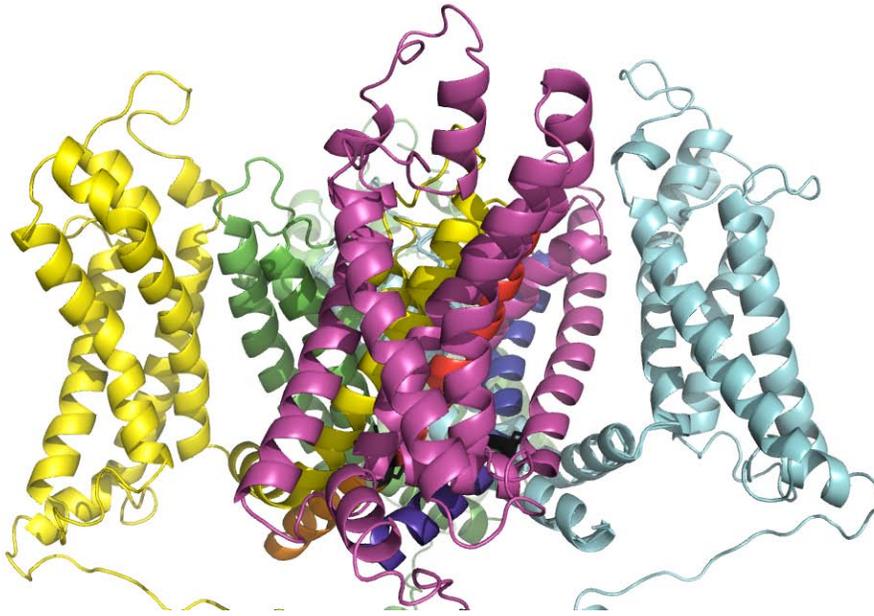


Figura 4.1: Estructura cristalográfica del canal TRPV1. En la parte baja del poro, se observa el llamado “dominio TRP”.

Tres estructuras del canal TRPV1 son conocidas y representan al canal en diferentes estados, que se pueden identificar al comparar los diámetros del camino de conducción de iones. En un estado, el camino está constreñido en el filtro de selectividad, así como en la compuerta inferior del camino. Cuando se acopla la capsaicina, no hay cambios en el filtro de selectividad, mientras que la compuerta inferior se expande notablemente. En la tercera estructura (RTX/DkTx), el canal se encuentra totalmente abierto, con el camino de conducción de iones completamente libre. Estos perfiles sugieren un mecanismo dual de apertura, que involucra cambios sustanciales tanto en el filtro de selectividad como en la compuerta inferior, es decir, un mecanismo de compuerta doble.

Sin entrar en mayores detalles sobre el proceso de apertura del TRPV1, es claro que con ligeras adaptaciones a nuestro modelo, podemos aplicarlo a

## 4. CONCLUSIONES

este canal y determinar de qué manera influyen los distintos residuos involucrados en el mecanismo de apertura. A manera de muestra, en la figura 4.2 podemos ver los mapas de residuos entre el segmento S6<sub>I</sub> y los *linkers* S4-S5 que interactúan en ambas conformaciones.

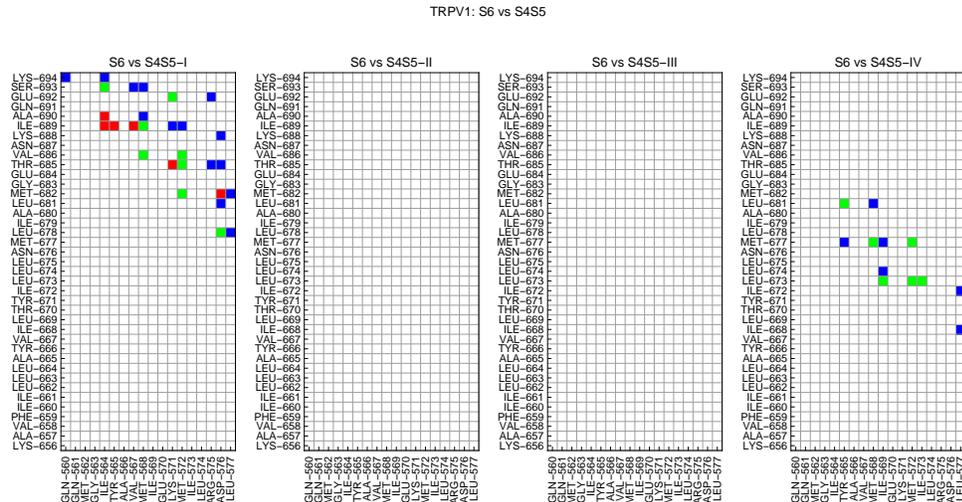


Figura 4.2: Interacción entre residuos del segmento S6 (eje vertical) y los *linkers* S4-S5 (eje horizontal).

En los mapas de contacto resalta que hay pocos residuos que actúan exclusivamente en el cerrado. En particular, una interacción llama la atención, la del I689 del S6 y el I696 del dominio TRP, pues sugiere que ésta es responsable de que el dominio TRP forme un “codo” con respecto al S6 en el estado cerrado. Además, otras interacciones pueden observarse y estudiarse, como las que hay en la región del I679 y las del M682, que han sido señaladas como importantes en el proceso de apertura de la segunda compuerta [15].

Como en los canales Kv, el modelo puede ser adaptado al TRPV1, y las interacciones encontradas se pueden estudiar de la misma manera, mostrando que el acercamiento es tan informativo como los métodos de dinámica molecular y energía libre, y ayudará a dirigir los esfuerzos experimentales y computacionales en la búsqueda de los mecanismos dominantes en la apertura de los canales iónicos, y de manera más general en los problemas de cambios conformacionales en proteínas.

## Apéndice A

# Métodos y material suplementario

En el capítulo 3 se ha mostrado sólo un ejemplo del análisis que se hizo para los canales Kv1.2 y Kv1.2/2.1 quimera. Este apéndice está dividido en tres partes. La primera es una breve descripción del proceso que se llevó a cabo para preparar las estructuras de los canales de manera que pudieran ser estudiadas. La segunda parte muestra los resultados obtenidos para el canal Kv1.2 que se obtuvieron en el capítulo 3 para el Kv1.2/2.1 quimera. La tercera parte incluye los mapas de calor y de contacto entre las diferentes componentes de ambos poros, y han sido agregadas para que el lector pueda profundizar en nuestras observaciones, y pueda hacer las suyas propias.

### A.1. Las estructuras

Las estructuras de ambos canales en el estado abierto se obtuvieron del *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb>), bajo los identificadores 2A79 para el canal Kv1.2 [75] y 2R9R para el Kv1.2/2.1 quimera [76]. Para el estado cerrado, la primera fue descargada de la página del *Theoretical and Computational Biophysics Group* (<http://www.ks.uiuc.edu>) y es resultado de la investigación realizada por el laboratorio de K. Schulten [67] y la segunda nos fue amablemente proporcionada por M. Jensen [60].

Las estructuras fueron preparadas usando VMD [56], WHAT IF [116] y PyMol [101], con el que también se hicieron las figuras 1.1, 3.1, 3.5 y 4.1. Una vez preparadas, se usó la paquetería de dinámica molecular GROMACS [92] para añadir los parámetros del campo de fuerza CHARMM27 [14].

El análisis numérico, el resto de las figuras y los diagramas de bifurcación, fueron realizados usando Mathematica [120] y AUTO [31].

## A.2. Diagrama de bifurcación del canal Kv1.2

A continuación presentamos el análisis de bifurcación del canal Kv1.2. Como en el capítulo 3, hemos considerado los residuos V399, P405, P407, N414, Y417 y T421. En la figura A.1, se muestran los diagramas de bifurcación del sistema con los cinco residuos.

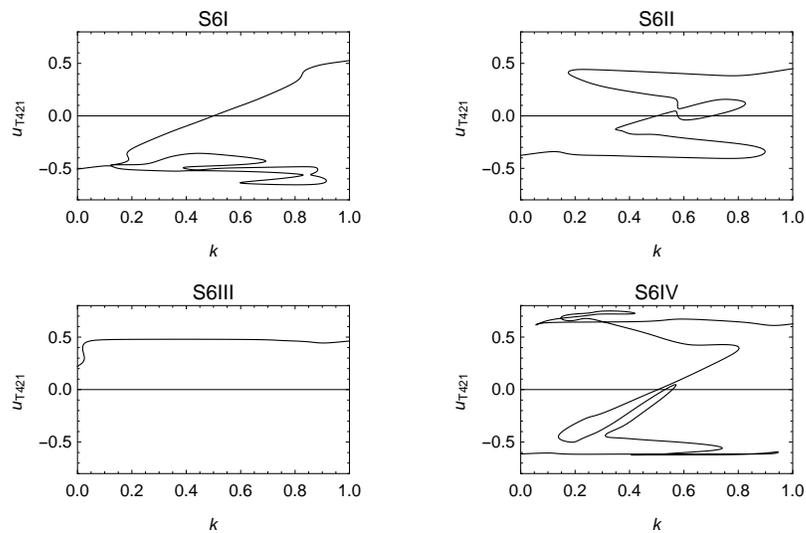


Figura A.1: Diagramas de bifurcación para el Kv1.2, considerando los residuos V399, P405, P407, N414, Y417 y T421.

Podemos observar que los cuatro segmentos abren de manera biestable. Así, considerando los ocho segmentos (cuatro de la quimera y cuatro de éste), siete exhiben biestabilidad, y el que no lo hace, es casi biestable.

## A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

A continuación se muestran todos los mapas de calor y contacto construidos para ambos canales. Cada mapa se debe a uno de los cuatro segmentos S6 contra los otros componentes del poro, en estados abierto y cerrado. En todas las figuras, los residuos del S6 estudiados se encuentran en el eje vertical.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

#### A.3.1. El canal Kv1.2/2.1 quimera

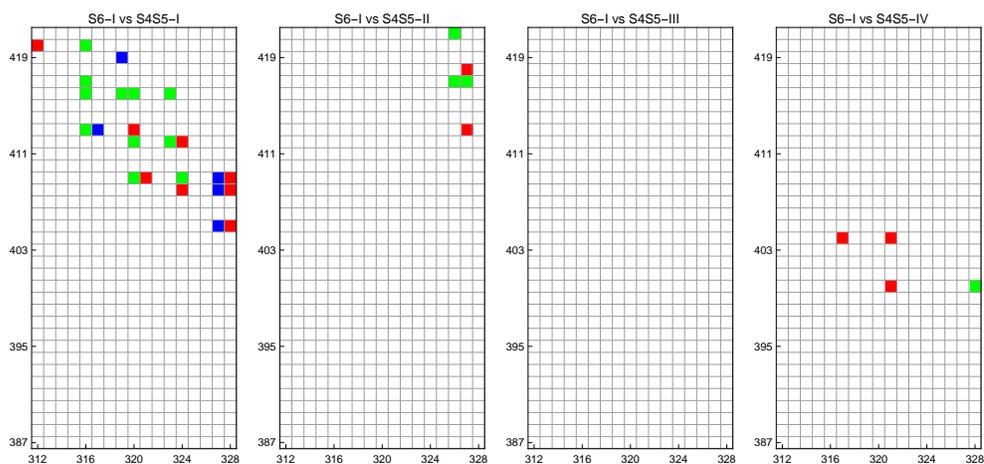


Figura A.2: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el *linker* S4-S5.

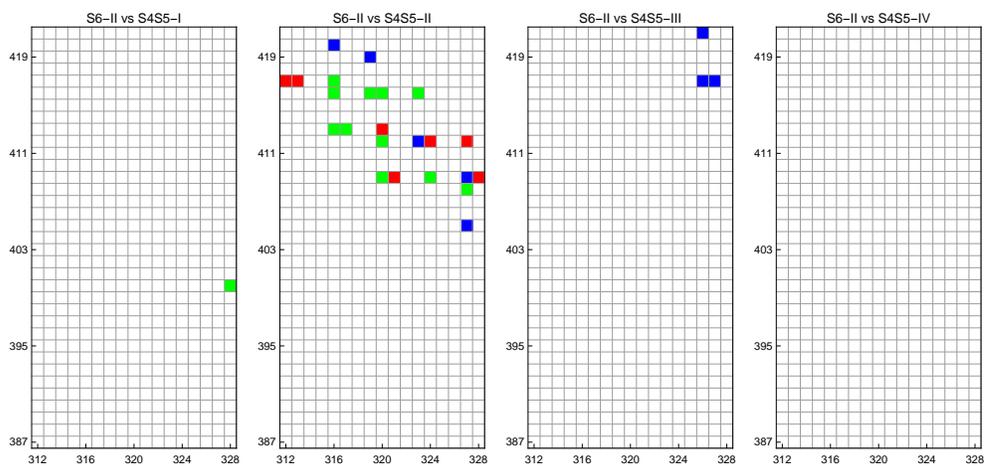


Figura A.3: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el *linker* S4-S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

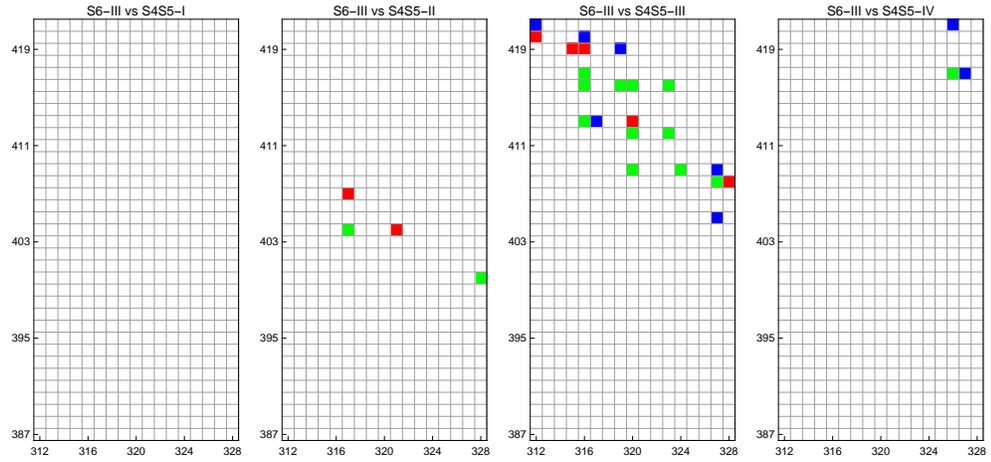


Figura A.4: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el *linker* S4-S5.

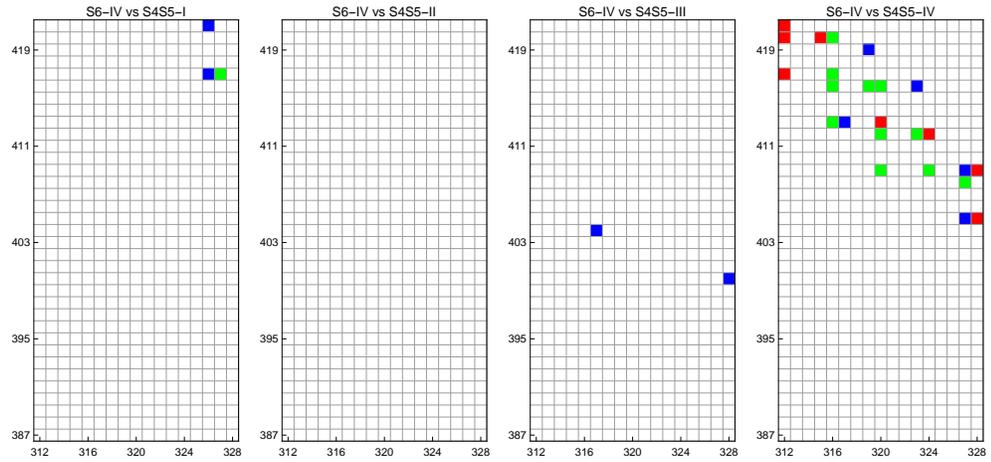


Figura A.5: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el *linker* S4-S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

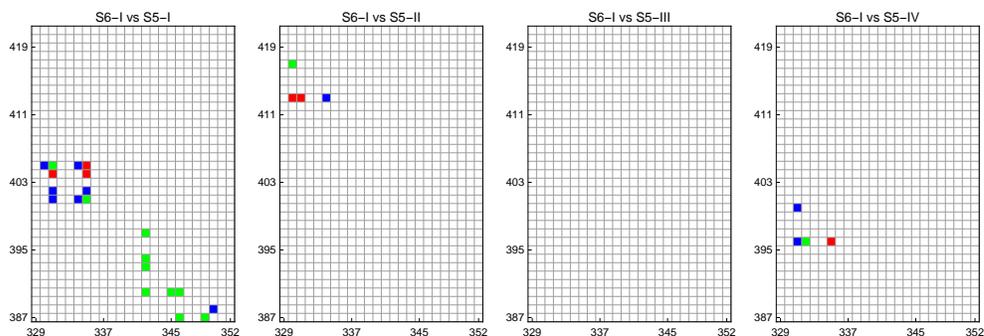


Figura A.6: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el S5.

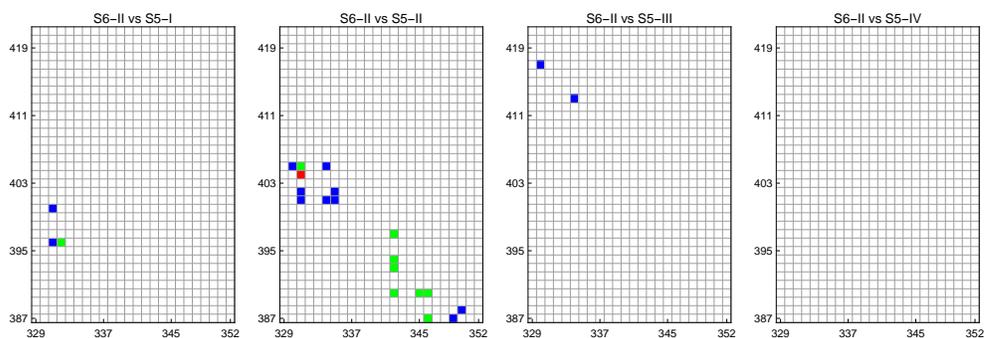


Figura A.7: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S5.

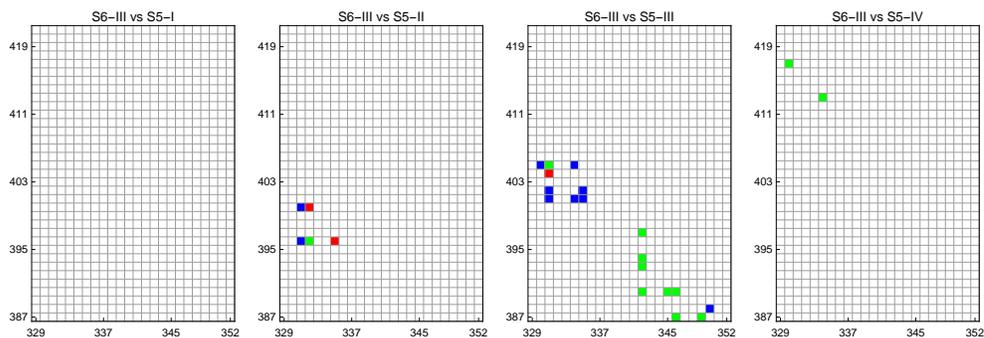


Figura A.8: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

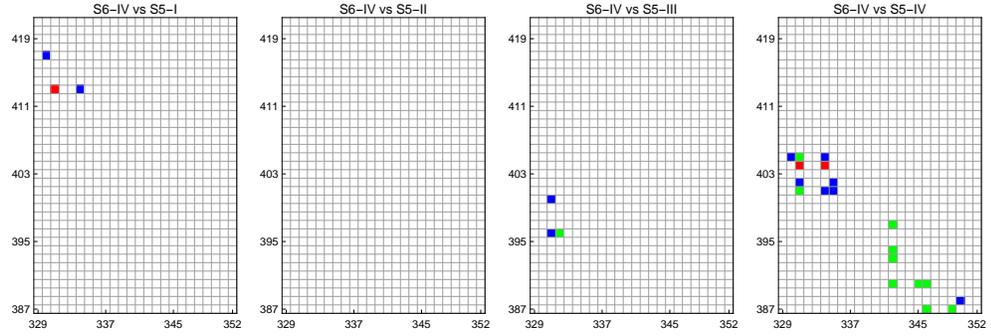


Figura A.9: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el S5.

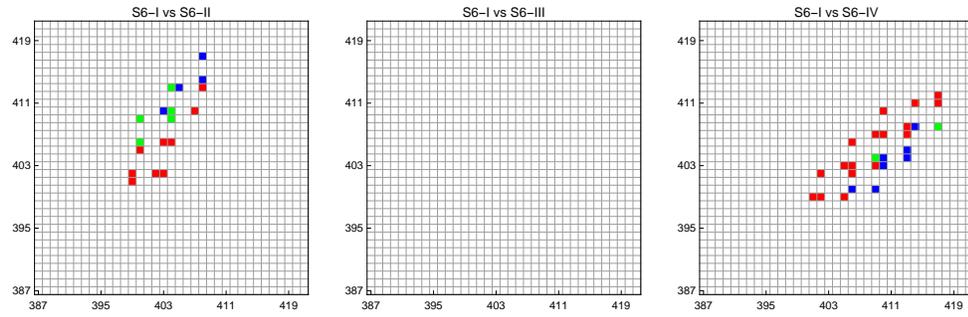


Figura A.10: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el S6.

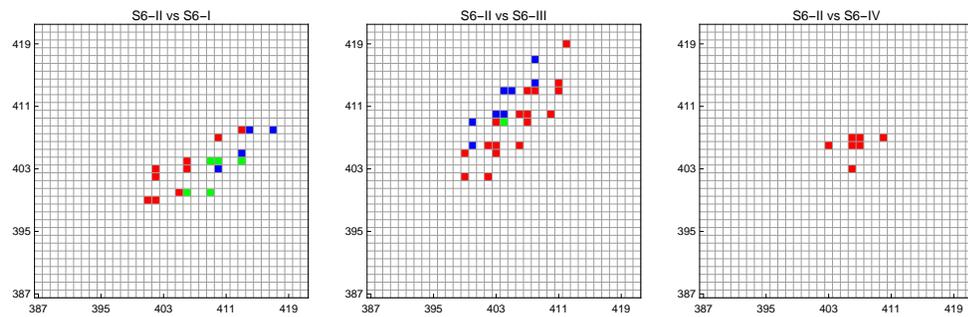


Figura A.11: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S6.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

---

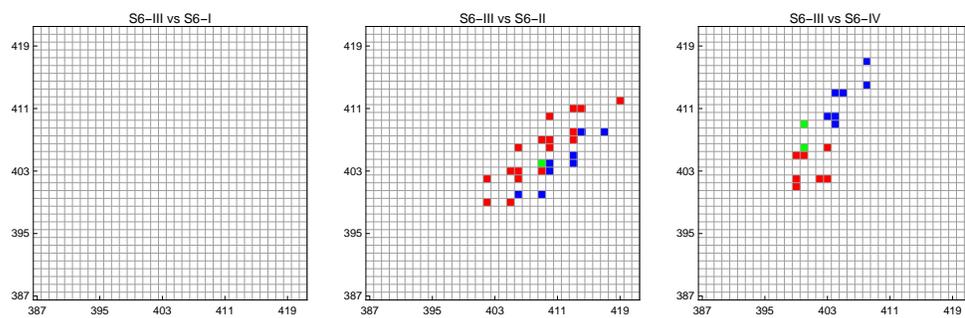


Figura A.12: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S6.

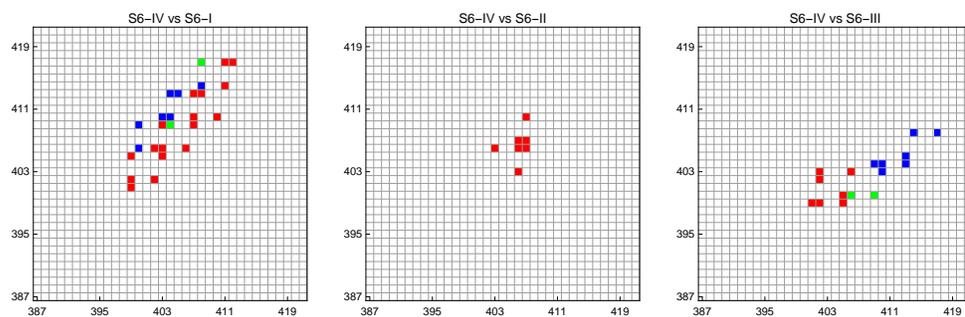


Figura A.13: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el S6.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

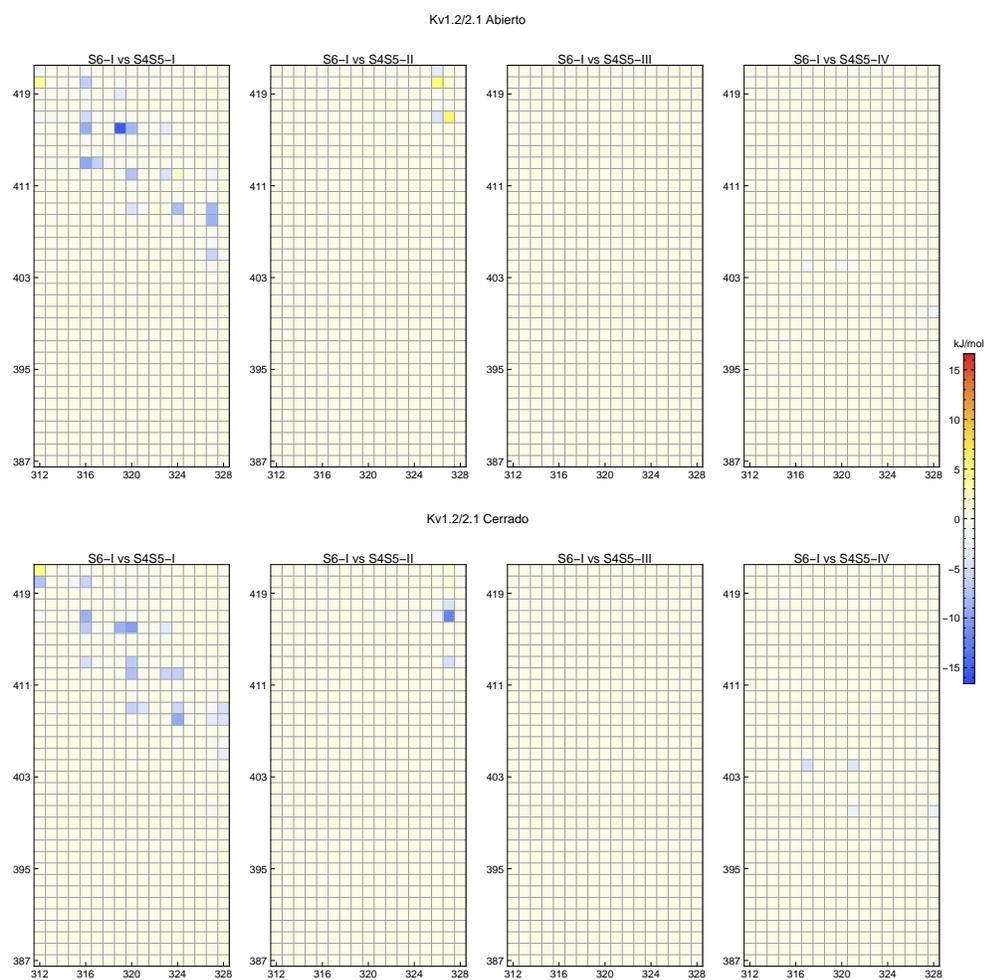


Figura A.14: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el *linker* S4-S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

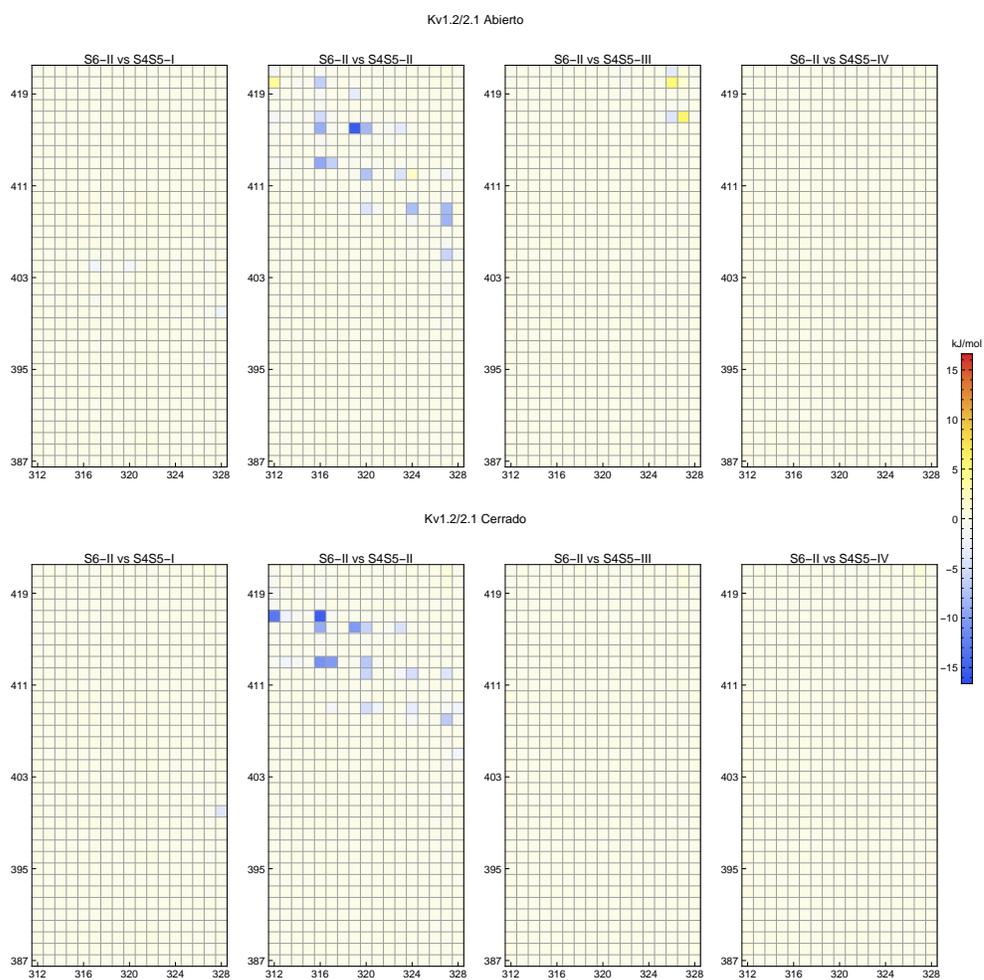


Figura A.15: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el *linker* S4-S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

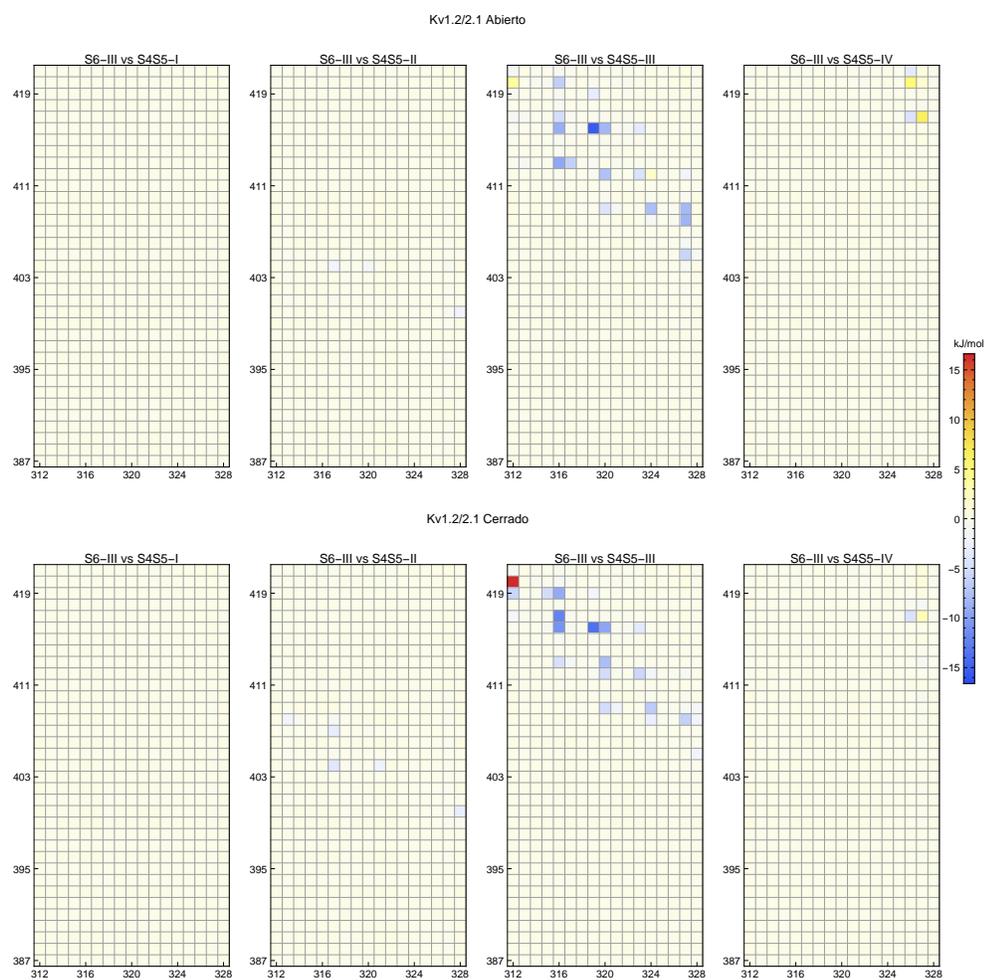


Figura A.16: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el *linker* S4-S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

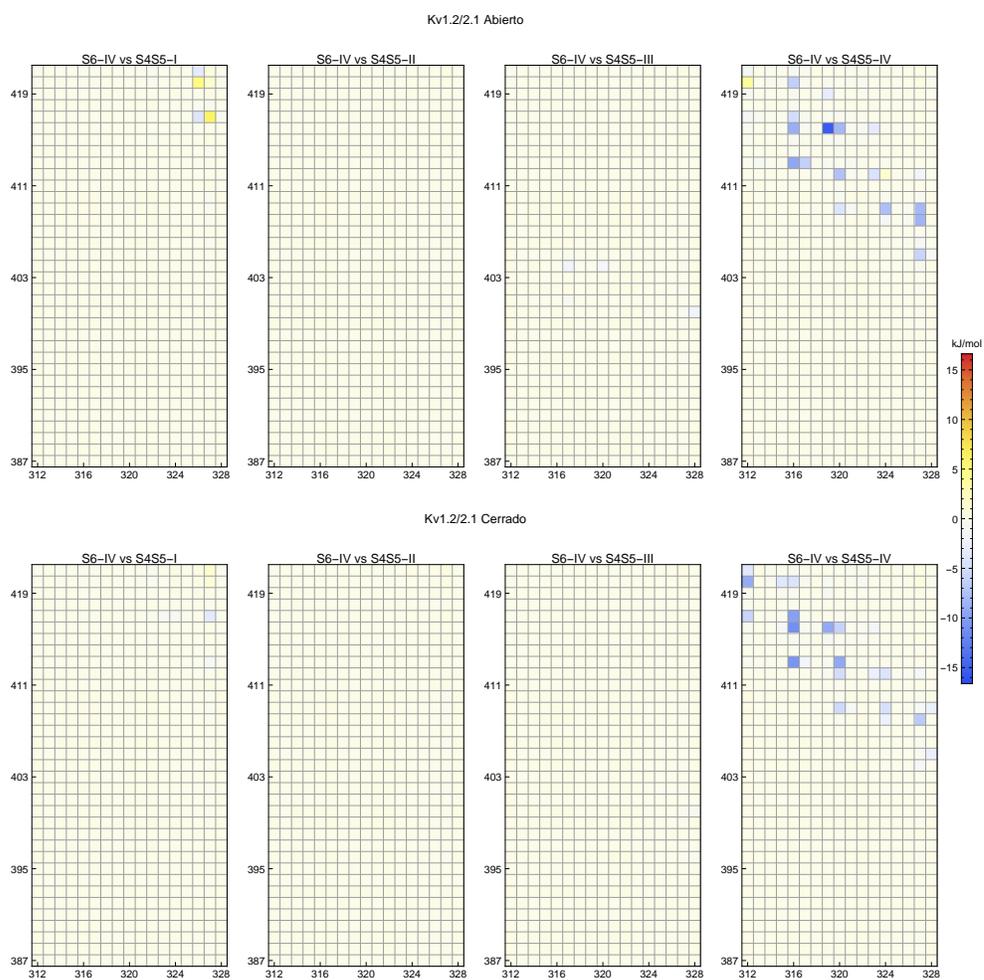


Figura A.17: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el *linker* S4-S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

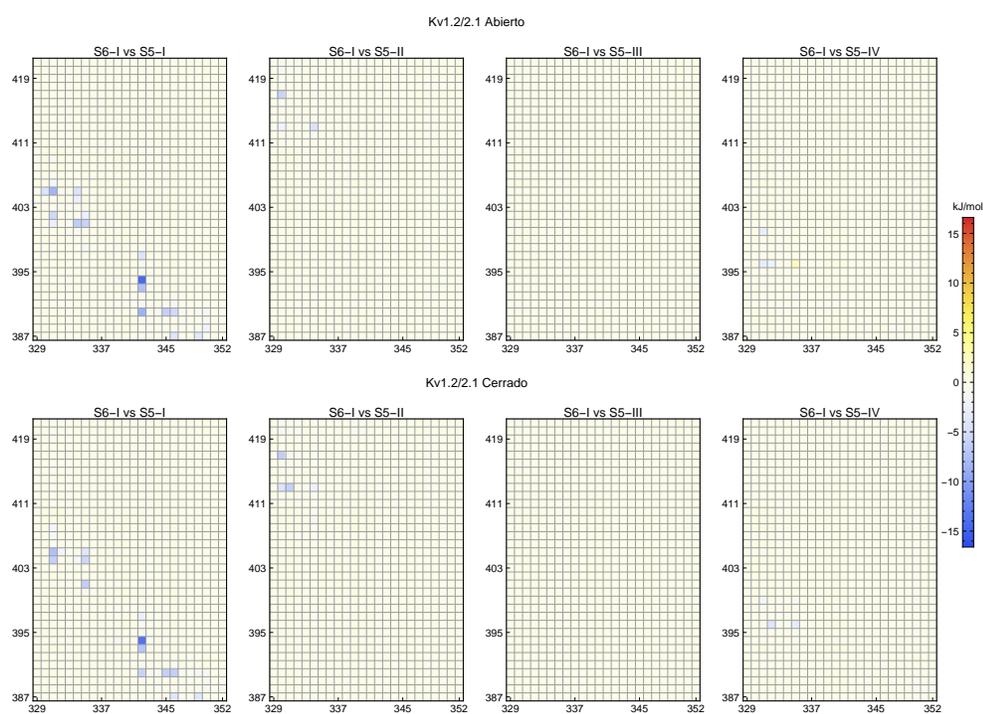


Figura A.18: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del  $S6_I$  contra el  $S5$ .

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

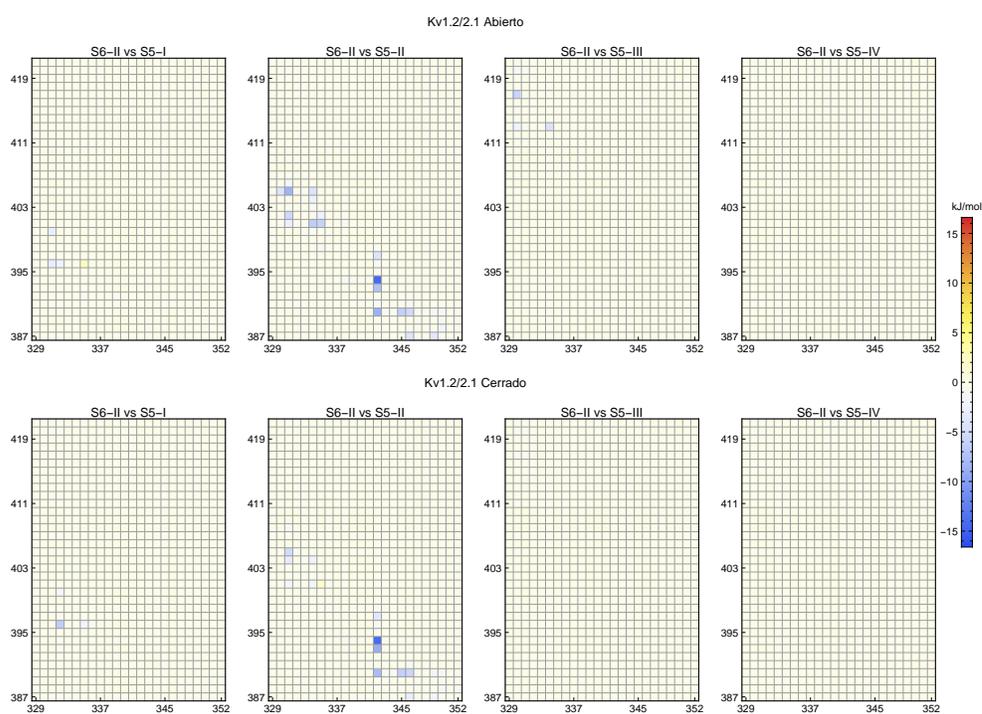


Figura A.19: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

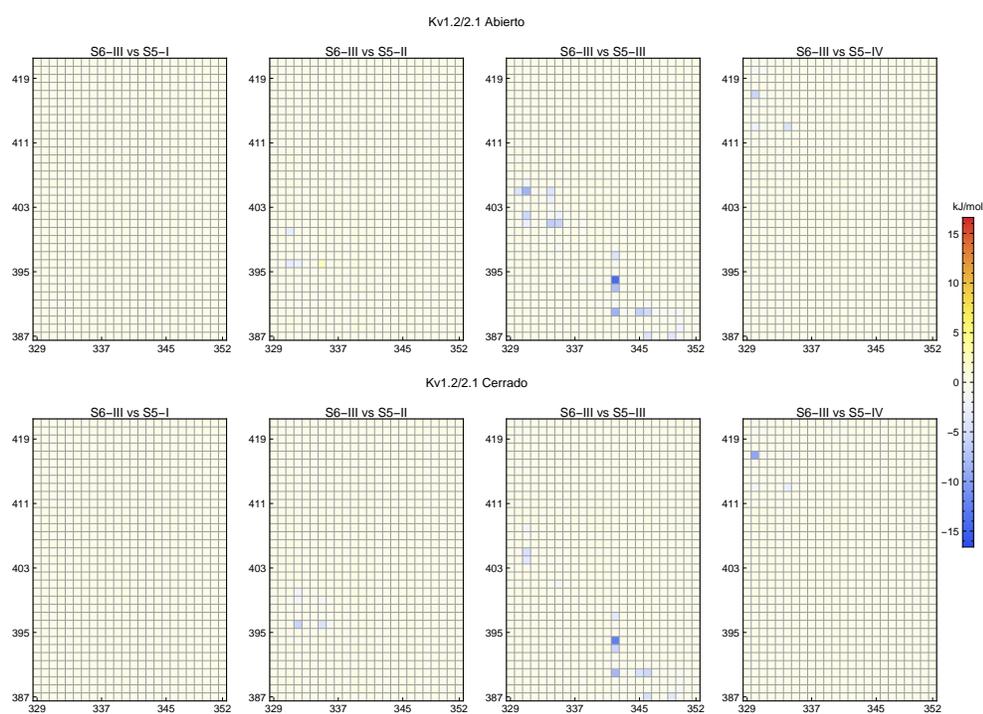


Figura A.20: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

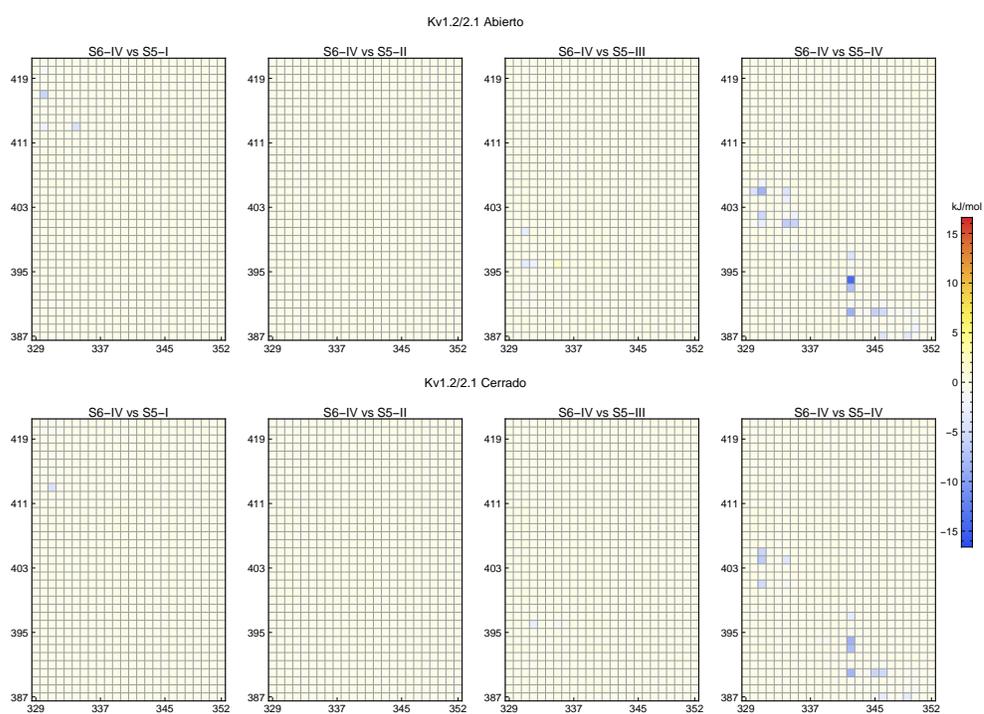


Figura A.21: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

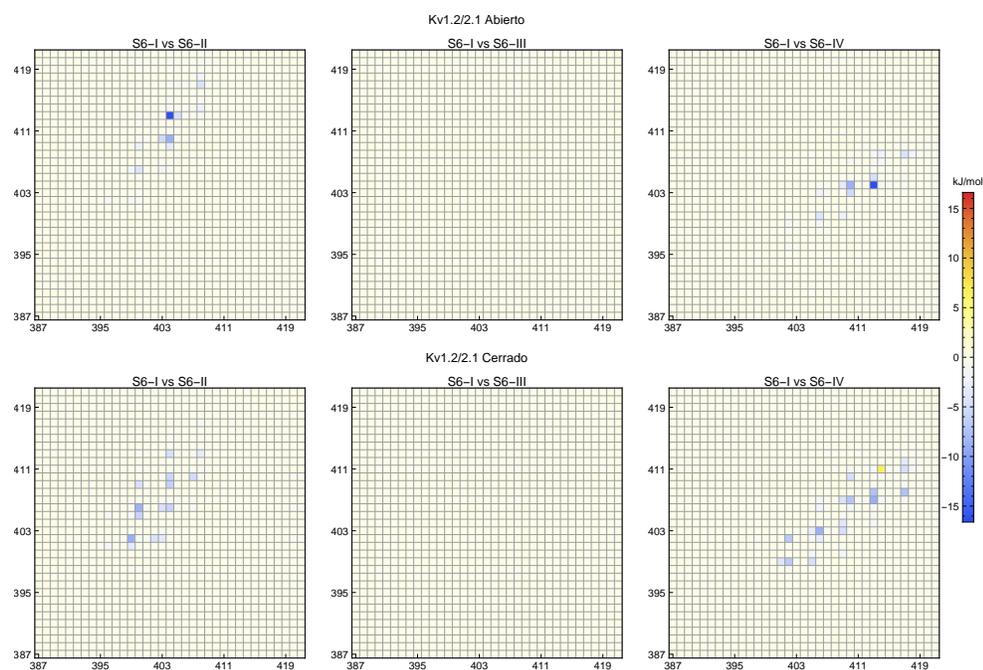


Figura A.22: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el S6.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

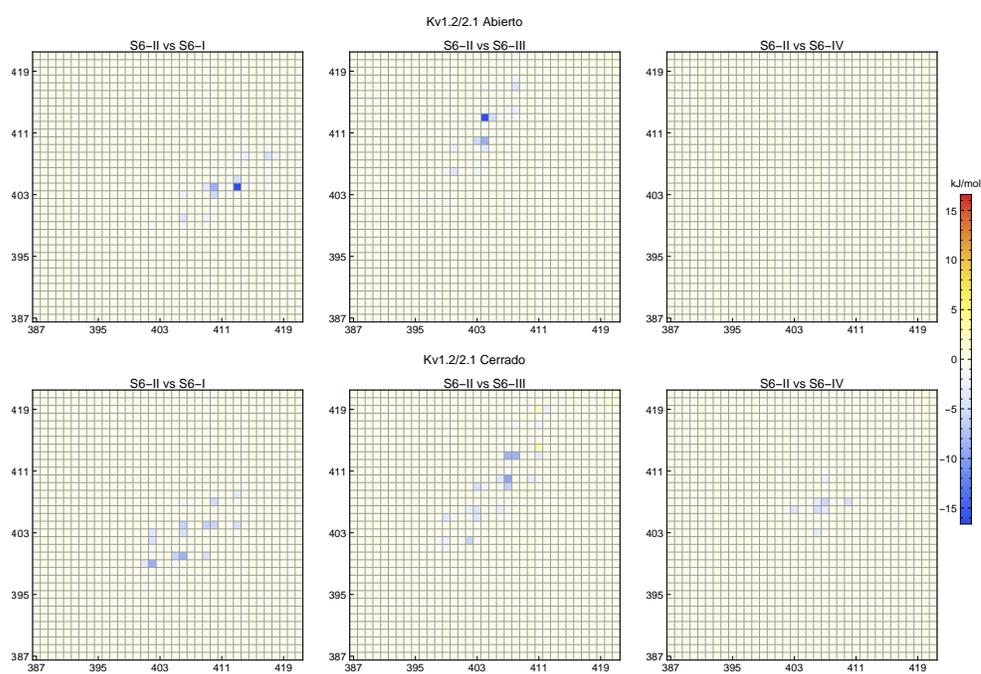


Figura A.23: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S6.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

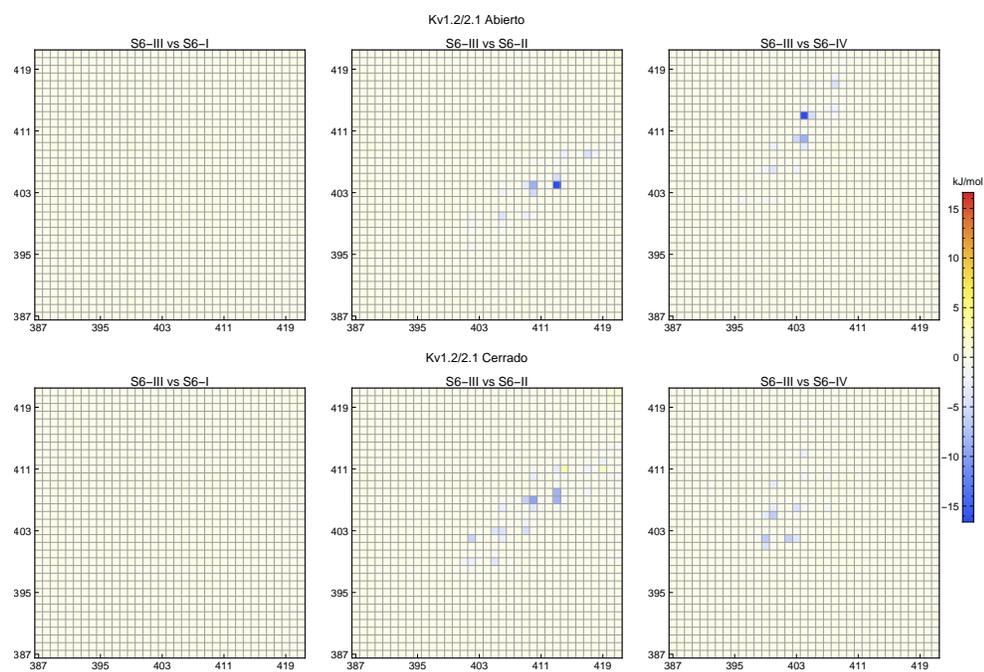


Figura A.24: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S6.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

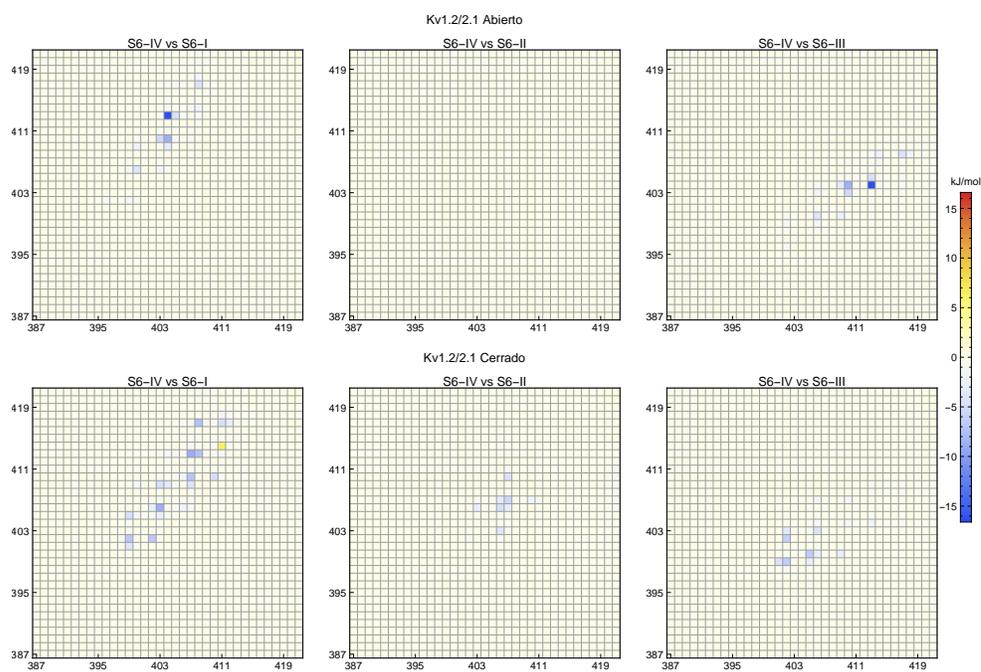


Figura A.25: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el S6.

### A.3.2. El canal Kv1.2

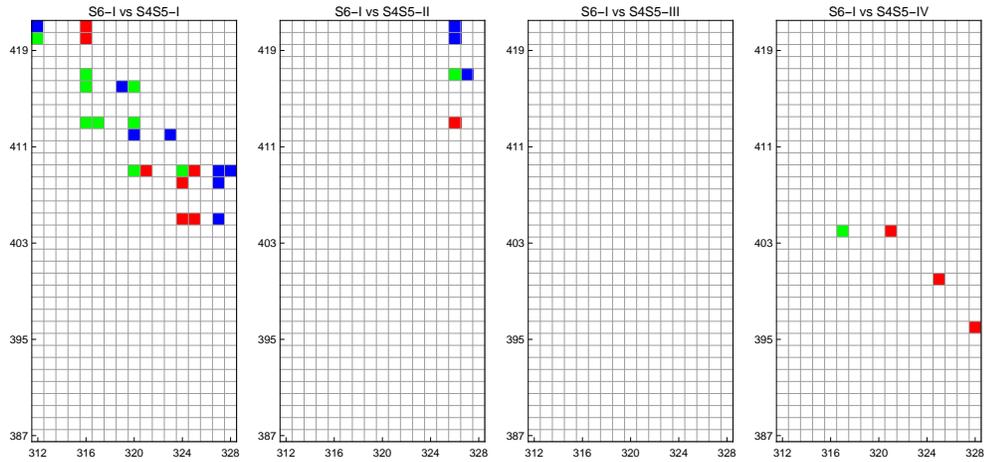


Figura A.26: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el *linker* S4-S5.

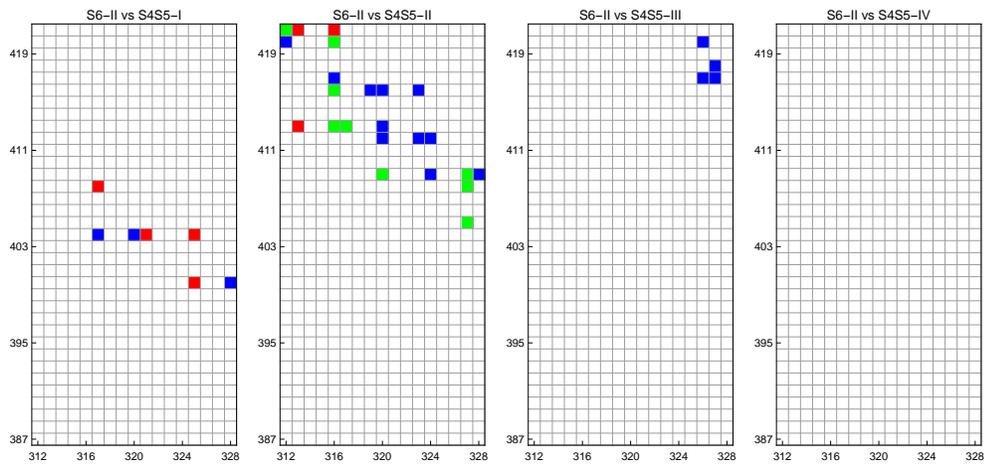


Figura A.27: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el *linker* S4-S5.

A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

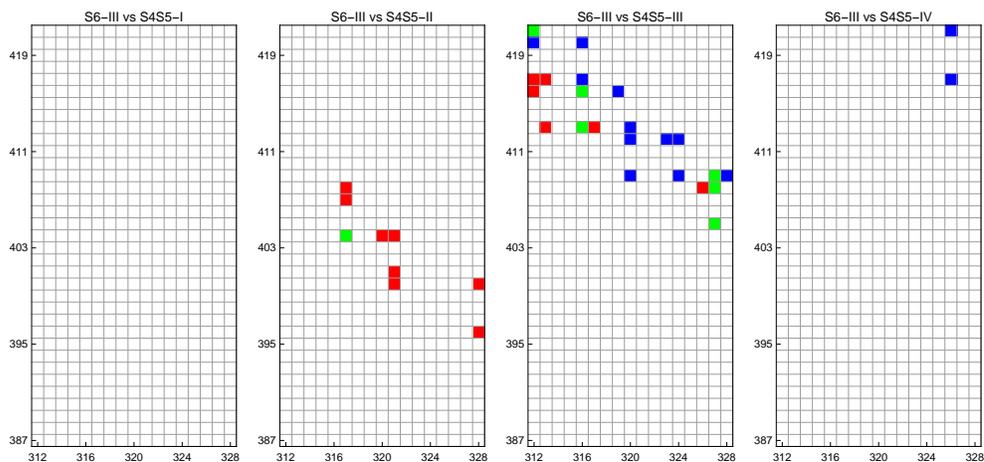


Figura A.28: Mapa de contactos entre pares no ligados S6<sub>III</sub> contra el *linker* S4-S5.

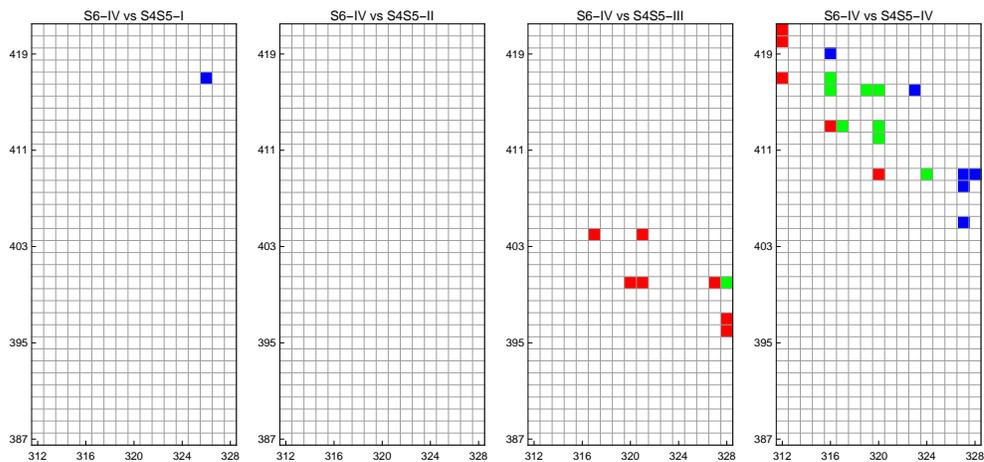


Figura A.29: Mapa de contactos entre pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el *linker* S4-S5.

A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

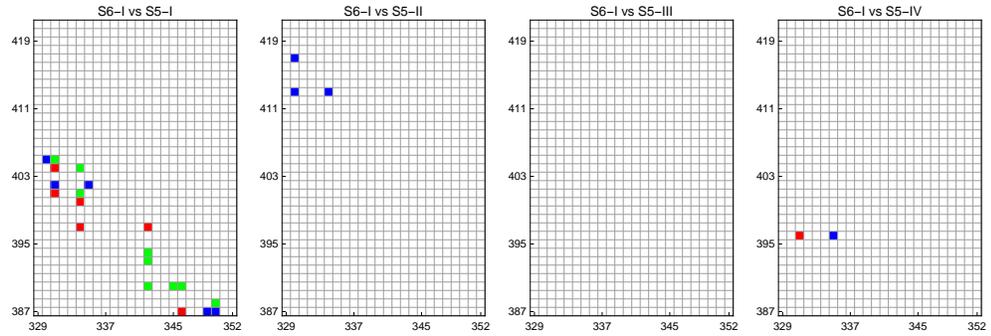


Figura A.30: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_I$  contra el  $S5$ .

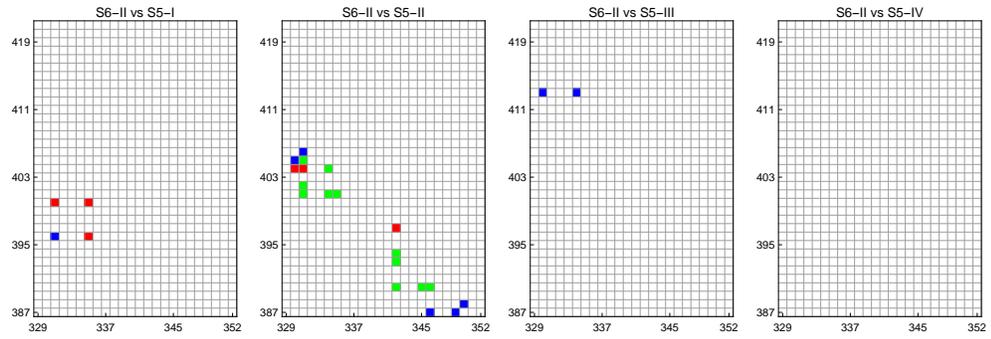


Figura A.31: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{II}$  contra el  $S5$ .

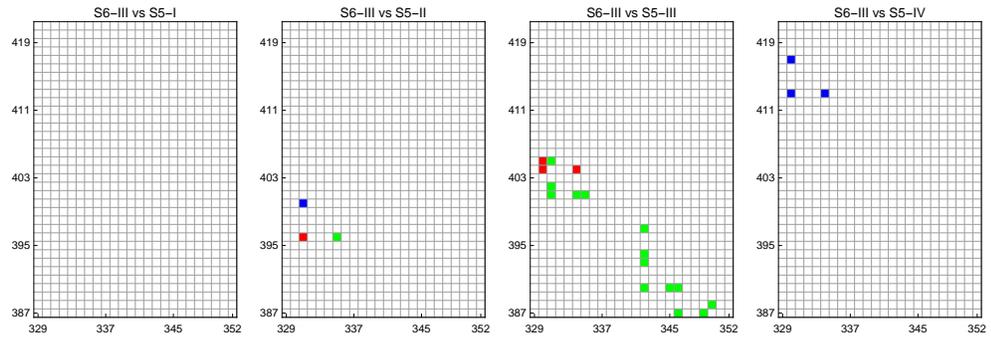


Figura A.32: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{III}$  contra el  $S5$ .

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

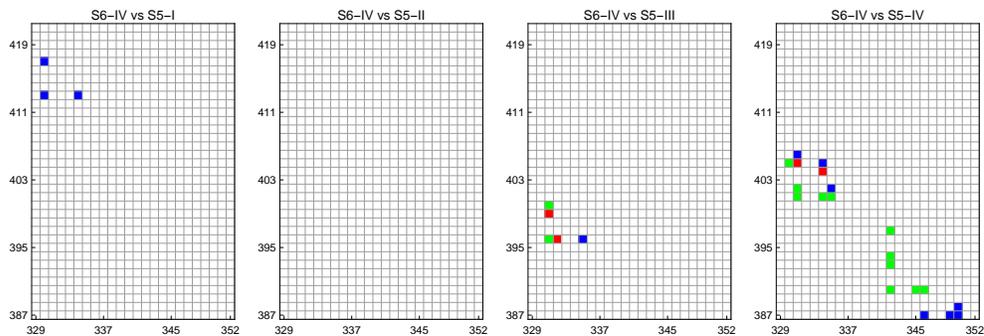


Figura A.33: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{IV}$  contra el  $S5$ .

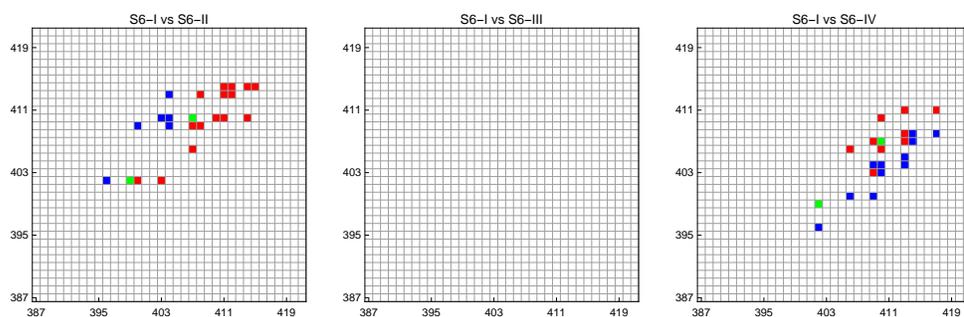


Figura A.34: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_I$  contra el  $S6$ .

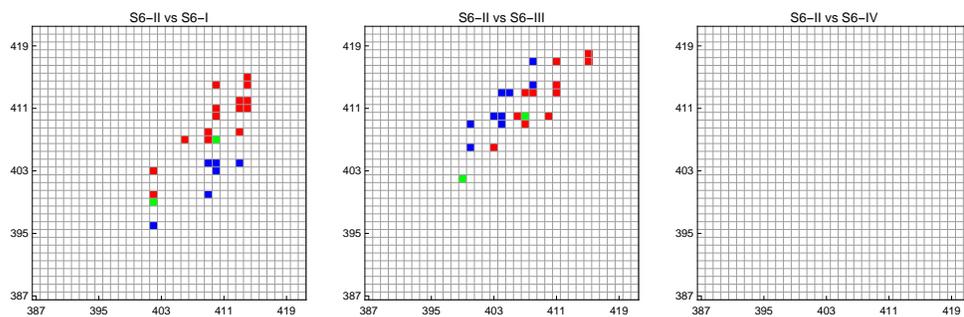


Figura A.35: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{II}$  contra el  $S6$ .

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

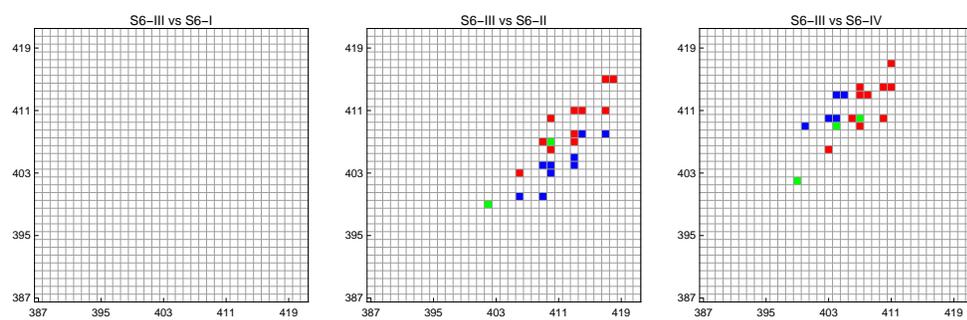


Figura A.36: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{III}$  contra el  $S6$ .

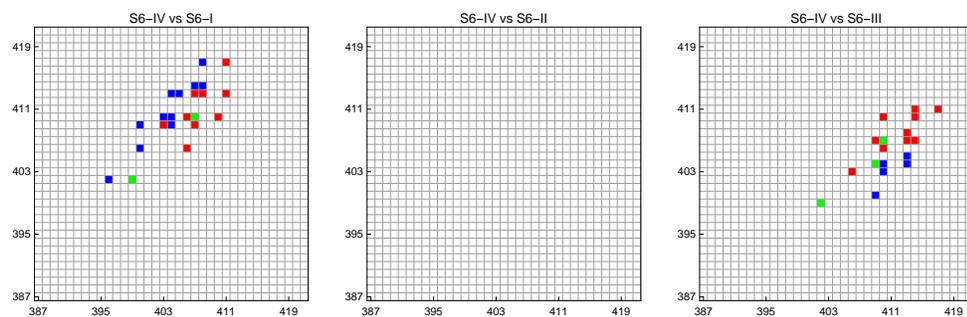


Figura A.37: Mapa de contactos entre pares no ligados del  $S6_{IV}$  contra el  $S6$ .

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

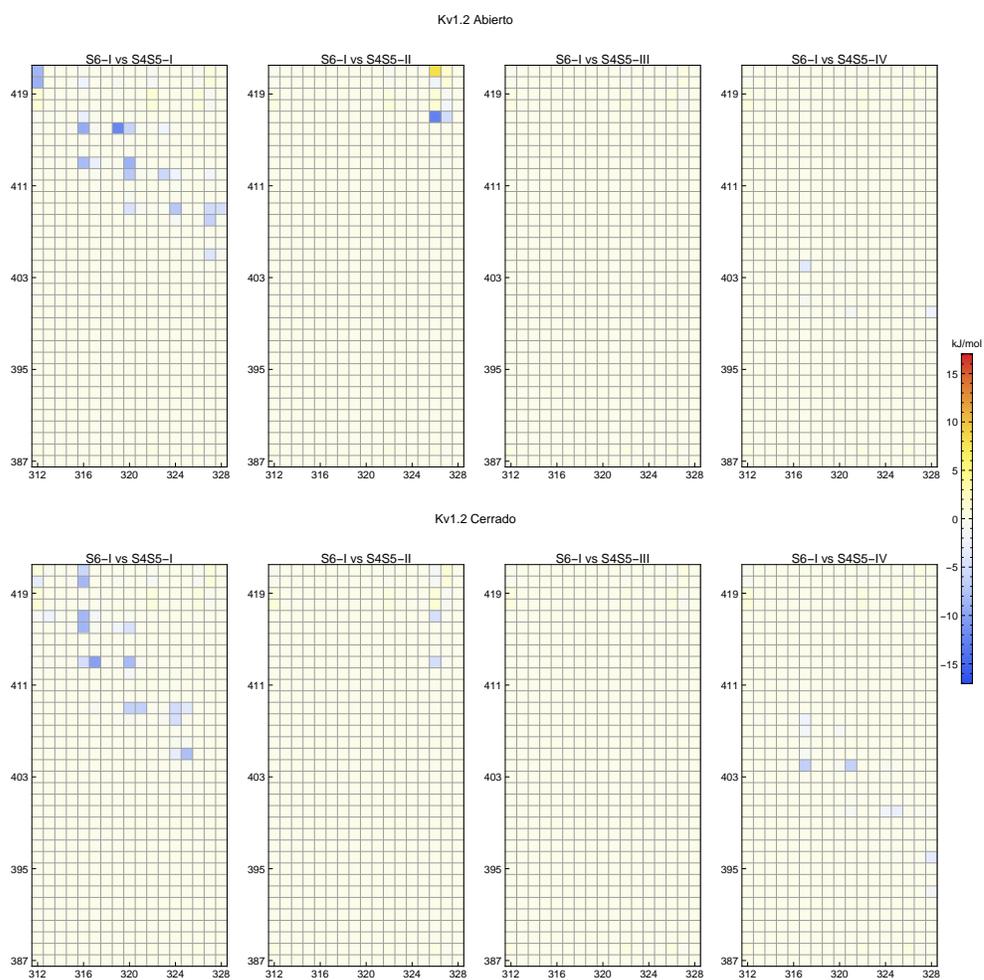


Figura A.38: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el *linker* S4-S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

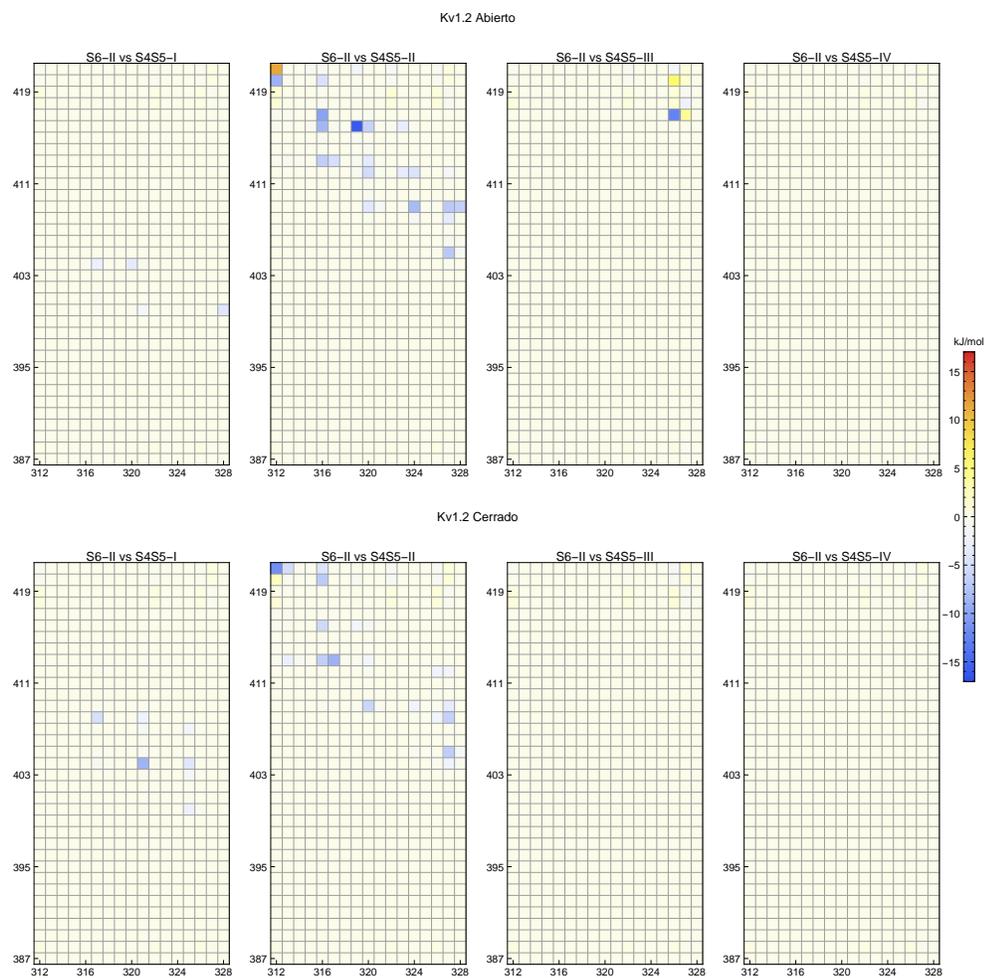


Figura A.39: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el *linker* S4-S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

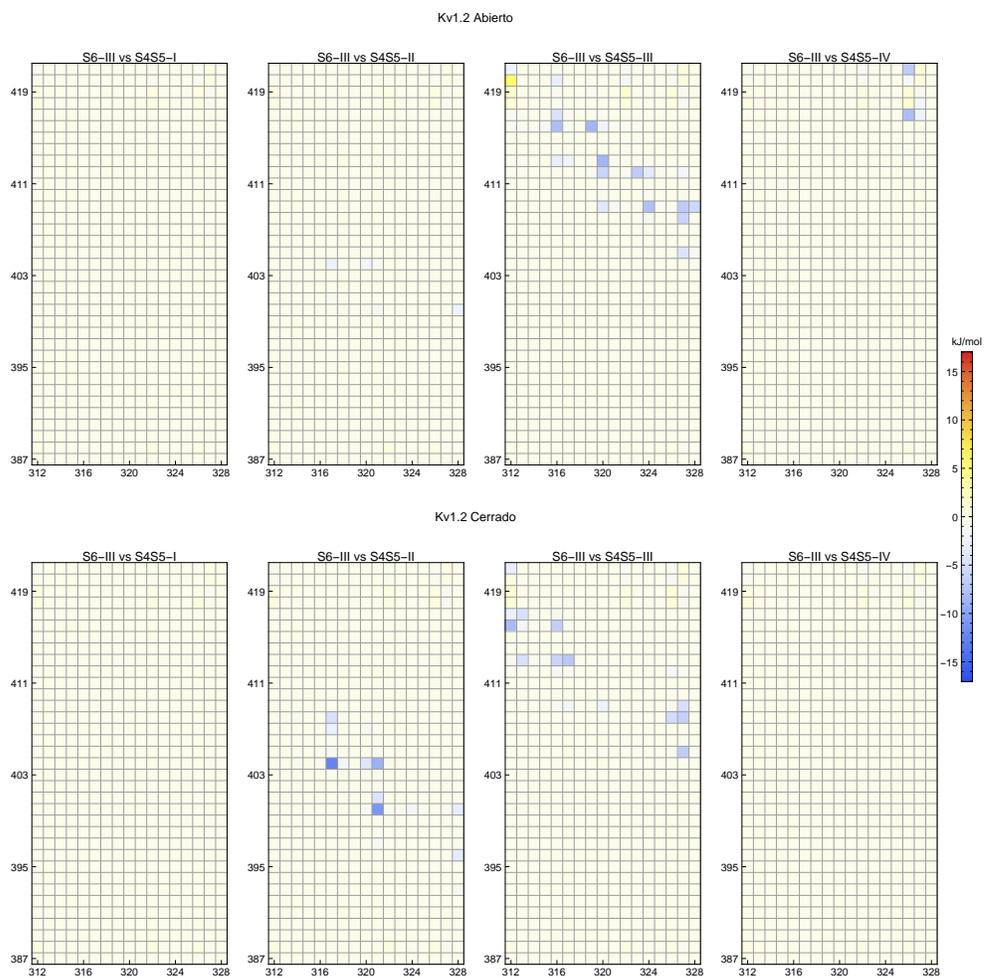


Figura A.40: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el *linker* S4-S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

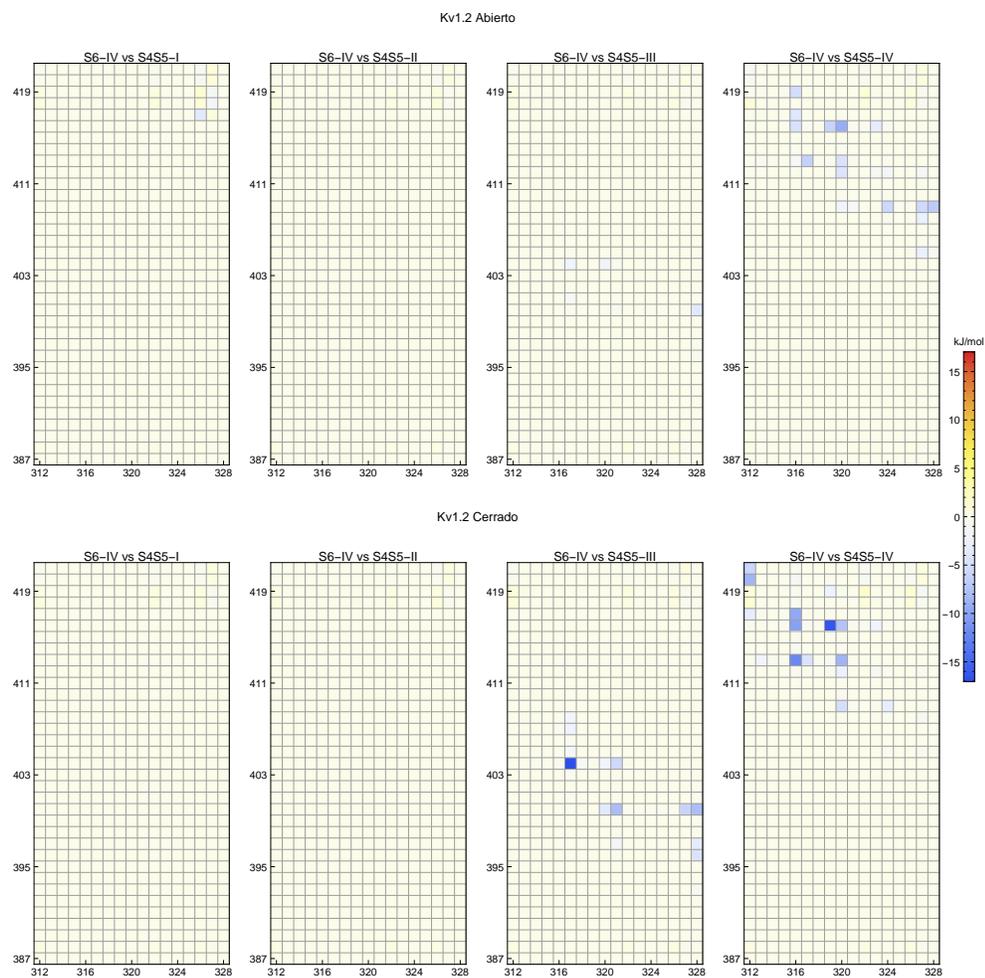


Figura A.41: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el *linker* S4-S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

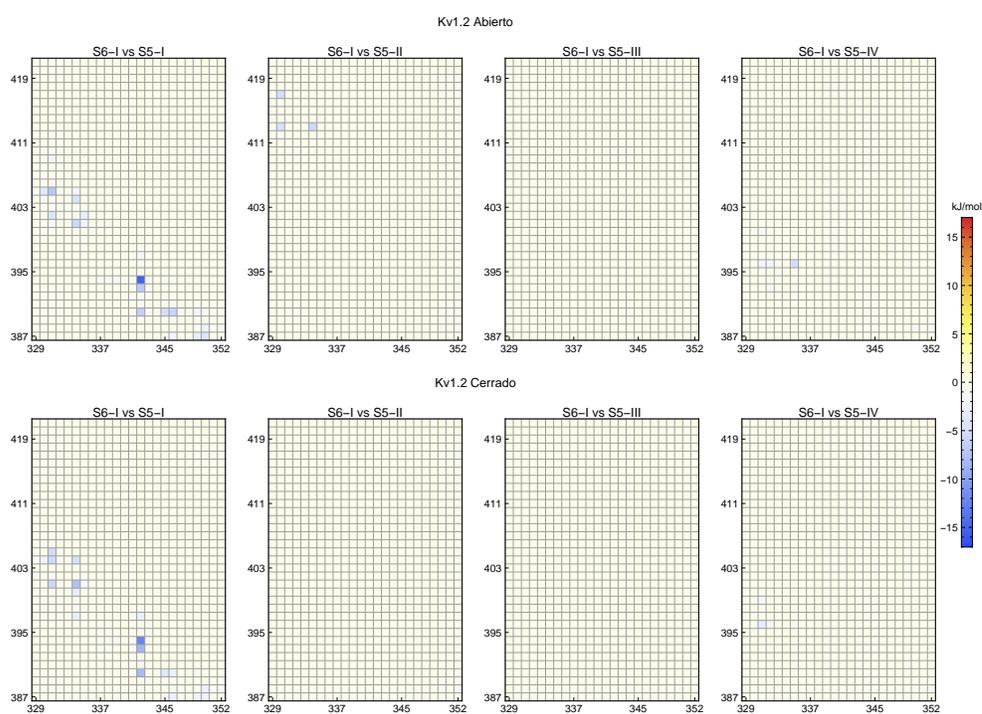


Figura A.42: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

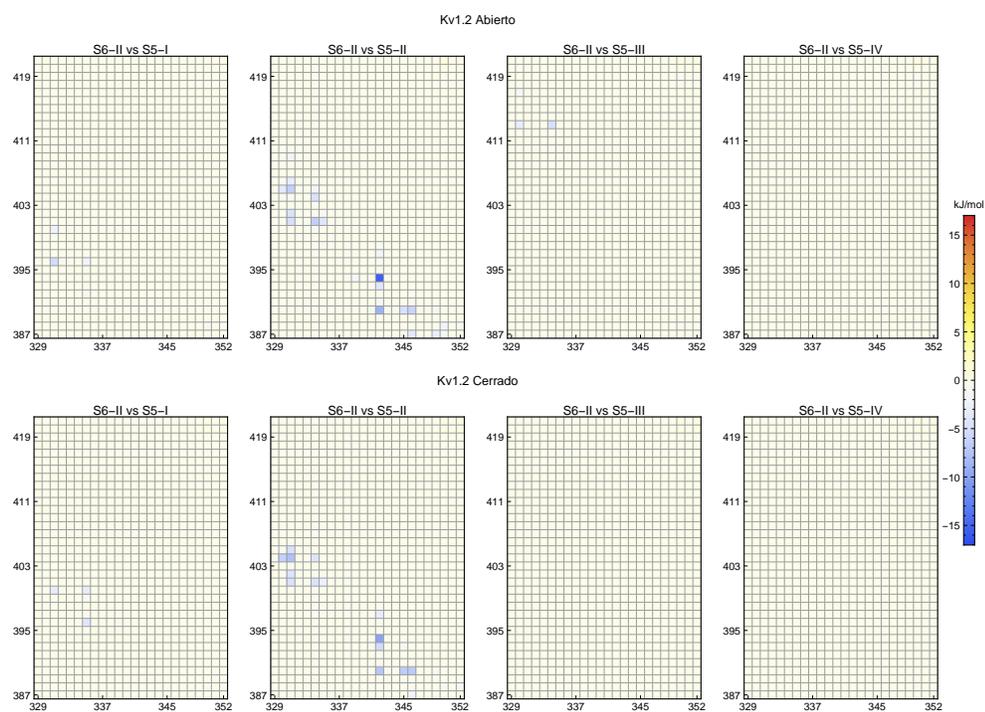


Figura A.43: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S5.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

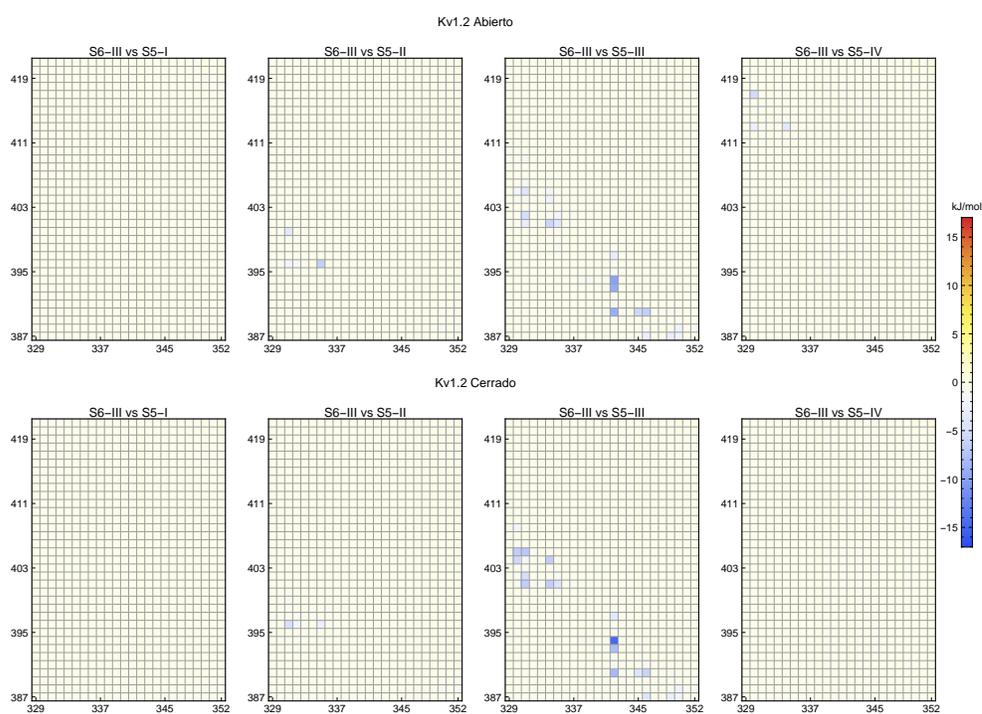


Figura A.44: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S5.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

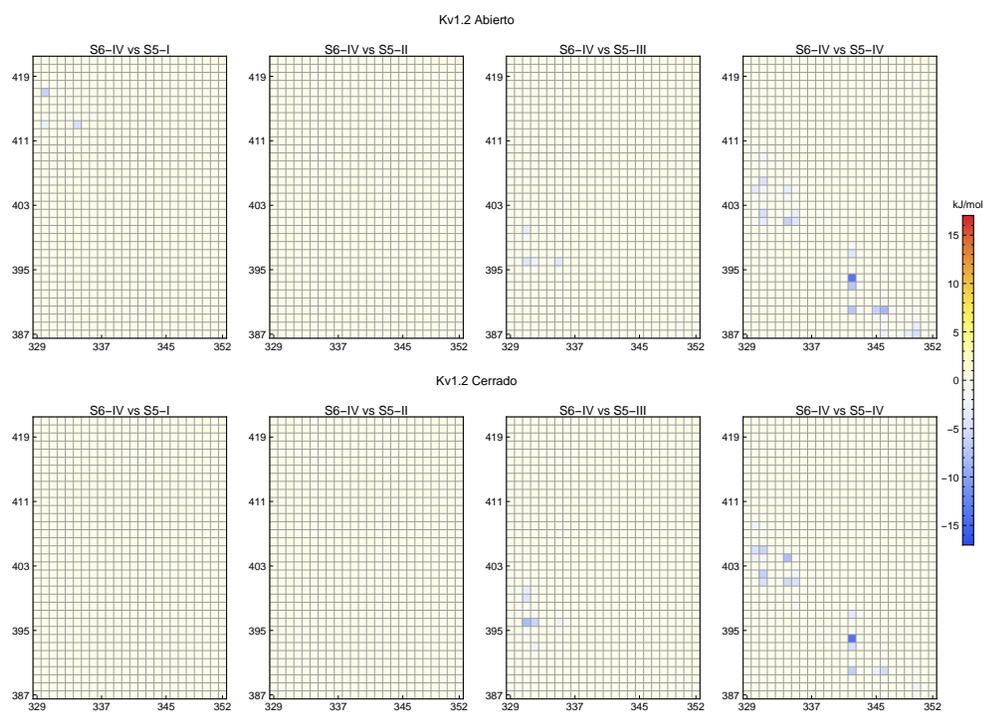


Figura A.45: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del  $S6_{IV}$  contra el  $S5$ .

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

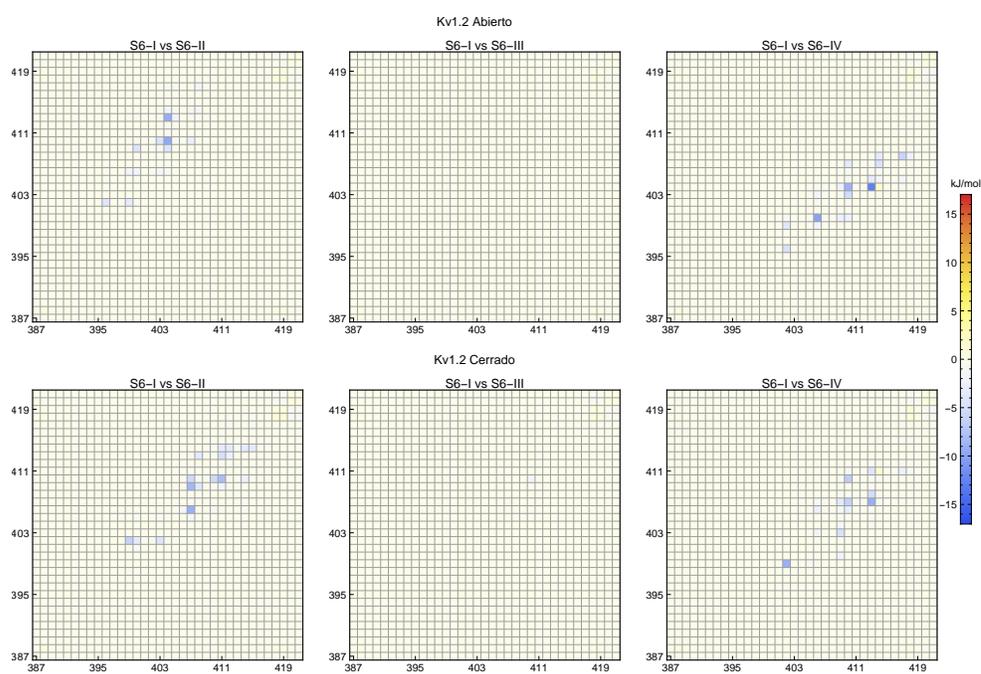


Figura A.46: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>I</sub> contra el S6.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

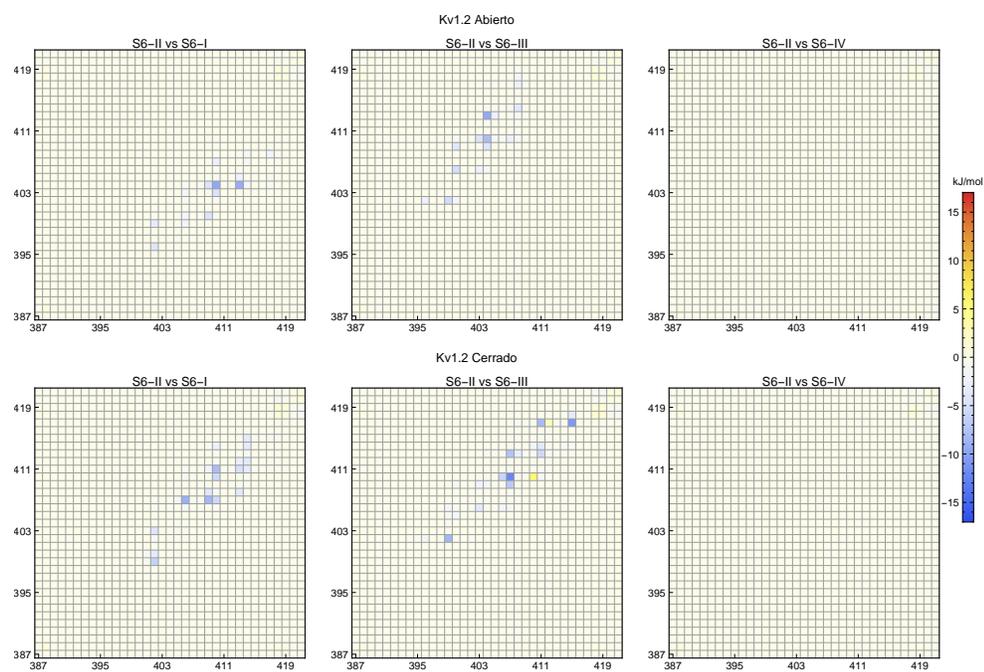


Figura A.47: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>II</sub> contra el S6.

### A.3. Mapas de calor y contacto de los canales Kv1.2/2.1 quimera y Kv1.2

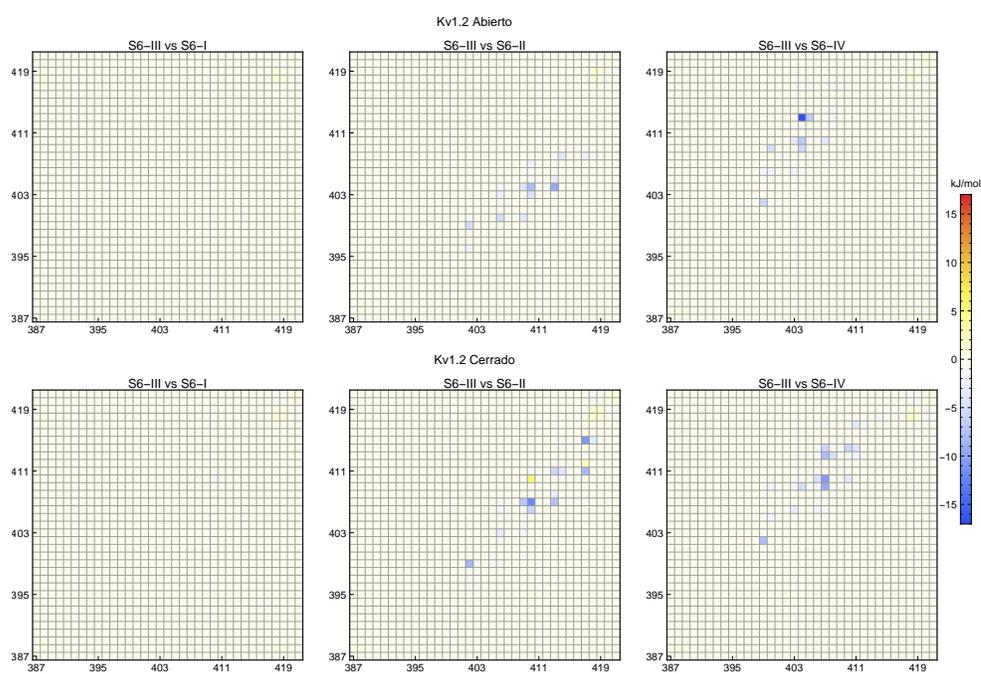


Figura A.48: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>III</sub> contra el S6.

## A. MÉTODOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

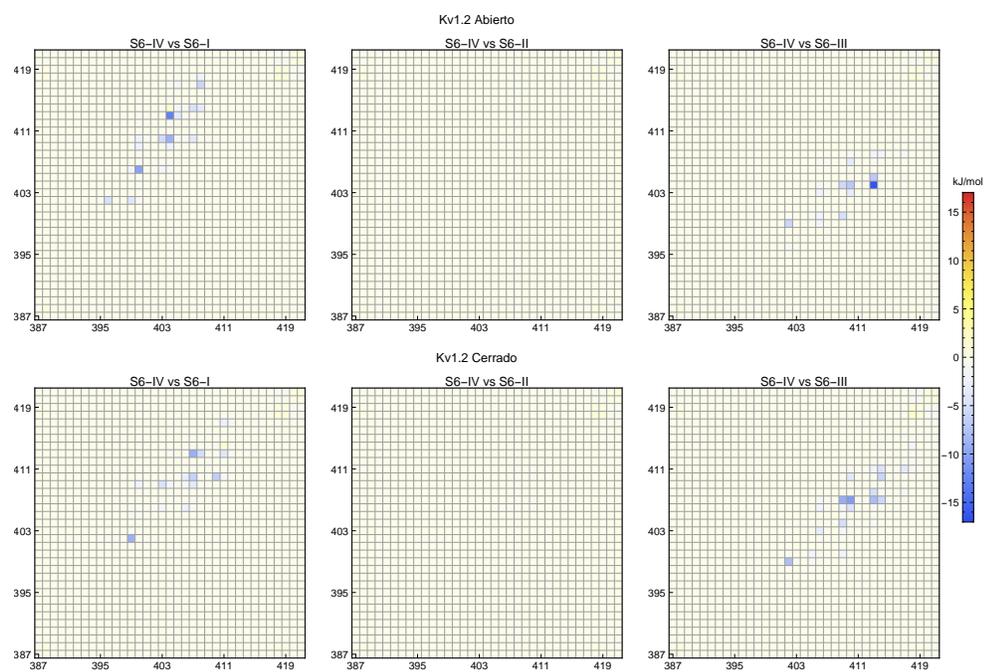


Figura A.49: Mapa de calor de las interacciones de pares no ligados del S6<sub>IV</sub> contra el S6.

# Bibliografía

- [1] I. Adamovic, S. M. Mijailovich, and M. Karplus. The elastic properties of the structurally characterized myosin II S2 subdomain: a molecular dynamics and normal mode analysis. *Biophys. J.*, 94(10):3779–3789, 2008.
- [2] S. K. Aggarwal and R. MacKinnon. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 16(6):1169–1177, 1996.
- [3] W. S. Agnew, S. R. Levinson, J. S. Brabson, and M. A. Raftery. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(6):2606–10, 1978.
- [4] A. A. Alabi, M. I. Bahamonde, H. J. Jung, J. I. Kim, and K. J. Swartz. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature*, 450(7168):370–375, 2007.
- [5] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 5 edition, 2008.
- [6] S. Antman. *Nonlinear Problems of Elasticity*. Applied Mathematical Sciences. Springer, 2006.
- [7] R. Azaria, O. Irit, Y. Ben-Abu, and O. Yifrach. Probing the transition state of the allosteric pathway of the Shaker Kv channel pore by linear free-energy relations. *J. Mol. Biol.*, 403(2):167–173, 2010.
- [8] D. J. Barlow and J. M. Thornton. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.*, 201(3):601–619, 1988.

- [9] Z. Batulan, G. A. Haddad, and R. Blunck. An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.*, 285(18):14005–14019, 2010.
- [10] F. Bezanilla. How membrane proteins sense voltage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(4):323–332, 2008.
- [11] F. Bezanilla. Ion channels: from conductance to structure. *Neuron*, 60(3):456–68, 2008.
- [12] E. Bianconi, A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, F. Frabetti, L. Vitale, M. C. Pelleri, S. Tassani, F. Piva, S. Perez-Amodio, P. Strippoli, and S. Canaider. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6):463–471, 2013. PMID: 23829164.
- [13] R. Blunck and Z. Batulan. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol*, 3:166, 2012.
- [14] B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*, 30(10):1545–1614, 2009.
- [15] E. Cao, M. Liao, Y. Cheng, and D. Julius. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504(7478):113–8, 2013.
- [16] W. A. Catterall. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6):915–928, 2010.
- [17] S. Chakrapani and A. Auerbach. A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(1):87–92, 2005.
- [18] M. L. Chapman and A. M. VanDongen. K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations. *J. Gen. Physiol.*, 126(2):87–103, 2005.

- 
- [19] J. Chen, J. S. Mitcheson, M. Tristani-Firouzi, M. Lin, and M. C. Sanguinetti. The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(20):11277–11282, 2001.
- [20] S. Choe and M. Grabe. Conformational dynamics of the inner pore helix of voltage-gated potassium channels. *J Chem Phys*, 130(21):215103, 2009.
- [21] S. Choe and S. X. Sun. The elasticity of alpha-helices. *J Chem Phys*, 122(24):244912, 2005.
- [22] P. Y. Chou and G. D. Fasman. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 13(2):211–222, 1974.
- [23] F. S. Choveau, N. Rodriguez, F. Abderemane Ali, A. J. Labro, T. Rose, S. Dahimene, H. Boudin, C. Le Henaff, D. Escande, D. J. Snyders, F. Charpentier, J. Merot, I. Baro, and G. Loussouarn. KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain. *J. Biol. Chem.*, 286(1):707–716, 2011.
- [24] S. Chowdhury, B. M. Haehnel, and B. Chanda. Interfacial gating triad is crucial for electromechanical transduction in voltage-activated potassium channels. *J. Gen. Physiol.*, 2014.
- [25] F. S. Cordes, J. N. Bright, and M. S. Sansom. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.*, 323(5):951–960, 2002.
- [26] J. Crank and P. Nicolson. A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type. *Advances in Computational Mathematics*, 6(1):207–226, 1996.
- [27] L. G. Cuello, D. M. Cortes, V. Jogini, A. Sompornpisut, and E. Perozo. A molecular mechanism for proton-dependent gating in KcsA. *FEBS Lett.*, 584(6):1126–1132, 2010.
- [28] N. Decher, J. Chen, and M. C. Sanguinetti. Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J. Biol. Chem.*, 279(14):13859–13865, 2004.

- [29] D. del Camino and G. Yellen. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron*, 32(4):649–656, 2001.
- [30] S. Ding, L. Ingleby, C. A. Ahern, and R. Horn. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J. Gen. Physiol.*, 126(3):213–226, 2005.
- [31] E. J. Doedel, A. R. Champneys, F. Dercole, T. Fairgrieve, Y. Kuznetsov, B. Oldeman, R. Paffenroth, B. Sandstede, X. Wang, and C. Zhang. *AUTO-07P: Continuation and Bifurcation Software for Ordinary Differential Equations*, 2008.
- [32] C. Domene and S. Furini. Chapter 7 - examining ion channel properties using free-energy methods. In M. L. Johnson, G. K. Ackers, and J. M. Holt, editors, *Biothermodynamics, Part B*, volume 466 of *Methods in Enzymology*, pages 155 – 177. Academic Press, 2009.
- [33] D. A. Doyle, J. Morais 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<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360):69–77, 1998.
- [34] E. G. Emberly, R. Mukhopadhyay, N. S. Wingreen, and C. Tang. Flexibility of alpha-helices: results of a statistical analysis of database protein structures. *J. Mol. Biol.*, 327(1):229–237, 2003.
- [35] E. Faure, G. Starek, H. McGuire, S. Berneche, and R. Blunck. A limited 4 radial displacement of the S4-S5 linker is sufficient for internal gate closing in Kv channels. *J. Biol. Chem.*, 287(47):40091–40098, 2012.
- [36] T. Ferrer, J. Rupp, D. R. Piper, and M. Tristani-Firouzi. The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.*, 281(18):12858–12864, 2006.
- [37] A. Fick. On Liquid Difussion. *Philosophical Magazine and Journal of Science*, 10(4):30–39, 1855.
- [38] P. W. Fowler and M. S. Sansom. The pore of voltage-gated potassium ion channels is strained when closed. *Nat Commun*, 4:1872, 2013.
- [39] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. Academic Press. Academic Press, 2002.

- 
- [40] D. G. Gagnon and F. Bezanilla. The contribution of individual subunits to the coupling of the voltage sensor to pore opening in Shaker K channels: effect of ILT mutations in heterotetramers. *J. Gen. Physiol.*, 136(5):555–568, 2010.
- [41] S. Goldstein, L. Price, D. Rosenthal, and M. Pausch. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23):13256–13261, 1996.
- [42] S. A. N. Goldstein, D. A. Bayliss, D. Kim, F. Lesage, L. D. Plant, and S. Rajan. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4):527–540, 2005.
- [43] D. H. Hackos, T. H. Chang, and K. J. Swartz. Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.*, 119(6):521–532, 2002.
- [44] G. Hardy, J. Littlewood, and G. Pólya. *Inequalities*. Cambridge Mathematical Library. Cambridge University Press, 1952.
- [45] L. Heginbotham, T. Abramson, and R. MacKinnon. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science*, 258(5085):1152–1155, 1992.
- [46] L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, and R. MacKinnon. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.*, 66(4):1061–1067, 1994.
- [47] B. Hille. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. a four-barrier model. *The Journal of General Physiology*, 66(5):535–560, 1975.
- [48] B. Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc 2001-07, 3rd edition, 2001.
- [49] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500–44, 1952.
- [50] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*, 116(4):449–72, 1952.

- [51] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*, 116(4):473–96, 1952.
- [52] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*, 116(4):497–506, 1952.
- [53] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, and B. Katz. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*, 116(4):424–48, 1952.
- [54] M. Holmgren, K. S. Shin, and G. Yellen. The activation gate of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron*, 21(3):617–621, 1998.
- [55] T. Hoshi, W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich. Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.*, 103(2):249–278, 1994.
- [56] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33–38, 1996.
- [57] L. D. Islas and F. J. Sigworth. Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J. Gen. Physiol.*, 114(5):723–742, 1999.
- [58] J. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. Intermolecular and Surface Forces. Elsevier Science, 2010.
- [59] J. Ize. *Cálculo de variaciones*. Serie Fenomec. UNAM, Proyecto Universitario de Fenomenos Nolineales y Mecánica, 2002.
- [60] M. Jensen, V. Jogini, D. W. Borhani, A. E. Leffler, R. O. Dror, and D. E. Shaw. Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science*, 336(6078):229–233, 2012.
- [61] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417(6888):523–526, 2002.
- [62] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, 423(6935):33–41, 2003.

- 
- [63] D. Johnston and S. Wu. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. MIT Press, 1995.
- [64] J. E. Jones. On the determination of molecular fields. ii. from the equation of state of a gas. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 106(738):463–477, 1924.
- [65] A. Kamb, J. Tseng-Crank, and M. A. Tanouye. Multiple products of the drosophila shaker gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron*, 1(5):421 – 430, 1988.
- [66] P. A. Karplus. Experimentally observed conformation-dependent geometry and hidden strain in proteins. *Protein Sci.*, 5(7):1406–1420, 1996.
- [67] F. Khalili-Araghi, V. Jogini, V. Yarov-Yarovoy, E. Tajkhorshid, B. Roux, and K. Schulten. Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel. *Biophys. J.*, 98(10):2189–2198, 2010.
- [68] T. Kitaguchi, M. Sukhareva, and K. J. Swartz. Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal. *J. Gen. Physiol.*, 124(4):319–332, 2004.
- [69] A. J. Labro, A. L. Raes, A. Grottesi, D. Van Hoorick, M. S. Sansom, and D. J. Snyders. Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues. *J. Gen. Physiol.*, 132(6):667–680, 2008.
- [70] K. Laidler. *Chemical Kinetics*. Harper & Row, 1987.
- [71] J. L. Ledwell and R. W. Aldrich. Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.*, 113(3):389–414, 1999.
- [72] S. Y. Lee, A. Banerjee, and R. MacKinnon. Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol.*, 7(3):e47, 2009.
- [73] Y. Li-Smerin, D. H. Hackos, and K. J. Swartz. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K+ channel. *Neuron*, 25(2):411–423, 2000.
- [74] M. Liao, E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478):107–112, 2013.

- [75] S. B. Long, E. B. Campbell, and R. Mackinnon. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, 309(5736):897–903, 2005.
- [76] S. B. Long, X. Tao, E. B. Campbell, and R. MacKinnon. Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, 450(7168):376–382, 2007.
- [77] Z. Lu, A. M. Klem, and Y. Ramu. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature*, 413(6858):809–813, 2001.
- [78] Z. Lu, A. M. Klem, and Y. Ramu. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.*, 120(5):663–676, 2002.
- [79] L. J. Ma, I. Ohmert, and V. Vardanyan. Allosteric features of KCNQ1 gating revealed by alanine scanning mutagenesis. *Biophys. J.*, 100(4):885–894, 2011.
- [80] L. M. Mannuzzu and E. Y. Isacoff. Independence and cooperativity in rearrangements of a potassium channel voltage sensor revealed by single subunit fluorescence. *J. Gen. Physiol.*, 115(3):257–268, 2000.
- [81] L. Monticelli and D. P. Tieleman. Force fields for classical molecular dynamics. *Methods Mol. Biol.*, 924:197–213, 2013.
- [82] Y. Murata, H. Iwasaki, M. Sasaki, K. Inaba, and Y. Okamura. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*, 435(7046):1239–1243, 2005.
- [83] Y. Muroi, M. Arcisio-Miranda, S. Chowdhury, and B. Chanda. Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(2):230–237, 2010.
- [84] M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, and S. Numa. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312(5990):121–127, 1984.
- [85] M. Noda, H. Suzuki, S. Numa, and W. Stuhmer. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.*, 259(1):213–216, 1989.

- 
- [86] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikuyotani, T. Hirose, M. Asai, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, and S. Numa. Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*, 301(5897):251–5, 1983.
- [87] Z. Opial. Sur une inégalité. *Annales Polonici Mathematici*, (8):29:32, 1960.
- [88] M. Pathak, L. Kurtz, F. Tombola, and E. Isacoff. The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J. Gen. Physiol.*, 125(1):57–69, 2005.
- [89] M. M. Pathak, V. Yarov-Yarovoy, G. Agarwal, B. Roux, P. Barth, S. Kohout, F. Tombola, and E. Y. Isacoff. Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron*, 56(1):124–140, 2007.
- [90] S. A. Pless, A. P. Niciforovic, J. D. Galpin, J. J. Nunez, H. T. Kurata, and C. A. Ahern. A novel mechanism for fine-tuning open-state stability in a voltage-gated potassium channel. *Nat Commun*, 4:1784, 2013.
- [91] O. Pongs, N. Kecskemethy, R. Muller, I. Krah-Jentgens, A. Baumann, H. H. Kiltz, I. Canal, S. Llamazares, and A. Ferrus. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *EMBO J.*, 7(4):1087–1096, 1988.
- [92] S. Pronk, S. Pall, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, and E. Lindahl. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7):845–854, Apr 2013.
- [93] I. S. Ramsey, M. M. Moran, J. A. Chong, and D. E. Clapham. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, 440(7088):1213–1216, 2006.
- [94] M. Reed and B. Simon. *Methods of Modern Mathematical Physics: Fourier analysis, self-adjointness*. Number v. 2 in Fourier Nanlysis, Self-adjointness. Academic Press, 1975.
- [95] A. Rosenhouse-Dantsker and D. E. Logothetis. New roles for a key glycine and its neighboring residue in potassium channel gating. *Biophys. J.*, 91(8):2860–2873, Oct 2006.

- [96] M. Salton and K. Kim. *Medical Microbiology*, chapter 2. Structure. University of Texas Medical Branch at Galveston, 4th edition, 1996.
- [97] N. E. Schoppa, K. McCormack, M. A. Tanouye, and F. J. Sigworth. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science*, 255(5052):1712–1715, 1992.
- [98] N. E. Schoppa and F. J. Sigworth. Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions. *J. Gen. Physiol.*, 111(2):271–294, 1998.
- [99] N. E. Schoppa and F. J. Sigworth. Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *J. Gen. Physiol.*, 111(2):313–342, 1998.
- [100] E. V. Schow, J. A. Freites, A. Nizkorodov, S. H. White, and D. J. Tobias. Coupling between the voltage-sensing and pore domains in a voltage-gated potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(7):1726–1736, 2012.
- [101] Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. August 2010.
- [102] S. A. Seoh, D. Sigg, D. M. Papazian, and F. Bezanilla. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 16(6):1159–1167, 1996.
- [103] X. M. Shao and D. M. Papazian. S4 mutations alter the single-channel gating kinetics of Shaker K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, 11(2):343–352, 1993.
- [104] D. Sigg. Modeling ion channels: Past, present, and future. *The Journal of general physiology*, 144(1):7–26, 2014.
- [105] J. C. Skou. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23:394–401, 1957.
- [106] J. Smoller. *Shock waves and reaction-diffusion equations*. Grundlehren der mathematischen Wissenschaften. Springer-Verlag, 1983.
- [107] G. J. Soler-Llavina, T. H. Chang, and K. J. Swartz. Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the Shaker K(v) channel. *Neuron*, 52(4):623–634, 2006.

- 
- [108] W. Stillwell. *An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts*. Elsevier Science, 2013.
- [109] L. Stock, C. Souza, and W. Treptow. Structural basis for activation of voltage-gated cation channels. *Biochemistry*, 52(9):1501–1513, 2013.
- [110] M. Sukhareva, D. H. Hackos, and K. J. Swartz. Constitutive activation of the Shaker Kv channel. *J. Gen. Physiol.*, 122(5):541–556, 2003.
- [111] B. L. Tempel, D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*, 237(4816):770–775, 1987.
- [112] S. Timoshenko and J. Goodier. *Theory of elasticity*. McGraw-Hill classic textbook reissue series. McGraw-Hill, 1969.
- [113] J. Tombran-Tink and C. J. Barnstable, editors. *Visual transduction and non-visual light perception*. Humana Press, 2008.
- [114] M. Tristani-Firouzi, J. Chen, and M. C. Sanguinetti. Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.*, 277(21):18994–19000, 2002.
- [115] E. Vargas, V. Yarov-Yarovoy, F. Khalili-Araghi, W. A. Catterall, M. L. Klein, M. Tarek, E. Lindahl, K. Schulten, E. Perozo, F. Bezanilla, and B. Roux. An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *The Journal of General Physiology*, 140(6):587–594, 2012.
- [116] G. Vriend. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph*, 8(1):52–56, Mar 1990.
- [117] S. Wall-Lacelle, M. I. Hossain, R. Sauve, R. Blunck, and L. Parent. Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)<sub>2</sub>.3 calcium channel. *J. Biol. Chem.*, 286(31):27197–27205, 2011.
- [118] S. M. Webster, D. Del Camino, J. P. Dekker, and G. Yellen. Intracellular gate opening in Shaker K<sup>+</sup> channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature*, 428(6985):864–868, 2004.
- [119] E. Whittaker and G. Watson. *A Course of Modern Analysis*. Cambridge Mathematical Library. Cambridge University Press, 1996.

- [120] Wolfram Research, Inc. Mathematica, Version 9.0, 2012.
- [121] J. Yang, P. T. Ellinor, W. A. Sather, J. F. Zhang, and R. W. Tsien. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*, 366(6451):158–161, 1993.
- [122] W. Y. Yang and M. Gruebele. Folding at the speed limit. *Nature*, 423(6936):193–197, 2003.
- [123] V. Yarov-Yarovoy, D. Baker, and W. A. Catterall. Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(19):7292–7297, 2006.
- [124] O. Yifrach and R. MacKinnon. Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel. *Cell*, 111(2):231–239, 2002.
- [125] N. Zandany, M. Ovadia, I. Orr, and O. Yifrach. Direct analysis of cooperativity in multisubunit allosteric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(33):11697–11702, 2008.
- [126] J. Zheng and F. J. Sigworth. Intermediate conductances during deactivation of heteromultimeric Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.*, 112(4):457–474, 1998.