



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Exploración de las características estructurales de la interacción entre inhibidores peptídicos y el canal hEAG1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Juan Manuel Hernández Meza

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ramón Garduño Juárez  
[Instituto de Ciencias Físicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Rudiño Piñera  
[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Arturo Picones Medina  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Cuernavaca, Mor., Abril, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*“All we can do, Scully, is pull the thread, see what it unravels”  
-Fox Mulder, The X-Files.*

## Dedicatoria

---

---

Esta tesis está dedicada a mis padres por seguir apoyándome después de tantos años. Entré a este posgrado con la esperanza de aprender a utilizar herramientas computacionales para entender la estructura de las proteínas, en aquel tiempo garabatos del libro “Lehninger Principios de bioquímica”. Estoy satisfecho de lo que he aprendido en dos años y ansioso de lo que he de aprender.

## Agradecimientos

---

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría (CVU 844052).

Al proyecto asociado de la Dirección General de Cómputo y Tecnologías de la Información LANCAD-UNAM-DGTIC-033 para el uso de la Supercomputadora HP *Cluster Platform 3000SL* (MIZTLI). Asimismo, agradezco al proyecto IN110119 del PAPIIT-UNAM.

Agradezco a mis amigos, en especial a Axel Donjuan y Mario Omar por estar ahí apoyando cuando trastabillé y me llené de inseguridades. Agradezco a mi novia por demostrar que es posible aguantarme con fines de semana incluidos. Agradezco al Dr. Ramón Garduño, al Dr. Sergio Mares por su invaluable experiencia en el modelado por homología y acoplado molecular y al Dr. Arturo Picones por confiarme este proyecto tan entretenido y estar ahí para darme sus opiniones y correcciones. Finalmente, agradezco a todo aquel que me ha escuchado, o leído este trabajo aportando correcciones y sus puntos de vista como es el Dr. Roberto Carlos Muñoz.

## Glosario de abreviaciones

---

---

CaM: Calmodulina

CG: *Coarse Grain force field*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

CNBHD: *Cyclic nucleotide-binding homology domain*

EAG: *ether-à-go-go*

$EC_{50}$ : La mitad de la concentración efectiva máxima o *half maximal effective concentration*

ELK: *EAG-like channels*

ERG: *EAG-related gene*

FG: *Fine Grain force field*

$IC_{50}$ : La mitad de la concentración inhibitoria máxima o *half maximal inhibitory concentration*

$K_V$ : Canales de potasio activados por voltaje

$Na_V$ : Canales de sodio activados por voltaje

$n_{Hill}$ : Coeficiente de Hill

NIH3T3: línea celular de fibroblastos de embrión de ratón *Swiss*

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*

PAS domain: Per-Arnt-Sim domain

PDB: *Protein Data Bank*

POPC: *1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocoline*

SCID: *Severe combined immunodeficient mice*

SF1: *Selectivity Filter first site*

VSD: *Voltage Sensor Domain*

RMSD: *Root mean square deviation*

# Tabla de contenido

---

---

Dedicatoria .....	3
Agradecimientos .....	4
Glosario de abreviaciones .....	5
Tabla de contenido .....	6
Resumen .....	8
Introducción.....	9
<b>1. Canales iónicos</b> .....	9
<b>1.1. Canales de potasio activados por voltaje</b> .....	10
<b>1.1.1. Canales de potasio activados por voltaje EAG</b> .....	12
<b>1.1.1.1. Dominio PAS</b> .....	14
<b>1.1.1.2. Dominio cNBHD</b> .....	15
1.2. Estructura del canal rEAG1 $\Delta$ de Rattus norvegicus .....	16
1.3. Fisiología de los canales EAG y su relación con el cáncer.....	17
1.4. Cáncer, la diversificación progresiva a partir de un linaje celular .....	18
Antecedentes.....	20
<b>2. Inhibición de los canales iónicos activados por voltaje</b> .....	20
2.1.1. Inhibidores peptídicos bloqueadores del poro .....	20
2.1.2. Inhibidores peptídicos modificadores del <i>gating</i> .....	22
<b>2.2. Inhibición de los canales EAG1</b> .....	26
2.2.1. Anticuerpo modificador del <i>gating EAG</i> .....	26
2.2.2. Inhibición de los canales EAG1 por toxinas peptídicas.....	27
2.2.2.1. $\kappa$ -hefutoxina 1 ( $\kappa$ -KTx 1.1) .....	27
2.2.2.2. APETx4 .....	28
2.2.2.3. Aa1a y Ap1a .....	29
<b>3. Predicción de la estructura de una proteína</b> .....	29
3.1. Modelado por homología .....	30
3.2. Modelado por hilvanado.....	30
3.3. Modelado <i>ab initio</i> .....	31
<b>4. Dinámica molecular</b> .....	31
4.1. CHARMM36 un campo de fuerza tipo todos los átomos .....	31
4.2. Campos de fuerza de grano grueso .....	32
4.2.1. SIRAH un campo de fuerza de grano grueso .....	33
4.3. Modelado multiescala .....	34
4.3.1. Modelado multiescala para estudiar interacciones ligando-receptor. 34	
Hipótesis .....	35

# Tabla de contenido

---

---

Objetivos .....	36
Metodología.....	37
1. Construcción del modelo molecular del canal de potasio hEAG1.....	37
2. Construcción de los modelos moleculares de los péptidos inhibidores: .....	38
3. Preparación de los modelos seleccionados.....	39
4. Acoplamiento moleculares hEAG1 y toxinas: .....	40
5. Modelado multiescala en paralelo (dinámica molecular) .....	44
6. Análisis de trayectorias (dinámica molecular).....	46
Resultados y discusión.....	48
1. Construcción del modelo molecular del canal hEAG1: .....	48
1.1. Selección del modelo del canal hEAG1 .....	48
2. Construcción de los modelos moleculares de los péptidos inhibidores .....	49
3. Preparación de los modelos seleccionados.....	50
3.1. Minimización .....	50
3.2. Evaluación de la calidad de los modelos y molde por MolProbity .....	51
4. Acoplamiento moleculares hEAG1 y toxinas .....	53
5. Dinámica molecular del sistema con hEAG1 no glicosilado .....	66
5.1. Toxina Ap1a (md1-md2).....	66
6. Dinámica molecular de los sistemas con hEAG1 glicosilado .....	69
6.1. Toxina Ap1a (md1-md2).....	71
6.2. Toxina Ap1a unida en un estado intermediario (md1*-md2*).....	75
6.3. Toxina Aa1a (md1-md2).....	78
6.4. Toxina Aa1a unida en un estado intermediario (md1*-md2*).....	81
7. Cálculo de la energía libre de unión de sistemas no glicosilados.....	84
8. Unificación del modelo de inhibición con el mecanismo de <i>gating</i> .....	86
Conclusiones y perspectivas.....	91
Apéndice .....	92
Referencias .....	112

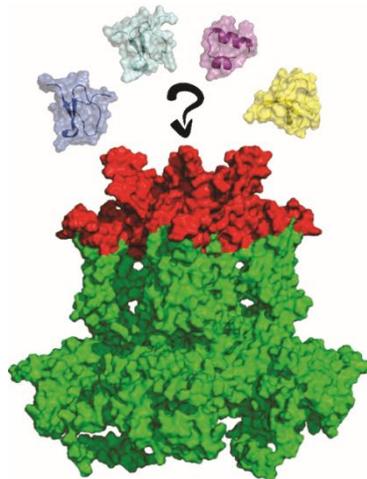
## Resumen

---

---

*Voltage-dependent potassium channels (Kv) promote the  $K^+$  ion efflux at membrane depolarization of excitable cells, this contributes to restoring the resting potential. An unregulated  $K^+$  flux has been associated with several diseases, including cancer. The ether-à-go-go-1 (Eag1, Kv10.1, KCNH1) channel is a member of voltage-dependent potassium channels family and was the first potassium channel associated with oncogenesis and tumor development. The presence of Kv10.1 is only detectable in healthy tissues of the central nervous system while ubiquitously expressed in more than 70% of diverse human tumors. In this work, molecular docking and molecular dynamics allowed exploration of structural characteristics that could be led to inhibition of Kv10.1 by globular proteins, particularly the loop- $\alpha$ -helix-loop that connects transmembrane segments S5-S6.*

Los canales de potasio activados por voltaje (Kv) promueven el flujo de salida de  $K^+$  en la despolarización de la membrana en células excitables, lo que ayuda a restaurar el potencial de membrana en reposo. La desregulación de la señalización de  $K^+$  está asociada con una variedad de enfermedades, incluido el cáncer. El canal ether-à-go-go-1 (Eag1, Kv10.1, KCNH1) es un miembro de la familia de canales de potasio activados por voltaje y fue el primer canal de potasio asociado con la oncogénesis y el desarrollo de tumores. En tejidos sanos, la presencia de Kv10.1 solo es detectable en el sistema nervioso central, en contraste, Kv10.1 está expresado de manera ubicua en más del 70% de los tumores humanos de diverso origen (Hemmerlein et al. 2006; Pardo et al. 2012). En este trabajo se utilizó el acoplamiento molecular y dinámica molecular para explorar las características estructurales que podrían llevar a la inhibición de Kv10.1 por proteínas globulares, en particular resalta el motivo asa- $\alpha$ -hélice-asa que conecta los segmentos transmembranales S5 y S6.



## 1. Canales iónicos

---

Actividades como la captación de sonidos, la señalización del sistema nervioso, la contracción de fibras musculares, la progresión del ciclo celular y la descarga eléctrica de una águila son posibles gracias a la actividad coordinada de macromoléculas llamadas canales iónicos. Un canal iónico es una estructura proteica transmembranal en forma de poro cuyas funciones pueden incluir el establecer un potencial de membrana, dar forma a señales eléctricas, permitir el paso de mensajeros moleculares (iones), control del volumen celular, regulación del flujo neto de iones y fluido a través de células epiteliales (Hille 2001). Los canales iónicos actúan como compuertas, es decir tienen un estado abierto o un estado cerrado y la transición entre dichos estados (o conformaciones) se conoce como *gating*. Un canal en la conformación abierta permite el flujo de iones a través del mismo lo que en consecuencia crea una pequeña corriente eléctrica que tendrá una magnitud constante a un potencial de membrana fijo (si tiene un solo estado de conductancia). Sin embargo, el tiempo que un canal individual permanece abierto es corto y variable (Hille 2001).

Los canales pueden cambiar de conformación (*gating*) en respuesta a un cambio en el potencial de membrana (canales activados por voltaje) o por la unión de un ligando extracelular o intracelular (canales activados por ligando); por el contrario si los canales aparentan tener un *gating* aleatorio se clasifican como independientes de voltaje. El cambio de conformación de un canal puede ser modulado, es decir, sustancias usualmente citosólicas pueden modificar el *gating* ante un mismo estímulo. La transición abierta o cerrada comúnmente ocurre en un lapso menor a 10  $\mu$ s (Ashcroft 2000).

La manera más directa de investigar la función de un canal iónico es registrando la corriente que fluye a través del canal abierto o medir los cambios en el potencial de membrana que el canal produce. La magnitud de las corrientes de canales individuales está determinada por las concentraciones de iones en cada lado de la membrana plasmática, por el potencial eléctrico a través de la membrana y por la facilidad con la que los iones pueden cruzar la membrana (su permeabilidad) (Ashcroft 2000). Usualmente las células tienen potenciales de membrana en reposo en el intervalo de -60 a -100 mV (el interior negativo). Un cambio en el potencial de membrana en reposo a un valor más positivo se conoce como despolarización, la transición de un potencial de membrana más positivo al potencial de reposo se conoce como repolarización, asimismo, cuando el cambio tiene como resultado un potencial más negativo que el de reposo se conoce como hiperpolarización. El potencial eléctrico al cual la corriente cambia de dirección (entrada o salida), es el potencial de equilibrio (Ashcroft 2000).

# Introducción

## 1.1. Canales de potasio activados por voltaje

Aunque existen distintas familias, en general los canales de potasio activados por voltaje ( $K_V$ ) cambian de conformación (*gating*) en respuesta a un cambio en el potencial de membrana y tienen una permeabilidad mayor a iones de potasio ( $K^+$ ) con respecto a cualquier otro ion (Ashcroft 2000). Una despolarización aumenta la probabilidad de producir un cambio conformacional para que los canales estén abiertos, en tal caso, los iones  $K^+$  salen hacia el espacio extracelular (a favor del gradiente electroquímico) y en consecuencia se favorece la repolarización de la membrana. En algunas familias de canales ante una despolarización sostenida ocurre otro cambio conformacional a un estado inactivado del canal que evita la conducción de iones, finalmente la repolarización promueve que el canal regrese a la conformación cerrada, ver Figura 1. Cuando un canal está en la conformación inactivada se mantiene en la misma a pesar de fijar el potencial de membrana en valores más positivos (despolarizaciones).

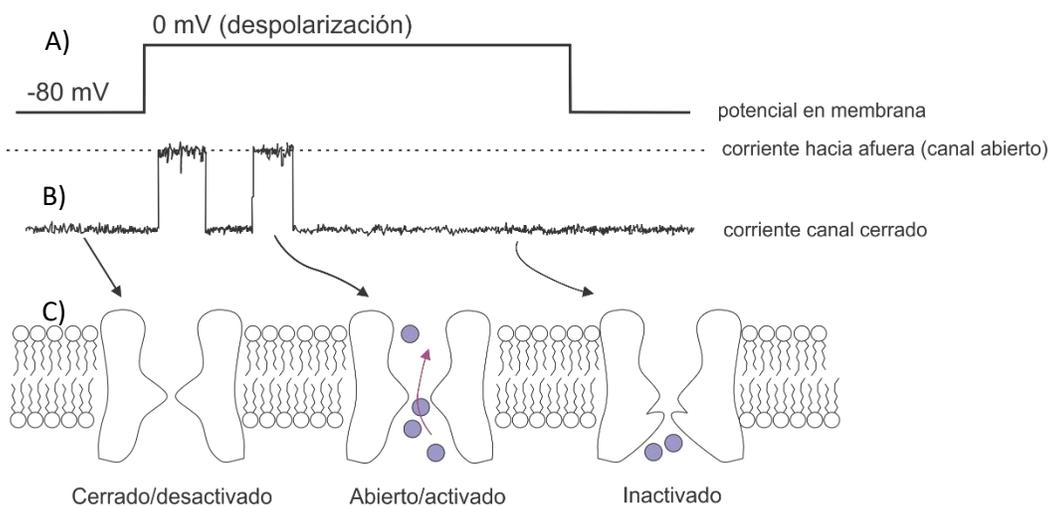


Figura 1. Esquema que representa los cambios conformacionales de un único canal iónico dependiente del potencial de membrana a través del tiempo. A) Potencial en membrana, B) la medición de corriente por electrofisiología, C) esquema distintas conformaciones que puede adoptar un canal. Modificado de Ashcroft (2000).

## Introducción

En general, los canales  $K_V$  son tetrámeros, donde cada monómero contiene seis segmentos transmembranales S1-S6; los segmentos S1-S4 forman el dominio sensor de voltaje o VSD (*Voltage Sensor Domain*) que se mueve en respuesta a cambios en el voltaje de la membrana, en particular, destaca el segmento S4 que contiene múltiples residuos cargados positivamente. En el tetrámero, los VSDs se sitúan alrededor del poro del canal que está constituido por los segmentos S5-S6 (Barros et al. 2019), ver Figura 2.

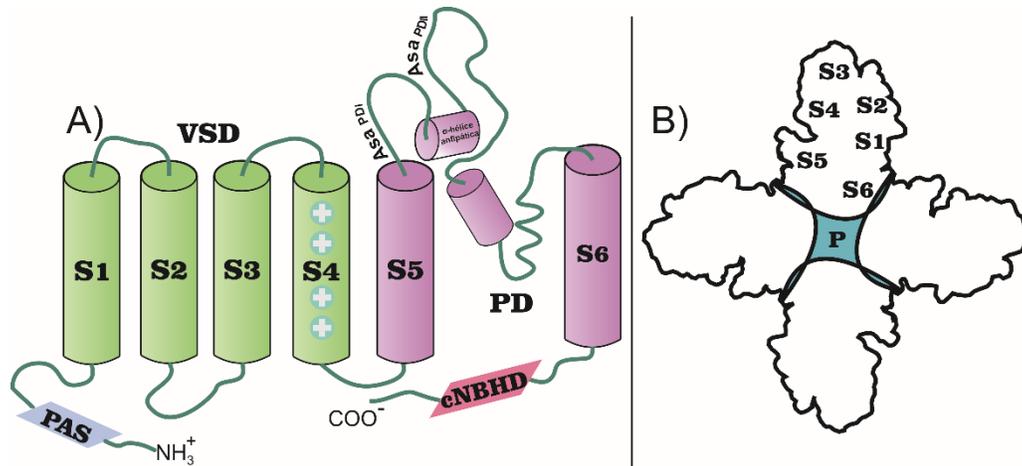


Figura 2. Esquema de la arquitectura de los canales de potasio activados por voltaje de la familia EAG. A) monómero, B) tetrámero visto desde el espacio extracelular. S1-S6 representan los segmentos helicoidales transmembranales del dominio sensor de voltaje o VSD (verde), PD es el dominio formador del poro (morado), PAS es el dominio Per-Arnt-Sim, cNBHD es el homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos y P es la región del poro (azul). Modificado de Bauer y Schwarz (2001).

Para que exista un cambio conformacional dependiente de voltaje, el movimiento del dominio sensor de voltaje (VSD) debe estar acoplado al dominio formador del poro (S5-S6). A partir de las estructuras de algunos canales de potasio como Kv1.2/2.1, de calcio como Cav1.1 y o de sodio NavAb se ha propuesto que el conector de los segmentos transmembranales S4 a S5 actúa de manera mecánica como palanca en S6 para abrir y cerrar el canal cuando la hélice de S4 es impulsada por el campo eléctrico transmembranal (Whicher y MacKinnon 2016). En estos canales el conector S4-S5 es una  $\alpha$ -hélice con su eje central paralelo al plano de la membrana, ver Figura 3. Sin embargo, en la familia de canales EAG se ha demostrado que el conector S4-S5 es corto y no tiene dicha estructura o función (Lorinczi et al. 2015), ver Figura 3, lo que sugiere que para esta familia debe existir al menos un mecanismo alternativo de *gating* (Whicher y MacKinnon 2016).

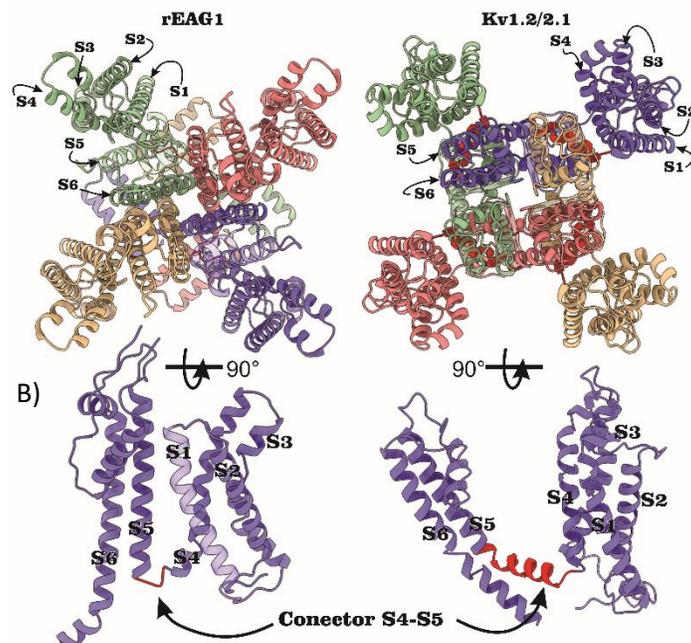


Figura 3. Arquitectura de los canales rEAG1 (5K7L) y Kv1.2-2.1 (2R9R). En (A) se muestra la organización de las cadenas desde una vista extracelular. En (B) se muestra el conector S4-S5 en rojo.

### 1.1.1. Canales de potasio activados por voltaje EAG (ether-à-go-go)

---

En 1969 se describió una mutante espontánea de *Drosophila melanogaster* que presentaba movimiento rápido de sus piernas después de ser expuesta a éter (dietiléter) (Kaplan y Trout 1969), posiblemente con la popularidad del estilo de baile “à go-go” de los años 60, se determinó que aquel fenotipo fuera denominado éter-à-go-go (EAG). Después, se identificó que el fenotipo era el resultado de una mutación en el gen que tenía como producto un canal de potasio dependiente de voltaje al que se le llamó EAG (Warmke, Drysdale, y Ganetzky 1991).

Warmke y Ganetzky propusieron la existencia de la familia de canales de potasio EAG con base en la identidad de secuencia de residuos de aminoácidos en núcleos hidrofóbicos y la presencia en el extremo carboxilo terminal de un segmento homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos o cNBHD (por sus siglas en inglés *Cyclic Nucleotide-Binding Homology Domain*); se estableció que los canales ELK (*EAG-like K<sup>+</sup>*) y ERG (*EAG-related gene*) fueran miembros de la familia EAG (Warmke y Ganetzky 1994); ver Figura 4.

## Introducción

---

---

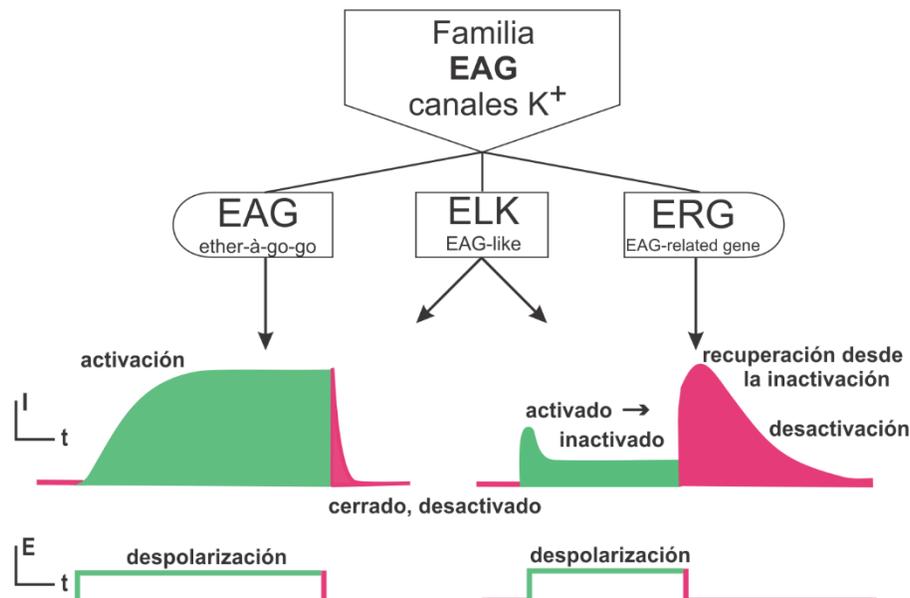


Figura 4. La familia de canales EAG es conformada por tres subfamilias: EAG, ELK, y ERG. Se muestran dibujos esquemáticos de la señal de corriente (de magnitud  $I$ ) mediada por miembros de las subfamilias ante un pulso (de magnitud  $E$ ) que despolariza la membrana a través del tiempo ( $t$ ). De la forma de la señal de corriente se hace evidente que la subfamilia EAG no tiene una inactivación ni desactivación prolongada como ERG y algunos miembros de ELK. Imagen modificada de Bauer y Schwarz (2001).

El dominio cNBHD se encuentra unido al poro a través de un dominio conector-C (*C-linker domain*). Por otra parte, los miembros de esta familia EAG contienen en el extremo amino terminal un dominio EAG característico compuesto de dos subdominios: el dominio Per-Arnt-Sim (PAS) y un dominio capucha-PAS (*PAS-cap*) (Cabral et al. 1998), ver Figura 2.

A partir de un ensayo *Northern blot*, en el cual se utilizó como sonda una región del extremo 3' de ADN codificante a EAG1 humano (hEAG1), se sabe que los canales son expresados de manera basal en el cerebro humano adulto y de manera transitoria en células miogénicas (Occhiodoro et al. 1998). La corriente repolarizante del canal hEAG1 ( $I_{hEAG}$ ) se activa con un potencial mayor a  $-50$  mV y no se inactiva durante una despolarización sostenida (Occhiodoro et al. 1998). Cuando mioblastos humanos proliferantes son transferidos a un medio que promueve la diferenciación, se observa que su potencial de membrana en reposo se hiperpolariza rápidamente debido a la expresión de  $I_{hEAG}$  (es decir hEAG1) lo que coincide con la detención del ciclo celular (Occhiodoro et al. 1998).

## Introducción

---

---

### 1.1.1.1. Dominio PAS

---

La respuesta a cambios en el ambiente como son condiciones de luz, compuestos xenobióticos y cambios en los niveles de oxígeno se debe a múltiples rutas metabólicas dependientes de distintas proteínas de adaptación ambiental. El dominio proteico Per-Arnt-Sim (PAS) está presente en varias proteínas de adaptación ambiental, se propuso con base en un segmento de aproximadamente 275 aminoácidos homólogo en el producto del gen *per* (*period*) de *Drosophila melanogaster*, en el regulador del desarrollo neural *sim* (*single-minded*) en moscas y en un componente de la ruta metabólica de señalización por dioxinas en humano: el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arilo (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) (McIntosh, Hogenesch, y Bradfield 2010). Posteriormente, por análisis de secuencias se identificaron dos regiones de aproximadamente 70 aminoácidos de longitud dentro del dominio PAS que se denominaron PAS A y PAS B. Ambas regiones PAS A y PAS B se presumen homologas entre sí, con una identidad menor al 20% en un análisis de secuencias en ratón, los autores mencionan que dicho análisis suele ser suficiente para clasificar las proteínas de ratón de acuerdo a su función biológica como desarrollo neuronal, vascular o transporte de iones (McIntosh, Hogenesch, y Bradfield 2010). Es necesario aclarar que un alto porcentaje de identidad de secuencia proteica suele ser un criterio suficiente para identificar a un homólogo cercano, no obstante, cuando se trata de una divergencia lejana el porcentaje de identidad es un criterio menos significativo y además se utiliza la estructura terciaria, la similitud de secuencia y la similitud en la función para identificar a un homólogo.

En la proteína *hERG1* (*human EAG-related gene*) si se elimina el dominio PAS, los canales *hERG1* truncados son activos pero muestran una tasa de desactivación más rápida. La reconstitución de la función silvestre a partir de la co-expresión del dominio escindido con el canal truncado indica que el dominio PAS amino-terminal tiene un papel importante en las propiedades de *gating* del canal que logra mediante su asociación con el cuerpo del canal (Cabral et al. 1998). Debido a la alta conservación de los primeros 25 aminoácidos y al efecto que tienen en la desactivación las mutaciones deletéreas en los residuos 2-26 y 2-23, se especuló que los aminoácidos N-terminal estarían en una posición para interactuar con los residuos del conector S4-S5 (Cabral et al. 1998); al resolver la estructura del canal se descubrió que éste no cuenta con un conector S4-S5 helicoidal (Wang y MacKinnon 2017) de tal forma que el mecanismo de asociación entre el dominio PAS y el *gating* permanece elusivo. En concordancia, la eliminación de todo el dominio N-terminal en hEAG1 (residuos 2 – 190) resulta en canales funcionales con activación desplazada hacia voltajes más negativos (75 mV con respecto a la silvestre) y una cinética de desactivación más lenta (Ziechner et al. 2006).

### 1.1.1.2. Dominio cNBHD

---

Los canales de potasio de la familia EAG se encuentran relacionados estructuralmente a los canales de potasio activados por hiperpolarización modulados por nucleótidos cíclicos o HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated*) y a los conmutados por nucleótidos cíclicos o cNG (*cyclic nucleotide gated*) ya que estos contienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos o cNBD (*cyclic nucleotide binding domain*) en su extremo carboxilo terminal. Sin embargo, mediciones de corriente en parches escindidos de membrana que contenían canales mEAG1 (*mouse EAG1*) y hERG1, en configuración “el interior en el exterior” (*inside out*), así como registros electrofisiológicos de corrientes de ovocitos de *Xenopus* que expresaban los canales no revelaron ningún indicio de modulación por nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) (Brelidze, Carlson, y Zagotta 2009). Además, el monitoreo por fluorescencia de la unión de nucleótidos cíclicos reveló que mientras el dominio cNBHD de hERG1 tiene una baja afinidad de unión ( $K_d \geq 51\mu M$ ) no hay unión de los nucleótidos cíclicos con el dominio cNBHD de mEAG1 (Brelidze, Carlson, y Zagotta 2009).

Análisis de estructuras cristalográficas de dominios cNBHD obtenidas de mEAG1 ratón y de zELK de pez cebra revelan que los dominios tienen dos residuos conservados (en mEAG1 Y699 y L701) en la ubicación análoga al sitio de unión de nucleótidos cíclicos en los dominios cNBD, los residuos además establecen una red de interacciones con otros residuos en el bolsillo de unión a ligando (Marques-Carvalho et al. 2012); a este arreglo que se supone característico de la familia EAG se le conoce como conformación auto-ligada (*self-liganded*) y parece tener un papel en la dependencia del voltaje de la activación puesto que la sustitución de los residuos Y672 y L674 de hEAG1 (equivalentes a Y699 y L701 en mEAG1) por alanina desplaza el voltaje de activación ( $V_{0.5}$ ) hacia potenciales de membrana más negativos (Marques-Carvalho et al. 2012). El dominio forma parte de varias proteínas que pertenecen a rutas metabólicas que regulan la respuesta a cambios en el ambiente mediante la unión con moléculas pequeñas tales como oxígeno molecular, metabolitos o hidrocarburos poliaromáticos (McIntosh, Hogenesch, y Bradfield 2010).

### 1.2. Estructura del canal rEAG1Δ de *Rattus norvegicus*

---

Whicher y MacKinnon reportaron en el 2016 la estructura de una mutante del ortólogo de EAG presente en *Rattus norvegicus* (rEAG1Δ), la cual se obtuvo con criomicroscopía electrónica en partícula única con una resolución de 3.78 Å. En el estudio se eliminaron los residuos 773 a 886 de la secuencia en la mutante rEAG1Δ que mostró todas las propiedades de la variante silvestre de 962 aminoácidos, entre las que se encuentra: una corriente no inactivante con  $V_{0.5}$  de  $4.9 \pm 0.6$  mV que contrasta con la silvestre con  $V_{0.5}$  de 10 mV; una cinética de activación sensible a la hiperpolarización e inhibición por calmodulina (CaM). No fue posible resolver las coordenadas de varios residuos de aminoácidos por lo cual el modelo atómico obtenido en presencia de CaM carece de los segmentos comprendidos por los residuos 1-9, 407-411, 697-703 y 723-849. El modelo reveló estructuras no observadas en otros canales  $K_V$  como: una torreta extracelular extendida (~25 Å) que se presume característica de la familia EAG eucarionte, los residuos 391-399 de la torreta forman una hélice  $\alpha$  cuyo eje es paralelo a la membrana e interacciona con la hélice del poro y el lazo peptídico entre el filtro de selectividad y S6. La torreta cuenta con dos sitios de glicosilación en N388 y N406, en concordancia, se observó la densidad electrónica de N-acetil glucosamina en N388 misma que se supone es capaz de rodear la apertura extracelular del poro y prevenir la unión de toxinas inhibitorias (Whicher y MacKinnon 2016).

El análisis del producto de la expresión de hEAG1 en células derivadas de ovario de hámster chino o CHO (*Chinese Hamster Ovary*) transfectadas así como de homogenados de células de tejido cerebral de rata (rEAG1) indican que *in vivo* coexisten dos formas de EAG1 con N-glicosilaciones en N388 y N406; en el mismo trabajo se hace evidente que la asparagina 406 está unida a un oligosacárido complejo involucrado en el tráfico intracelular de la proteína así como en su cinética (la mutante N406Q presentó menor amplitud de corriente y mayor tiempo de activación) (Napp et al. 2005).

Una comparación entre la estructura tridimensional del canal cerrado rEAG1Δ y el canal abierto hERG1 permite proponer diferencias entre ambos estados que serían características en los canales de la familia EAG. Entre las características inferidas de la familia EAG está la falta de un conector S4-S5  $\alpha$ -helicoidal y un mecanismo alternativo de *gating*, puesto que la superposición de ambos estados hace evidente que S4 no se mueve a través de la membrana, además S5 y S6 se mantienen bajo contacto antiparalelo extenso, lo que podría ser indicio de que el mecanismo de cierre de los canales EAG involucra el desplazamiento de S4 hacia el centro del canal, lo que comprime la hélice S5 que a su vez cierra S6 ya que se transmite la fuerza de compresión por la interfaz S5-S6 (Wang y MacKinnon 2017). Un mecanismo alternativo de *gating* sugiere la existencia de interacciones muy características entre esta familia de canales y sus inhibidores modificadores del *gating*.

### 1.3. Fisiología de los canales EAG y su relación con el cáncer

---

El análisis de transcritos sitúa el papel fisiológico normal de EAG1 en células miogénicas y del tejido cerebral (Occhiodoro et al. 1998). En contraste, se ha identificado la expresión ectópica de hEAG1 en más del 70% de muestras de tumores de diverso origen (Pardo et al. 2012; Hemmerlein et al. 2006). En el 2002 se propuso una hipótesis para explicar la función del canal hEAG1 en la proliferación celular con base en el crecimiento de líneas celulares oncogénicas que expresan hEAG1; en el estudio se utilizó el inhibidor no específico imipramina. Las líneas celulares con el potencial de formar tumores, en contraste con líneas celulares relacionadas no oncogénicas, no requieren de grandes concentraciones del ión  $Ca^{2+}$  para proliferar. Las células tumorales tienen una ligera hiperpolarización en la fase G1 del ciclo celular, incluso antes que las líneas celulares relacionadas no oncogénicas, pero su potencial de membrana permanece sin cambios a lo largo del resto del ciclo celular lo que sugiere la expresión de un mecanismo que permite la hiperpolarización inicial aún en bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$ . Así, en un medio abundante en  $Ca^{2+}$ , las corrientes ocasionadas por hEAG1 son expresadas principalmente en la fase G1 del ciclo celular, lo que resulta en una ligera hiperpolarización de las membranas celulares necesaria para avanzar en el ciclo celular. Debido al eflujo del ion  $K^+$  aumenta el flujo de  $Ca^{2+}$  hacia adentro, luego el incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  inhibe hEAG1 y activa los canales de potasio activados por calcio ( $K_{Ca}$ ) lo que permite hiperpolarizar más la membrana celular para avanzar en el ciclo celular (Gavrilova-Ruch et al. 2002).

En contraparte, el tratamiento con el inhibidor no específico astemizol en modelos de ratón SCID disminuyó el crecimiento de tumores inducidos por injertos de células que expresaban EAG1: CHO transfectadas con EAG1 y células de cáncer de mama MDA-MB435S (que no expresan hERG) a una escala comparable con el fármaco citotóxico ciclofosfamida que interfiere con la replicación del ADN por entrecruzamiento de las bases guanina y alquilación de las bases nitrogenadas (Downie et al. 2008). Para identificar si la permeación de iones es necesaria para la proliferación de tumores, se modificó la secuencia firma TSVGFGN de la región del poro a TSVGFSN (EAG-G440S) para impedir el paso de iones. Los injertos de células NIH3T3 y CHO que expresaron EAG-G440S generaron tumores de menor tamaño comparados los injertos que expresaron EAG1 silvestre, lo que indica que un mecanismo que explique la proliferación celular solo en función de la permeación de iones, como el propuesto por Gavrilova-Ruch et al., 2002 es solo un mecanismo secundario de la oncogénesis. Puesto que el injerto de células NIH3T3 silvestres no genera tumores se concluye que la proliferación celular asociada a la expresión de EAG1 se debe a cambios conformacionales que influyen en la señalización celular, ya que el astemizol además de impedir el paso de iones fija el canal en la conformación abierta (Downie et al. 2008).

## Introducción

---

---

Se ha identificado que EAG1 proporciona ventajas selectivas a células de cáncer y tumores, lo que se ha correlacionado con una mala prognosis; incrementa la vascularización de tumores y migración celular, promueve la progresión a través de las fases G1, G2 y M del ciclo celular, modula el desensamble del cilio primario necesario para la señalización morfogénica y por factores de crecimiento (Cazares-Ordóñez y Pardo 2017); lo que podría explicar el dismorfismo asociado al síndrome Zimmermann-Laband (Bauer y Schwarz 2018). La incertidumbre asociada a las múltiples rutas metabólicas en las que puede participar EAG1 resalta la complejidad de las redes de interacción proteína-proteína.

### 1.4. Cáncer, la diversificación progresiva a partir de un linaje celular

---

---

Las células que constituyen a un organismo pluricelular como el ser humano necesariamente están coordinadas por mecanismos dependientes del genoma de cada célula. El hecho de que más de  $10^{13}$  células constituyan el cuerpo humano (Sender, Fuchs, y Milo 2016) es una muestra de la capacidad regulatoria alcanzada tras millones de años de evolución, tal convivencia es la envidia de cualquier estructura social. Sin embargo, el genoma de toda célula es a su vez susceptible a mutaciones o alteraciones genéticas que perturban los mecanismos de regulación celular.

La mayoría de los casos de cáncer tienen sus orígenes a partir de una sola célula aberrante (Nowell 1976). Dicha célula tiene su origen con al menos una mutación de un conjunto de “genes críticos” cuya alteración contribuye a la causa o evolución del cáncer. Los genes críticos se agrupan en dos clases: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores (Alberts 2015). Los proto-oncogenes son genes relacionados a cáncer que como resultado de una mutación pueden adquirir o mejorar su actividad, la variante más activa del gen se conoce como oncogen y su producto puede contribuir al desarrollo del cáncer directamente por un incremento en la proliferación; se ha propuesto que los oncogenes inducen la inestabilidad genética en cánceres esporádicos debido a que alteran los procesos de replicación del ADN (Negrini, Gorgoulis, y Halazonetis 2010). Por otra parte, los genes supresores de tumores son aquellos cuyas mutaciones que llevan a la pérdida de la función del gen permiten el desarrollo del cáncer, generalmente se asocian a mecanismos moleculares de reparación del ADN, así como la detección y eliminación de la proliferación de células anormales; se ha correlacionado la inactividad de estos genes con la inestabilidad genética en cánceres hereditarios (Negrini, Gorgoulis, y Halazonetis 2010). Se estima que el número de mutaciones en los genes críticos que conducen a un caso individual de cáncer es en el orden de 10, el efecto aditivo de tales mutaciones conlleva a una enorme inestabilidad genética y epigenética de las células afectadas (Alberts 2015).

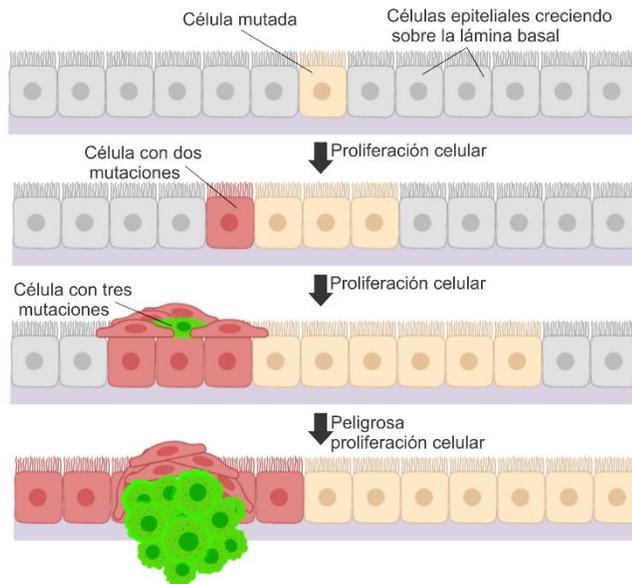
## Introducción

---

---

Desde el punto de vista evolutivo, la consecuencia principal de una inestabilidad genética es una enorme diversidad genética aunada a un intenso proceso selectivo que puede resultar en poblaciones celulares exitosas y diversas en una misma persona (ver Figura 5), tal diversidad supone un enorme reto en el desarrollo de fármacos de amplia distribución que eliminen la mayor cantidad de poblaciones anormales de células y la menor cantidad de células sanas (Nowell 1976). Aunque no se encuentran completamente determinadas las rutas de señalización en las cuales está involucrado el canal oncogénico EAG1 (particularmente sus dominios citoplasmáticos), su inhibición se ha asociado a una detención de la proliferación de células cancerosas (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017; Gomez-Varela et al. 2007) lo que aunado a su expresión ubicua en la mayoría de los cánceres lo hace un blanco terapéutico muy prometedor.

*Figura 5. Evolución clonal. Esquema de una célula con una mutación espontánea en uno de los genes críticos en el desarrollo del cáncer (naranja). En cada paso una sola célula recibe una mutación adicional que puede aumentar la proliferación celular o disminuir la muerte celular. En el último paso se muestra la invasión de las células cancerosas, un paso inicial en la metástasis. En realidad las células cancerosas tienen numerosas mutaciones y cambios epigenéticos además de los necesarios para dar el fenotipo de cáncer debido a la inestabilidad genética. La aparición del fenotipo aberrante puede tardar años en aparecer. Imagen modificada de Alberts (2015) con Biorender.com.*



### 2. Inhibición de los canales iónicos activados por voltaje

---

Los ligandos capaces de inhibir los canales iónicos activados por voltaje pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza química como iones metálicos, moléculas de bajo peso molecular y peptídicos; los ligandos pueden ocluir el poro del canal o alterar las propiedades de *gating* de los canales (Kuzmenkov et al. 2016). En las secciones posteriores se tratará únicamente con inhibidores peptídicos a no ser que se especifique lo contrario.

Aunque las investigaciones relacionadas a elucidar los mecanismos de inhibición se encuentran distribuidas entre las distintas familias y subfamilias de canales, se ha corroborado que existen mecanismos conservados agrupados en dos grandes categorías: los inhibidores bloqueadores del poro y los modificadores del *gating*.

#### 2.1.1. Inhibidores peptídicos bloqueadores del poro

---

Los inhibidores peptídicos bloqueadores del poro se colocan físicamente sobre el vestíbulo extracelular de los canales y posicionan un residuo cargado (como lisina) en el primer sitio de unión a ion en el filtro de selectividad o  $SF_1$  (el más cercano al espacio extracelular) en el poro del canal, tal inhibición suele ser desestabilizada por la presencia de iones intracelulares puesto que los iones compiten por el sitio de unión, tal fenómeno observado en electrofisiología se conoce como *trans-enhanced dissociation effect* (Banerjee et al. 2013; Miller 1995). La arquitectura de tales inhibidores peptídicos de canales  $K_V$  encontrados en venenos de alacrán, la familia  $\alpha$  (familia de la caribdotoxina), está conformada por dos o tres  $\alpha$ -hélices-giro unidas por puentes disulfuro a una  $\beta$ -lámina compuesta por tres hebras; lo que confiere rigidez y permite mantener una forma globular (Miller 1995); ver Figura 6.

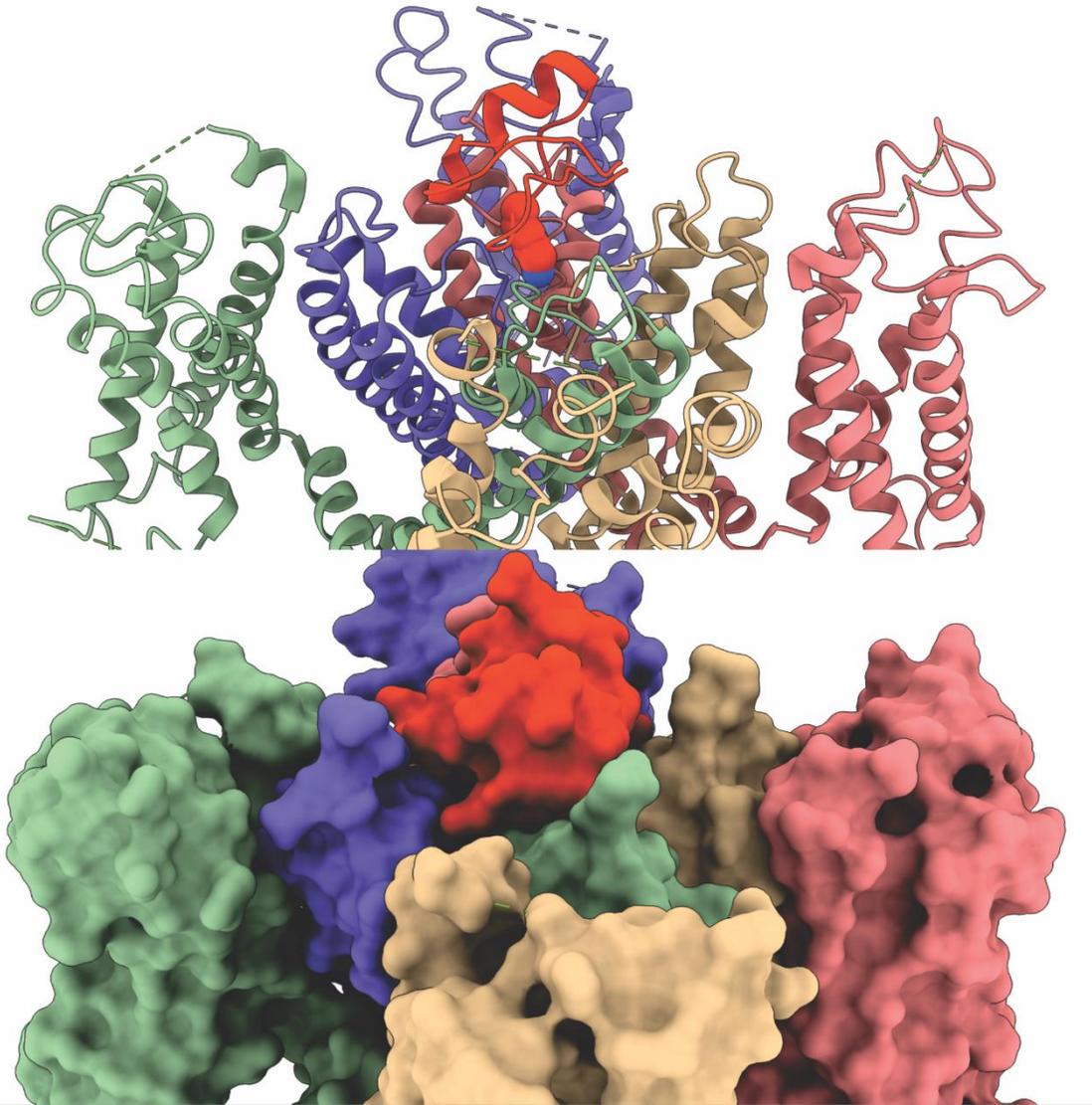


Figura 6. Estructura de la caribdotoxina (CTX) unida a canal quimera  $K_V1.2$ - $asas K_V2.1$  determinada por difracción de rayos X. Arriba se utiliza la representación de lazos para el esqueleto peptídico, abajo se visualiza la superficie. Cada cadena polipeptídica tiene un color distinto. La caribdotoxina (naranja) se une al vestibulo extracelular y dirige el residuo K27 (arriba en esferas) hacia el poro del canal impidiendo el flujo de iones; la posición tetraedral de los hidrógenos del nitrógeno terminal de K27 maximiza el número de contactos con los átomos de oxígeno de los carbonilos en el sitio  $SF_1$  del canal. La unión de la caribdotoxina no altera de manera significativa la estructura del canal; lo que es consistente con el modelo de unión llave-cerradura. Esta fue la primera estructura resuelta de una toxina unida a un canal de potasio PDB:4JTA (Banerjee et al. 2013).

## Antecedentes

---

---

### 2.1.2. Inhibidores peptídicos modificadores del *gating*

---

Los inhibidores peptídicos modificadores del *gating* alteran la cinética y la dependencia de voltaje de la activación o inactivación (Catterall et al. 2007). Se ha propuesto un mecanismo conservado entre toxinas polipeptídicas provenientes de escorpión, anémona de mar y araña llamado el atrapamiento del sensor de voltaje (con el sitio de unión en el lado extracelular) (Catterall et al. 2007); dicho mecanismo ha sido especialmente estudiado en los canales de sodio activados por voltaje o  $Na_V$ . A diferencia de los canales  $K_V$ , los canales  $Na_V$  eucariontes se caracterizan por incluir en una sola cadena polipeptídica (llamada subunidad  $\alpha$ ) cuatro dominios homólogos (I-IV) de seis segmentos transmembranales (hélices S1-S6) lo que es suficiente para formar un poro sensible a cambios de voltaje (Catterall et al. 2007; Clairfeuille et al. 2019). En general, las asas que conectan los segmentos transmembranales en los canales  $Na_V$  son distintas entre los dominios, por ejemplo: el asa extracelular entre S1-S2 del dominio I es distinta en longitud o secuencia del asa entre S1-S2 del dominio II, III o IV. De esta forma se ha identificado que el sitio de unión de las toxinas modificadoras del *gating* está constituido por distintas asas extracelulares de los canales  $Na_V$  (Shen et al. 2018; Xu et al. 2019; Catterall et al. 2007). Debido a que suele existir una buena correlación entre la dependencia del voltaje del canal iónico y la afinidad de unión de las toxinas modificadoras del *gating*, se ha establecido que la unión de las toxinas es dependiente de la conformación del canal a un voltaje dado (Catterall et al. 2007) esta aseveración también se extiende a canales  $K_V$  (Wang et al. 2004); en otras palabras, la conformación de las asas extracelulares puede favorecer o desfavorecer la unión de la toxina modificadora del *gating*. A continuación se describirán algunos ejemplos de esta clase de inhibidores con el propósito de resaltar diferencias y mecanismos consenso.

La superfamilia de toxinas ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) es representada por la hanatoxina (HaTx1) que puede interaccionar con cuatro sitios de unión equivalentes en los VSD de canales  $K_V$  homotetrámeros y se ha propuesto que su potencia puede ser modulada por la composición lipídica de la membrana (Xu et al. 2019). Dentro de esta familia, la protoxina II aislada de la tarántula *Thrixopelma pruriens* es capaz de inhibir la corriente mediada por los canales  $Na_V$  1.7 atrapando el VSD<sub>II</sub> en el estado desactivado, aunque se ha determinado también un sitio de unión en el VSD<sub>IV</sub> (Shen et al. 2019). En la Figura 7, se muestra el modo de unión resuelto de la protoxina II en el VSD<sub>II</sub> del canal humano  $Na_V$  1.7; la estrategia consistió en sustituir el VSD del canal homotetrámero bacteriano  $Na_V$ Ab por la secuencia de aminoácidos del VSD<sub>II</sub> del canal humano  $Na_V$  1.7. El complejo muestra cuatro moléculas de protoxina II unidas de manera equivalente a cada VSD<sub>II</sub>, tal interacción es posible puesto que el canal es un homotetrámero, el sitio de unión de una molécula de protoxina II está constituido por un solo VSD<sub>II</sub> y la unión de una molécula no induce cambios conformacionales que se extiendan a los otros tres sitios de unión en los VSD<sub>II</sub>. La protoxina II se involucra principalmente en interacciones electrostáticas selectivas con el asa S3-S4 del VSD<sub>II</sub>, utilizando dos cadenas laterales básicas (R22, K26) para neutralizar la acción de residuos ácidos esenciales necesarios para el movimiento de S4 (E811, D816 y E818 de  $Na_V$ 1.7) y se propone que el sitio de unión además está compuesto de una región expuesta a lípidos que justifica la importancia de la partición de la membrana para una unión de alta afinidad como en el caso de la hanatoxina (Xu et al. 2019).

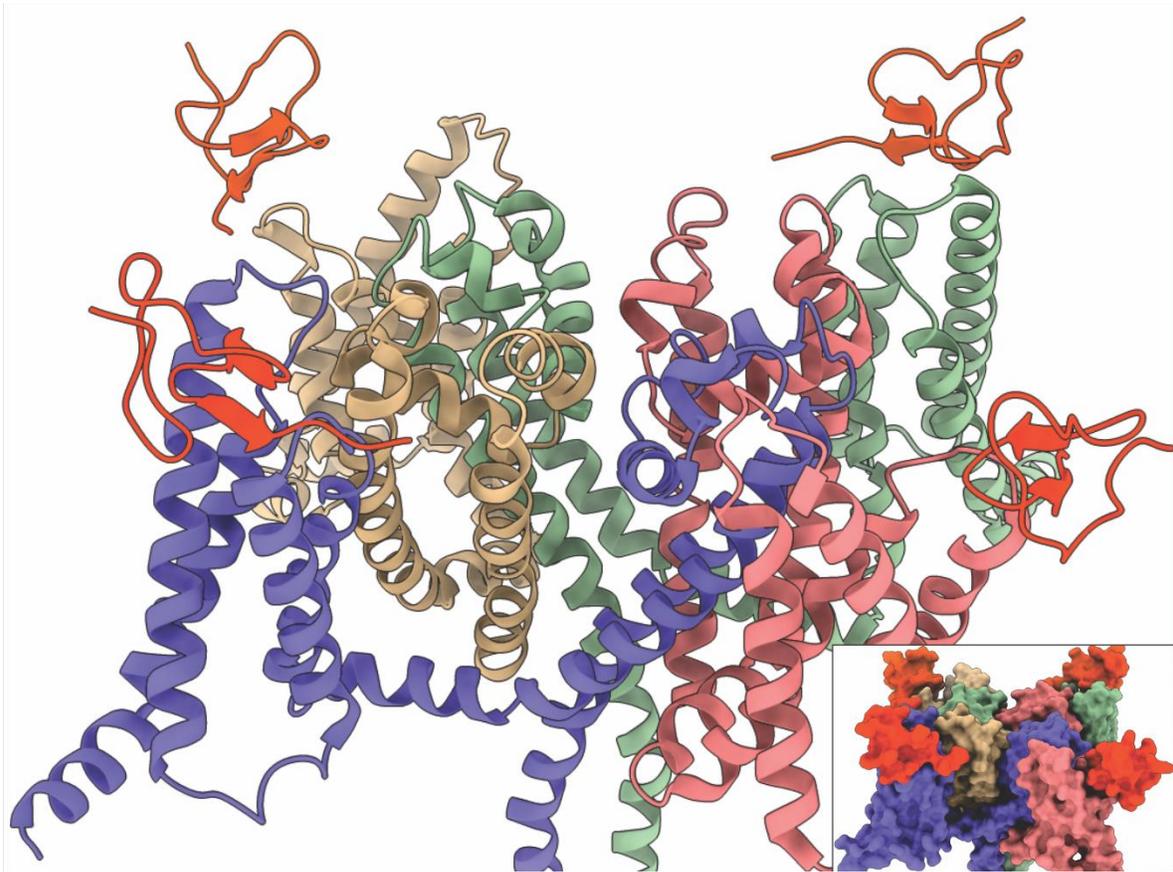


Figura 7. Estructura del canal quimérico  $Na_V Ab$  con el  $VSD_{II}$  del canal humano  $Na_V 1.7$  unido a protoxina II (o  $ProTx2$ ) determinada por criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X (PDB:6N4R). Cada cadena polipeptídica del canal homotetrámero se muestra en un color diferente. En naranja se muestran las cuatro moléculas de  $ProTx2$  y en una miniatura se ilustra la superficie del complejo.

Se ha demostrado que la protoxina II reconoce como sitios de unión, homólogos entre sí, los dominios  $VSD_{II}$  y  $VSD_{IV}$  del canal  $Na_V 1.7$  (Shen et al. 2019). La capacidad de una toxina modificadora del *gating* para unirse a distintos sitios homólogos del VSD se ha descrito en detalle en la estructura del canal  $Na_V 1.7$  unido a AaH2, una toxina proveniente del veneno del escorpión *Androctonus australis Hector*. El sitio de unión de AaH2 cubre la superficie extracelular del  $VSD_{IV}$  y la región adyacente (en el subdominio I) del dominio formador del poro ( $PD_I$ ), por lo que se piensa que la toxina atrapa al  $VSD_{IV}$  en el estado desactivado y como tal retrasa el movimiento de cargas ( $\sim 30\%$ ) de los canales  $Na_V 1.2$  y  $1.7$  con  $EC_{50}$  de  $0.72 \pm 0.59$  nM y  $51.7 \pm 1.5$  nM respectivamente a  $-100$  mV (canal cerrado). Sin embargo, la estructura de un canal quimérico de la cucaracha *Periplaneta americana*  $Na_V Pas$  (similar al canal humano  $Na_V 1.4$ ) cuyo dominio  $VSD_{IV}$  y hélice  $S5_I$  fueron sustituidos con los respectivos segmentos del  $Na_V 1.7$  humano mostró a AaH2 unida en dos sitios, ver Figura 8. El primer sitio muestra a AaH2 en contacto con la región extracelular de  $S5_I$ , las asas  $S1-S2$  y  $S3-S4$  del  $VSD_{IV}$ , y con una glicosilación altamente conservada en la torreta conectada a  $S5_I$ . La formación del complejo parece estar determinada por la alta superficie de contacto ( $\sim 712 \text{ \AA}^2$ ) y la complementariedad electrostática (Clairfeuille et al. 2019).

## Antecedentes

---

---

Asimismo, la Figura 8 muestra a AaH2 unida al VSD<sub>I</sub> (nativo de *Na<sub>V</sub>Pas*). Se sugiere que la afinidad de la toxina por este sitio es menor ya que el mapa de densidad correspondiente a esta molécula de AaH2 está menos definido que para el sitio VSD<sub>IV</sub>. No obstante, experimentos de electrofisiología en mutantes del canal de la cucaracha *Blattella germanica* *BgNa<sub>V</sub>1* sugieren que dicho sitio de unión puede tener una relevancia biológica (Clairfeuille et al. 2019).

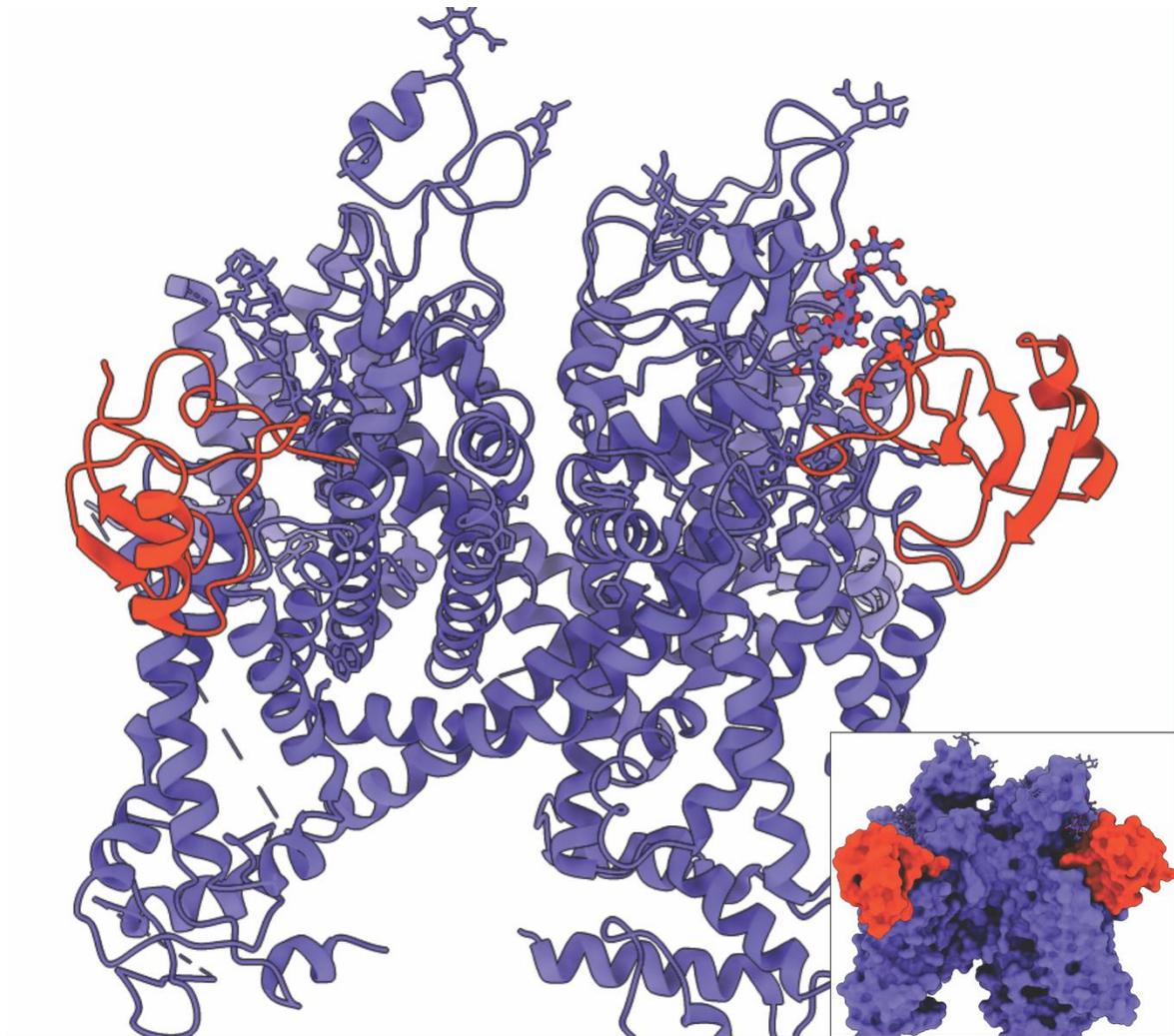


Figura 8. Estructura obtenida por criomicroscopía electrónica de las toxinas AaH2 (naranja) unidas al canal quimérico *Na<sub>V</sub>Pas* cuyo VSD<sub>IV</sub> ha sido sustituido por el dominio VSD<sub>IV</sub> de *Na<sub>V</sub>1.7* (PDB: 6NT4). El principal sitio de unión está constituido por la superficie extracelular del dominio VSD<sub>IV</sub> (derecha) y una glicosilación del dominio sensor del poro. Por otra parte, el segundo sitio de unión se encuentra sobre la superficie del VSD<sub>I</sub> y presenta una glicosilación en la cercanía aunque no se encuentra en contacto con la toxina. En la esquina inferior derecha se encuentra una miniatura que ilustra la superficie de las proteínas.

## Antecedentes

---

---

Al igual que la protoxina II y la hanatoxina previamente descritas, la toxina Dc1a proveniente de la araña *Diguetia canities* pertenece a la superfamilia de toxinas ICK. El modo de unión resuelto (PDB: 6A91) de la toxina en el canal  $Na_vPas$  engloba muchas características de las toxinas previamente descritas y añade otras, ver Figura 9. Primero, interacciona con las asas extracelulares del sensor  $VSD_{II}$ , sin embargo, la toxina inserta una horquilla  $\beta$  en el interior de una cavidad hidrofóbica del  $VSD_{II}$ ; en la punta de la horquilla  $\beta$  se encuentra el residuo F47 con su cadena lateral dirigida hacia una fosfatidilcolina. Segundo, en la cercanía del residuo Y33 de Dc1a se encuentra una glicosilación del canal. Finalmente, una parte importante de la interfase Dc1a-canal pertenece al dominio formador del poro (Shen et al. 2018).

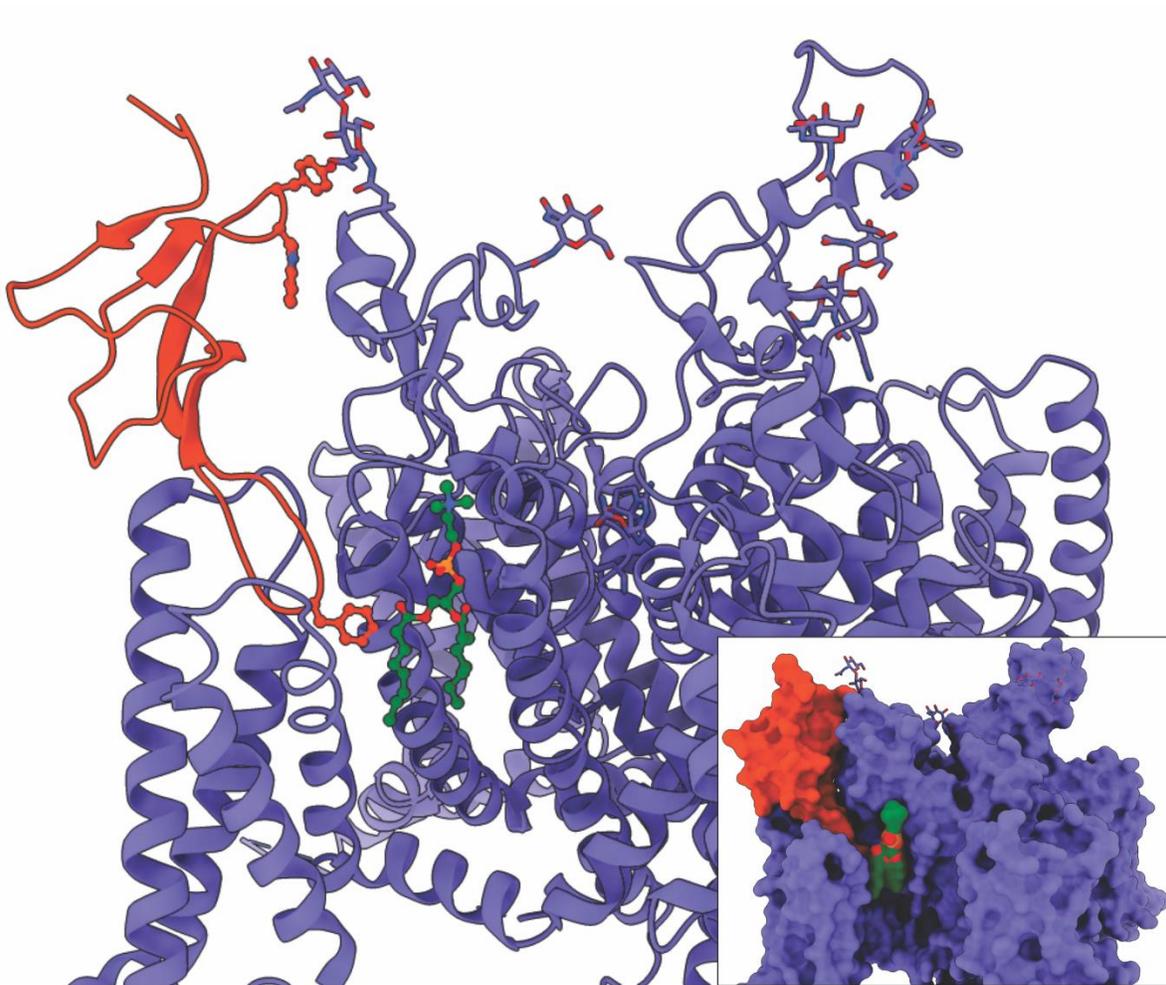


Figura 9. Estructura obtenida por criomicroscopía electrónica (PDB: 6A91) del canal  $Na_vPas$  (morado) unido a saxitoxina y a la toxina peptídica Dc1a (naranja). En la estructura se resolvió la posición de una cadena lateral de Phe47 dirigida hacia una molécula de lípido fosfatidilcolina (verde).

### 2.2. Inhibición de los canales EAG1

---

La viabilidad de un tratamiento del cáncer mediante la inhibición de los canales EAG1 se ha estudiado con base en la búsqueda de efectos adversos en animales. En ratones deficientes de actividad mEAG1, el gen que expresa el canal carecía de la región que codifica el segmento S4 del dominio sensor de voltaje y la primera mitad del segmento S5 que forma la región del poro, no se detectó letalidad de embriones o aberraciones en el crecimiento, habilidades motoras, reflejos, ansiedad, comportamiento, aprendizaje, memoria, ni diferencias anatómicas entre los tejidos de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo (Ufartes et al. 2013). Los resultados sugieren que la inhibición de la actividad del canal EAG1 no implica un peligro inminente y por lo tanto es un potencial blanco terapéutico.

No obstante, uno de los mayores retos para el desarrollo de un tratamiento basado en la inhibición de hEAG1 es la búsqueda de inhibidores que bloqueen selectivamente hEAG1 sobre su parálogo hERG1 cuya inhibición tiene como consecuencia síndrome del QT largo, una enfermedad cardíaca, que a su vez puede resultar en la muerte repentina (Ma et al. 2018).

#### 2.2.1. Anticuerpo modificador del *gating* EAG

---

La búsqueda de la primera molécula capaz de bloquear selectivamente el flujo del canal hEAG1 contempló la generación de anticuerpos que tuvieran como epítipo una secuencia dentro de la región extracelular del canal comprendida entre las hélices transmembrana S5 y S6 (residuos 374-452), la región extracelular no es similar a hERG1 o hEAG2. El anticuerpo resultante mAb56 con  $IC_{50} = 73 \pm 47 \text{ nM}$  reconoce la región del canal con la secuencia peptídica GSGSGKWEK (residuos 407-415) y es capaz de inhibir la proliferación de distintas líneas celulares de tumores *in vitro* así como el crecimiento de tumores en ratones SCID, en contraste el anticuerpo mAb62 que reconoce los residuos 375-383 no impide el flujo de iones del canal hEAG1 ni disminuye el crecimiento de tumores; la unión de moléculas en ciertas regiones extracelulares distintas del poro puede inhibir al canal hEAG1 (Gomez-Varela et al. 2007).

## Antecedentes

### 2.2.2. Inhibición de los canales EAG1 por toxinas peptídicas

Se han reportado cuatro toxinas capaces de inhibir el canal humano EAG1, todas cuentan con puentes disulfuro y una estructura tridimensional globular. En la Tabla 1 se muestra un resumen de las toxinas y su potencia.

Tabla 1. Toxinas reportadas con alta potencia para el canal hEAG1

Organismo	Nombre toxina	PDBID	IC <sub>50</sub>	Referencia
<i>Heterometrus fulvipes</i>	$\kappa$ -hefutoxina 1	6ATS/1HP9	26 ± 2 $\mu$ M	(Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. 2017)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	$\kappa$ -actitoxina-Ael2e (APETx4)	-	1.1 $\mu$ M	(Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017)
<i>Avicularia aurantiaca</i>	$\kappa$ -theraphotoxin-Aa1a	5WLX	637 ± 59 nM	(Ma et al. 2018)
<i>Avicularia purpurea</i>	$\mu/\kappa$ -theraphotoxin-Ap1a	-	236 ± 21 nM	(Ma et al. 2018)

#### 2.2.2.1. $\kappa$ -hefutoxina 1 ( $\kappa$ -KTx 1.1)

Es la primera toxina de origen peptídico reportada capaz de inhibir la corriente del canal hEAG1 (IC<sub>50</sub> 26 ± 2  $\mu$ M), fue aislada del veneno de escorpión *Heterometrus fulvipes*. Está compuesta de 22 residuos con un extremo C-terminal amidado. No se ha reportado actividad inhibitoria en hERG1 a concentraciones de 40  $\mu$ M, mientras que en hEAG1 se inhibe la corriente en toda la célula (*whole cell current*) 57 ± 2% con  $n_{Hill}$  1.0 ± 0.5. La máxima inhibición de corriente > 90% se alcanza a una concentración  $\approx$  100  $\mu$ M. Se identificó como inhibidor de canales de potasio por su diada funcional que contiene los residuos Y5 y K19 a una distancia de 6 ± 1.0 Å. De acuerdo a los autores se espera un mecanismo bloqueador de poro, común en las toxinas de escorpión, en el cual la cadena positivamente cargada de la lisina entra al poro y se une a un residuo negativamente cargado del canal, actuando como un catión que tapa el poro cargado negativamente (Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. 2017). En la Figura 10, se muestra el alineamiento de las  $\kappa$ -hefutoxinas cuyo efecto se ha estudiado en hEAG1.

## Antecedentes

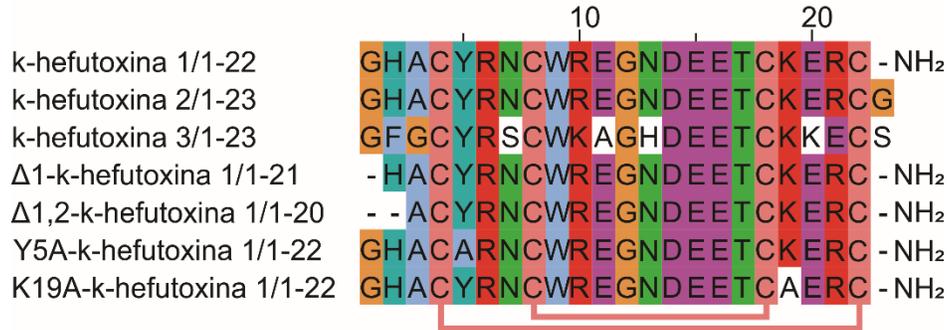


Figura 10. Alineamiento de secuencias homólogas de k-hefutoxina 1 y secuencias mutantes. k-hefutoxina 1 comparte una identidad de secuencia de 96%, 61%, 96%, 91%, 96% y 96% con k-hefutoxina 2, k-hefutoxina 3, Δ1-k-hefutoxina 1, Δ1,2-k-hefutoxina 1, Y5A-k-hefutoxina 1 y K19A-k-hefutoxina 1 respectivamente. El código de colores corresponde al utilizado por el programa Clustal X. Se utilizó "NH<sub>2</sub>" para indicar el extremo C-terminal amidado. Modificado de Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. (2017).

### 2.2.2.2. APETx4

Toxina de anemona de mar (APETx4) con tres puentes disulfuro que inhibe las corrientes de Kv10.1 uniéndose preferencialmente al estado cerrado del canal ( $IC_{50}$  1μM) y fijándolo en esa conformación. Se cree que el modo de acción es similar al de APETx1 (88% identidad) en hERG1 ( $IC_{50}$  34nM), se une la toxina al asa extracelular del sensor de voltaje (región S3-S4) y desplaza la activación hacia potenciales más positivos (hasta 18 mV). Se ha sugerido que la combinación de un parche hidrofóbico y residuos cargados en la superficie de la toxina son los responsables de la unión de los modificadores del *gating* y los canales iónicos. Muchos modificadores del *gating* cuentan con una triada hidrofóbica, en APETx4 la triada son los residuos Y32, F33 y L34, ver Figura 11 (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017).

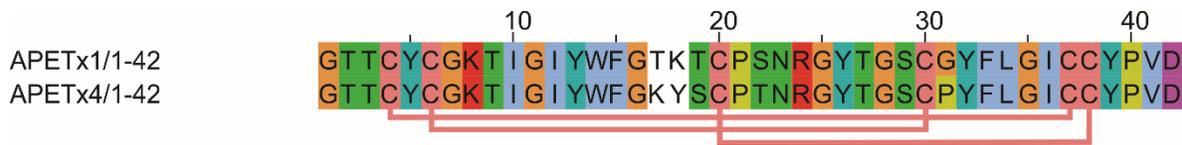


Figura 11. Alineamiento entre secuencias homólogas. La identidad de secuencia entre APETx1 y APETx4 es 88%. El código de color corresponde al utilizado por el programa Clustal X. Modificado de Moreels, Peigneur, Galan, et al. (2017).

## Antecedentes

---

---

### 2.2.2.3. Aa1a y Ap1a

---

Dos péptidos inhibidores de hEAG1 ( $\kappa$ -terafotoxina-Aa1a y  $\kappa$ -terafotoxina-Ap1a) con un motivo nudo inhibidor de cistina o ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) se identificaron como modificadores del *gating* en vez de ser bloqueadores del poro. Ambos péptidos reducen significativamente la probabilidad de que el canal esté abierto en el intervalo de potenciales de membrana fisiológicos, tienen 36 residuos de longitud, un extremo C terminal amidado, con seis cisteínas, son parálogos con 81% de identidad de secuencia, ver Figura 12. Uno de los péptidos (Ap1a) es el primer inhibidor que tiene alta potencia ( $IC_{50} 236 \pm 21$  nM,  $n_{Hill} = 1.32 \pm 0.13$ ) y una selectividad más de 30 veces sobre hERG1. Se reporta hasta 72 horas de estabilidad a 37°C en fluido cerebroespinal y plasma humano. En Aa1a los tres enlaces disulfuro forman un nudo de cistina; los enlaces disulfuro  $Cys^3-Cys^{18}$ ,  $Cys^{10}-Cys^{23}$  y la sección intermedia forman un lazo cerrado que es perforado por el enlace disulfuro  $Cys^{17}-Cys^{30}$ , con dos disulfuros formando una vuelta de horquilla  $\beta$  canónica ( $\beta$ -*hairpin*). La secuencia de Ap1a difiere de Aa1a solo por siete residuos, sin embargo, Aa1a es tres veces menos potente que Ap1a ( $IC_{50} 637 \pm 59$  nM,  $n_{Hill} = 1.03 \pm 0.09$ ) pero a alta concentración inhibe completamente hEAG1; Aa1a se lava fácilmente mientras que el efecto inhibitorio de Ap1a es menos reversible (Ma et al. 2018).

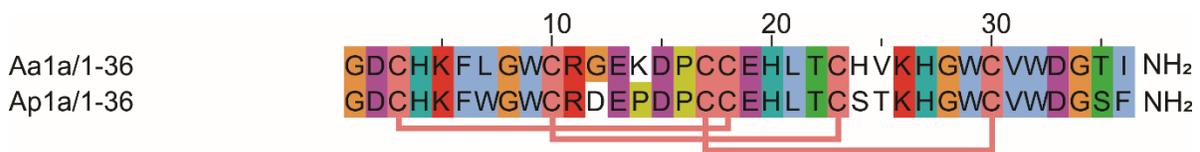


Figura 12. Alineamiento de secuencias homólogas. La identidad de secuencia entre Aa1a y Ap1a es 81%. El código de colores corresponde al utilizado en el programa Clustal. Se utilizó "NH<sub>2</sub>" para indicar el extremo C-terminal amidado. Modificado de Ma et al. (2018).

### 3. Predicción de la estructura de una proteína

---

---

La predicción de la estructura de una proteína con base en su estructura primaria es un tema importante dada la diversidad de funciones (protección, metabolismo, soporte estructural, etc) que se sabe pueden desempeñar las proteínas; aún más atractiva es la idea de diseñar proteínas para nuevas funciones. Sin embargo, el problema es complejo de resolver y por lo tanto coexisten tres enfoques para abordarlo: el modelado por homología, el modelado por hilvanado y la predicción *ab initio* (Pevsner 2015). Actualmente existen múltiples programas (*software*) que implementan una combinación de enfoques para predecir la estructura de una proteína (Kihara 2014).

## Antecedentes

---

---

### 3.1. Modelado por homología

---

El modelado por homología, también llamado modelado comparativo, consiste en encontrar una estructura de proteína en una base de datos de resultados experimentales (de rayos X, NMR, Crio-ME) que comparta típicamente una identidad de secuencia aminoacídica mayor al 40% con la secuencia objetivo; dicha estructura se conoce como molde. Altas identidades de secuencia entre proteínas sugieren un mismo origen evolutivo (homología), así como un plegamiento similar y disminuyen la probabilidad de tener regiones incorrectamente alineadas. Con base en la estructura molde se construye un modelo de la proteína objetivo. Posteriormente a la construcción del modelo es necesario evaluar la calidad del mismo, las métricas de evaluación se basan en el conocimiento general de la estructura de proteínas y consideran la longitud de enlaces, ángulos, la planaridad de los enlaces peptídicos, la conformación del esqueleto polipeptídico (gráfico de Ramachandran), regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, entre otras características.

Los errores más comunes durante el modelado por homología (Pevsner 2015) son:

- Errores en regiones del modelo que carecían de una región del molde
- Selección de un molde incorrecto (estructura incorrecta o sin relación evolutiva)
- Errores en el alineamiento de secuencias
- Empaquetamiento incorrecto de cadenas laterales
- Distorsiones en regiones correctamente alineadas

### 3.2. Modelado por hilvanado

---

El modelado por hilvanado, o también llamado modelado por reconocimiento de un plegamiento, se utiliza cuando en la búsqueda de un molde se encuentran identidades de secuencia menores al 30 % con las secuencias que tienen asociada una estructura reportada y no obstante se reconoce un plegamiento común (Pevsner 2015). Esto puede ocurrir porque la proteína objetivo se pliega de manera similar a alguna estructura reportada por evolución convergente (por alguna presión selectiva se adquieren características similares pero no tienen un origen en común) o porque la secuencia objetivo es homóloga pero divergió hace mucho tiempo. La secuencia objetivo se divide en fragmentos que se hilvanan sobre plegamientos conocidos, posteriormente se evalúa que tan coherente es el modelo construido con respecto a una función de puntaje que refleja el conocimiento general de la estructura de proteínas.

## Antecedentes

---

---

### 3.3. Modelado *ab initio*

---

El modelado *ab initio* es el método predictivo más ambicioso y complicado. Se basa en dos supuestos: 1) toda la información de la estructura de una proteína está codificada en la secuencia de aminoácidos y 2) una proteína globular se pliega formando la estructura con la menor energía libre (Pevsner 2015). Así, el modelado *ab initio* depende en principio de la implementación de leyes físicas en el *software*, generalmente en forma de campos de fuerza (ver capítulo 4), y de su éxito para describir el estado nativo de una proteína (Farhadi 2018).

## 4. Dinámica molecular

---

La dinámica molecular es una herramienta computacional que permite estudiar el cambio a través del tiempo de un sistema de coordenadas y el estado de un sistema macromolecular dado; la evolución del sistema se conoce como trayectoria (Paquet y Viktor 2015). Una trayectoria se obtiene resolviendo las ecuaciones de Newton de la mecánica clásica; a través de la trayectoria las interacciones no favorables tienden a desaparecer, esto es una ventaja utilizada para evaluar interacciones entre moléculas.

La relación entre estructura y energía ha motivado el desarrollo de técnicas computacionales que describan modelos atómicos partiendo de conceptos de la mecánica clásica. Una función de energía potencial (llamada campo de fuerza) es utilizada para calcular la energía potencial de un sistema y sus derivadas a partir de las coordenadas que representan la estructura o conformación del sistema. Los campos de fuerza son aproximaciones a la energía potencial exacta y como tal están sujetos a mejoras (Brooks et al. 2009).

### 4.1. CHARMM36 un campo de fuerza tipo todos los átomos

---

CHARMM36, su función de energía potencial  $U(\vec{R})$  es una suma de los términos individuales que representan contribuciones enlazantes y no enlazantes como función de sus coordenadas atómicas, además de un término correctivo. Sus contribuciones enlazantes incluyen el enlace ( $b$ ), ángulo de valencia  $\theta$ , Urey-Bradley (UB,S), ángulos diedros ( $\phi$ ), ángulos impropios ( $\omega$ ), y contribuciones de corrección torsional en el esqueleto (*CMAP*,  $\phi$ ,  $\psi$ ) (Brooks et al. 2009). De manera similar las contribuciones no enlazantes quedan definidas por el término de Lennard-Jones (interacciones 6-12) y las coulombicas representadas por cargas puntuales  $q_i q_j$ , como se muestra en la siguiente ecuación:

## Antecedentes

$$U(\vec{R}) = \sum_{\text{enlaces}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\substack{\text{Urey-} \\ \text{Bradley}}} K_{UB}(S - S_0)^2 \\ + \sum_{\text{diedros}} K_\phi(1 + \cos(n\phi - \delta)) + \sum_{\text{impropios}} K_\omega(\omega - \omega_0)^2 \\ + \sum_{\substack{\text{pares de} \\ \text{no-enlace}}} \left\{ \epsilon_{ij}^{\min} \left[ \left( \frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} \right\} + \sum_{\text{residuos}} U_{CMAP}(\phi, \psi)$$

Donde los parámetros  $K_b, K_\phi, K_{UB}, K_\theta$ , y  $K_\omega$  son las respectivas constantes de fuerza y las variables con el subíndice 0 son los valores respectivos en el equilibrio. Los términos de enlace son armónicos con excepción de los diedros que están expresados por una sinusoidal donde  $n$  es la multiplicidad o periodicidad del ángulo diedro y  $\delta$  el desplazamiento de fase. Con respecto a los pares no enlazados  $\epsilon_{ij}$  corresponde a la profundidad del pozo en el potencial de Lennard-Jones, mientras que  $\epsilon_0$  y  $\epsilon$  corresponden a la permitividad del vacío y la constante dieléctrica relativa respectivamente.

CHARMM es consistente con otros campos de fuerza derivados del mismo lo que permite utilizarlos para el modelado de sistemas biomoleculares heterogéneos que incluyan tanto proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas similares a fármacos (Mallajosyula et al. 2015).

### 4.2. Campos de fuerza de grano grueso

Los campos de fuerza que incluyen todos los átomos como CHARMM, AMBER, GROMOS etc... son inadecuados para simular sistemas con gran número de átomos y largas escalas temporales, incluso si el desarrollo de la electrónica obedece la ley de Moore se estima que existirá una aplicación para modelos “computacionalmente baratos” durante los próximos 30 años (Ingólfsson et al. 2014). Los modelos de grano grueso (CG) prescinden de algunos grados de libertad atómicos agrupando varios átomos dentro de entidades de mayor tamaño (llamadas cuentas), en consecuencia disminuye el número de interacciones que deben ser calculadas, además suaviza la superficie de energía potencial del espacio conformacional por lo cual es posible incrementar el tamaño de paso (*time step*) de integración lo que incrementa su uso espacio temporal sobre los modelos de todos los átomos, ver Figura 13.

Existen dos enfoques principales en cuanto a la parametrización en campos de fuerza de grano grueso: de arriba-hacia-abajo (*top-down*) y de abajo-hacia-arriba (*bottom-up*). El primero basa sus parámetros en valores termodinámicos obtenidos experimentalmente, lo que en principio significa que el campo de fuerza podría ser utilizado con moléculas para los cuales no ha sido explícitamente parametrizado. Por otra parte, los parámetros obtenidos con el enfoque *bottom-up* se derivan de cálculos cuánticos y campos de fuerza atómicos lo que los restringe más para usarse con ciertas moléculas (Goossens y De Winter 2018).

## Antecedentes

---

---

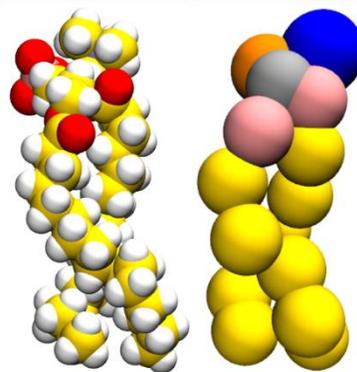
### 4.2.1. SIRAH un campo de fuerza de grano grueso

---

SIRAH (*Southamerican Initiative for a Rapid y Accurate Hamiltonian*) es un campo de fuerza que mediante el enfoque *top-down* se hace de parámetros para proteínas, lípidos, nucleótidos y disolvente acuoso (Machado et al. 2019). Los desarrolladores de SIRAH tuvieron el cuidado de que las cuentas de grano grueso (*CG-beads*) conservaran la posición de átomos reales esto facilita la interpretación y conversión entre estructuras de grano grueso y estructuras de resolución atómica (aquí llamadas de grano fino FG) (Darre et al. 2015), ver Figura 13. La equivalencia entre cuentas y grupos de átomos se decidió con base en la intuición fisicoquímica para cada caso en particular (no hay una relación 1 a 4 como en el popular campo de fuerza CG MARTINI); en general las regiones polares son representadas con mayor detalle que las regiones hidrofóbicas y voluminosas (Machado et al. 2019). Todas las interacciones son calculadas dentro del hamiltoniano clásico de la dinámica molecular (Darre et al. 2015).

SIRAH utiliza un modelo de agua llamado WatFour (o WT4) que está representado por cuatro cuentas interconectadas para formar un tetraedro equivalente a 11 moléculas de agua. Las cuentas tienen cargas parciales que proporcionan en conjunto una permitividad dieléctrica, lo que permite modular la fuerza iónica (Darre et al. 2015). Si a temperatura ambiente un modelo atomístico de agua como SPC, TIP3P o SPC/E se mezcla con el modelo CG WT4 ambos modelos se separan en fases, esto debido a una diferencia en las energías libres de solvatación respectiva de cada modelo de agua, sin embargo, tal separación ( $\approx 1$  nm) es suave y pocas moléculas de agua se mezclan en ambas regiones (Gonzalez, Darre, y Pantano 2013). Tal propiedad se ha utilizado con éxito para simular sistemas de resolución dual o multiescala entre estructuras adicionales descritas por campos de fuerza de grano grueso (WT4) y grano fino (proteína y lípido), una comparación entre la simulación multiescala y la de grano fino del complejo transmembranal SNARE no mostró diferencias significativas en la región de grano fino de ambas simulaciones y por consiguiente se concluyó que WT4 no perturba las estructuras (lipídicas o proteicas) de la región de grano fino (Darre et al. 2012).

*Figura 13. Estructuras de un lípido POPC en representación de esferas de Van der Waals. La estructura de la izquierda es una molécula parametrizada por un campo de fuerza FG, mientras que la estructura a la derecha corresponde a la misma molécula transformada al campo de fuerza CG "SIRAH". La comparación de ambas estructuras hace evidente la reducción del número de átomos y enlaces o grados de libertad a considerar durante el cálculo de la dinámica molecular.*



### 4.3. Modelado multiescala

---

Debido a las ventajas y desventajas inherentes a los modelos de grano fino y los modelos de grano grueso, se han intentado múltiples formas de combinar ambos para obtener modelos mecanísticos de alta resolución y dentro de escalas de tiempo más grandes. Se distinguen dos enfoques: modelado multiescala en paralelo y modelado multiescala en serie. En el primero, ciertas partes del sistema son descritas por el modelo de grano grueso mientras otras son descritas por el modelo de grano fino; el problema asociado a este enfoque está relacionado con la delimitación y estabilidad de la interfase CG-FG. Por otro lado, en el modelado multiescala en serie primero se evalúa el sistema bajo la resolución CG y subsecuentemente se convierte el sistema a resolución atómica y luego se evalúa nuevamente, lo que elimina el problema de la interfase CG-FG; sin embargo el costo computacional es alto ya que el sistema se tiene que convertir a resolución atómica en el intervalo de tiempo donde se desee estudiar alguna interacción (Goossens y De Winter 2018).

#### 4.3.1. Modelado multiescala para estudiar interacciones ligando-receptor

---

Para las proteínas de membrana los diferentes enfoques multiescala CG/FG difieren en: 1) la manera de definir la separación del sistema entre las regiones FG y CG; 2) los campos de fuerza FG y CG que utilizan; y 3) el esquema de acoplamiento utilizado para combinar las partes FG y CG (Schneider et al. 2018).

Una estrategia multiescala hecha a la medida para el estudio de la unión de un ligando a una proteína de membrana involucró una representación implícita de la membrana, mientras el sitio de unión y las moléculas de agua alrededor del mismo se trataron atómicamente (GROMOS FG), el resto de la proteína fue descrito por un campo de fuerza CG. Tal enfoque depende de barreras de potencial hemisféricas para delimitar el volumen ocupado por el agua atómica en el espacio extracelular y otra para el espacio intracelular (Schneider et al. 2018). Los sistemas modelados con el receptor adrenérgico humano  $\beta_2$  ( $h\beta_2AR$ ) y los ligandos modelados (S-Carazolol y R-Isoprenalina) por mencionar algunos ejemplos reprodujeron los resultados experimentales y además se reporta que dicho enfoque permitió en otros sistemas de proteínas transmembrana refinar acoplamientos moleculares previos y predecir nuevos sitios de unión (lo que se confirmó experimentalmente por mutagénesis) (Schneider et al. 2018). Sin embargo, los autores mencionan que su propuesta por el momento se encuentra limitada a proteínas de membrana monoméricas; es probable que dicha limitación esté relacionada a dificultades para definir barreras de potencial adecuadas para cada monómero.

## Hipótesis

---

---

Con la información estructural de las toxinas peptídicas que inhiben el canal Kv10.1 (hEAG1) y técnicas de simulación computacional como son el acoplamiento molecular y la dinámica molecular se elucidarán las interacciones moleculares que dan origen a la inhibición del canal.

## Objetivos

---

---

Obtener y validar modelos moleculares consistentes con los datos experimentales del canal de potasio hEAG1 y los péptidos inhibidores modificadores del *gating*: Ap1a, Aa1a, APETx1, APETx4 así como de la k-hefutoxina 1 y sus mutantes reportadas.

Identificar los posibles sitios de unión del canal hEAG1 con los inhibidores peptídicos modificadores del *gating* con base en técnicas de acoplamiento molecular.

Validar un modelo de inhibición mediante dinámica molecular utilizando el sitio de unión más representativo de los acoplamientos.

## 1. Construcción del modelo molecular del canal de potasio hEAG1

---

- 1.2. Se identificó como molde para el modelado por homología la estructura del canal de rata rEAG1 (PDB:5K7L) determinada por criomicroscopía electrónica (Whicher y MacKinnon 2016).
- 1.3. Se utilizó SCWRL4 (Krivov, Shapovalov, y Dunbrack 2009) para adicionar átomos faltantes, así como para optimizar la posición de las cadenas laterales.
- 1.4. Se realizó el modelado por homología utilizando automodel del programa MODELLER (Sali y Blundell 1993) versión 9.21, se construyeron 10,008 modelos.
- 1.5. Selección de los mejores cinco modelos basado en el puntaje SOAP para proteínas (Dong et al. 2013) y la raíz de la desviación cuadrática media o RMSD de los átomos C,N,O,CA con respecto a la estructura 5K7L refinada por SCWRL4 en las zonas correspondientes a los residuos 10-406, 412-696 y 704-722.
- 1.6. Se verificaron las estructuras de los modelos con ERRAT (Colovos y Yeates 1993) y posteriormente se refinaron las asas peor evaluadas, se construyeron 101 modelos refinados de cada uno de los cinco modelos, se obtuvo un total de 505 modelos. En el protocolo de refinamiento se puso la restricción de que los residuos 391-394 y 419-435 deben formar hélices alfa.
- 1.7. A partir de los 505 modelos se seleccionó aquel que tuviera un menor valor de RMSD (en los átomos C, CA) en la región del asa del poro (residuos 420-455) con respecto al molde refinado por SCWRL4.
- 1.8. Se evaluó el RMSD (C, N, O, CA) de los 101 modelos refinados de la estructura 91475 en los residuos 10-406,412-696, 704-722 con respecto al molde refinado por SCWRL4.
- 1.9. Se modificó el rotámero de la cadena lateral del residuo de asparagina 388 con el sistema PyMOL Molecular Graphics, Versión 4.5.0, Schrodinger, LLC. Posteriormente se utilizó CHARMM-GUI (Jo et al. 2008) para generar un archivo extensión “.pdb” con las coordenadas del tetrámero explícito.
- 1.10. Se utilizó PROPKA (Olsson et al. 2011) en el servidor PDB2PQR (2.1.1) (Dolinsky et al. 2004; Dolinsky et al. 2007) para calcular el estado de protonación de los residuos a pH 7.4 (el usado para las mediciones de electrofisiología). El archivo .pqr resultante se introdujo a CHARMM-GUI “*Glycan-Reader & Modeler*” (Jo et al. 2011; Park et al. 2017; Park et al. 2019) para adicionar la  $\beta$ -N-acetil-D-glucosaminación al residuo N388. Se utilizó el archivo con extensión .pdb para construir el tetrámero explícito con Chimera (Pettersen et al. 2004) y nuevamente se utilizó CHARMM-GUI para obtener los archivos con extensión .pdb, .psf y .crd (Brooks et al. 2009; Lee et al. 2016).

## Metodología

---

---

1.11. Se realizó la conversión del archivo de topología de CHARMM (.psf) al formato GROMACS (.top) utilizando el plug-in TopoTools (Axel Kohlmeyer 2016. TopoTools: Release 1.7 <http://doi.org/10.5281/zenodo.50249>) de VMD en conjunto con los archivos de lista de topología y parámetros de CHARMM36 (descargables de <http://mackerell.umaryland.edu> "toppar\_c36\_jul18.tgz") se utilizaron los archivos "par\_all36\_carb.prm", "par\_all36m\_prot.prm" y "toppar\_all36\_carb\_glycopeptide.str" (Mallajosyula et al. 2015).

### 2. Construcción de los modelos moleculares de los péptidos inhibidores:

---

- 2.1 Se identificaron las estructuras depositadas en la base de datos del *Protein Data Bank* que correspondían a la secuencia de los péptidos inhibidores de hEAG1: Aa1a (PDB:5WLX) y k-hefutoxina 1 (PDB:6ATS). Asimismo, APETx1 (PDB:1WQK) que inhibe al canal hERG1.
- 2.2. De las estructuras obtenidas por NMR (Aa1a y APETx1) se identificó el modelo más representativo, con base en los RMSD (N, CA, C, O) de cada uno de los modelos, ver Figuras Suplementarias 4 y 5. Para APETx1 se eligió el modelo 7 y para Aa1a el modelo 2.
- 2.3. Todas las estructuras se introdujeron al programa SCWRL4.
- 2.4. Se generaron los modelos moleculares de Ap1a, APETx4, k-hefutoxina 2, k-hefutoxina 3, N1-hefutoxina 1, N2-hefutoxina 1, Y5A-hefutoxina 1 y K19A-hefutoxina 1; se especificó en MODELLER la localización de los puentes disulfuro y en general se identificó la estructura que contara con el RMSD y puntaje DOPE más bajo (DOPE es la función de puntaje predeterminada de MODELLER). No se utilizó el puntaje SOAP debido a que dicha función de puntaje requiere especificar si la estructura a evaluar es una proteína o un péptido. Posteriormente, se revisaron los RMSD (N, CA, C, O) de las estructuras seleccionadas.
- 2.5. Todas las estructuras se introdujeron a PROPKA para obtener el estado de protonación a pH 7.4, posteriormente se utilizó CHARMM-GUI para amidar el extremo C terminal en las estructuras pertinentes y para preparar el archivo de topología para la minimización en GROMACS; se tuvo el cuidado de especificar los puentes disulfuro.
- 2.6. Al igual que con el modelo de hEAG1 se utilizó TopoTools para convertir el archivo de topología de CHARMM al formato de GROMACS.

### 3. Preparación de los modelos seleccionados

---

- 3.1. Se realizaron protocolos de minimización en agua TIP3P de las estructuras del canal hEAG1, las toxinas k-hefutoxina 1, k-hefutoxina 2, k-hefutoxina 3,  $\Delta$ 1-k-hefutoxina 1,  $\Delta$ 1,2-hefutoxina 1, Y5A-hefutoxina 1, K19A-hefutoxina 1, Ap1a, Aa1a y APETx4 empleando el programa GROMACS (Abraham et al. 2015) versión 2018.1 bajo el campo de fuerza CHARMM36. Se convirtió el archivo de coordenadas resultante de hEAG1 (.gro) a formato .pqr para visualizar el potencial electrostático en PyMOL Molecular Graphics, Version 4.5.0, Schrodinger, LLC.
- 3.2. Se evaluaron por MolProbity (Chen et al. 2010) los modelos minimizados; previamente se eliminaron todas las líneas del archivo de coordenadas (.pdb) de hEAG1 que contenían átomos de la glucosaminación. Además, se incluyó la evaluación del molde 5K7L sin refinar por SCWRL4.
- 3.3. Se obtuvo el potencial lipofílico del modelo del canal hEAG1 para tener una aproximación de la posición de la membrana, para lo cual se utilizó el software incluido en el paquete VASCo (Steinkellner et al. 2009) y por compatibilidad se visualizó en PyMOL Molecular Graphics, Versión 2.0.4, Schrodinger, LLC.

# Metodología

## 4. Acoplamiento moleculares hEAG1 y toxinas:

### 4.1. Acoplamiento globales (*ab initio*)

#### 4.1.1. Acoplamiento en ClusPro

ClusPro (Kozakov et al. 2017) es un servidor que realiza acoplamiento rígido, después agrupa 1,000 estructuras generadas de menor energía con base en su RMSD. Se supone que las agrupaciones más grandes se asemejan más a los modelos más probables, representando el ancho de un pozo de energía en el espacio conformacional. ClusPro utiliza el algoritmo de búsqueda por transformada rápida de Fourier de PIPER para realizar el acoplamiento rígido, posteriormente evalúa con una función de puntaje de la forma:

$$E_{interacción} = w_1 E_{repulsión} + w_2 E_{atracción} + w_3 E_{electrostática} + w_4 E_{DARS}$$

Los coeficientes  $w_1, \dots, w_4$  sirven para darle un peso a cada termino y se han optimizado empíricamente para distintos problemas de acoplamiento (Kozakov et al. 2017).

De acuerdo al potencial lipofílico se seleccionó una zona del canal para buscar posibles sitios de unión de los péptidos. La zona abarca los residuos 232-250, 311-329, 359-454 como se muestra en la Figura 14; ClusPro asocia un término repulsivo a los residuos fuera de la zona de búsqueda.

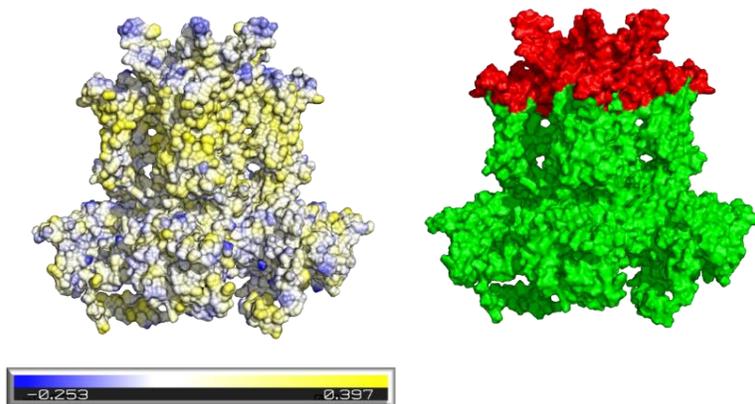


Figura 14. A) Representación del potencial lipofílico en la superficie de hEAG1, vista lateral; el amarillo denota una mayor afinidad por lípidos. B) En rojo se representa la superficie de los residuos en los cuales se realizó el acoplamiento global, la superficie verde representa los residuos que se propone están en la membrana o en la parte citosólica de la célula.

### 4.1.2. Acoplamiento en PyDockWEB

PyDockWEB (Jimenez-Garcia, Pons, y Fernandez-Recio 2013) es un servidor que permite realizar acoplamientos rígidos así como utilizar datos experimentales en forma de restricciones espaciales, es decir se especifican residuos que deben estar o ser cercanos a la interfaz y a mayor número de restricciones satisfechas se obtiene un mejor puntaje en la evaluación de un modo de unión. Las restricciones pueden especificarse en ambas estructuras: canal y toxina; sin embargo, puesto que el objetivo es comparar los resultados de ClusPro y PyDockWEB solo se pusieron restricciones en el canal de tal forma que los residuos abarcados por ClusPro sean los mismos en PyDockWEB, es decir los modos de unión que involucren la mayor cantidad de residuos comprendidos en los segmentos 232-250, 311-329, 359-454 del canal serán más favorables, ver Figura 14 (derecha).

### 4.2. Evaluación de los modos de unión por número de contactos de la interfaz canal-toxina con PRODIGY

---

La afinidad de unión (o energía libre de unión) define si la formación de un complejo ocurre bajo unas condiciones dadas; se ha demostrado que el número de contactos en la interfaz de un complejo proteína-proteína se correlaciona con la afinidad de unión experimental (Xue et al. 2016). PRODIGY (Xue et al. 2016) es uno de los predictores con mejor desempeño a la fecha, en las pruebas de desempeño ha mostrado un coeficiente de correlación de Pearson de 0.73 entre las afinidades de unión medidas y predichas con un valor  $P < 0.0001$ , y una raíz del cuadrado del error medio o RMSE (*Root Mean Square Error*) de  $1.89 \text{ kcal/mol}$  (Vangone y Bonvin 2015). Los mejores modos de unión se introdujeron al servidor de PRODIGY con el objetivo de obtener energías libres de unión así como identificar residuos que podrían estar involucrados en la formación del complejo toxina-canal.

Para facilitar la visualización de las energías se realizó un gráfico tridimensional del centro de masa de todos los modos de unión de las toxinas. Para el caso de pyDockWEB se descartaron los modos de unión con la región transmembranal por inspección visual. Se identificaron los modos de unión con las energías más favorables y se agruparon por toxina (sin importar el programa que los generó) y se graficó la información de los contactos proteína-proteína. Aunque este enfoque es muy sensible a las orientaciones similares en los modos de unión no se empleó un algoritmo adicional para descartar orientaciones similares ya que el número de modos de unión similares puede ser interpretado como una medida de la amplitud del pozo de energía del espacio conformacional de acuerdo a la teoría de ClusPro (Kozakov et al. 2017). Posteriormente, con un análisis de frecuencia de contactos entre la toxina-canal se identificaron los residuos del canal que consistentemente estabilizan los modos de unión más favorables de las toxinas globulares; la información experimental de la literatura y del análisis de contactos se utilizó posteriormente para realizar acoplamientos dirigidos.

### 4.3. Acoplamiento dirigido en HADDOCK

---

Este enfoque es distinto al acoplamiento basado en transformadas rápidas de Fourier (ClusPro y pyDockWEB) y se utiliza cuando se tiene alguna información de interacciones intermoleculares de las proteínas que forman el complejo. En vez de una búsqueda global (*Ab initio*) se delimitan “superficies de búsqueda” en el receptor y ligando. Para construir las superficies de búsqueda, residuos expuestos al disolvente tanto del ligando como del receptor que se supone son muy relevantes para la formación del complejo se definen como “residuos activos” y aquellos no tan relevantes o en la cercanía como “residuos pasivos” (Dominguez, Boelens, y Bonvin 2003). La información sobre los residuos que interactúan se introduce en forma de restricciones de interacción ambigua o AIRs (por sus siglas en inglés *Ambiguous Interaction Restraints*) definida como una distancia intermolecular ( $d_{iAB}$ ) con un valor máximo de 3Å entre cualquier átomo  $m$  de un residuo activo  $i$  de la proteína A ( $n_{iA}$ ) y cualquier átomo  $n$  de los residuos activos o pasivos  $k$  ( $N_{res}$  en total) de la proteína B ( $n_{kB}$ ) (e inversamente para la proteína B). La distancia efectiva  $d_{iAB}^{eff}$  para cada restricción es calculada utilizando la ecuación:

$$d_{iAB}^{eff} = \left( \sum_{m_{iA}=1}^{N_{atom}} \sum_{k=1}^{N_{res}} \sum_{n_{kB}=1}^{N_{atom}} \frac{1}{d_{m_{iA}n_{kB}}^6} \right)^{-\frac{1}{6}}$$

Donde  $N_{atom}$  indica todos los átomos de un residuo dado y  $N_{res}$  la suma de los residuos activos y pasivos para una proteína dada. De esta forma, los residuos pasivos no tienen AIRs directos a la otra proteína pero pueden satisfacer las restricciones activas de la otra proteína. El uso de AIRs permite buscar a través de todas las posibles configuraciones alrededor del sitio de interacción definido por los datos bioquímicos y/o biofísicos (Dominguez, Boelens, y Bonvin 2003). Un potencial de restricción es definido para minimizar todas las distancias efectivas hasta un máximo valor de 2Å. Este potencial es armónico hasta una violación de 1Å de distancia y luego cambia dentro de una ventana de 1Å a modo lineal: lo que hace que las fuerzas AIR sean constantes para violaciones mayores a 2Å.

El protocolo de acoplamiento consiste de tres pasos. Acoplamiento rígido dirigido por minimización de energía de las restricciones de interacción (it0), refinamiento semiflexible en el espacio de ángulos de torsión en el cual se permite el movimiento de las cadenas laterales y los átomos del esqueleto de los residuos de la interfase (it1), y finalmente, el refinamiento de dinámica Cartesiana en disolvente explícito, típicamente agua. Los últimos dos pasos son referidos como la etapa de refinamiento.

Durante las etapas del protocolo del acoplamiento se utilizan las siguientes funciones de puntaje:

$$It0: 0.01E_{vdW} + 1.0E_{elec} + 0.01E_{AIR} - 0.01BSA + 1.0E_{desolv}$$

$$It1: 1.0E_{vdW} + 1.0E_{elec} + 0.1E_{AIR} - 0.01BSA + 1.0E_{desolv}$$

$$\text{Agua: } 1.0E_{vdW} + 0.2E_{elec} + 0.1E_{AIR} + 1.0E_{desolv}$$

$E_{AIR}$  es la energía de restricción de interacciones ambiguas, BSA es el área de superficie enterrada (no expuesta) y  $E_{desolv}$  es la energía de desolvatación (Dominguez, Boelens, y Bonvin 2003).

### 4.3.1. $\kappa$ -hefutoxina 1 (HADDOCK)

De la información disponible de la  $\kappa$ -hefutoxina 1 y sus mutantes se sabe que la sustitución, o modificación de los residuos 5, 19 y 22 elimina la capacidad de inhibición de corriente (0%). Se intuye que dichos residuos son necesarios para la unión canal-toxina y por lo tanto se definieron como residuos activos. Por otra parte, los residuos H2, A3, N7, R10, E11, N13, E20 y R21 se propusieron como residuos pasivos puesto que su eliminación o sustitución disminuye la capacidad de inhibir la corriente (Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. 2017).

### 4.3.2. APETx4 (HADDOCK)

Para la toxina APETx4 no hay información disponible de mutantes. Sin embargo, se sabe que la toxina APETx1, con la cual APETx4 comparte 88% de identidad no es capaz de inhibir el canal EAG1 (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017). Así, se supone que los 5 residuos en los cuales difiere APETx4 de APETx1 (K17T, Y18K, S19T, T22S, P31G) son necesarios para la unión canal-toxina y por lo tanto se definieron como residuos activos.

### 4.3.3. Ap1a y Aa1a (HADDOCK)

Ambas toxinas son homólogas y comparten una gran potencia de inhibición por hEAG1 por lo que para definir los residuos activos se propusieron aquellos que comparten y forman la escalera de aminoácidos hidrofóbicos: F6, L7/W7, W9, W29, y W32. Esto parte de la suposición de que el modo de unión energéticamente más favorable situaría dichos aminoácidos hidrofóbicos en la interfase proteína-proteína en vez de situarlos expuestos al disolvente; tal noción ha sido sustentada experimentalmente (Ma y Nussinov 2007).

### 5. Modelado multiescala en paralelo (dinámica molecular)

---

---

- 5.1 Del resultado del acoplamiento en HADDOCK se tomó el mejor modo de unión de las toxinas y se introdujo a PROPKA para optimizar el estado de protonación de los residuos aminoácidos. Se eliminaron los residuos de aminoácidos del canal que corresponden a los dominios citoplasmáticos PAS y cNBHD.
- 5.2 Para construir los sistemas con glicosilaciones en el residuo N388 fue necesario alejar la toxina del canal 0.55 nm en el eje Z (es el eje que atraviesa el poro del canal).
- 5.3 El modelo protonado se introdujo a CHARMM-GUI para ser insertado en una doble membrana lipídica de 706 moléculas de POPC (área de la monocapa de lípidos =  $5.7 \times$  área transversal de hEAG1 en la membrana) con el método de remplazo y ser solvatado con agua y iones  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  con fuerza iónica 0.15 M. El archivo de topología con extensión (.psf) se convirtió al formato de GROMACS con TopoTools de VMD y los archivos de parámetros de CHARMM36: “par\_all36\_carb.prm”, “par\_all36\_lipid.prm” y “par\_all36\_prot.prm”.
- 5.4 En el archivo de topología (.gro) se eliminó la topología correspondiente a las moléculas de POPC atómico y se sustituyó con la topología de POPC de grano grueso.
- 5.5 Se calculó el centro de masa de la toxina, se eliminaron todas las moléculas de agua y iones  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  a más de 6 nm de distancia.
- 5.6 Con la paquetería de SIRAH *tools* (Machado y Pantano 2016) se sustituyeron las coordenadas de los lípidos POPC atómicos (FG) por lípidos de grano grueso POPC del campo de fuerza SIRAH.
- 5.7 En GROMACS se solvató el sistema con el modelo de agua y iones CG de SIRAH para alcanzar una fuerza iónica de 0.15 M y la electroneutralidad del sistema. Para construir el campo de fuerza híbrido solo se añadieron los parámetros de SIRAH v2.0 al campo de fuerza CHARMM36m vMar-2019 y se utilizó un tamaño de paso de 2 fs.
- 5.8 En el archivo de topología se comentaron todas las líneas con el tipo de átomos de CHARMM36 y se referenció directamente el campo de fuerza modificado CHARMM36m-SIRAH.
- 5.9 Se realizó un paso de minimización energética del sistema utilizando cinco pasos del algoritmo “descenso empinado” (*steepest descent*) por cada paso con el algoritmo “gradiente conjugado” (*conjugate gradient*).
- 5.10 Se construyeron archivos de restricción para todos los átomos del esqueleto peptídico de las proteínas del canal, para todos los átomos del esqueleto peptídico de la toxina, para las cuentas BCO (CG) que representan la cabeza polar del POPC ( $-\text{NH}_3^+$ ), para el segmento transmembranal S1 (extremo N-terminal) compuesto por los residuos 210-240.

## Metodología

5.11 Se realizó un paso de 30 ns de equilibración del sistema, se procuró un ensamble NPT con un baróstato Berendsen (1 bar) y un termostato (298 K) por re-escalamiento de velocidades. Se utilizaron todas las restricciones generadas en el paso 5.9; lo que permitió el movimiento de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos, las colas hidrofóbicas de los lípidos y el disolvente. Además, se definieron grupos para el acoplamiento de temperatura: proteína FG, lípido CG, disolvente FG, disolvente CG.

5.12 En un segundo paso de equilibrio de 30 ns se volvió a utilizar Berendsen como baróstato (1 bar) y el re-escalamiento de velocidades como termostato (298 K) para asemejar un ensamble NPT. Sin embargo, se quitaron todas las restricciones en las cabezas polares del POPC.

5.13 Finalmente, en el paso de producción (200 ns) se utilizó un verdadero ensamble NPT con un baróstato Parrinello-Rahman (1 bar) y un termostato (298 K) por re-escalamiento de velocidades. Se quitaron las restricciones que abarcaban todo el esqueleto de la toxina y del canal para mantener solo aquellas que restringían el esqueleto de la primera estructura secundaria del extremo N terminal del canal.

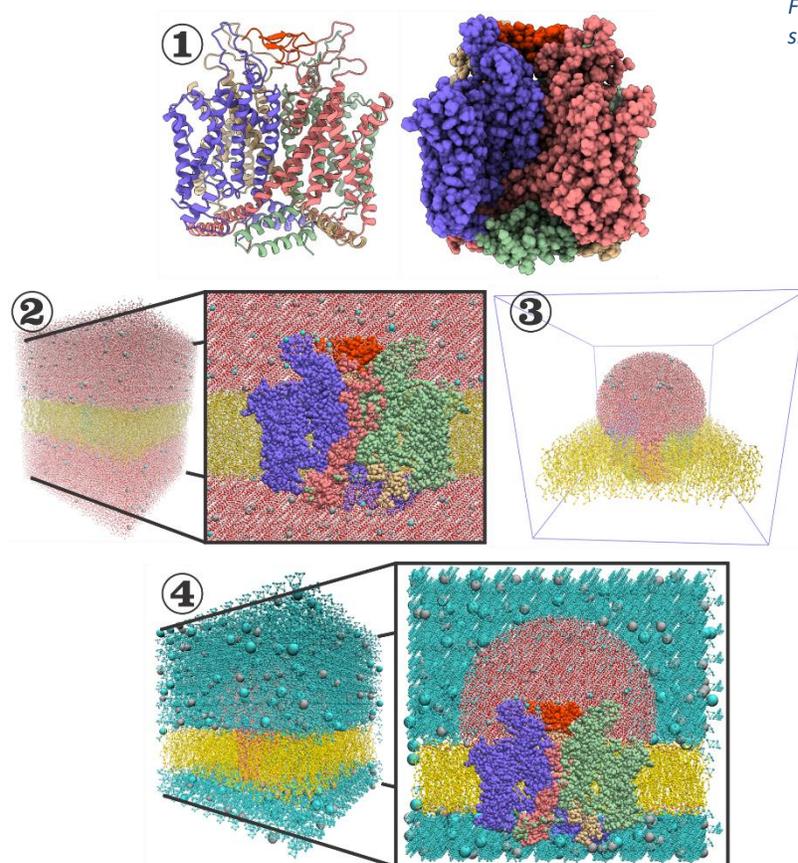


Figura 15. Esquema de la preparación del sistema para la dinámica molecular.

- (1) Modelo obtenido del acoplamiento dirigido. Cada cadena polipeptídica tiene un color. En naranja se muestra la toxina.
- (2) Se adiciona a (1) la bicapa lipídica de POPC (amarillo), agua TIP3P con iones (cian y plata) y, de ser necesario, modificaciones postraduccionales (sistema FG). Se incluye una vista transversal.
- (3) Se elimina el disolvente a más de 60 Å del centro de masa de la toxina. Después, se convirtió la membrana atómica de (2) a CG.
- (4) Sistema multiescala completo. Se solató el sistema (3) con agua CG y iones CG. Se incluye una vista transversal.

## Metodología

---

---

### 6. Análisis de trayectorias (dinámica molecular)

---

---

6.1. Para realizar un aseguramiento de la calidad de las dinámicas se inspeccionaron los términos energéticos del sistema y la estructura de las proteínas a lo largo del tiempo de la corrida de producción (200 ns). Siendo estos la energía potencial, temperatura, presión, radio de giro total y la desviación cuadrática media o RMSD.

6.2. Para posteriores análisis solo se consideraron los últimos 50 ns de la corrida de producción. Aunque el archivo de trayectoria original tenía intervalos de 2ps entre cuadros, para el análisis se redujo el número de cuadros al considerar intervalos de 16 ps, para un total de 3126 cuadros analizados por réplica (3125 cuadros más la configuración en  $t=150$  ns).

6.3. Se utilizó PRODIGY para calcular el número de contactos residuo-residuo a lo largo de las 3126 conformaciones, fue necesario cambiar el umbral para definir un contacto de 0.55 nm a 0.39 nm puesto que la flexibilidad del sitio de unión ya está considerada por la dinámica molecular. Para calcular los contactos de las glicosilaciones con las toxinas se utilizó la paquetería GetContacts (<https://getcontacts.github.io/>).

6.4. Se utilizó la paquetería de R Circlize (Gu et al. 2014) para ilustrar las regiones del canal que interaccionan con la toxina para cada réplica, por claridad se utilizó una transparencia del 95% para las líneas que conectan los residuos, de tal forma que los contactos menos frecuentes son más claros.

6.5. Para ilustrar el número de contactos que tiene un determinado residuo de la toxina a lo largo de los últimos 50 ns de la corrida de producción se construyó una gráfica de caja y bigotes. Además, en dicha gráfica se incluyó el porcentaje de cuadros en el cual el residuo aparece haciendo contactos, esta propiedad se llamará a lo largo del texto como permanencia. Posteriormente, se utilizó dicho porcentaje para calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre réplicas.

6.6. Se utilizó la herramienta de GROMACS gmx cluster con valores predeterminados es decir algoritmo de enlace único y un RMSD de corte de 0.1nm para identificar una estructura representativa de los últimos 50 ns, dicha estructura es aquella que se localiza en el centro del clúster más poblado.

---

### 7. Cálculo de la energía libre de unión de sistemas no glicosilados

---

8.1. Después de 200 ns de simulación multiescala, se convirtió la última configuración de las trayectorias de hEAG1 no glicosilado unido a Ap1a y Aa1a (no se muestran los datos) a representación totalmente CG. Representando los extremos N- y C-terminal de las toxinas con cargas parciales (zwitterion), a excepción del sistema hEAG1 Aa1a md2 Neutral. En la realización de todas las simulaciones posteriores a este paso se utilizó una copia inalterada del campo de fuerza SIRAH v2.0, con un tamaño de paso de 20 fs.

8.2. Se minimizó el sistema, se equilibró en NPT durante 10 ns con termostato de re-escalamiento de velocidades a una temperatura de referencia de 300 K para los grupos: lípidos, proteína y disolvente. Se utilizó el baróstato Parinello-Rahman para mantener la presión en promedio a 1 bar.

8.3. A partir de la configuración inicial CG se realizó una dinámica molecular dirigida (*Steered Molecular Dynamics*) con el ensamble NPT, se aplicó una constante de fuerza del resorte de 1500 kJ/mol nm<sup>2</sup> normal al plano de la membrana sobre las cuentas que representan los átomos del esqueleto peptídico de las toxinas. La tasa de elongación del resorte fue de 0.001 nm/ps. Además se utilizaron restricciones de posición con una constante de 25 kJ/mol nm<sup>2</sup> en los tres ejes de coordenadas en las cuentas que representan los átomos del esqueleto peptídico de hEAG1.

8.4. La distancia entre las toxinas y hEAG1 se determinó a partir de la distancia entre los centros de masa de los átomos del esqueleto peptídico. De las configuraciones obtenidas del paso 7.3, se utilizaron 35-40 configuraciones a lo largo del eje Z (coordenada de reacción); en donde la distancia entre la toxina y hEAG1 difiere  $\approx 0.05$  nm entre cada configuración. En total se cubrió más de 1.7 nm de distancia entre la toxina y el canal hEAG1, partiendo de una configuración unida y terminando en una configuración no unida.

8.5. Cada configuración se equilibró con el ensamble NPT durante 4 ns reiniciando las velocidades iniciales.

8.6. Después de equilibrar los sistemas se realizó un muestreo sombrilla (*umbrella sampling*) de 35-40 ventanas de 10 ns.

8.7. Se utilizó el algoritmo WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*) incorporado en GROMACS (Hub, de Groot, y van der Spoel 2010) para obtener los potenciales de fuerza media (PMF) a lo largo de la coordenada de reacción a partir de las 35-40 ventanas del muestreo sombrilla. Además se incluyó un intervalo de confianza del 95% (suponiendo una distribución normal) a partir del cálculo del error estándar estimado de acuerdo a 100 remuestreos bootstraps. Los resultados se desplazaron tomando la mínima distancia entre la toxina y el canal como cero. De igual manera se desplazó el segundo valor máximo de energía libre (PMF) a cero.

8.8. Como control se siguió el protocolo de Patel y Ytreberg (2018) para utilizar el muestreo sombrilla con el campo de fuerza SIRAH para calcular las energías libres de unión de las mutantes W<sub>H</sub>98F y D<sub>V</sub>101K para un sistema antígeno-anticuerpo (PDBID:3HFM).

8.9. Además, como control positivo se calculó la energía libre de unión de la toxina peptídica bloqueadora del poro "caribdotoxina" con una quimera del canal Kv(1.2-2.1). Partiendo de la estructura del complejo resuelta por criomicroscopía electrónica (PDBID:4JTA).

## Resultados y discusión

---

---

### 1. Construcción del modelo molecular del canal hEAG1:

---

#### 1.1. Selección del modelo del canal hEAG1

El resumen estadístico de los modelos generados se muestra en la Tabla 2. La distribución de los modelos evaluados por RMSD y puntaje SOAP se muestra en la Figura 16. Bajo el supuesto de que el molde depositado en el PDB es la estructura nativa, se supone que, si los átomos de un modelo generado tienen coordenadas similares al molde ese modelo tenderá a ser de mínima energía. Por otra parte, el puntaje SOAP se utiliza como aproximación para obtener la energía de la estructura generada y es independiente de la estructura utilizada como molde. Los modelos seleccionados, que cumplen con una buena relación entre RMSD y puntaje SOAP, tienen la numeración 90500, 91475, 91604, 96277 y 99006 que corresponden a los modelos generados 500, 1475, 1604, 6277 y 6 respectivamente. A partir de la evaluación de dichos modelos en ERRAT se eligieron las asas a refinar. Las regiones refinadas fueron: 90500 (asa S5- $\alpha$ -hélice'379-409), 91475 (asa S5- $\alpha$ -hélice'379-390), 91604 (asa S5- $\alpha$ -hélice-asa S5'379-418, SF'436-447), 96277 (asa S3-S4'313-318, asa S5- $\alpha$ -hélice-asa S5'379-418) y 99006 (asa S1-S2'242-247,  $\alpha$ -hélice-asa S5'400-418, SF'436-446). En general todos los 101 modelos refinados de 91475 tienen el menor RMSD (0.121 Å en átomos C y CA) en la región del asa del poro. El modelo seleccionado para una posterior minimización fue el 91475\_001, por su RMSD con el molde refinado con SCWRL4 (1.426 Å en átomos C, N, O, CA).

Tabla 2. Resumen estadístico de los modelos de hEAG1 generados por MODELLER

Modelos hEAG1 N = 10,008	Media	SD	Mínimo	Mediana	Máximo
Puntaje SOAP	-245,214	4,327	-263,397	-245,248	-227,954
RMSD (Å)	3.64	0.72	1.41	3.62	6.89

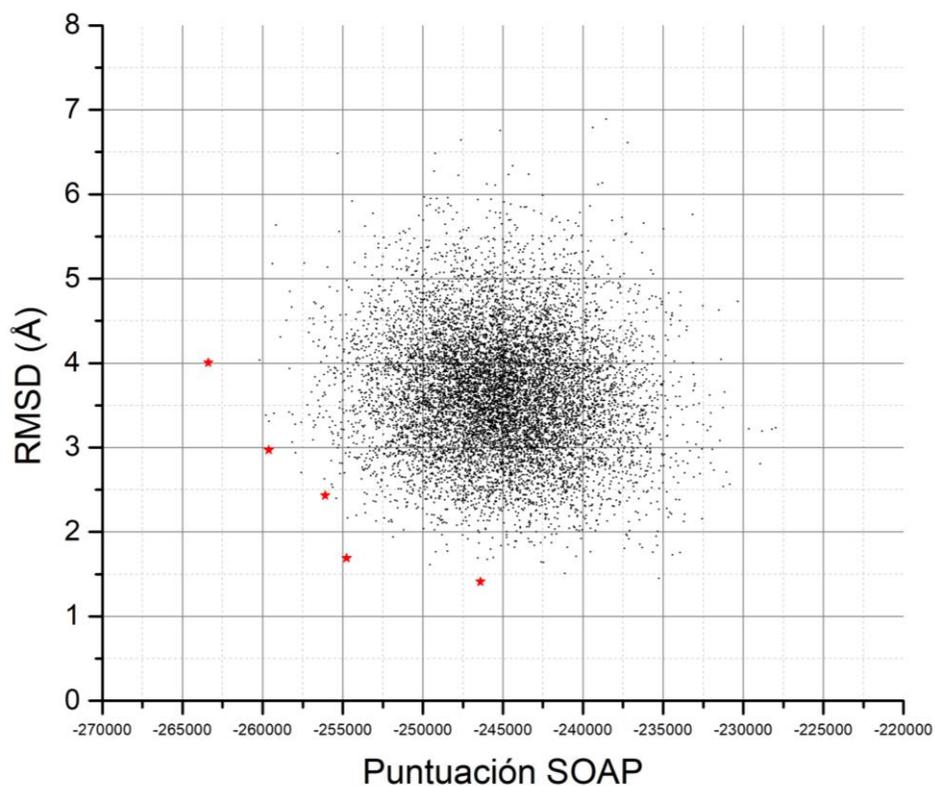


Figura 16. Distribución de los 10,008 modelos generados para hEAG1. En rojo se resalta la posición en la gráfica de los 5 modelos seleccionados para refinamiento de asas.

### 2. Construcción de los modelos moleculares de los péptidos inhibidores

---

Para elegir la estructura a minimizar a partir de las toxinas modeladas se buscó una buena relación entre el puntaje DOPE más bajo y el RMSD (N,CA,C,O) más bajo con respecto a las estructuras moldes refinadas por SCWRL4. Los modelos seleccionados y su RMSD fueron los siguientes: Ap1a 93852 (0.251 Å), APETx4 96248 (0.361 Å), k-hefutoxina 2 99181 (0.265 Å), k-hefutoxina 3 98892 (0.310 Å),  $\Delta$ 1-k-hefutoxina 1 93936 (0.223 Å),  $\Delta$ 1,2-k-hefutoxina 1 97983 (0.345 Å), Y5A-k-hefutoxina 1 90784 (0.236 Å), K19A-k-hefutoxina 1 93196 (0.301 Å).

## Resultados y discusión

### 3. Preparación de los modelos seleccionados

#### 3.1. Minimización

Para todos los modelos se obtuvo una energía potencial negativa en el orden de  $10^5 \text{kJ/mol}$  lo que sugiere que la construcción del sistema no presenta sobreposiciones severas entre átomos, de tal forma que la fuerza máxima que experimentan dos átomos en el sistema es del orden de magnitud de  $10^2 \text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm})$ , por lo tanto todos los sistemas son lo suficientemente coherentes para una posterior simulación por dinámica molecular, ver Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los resultados de la minimización

Nombre de la estructura	Energía potencial $\text{kJ/mol}$	Fuerza máxima $(\text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{nm}))$	Norma de la fuerza
hEAG1	$-9.39 \times 10^6$	$4.47 \times 10^2$	3.31
Aa1a	$-2.33 \times 10^5$	$1.45 \times 10^2$	2.88
Ap1a	$-2.58 \times 10^5$	$3.67 \times 10^2$	4.63
APETx1	$-2.29 \times 10^5$	$1.42 \times 10^2$	2.76
APETx4	$-2.22 \times 10^5$	$2.18 \times 10^2$	3.48
k-hefutoxina 1	$-1.40 \times 10^5$	$2.07 \times 10^2$	3.94
k-hefutoxina 2	$-1.44 \times 10^5$	$2.56 \times 10^2$	4.31
k-hefutoxina 3	$-1.41 \times 10^5$	$2.00 \times 10^2$	3.82
$\Delta$ 1-k-hefutoxina 1	$-1.43 \times 10^5$	$1.92 \times 10^2$	3.63
$\Delta$ 1,2-k-hefutoxina 2	$-1.40 \times 10^5$	$1.85 \times 10^2$	3.56
Y5A-k-hefutoxina 1	$-1.44 \times 10^5$	$1.97 \times 10^2$	3.76
K19A-k-hefutoxina 1	$-1.33 \times 10^5$	$2.31 \times 10^2$	4.27

En la Figura 17 se muestra la gráfica de energía potencial para hEAG1, que es el sistema más grande y con menor energía potencial, en ella se puede observar que la curva tiene un comportamiento suave y aparentemente converge hacia un equilibrio. Curvas con comportamiento similar se obtuvieron para todas las estructuras, esto indica que las estructuras bien podrían pertenecer a un mínimo local del espacio conformacional de la proteína.

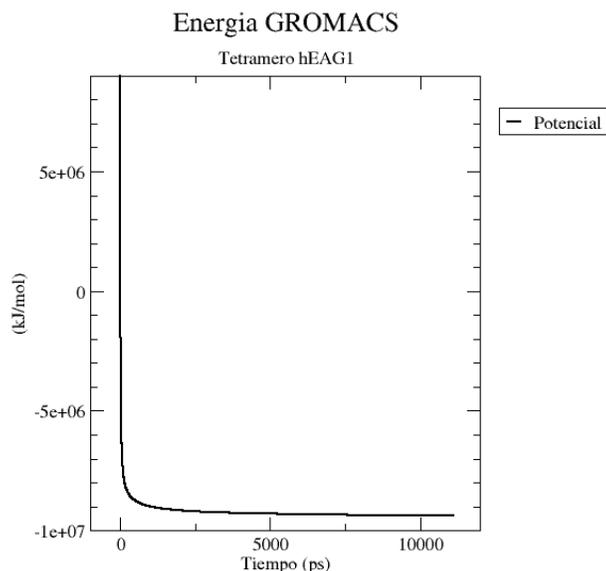


Figura 17. Gráfica de la energía potencial del canal hEAG1

### 3.2. Evaluación de la calidad de los modelos y molde por MolProbity

El análisis de la estructura del modelo minimizado de hEAG1 en MolProbity, ver Tabla 4, resaltó un incremento en el número de residuos con posiciones poco favorecidas en el gráfico de Ramachandran, ver Figura S14; 58 en todo el tetrámero y 27 residuos en zonas que se suponen en contacto con el líquido extracelular. Cabe destacar que los residuos con ángulos  $\phi$  y  $\psi$  atípicos no se encuentran distribuidos de igual manera en todas las cadenas. Esto sugiere que formado el tetrámero, previo al paso de la minimización, dichos residuos se encontraban en posiciones de muy alta energía; de tal forma, que la relocalización de átomos a pesar de no estar favorecida por las energías de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  fue favorecida por energías no enlazantes. Asimismo, el tetrámero utilizado como molde tuvo más choques estéricos que el monómero molde (mayor *clashscore*), lo que podría ser un reflejo de la baja resolución (3.78Å) a la cual se obtuvo dicha estructura particularmente en la interfase entre monómeros.

El puntaje de MolProbity representa, en un número, la estadística de calidad de una proteína; se basa en el número de colisiones, el porcentaje de residuos Ramachandran no favorecidos, el porcentaje de rotámeros no favorecidos y porcentaje de rotámeros de cadena lateral no favorecidos. Así, una estructura con un puntaje de MolProbity menor que la resolución cristalográfica a la que se obtuvo es de mejor calidad que una estructura promedio a esa resolución (Chen et al. 2010). Entonces, como se puede observar en la Tabla 4, con base en el puntaje de MolProbity se han obtenido estructuras de calidad aceptable.

## Resultados y discusión

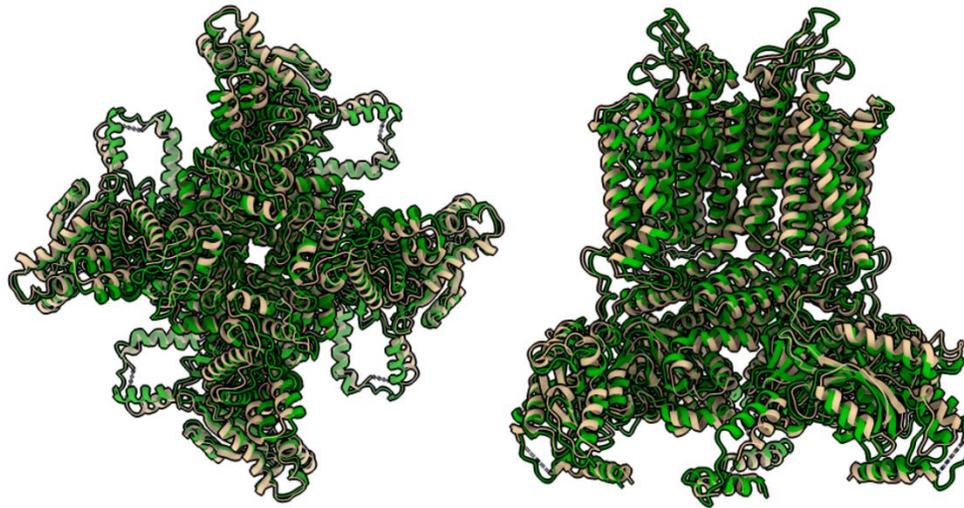


Figura 18. Superposición del molde utilizado canal rEAG1 (PDB: 5K7L) en café y el modelo construido y minimizado del canal hEAG1 en verde.

Tabla 4. Calidad de las estructuras generadas y el molde rEAG1

Nombre de la estructura	Clashscore <sup>†</sup>	Valores atípicos de Ramachandran	Puntaje de MolProbity
rEAG1 cadena A (PDB:5K7L)	3.25	1 (0.14%)	1.58
rEAG1 tetrámero (PDB:5K7L)	42.18	4 (0.14%)	2.78
hEAG1 tetrámero	1.15	58 (2.04%)	1.76
Aa1a	0	0(0%)	1.49
Ap1a	0	0(0%)	1.15
APETx1	0	1(2.50%)	1.44
APETx4	0	1(2.50%)	1.42
k-hefutoxina 1	0	0(0%)	1.05
k-hefutoxina 2	0	0(0%)	1.05
k-hefutoxina 3	0	0(0%)	1.04
Δ1-hefutoxina 1	0	0(0%)	1.41
Δ1,2-hefutoxina 1	0	0(0%)	0.50
Y5A-k-hefutoxina 1	0	0(0%)	0.50
K19A-k-hefutoxina 1	0	1(5.00%)	1.77

<sup>†</sup>El clashscore se define como el número de choques estéricos desfavorables entre átomos, mayores o iguales a 0.4 Å, por cada 1000 átomos

## Resultados y discusión

### 4. Acoplamiento molecular hEAG1 y toxinas

Puesto que el canal hEAG1 es un homotetrámero y suponiendo que las toxinas tienen un solo sitio de unión con el canal hEAG1, como sugieren los coeficientes de Hill con valor  $n_{Hill} \approx 1$  (con excepción de APETx4), es de esperar que el sitio de unión de la toxina, si aparece en los acoplamiento, no cumpla con una simetría rotacional de orden 2, 3, 4 o mayor (repetición cada  $180^\circ$ ,  $120^\circ$  y  $90^\circ$ ) sin que ocurra una superposición. Sin embargo, puesto que el acoplamiento no considera cambios conformacionales del canal asociados a la unión de una sola toxina, que ocurrirían si hubiera un mecanismo alostérico, se propone que la probabilidad de que un modo de unión sea correcto decrece con el producto del orden de su simetría rotacional y el radio con respecto al origen o centro del canal. Esta restricción conceptual se satisface en la interfaz entre más de 2 monómeros del canal, Figura 19. Los resultados generales todos los acoplamiento globales se muestran en las Figuras suplementarias 12 y 13 en el apéndice.

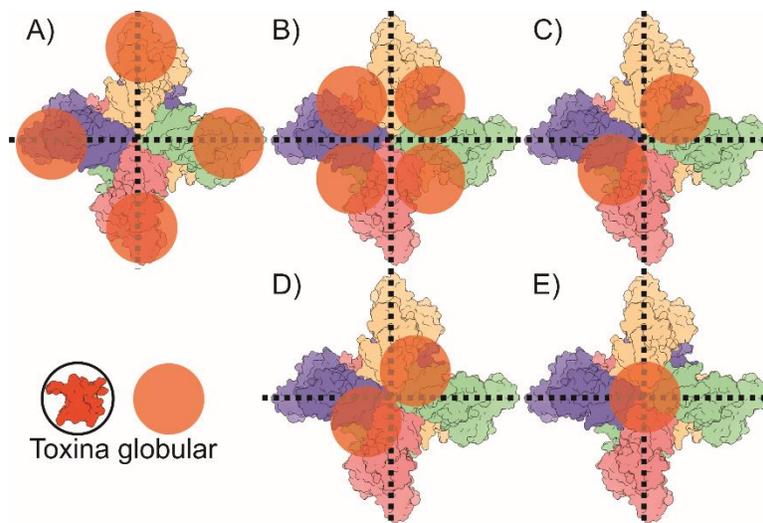


Figura 19. Esquema de la probabilidad de un modo de unión de un péptido (naranja) en un canal homotetrámero; cuando  $n_{Hill} \approx 1$ . La probabilidad de que el modo de unión sea correcto  $P(X)$  crece con el número de interfaces involucradas, así como con la cercanía al poro de tal forma que:  $P(A) < P(B) \leq P(C) < P(D) < P(E)$ .

Es necesario aclarar que los programas de acoplamiento global utilizados no tienen soporte para extremos C-terminales amidados, lo que podría influir significativamente en la exactitud de los modos de unión de Aa1a, Ap1a y algunas k-hefutoxinas.

## Resultados y discusión

En la Figura 20 se muestra como se realizó el análisis de modos de unión de las toxinas y las energías libres de unión asociadas. El color rojizo representa una energía de unión más favorable que uno amarillo. En la columna izquierda de la Figura 20 es evidente que pyDockWEB propone muchos modos de unión en una región no accesible a la toxina (a la mitad del poro del canal) y en la región transmembranal; no obstante, aunque son pocos existen modos de unión rojizos (de energía comparable) en la región del vestíbulo extracelular lo que podría ser un indicativo de un bajo muestreo en la zona.

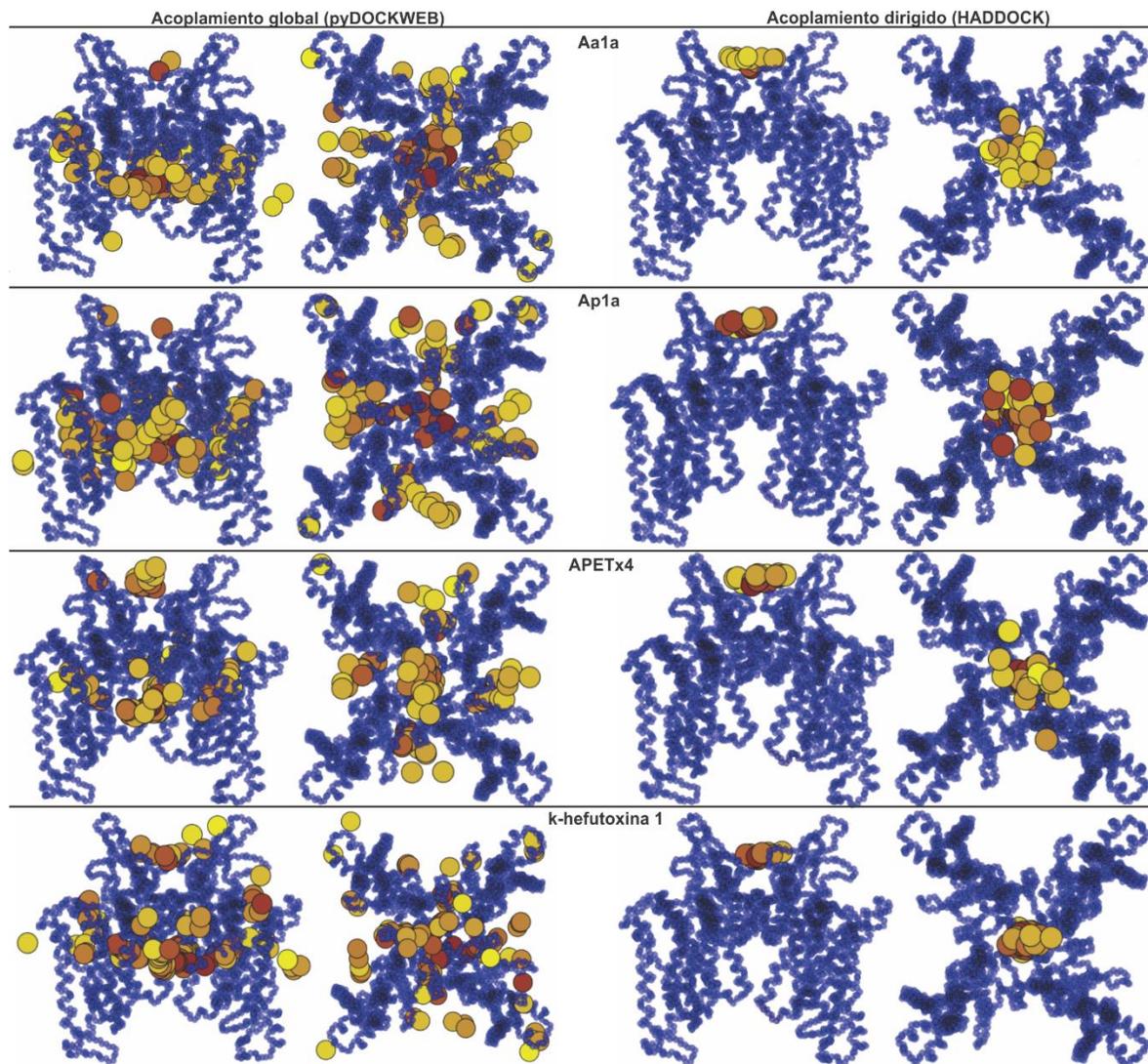


Figura 20. Diferencia entre el acoplamiento global con pyDockWEB y el acoplamiento dirigido con HADDOCK. Se muestra el centro de masa de las toxinas en los modos de unión propuestos. En azul se muestra el esqueleto del canal hEAG1, en colores rojizos se ilustran los modos de unión mejor evaluados por PRODIGY mientras que en amarillo los peor evaluados.

## Resultados y discusión

---

---

El programa HADDOCK tiene un protocolo riguroso para dirigir el acoplamiento con base en información experimental y además refina los modos de unión implementando movilidad en las cadenas laterales y acepta extremos C-terminales amidados. Sin embargo, debido a la falta de información experimental sobre el sitio de unión en el canal hEAG1 se hizo un análisis de los mejores modos de unión propuestos en el acoplamiento global basándonos en tres suposiciones iniciales: 1) un solo sitio de unión, 2) el sitio de unión debe estar en el espacio extracelular y 3) no existen grandes cambios de conformación en la estructura de las proteínas para que se lleve a cabo la unión (tal suposición es mandatoria en la teoría del acoplamiento). Con base en la tercera suposición, se propuso que existen residuos del canal que preferencialmente y por complementariedad con la geometría globular de la toxina son claves en la interacción proteína-proteína. Para obtener una medida de si la geometría globular favorece la interacción de algún residuo del canal se dividió el número de contactos de cada residuo entre la suma del número de contactos total que tiene el canal en un modo de unión y así normalizar la contribución de todos los residuos del canal en un modo de unión a 1 (frecuencia relativa). Para todos los mejores modos de unión extracelulares (rojizos pyDockWEB y ClusPro) de una toxina se obtuvo la frecuencia relativa de cada residuo del canal y se agrupó en una gráfica de barras (un acumulado de frecuencias relativas); los resultados del análisis se muestran en la Figura 21.

De la Figura 21 se muestra que existe una tendencia de los residuos M397 y D398 por participar en los modos de unión más rojizos independientemente de la toxina globular evaluada; mientras que la región comprendida por los residuos 390-396 parece reflejar una baja accesibilidad a la geometría de las toxinas globulares. Por otra parte, para las k-hefutoxinas (las toxinas de menor tamaño en el presente estudio) la interacción con el residuo R244 parece estar muy favorecida por su geometría, mientras que en las terafotoxinas Ap1a y Aa1a es el residuo G400. Finalmente, la disposición espacial de N388 le permite al residuo tener una contribución muy modesta pero consistente en la mayoría de las toxinas, sin embargo, ninguno de los programas de acoplamiento utilizados permite evaluar la contribución de la glicosilación en N388 en la energía de unión. Sustentados en el análisis de frecuencias se definieron los residuos M397, D398 y R244 como pertenecientes al sitio de unión en el programa HADDOCK.

# Resultados y discusión

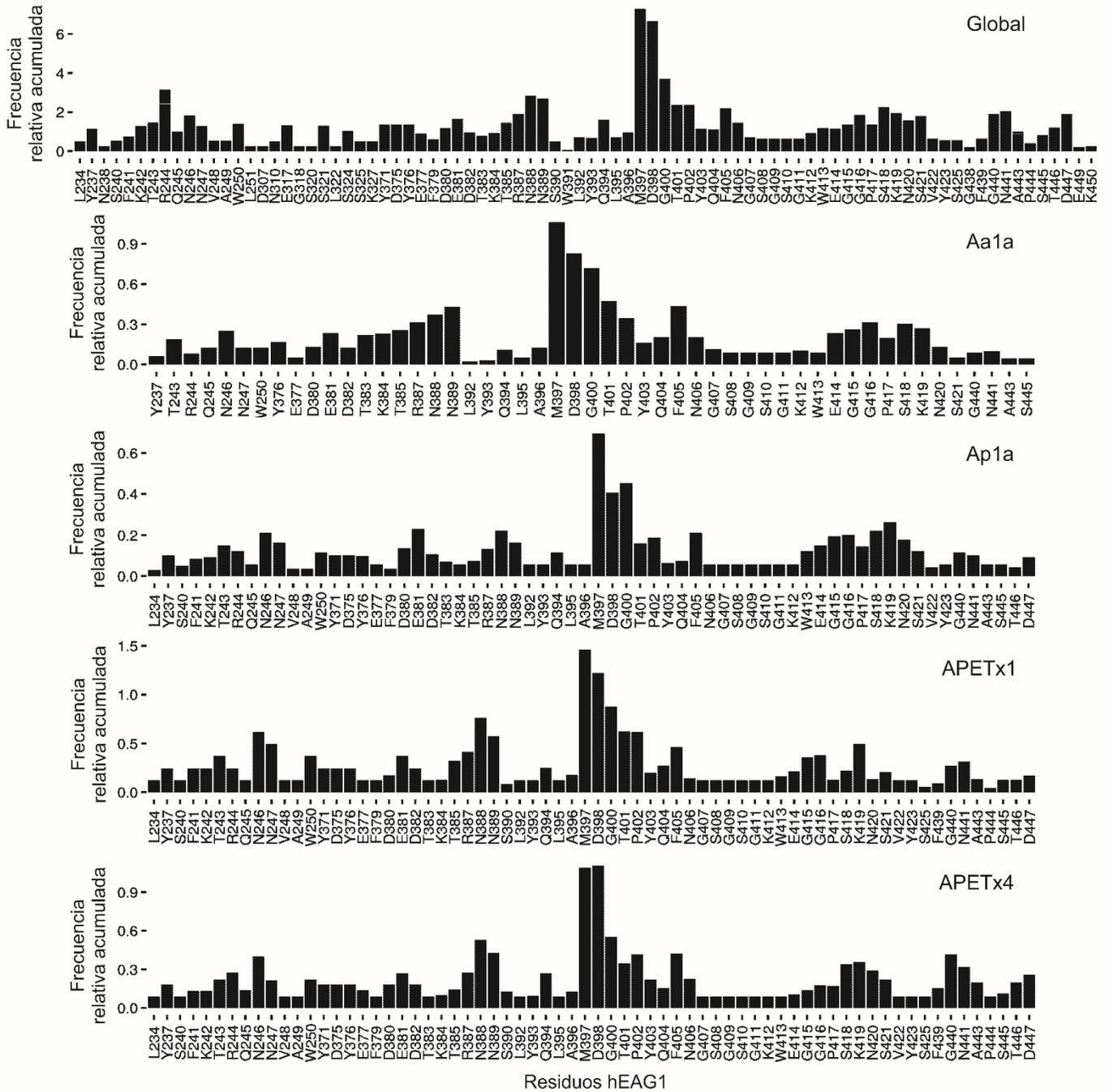
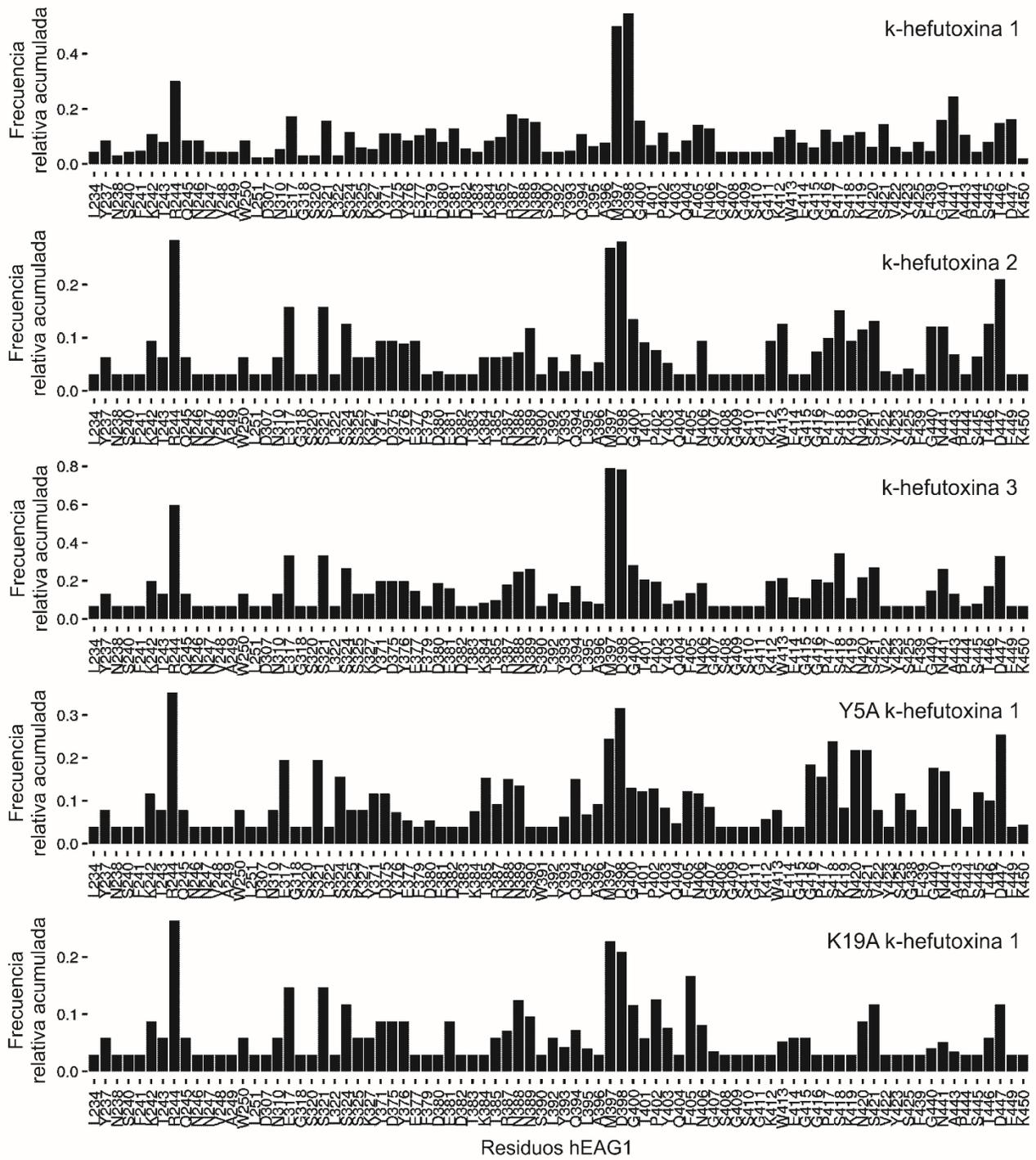


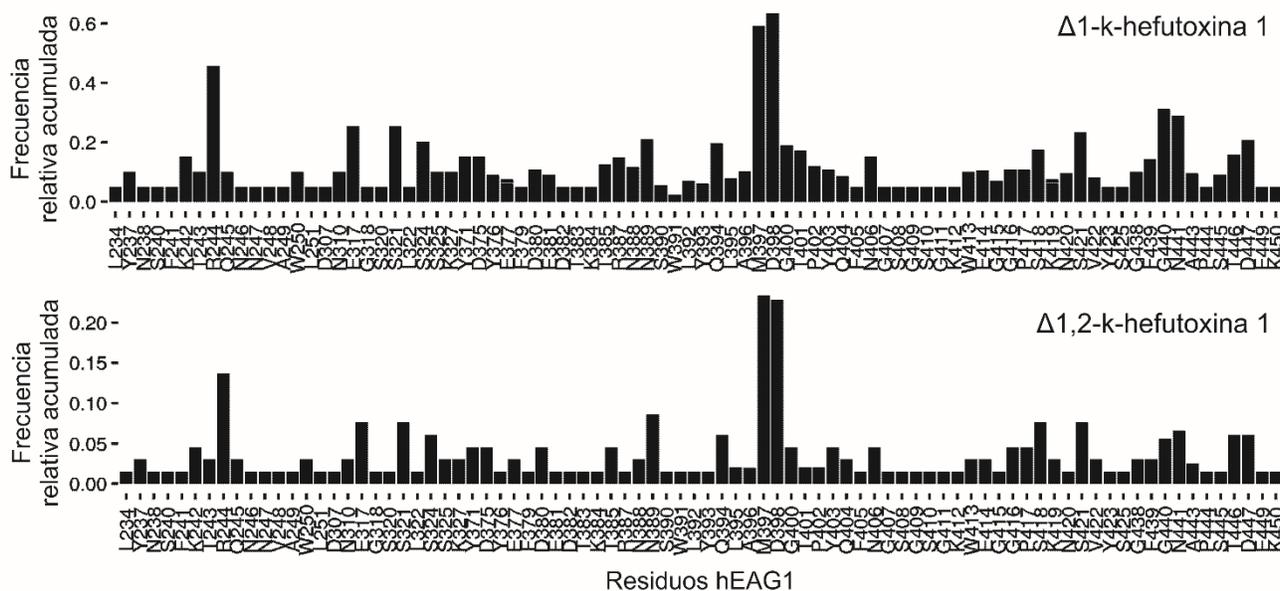
Figura 21. Gráfica de barras que representa la suma para cada modo de unión del número de contactos de cada residuo del canal hEAG1 entre el número de contactos totales. La escala del eje de las ordenadas es proporcional al número de modos de unión considerados para hacer la gráfica.

# Resultados y discusión



... continúa Figura 21.

## Resultados y discusión



... continúa Figura 21.

Los residuos de las toxinas definidos como activos se identificaron por un análisis comparativo de las secuencias de proteínas en las mutantes reportadas de k-hefutoxina 1 (G1, H2, Y5, K19, C22) (Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. 2017) y entre la toxina APETx4 y su homóloga inactiva APETx1 (K17, Y18, S19, T22, P31) (ver capítulo 2.2.2.). Para el caso de las toxinas homólogas Aa1a y Ap1a ambas comparten la propiedad de inhibición del canal hEAG1, del análisis de secuencia (ver capítulo 2.2.3.) se ve que existe una “escalera hidrofóbica” (Ma et al. 2018) entre ambas toxinas compuesta por los residuos F6, L7 o W7, W9, W29 y W32; tales residuos se definieron como activos ya que se supuso que el modo de unión más favorable energéticamente tendría dichos residuos hidrofóbicos en contacto con la interfase del complejo en vez de exponerlos al disolvente acuoso (Ma y Nussinov 2007).

El posterior acoplamiento dirigido en HADDOCK (Figura 20) sugiere que se realizó un muestreo más exhaustivo en la región del vestíbulo extracelular; los modos de unión más favorables de HADDOCK resultaron muy similares a al menos uno de los mejores modos de unión de pyDockWEB y en algunos casos a los mejores modos de unión de ClusPro. Los modos de unión del acoplamiento dirigido consistentes con los del global se analizaron exhaustivamente con LigPlot+ lo que permitió elegir un solo modo de unión para cada toxina que a su vez era altamente consistente con la información disponible, tales relaciones se pueden ver en la Figura 22.



## Resultados y discusión

---

---

### Modelos de unión propuestos Aa1a y Ap1a

Para las toxinas Aa1a y Ap1a (Figura 22 I-II) todos los residuos definidos como activos están involucrados en el modelo, sin embargo, el residuo del canal R244 que previamente se propuso como activo no aparece, esto podría ser consecuencia de una incompatibilidad geométrica para cumplir con las otras restricciones; HADDOCK tiene la capacidad de descartar hasta la mitad de los residuos activos si estos son incompatibles con un modo de unión de baja energía.

De acuerdo al modelo propuesto, el residuo K5, presente en ambas toxinas está involucrado en un puente salino con el residuo D398 del canal, mientras la R11 de la toxina estabiliza el complejo con puentes de hidrógeno, ver Figura 22 I-II. Aunque ambas toxinas comparten 81% de identidad de secuencia parece que la unión de Aa1a es más dependiente de la estabilización hidrofóbica por los residuos del canal, mientras que Ap1a depende en mayor medida de los puentes de hidrógeno.

Un comportamiento interesante de estas toxinas fue reportado previamente (Ma et al. 2018), mientras que Ap1a es más potente que Aa1a, con un  $IC_{50}$  de  $236 \pm 21$  nM contra  $637 \pm 59$  nM respectivamente, se enfatizó que Ap1a no inhibe completamente la corriente eléctrica de hEAG1 como si sucede con la unión de Aa1a. El modelo de unión propuesto sugiere la siguiente explicación basado en los residuos del canal involucrados en contactos.

Aa1a depende de tres de los cuatro residuos N388 de la estructura tetramérica, tales residuos contribuyen con interacciones hidrofóbicas y uno está disponible para formar dos puentes de hidrógeno con la cadena lateral de R11; mientras que Ap1a solo tiene una interacción: un puente de hidrógeno con N388. Esto sugiere que la unión con Ap1a es muy dependiente del estado de glicosilación de N388 y debido a que EAG1 es expresado como una población heterogénea de canales N-glicosilados (Napp et al. 2005) la toxina no puede inhibir toda la señal de corriente en los experimentos de electrofisiología en célula completa (*whole-cell patch-clamp*). De acuerdo con esto, los residuos N388 contribuyen principalmente con contactos hidrofóbicos en Aa1a y, como tales, estos contactos serán menos afectados por el estado de glicosilación en la cadena lateral. Debido a que la N-acetil glicosilación varía con el sistema de expresión y porque no es considerada en el protocolo de acoplamiento no se puede especular si la glicosilación de N388 favorecería la unión con Ap1a. Un análisis comparativo entre las energías libres de unión de la dinámica molecular del canal hEAG1 glicosilado y no glicosilado sugeriría cual estado del canal favorece la unión o si la propuesta es incorrecta.

## Resultados y discusión

---

---

### Modelo de unión propuesto para APETx4

El modelo obtenido contiene todos los residuos definidos como activos para la toxina (K17, Y18, S19, T22, P31) pero no el residuo del canal R244 definido como activo (Figura 22 III). De acuerdo al modelo, el residuo de K17 podría estar involucrado en un puente de hidrógeno o una interacción de puente salino con D398, mientras que el residuo L34 de la toxina está involucrado en un puente de hidrógeno con D398 de otro monómero del canal. Todos los residuos aromáticos de la toxina están estabilizados por interacciones hidrofóbicas con varios residuos del canal, particularmente los residuos de la toxina F33, Y18 y Y32. Una comparación previa entre la secuencia de APETx4 con varias toxinas modificadoras del *gating* (*gating modifiers*) predijo que los residuos hidrofóbicos Y32, F33 y L34 eran esenciales para la unión con EAG1 (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017) y en el mismo estudio se propuso que la toxina homóloga (APETx1) se unía por una interacción electrostática con el residuo E518 del canal homólogo hERG1 y diversas interacciones hidrofóbicas. Así concluimos que el modelo de acoplamiento es consistente con la información disponible correspondiente a las secuencias peptídicas y su geometría globular y sugiere a su vez que el residuo de la toxina K17 es necesario para que toxina distinga entre hEAG1 y hERG1.

El modelo de unión de APETx4 se descarta para el análisis de dinámica molecular posterior. APETx4 es una toxina promiscua que inhibe tanto canales de sodio como canales de potasio, es probable que su mecanismo de inhibición no sea muy conservado. Esto también se refleja en un análisis comparativo con su homólogo APETx1 y el canal homólogo hERG1, mientras que APETx4 tiene un  $IC_{50} \approx 1\mu\text{M}$  con el canal hEAG1; APETx1 con 88% de identidad tiene un  $IC_{50} \approx 34\text{ nM}$  en el canal hERG1 y no inhibe significativamente a hEAG1 a concentraciones de  $10\mu\text{M}$  (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017). Los resultados de acoplamiento global no sugieren un modo de unión sobre las asas extracelulares del VSD, en principio, el sitio de unión de APETx4 podría estar constituido de la región transmembranal del canal y por lípidos de la membrana celular, ver Figuras suplementarias 12 y 13. Finalmente, es necesario enfatizar que la dinámica molecular y los análisis computacionales son siempre complementarios a la información de laboratorio húmedo, por consiguiente, es improductivo validar un modelo de acoplamiento de un solo sitio de unión cuando APETx4 tiene reportado un  $n_{Hill} \approx 4$ .

## Resultados y discusión

---

---

### Modelo de unión propuesto para k-hefutoxina 1

Todos los residuos de la toxina definidos como activos se muestran involucrados en las interacciones intermoleculares del diagrama de LigPlot+ (Figura 22 IV). Incluso en el modo de unión de la k-hefutoxina 1, el residuo del canal R244 no está involucrado en una interacción intermolecular y probablemente su presencia en los histogramas (Figura 21) es un indicador de un alto umbral de PRODIGY para definir un contacto intermolecular (al menos en el comportamiento predeterminado), no obstante, el modelo es altamente consistente con las observaciones experimentales del trabajo de Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. (2017). Las variantes mutadas de k-hefutoxina 1: K19A k-hefutoxina 1 y Y5A k-hefutoxina 1 mostraron una pérdida total de la potencia de inhibición y de acuerdo con esto, nuestro modelo muestra al residuo K19 en un puente de hidrógeno con M397 mientras Y5 de la toxina forma un puente de hidrógeno con D398 que a su vez dirige D398 hacia el residuo H2 de la toxina para formar un puente de hidrógeno.

La importancia del residuo C22 se explica por su interacción hidrofóbica con M397 y D398. Una inspección visual de la estructura de k-hefutoxina 1 reveló que su extremo C-terminal amidado tiene un puente de hidrógeno (3.10 Å) con el residuo D398 del canal, esta interacción no fue detectada por LigPlot+ (ya que no reconoce extremos amidados) todas estas interacciones explicarían por qué k-hefutoxina 2 (ver Figura 10, capítulo 2.2.2.1.) con 96% de identidad de secuencia es incapaz de inhibir Kv10.1.

Aparentemente, k-hefutoxina 1 no dirige uno de sus residuos cargados hacia el poro del canal, como se ha descrito para otras toxinas de escorpión (Olamendi-Portugal et al. 2016); sin embargo, un mecanismo eficiente conservado de inhibición no es esperado ya que hEAG1 no es el verdadero blanco de la toxina como puede inferirse de su  $IC_{50}$  en el intervalo micromolar (Moreels, Peigneur, Yamaguchi, et al. 2017) y por una falta de fenotipo letal o incapacitante en los ratones deficientes de actividad mEAG1 (Ufartes et al. 2013). Es posible refinar el modo de unión con dinámica molecular para evaluar si K19 se dirige preferencialmente al poro o a M397 considerando la flexibilidad de las proteínas.

## Resultados y discusión

---

---

### Comparación de modelos propuestos con modelos actuales de inhibición

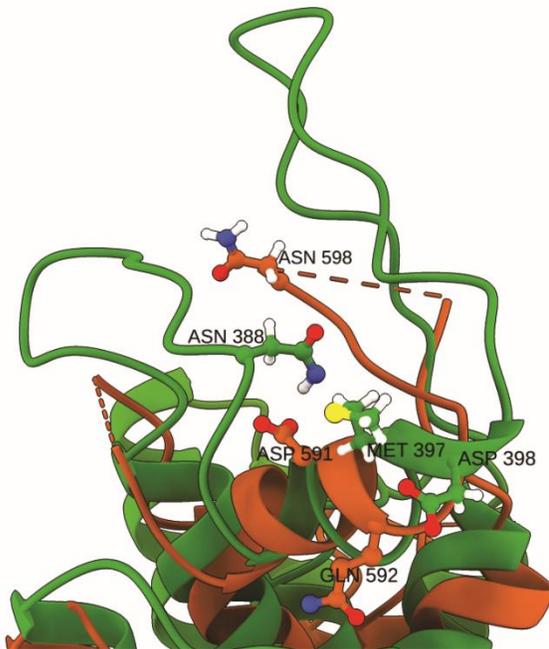
En relación a los resultados obtenidos en los acoplamientos globales, resulta interesante proponer como sitio de unión al centro del canal o región del vestíbulo extracelular para aquellas toxinas con  $n_{Hill}=1$ . Primero, la familia de canales EAG (que incluye a EAG, ERG y ELK) no tiene un conector helicoidal S4-S5 que entrelace sus unidades monoméricas, por lo que un mecanismo de *gating* basado en el conector helicoidal S4-S5 impulsado por los dominios sensores de voltaje es descartado (Wang y MacKinnon 2017). El actual modelo propuesto de *gating* contempla una “compresión” de S4 sobre S5 y S6 que cierra el canal (Wang y MacKinnon 2017), dicho cambio conformacional dependería en menor medida de la movilidad de las asas cortas extracelulares E1(S1-S2) y E2(S3-S4) que forman parte del dominio sensor de voltaje; lo que dificultaría la inhibición por la unión de un solo péptido globular a una asa extracelular E1 o E2. Siguiendo el principio de la navaja de Ockham se prefirió estudiar la viabilidad del mecanismo más simple: un solo sitio de unión a proteína globular. Por otra parte, del análisis de los contactos de la interface entre el canal-toxina, resalta que a mayor número de contactos en la región de la hélice  $\alpha$  anfipática (comprendida entre los residuos 388-400) se obtiene una energía de unión menor. En este aspecto, se resalta que el residuo M397 en hEAG1 es sustituido por el residuo L397 en rEAG1, lo que enfatiza la importancia de realizar un modelado por homología de una proteína blanco.

## Resultados y discusión

---

---

Segundo, aunque se ha propuesto que los modificadores del *gating* se unen en regiones o asas extracelulares del VSD puesto que no inhiben totalmente la corriente y desplazan el voltaje de activación (Hill et al. 2007), las energías de afinidad de unión obtenidas para hEAG1 en general sugieren que el sitio de unión de las toxinas no se encuentra sobre un dominio VSD. En un estudio realizado por Pardo-Lopez, Zhang, et al. (2002), en el canal homólogo hERG1 y la toxina globular ErgTx (CnErg1) de 42 residuos, se identificó el sitio de unión de la toxina en residuos en la “torreta” extracelular en la  $\alpha$ -hélice anfipática de la región del asa S5-P del vestíbulo externo, ver Figura 23. Se ha propuesto que existen cambios conformacionales en el asa S5-P durante despolarizaciones de la membrana que desestabilizan la unión de CnErg1, además se ha demostrado que la  $\alpha$ -hélice anfipática, localizada en el vestíbulo extracelular es una región dinámica (Jiang et al. 2005) y cuyos residuos están involucrados en la unión con CnErg1 (Pardo-Lopez, Zhang, et al. 2002), una estructura  $\alpha$ -hélice similar se encuentra en EAG1 (388-400) y la identidad de secuencia no está altamente conservada. Lo que a su vez sugiere que la especificidad de la unión toxina-canal podría estar relacionada a los residuos M397 y D398 que en hERG1 se sustituyen por los residuos D591 y Q592, ver Figura 23. Una sorpresa fue que la toxina CnErg1 no tapa completamente el poro de hERG1, solo llega a inhibir aproximadamente el 90% de la corriente control y además desplaza el voltaje de activación  $V_{0.5}$  de  $-15.1 \pm 1.6$  mV a  $-1.6 \pm 2.9$  mV (Hill et al. 2007).



*Figura 23. Alineamiento estructural entre monómeros del canal hEAG1 (verde) construido por modelado por homología y el canal hERG PDB:5VA1 (café). Se presenta la  $\alpha$ -hélice anfipática que contiene los residuos M397 y D398 en hEAG1 mientras que en hERG contiene los residuos D591 y Q592. Además se muestran los aminoácidos N388 y N598 que son sitio de glicosilación y se encuentran en asas opuestas de la  $\alpha$ -hélice. El aminoácido N598 se adicionó manualmente con fines ilustrativos. En el asa equivalente a la que contiene N598 en hERG se encuentra el aminoácido N406 en hEAG1 que es sitio de una glicosilación compleja.*

## Resultados y discusión

---

---

Oculto entre líneas de la literatura se tiene un ejemplo de un modelo de inhibición dependiente del estado de glicosilación. Primero, en el estudio de Pardo-Lopez, Garcia-Valdes, et al. (2002) se estudió la unión de CnErg1 a una mutante de hERG1 N598Q que tenía un 60% de inhibición de corriente por CnErg1 en comparación con la silvestre con 80% de inhibición, de tal forma se concluyó en dicho estudio que N598 era parte del sitio de unión. Sin embargo, un estudio posterior determinó que el residuo N598 en hERG1 está glicosilado (Gong et al. 2002), lo que sugiere que la glicosilación estabiliza la unión de la toxina CnErg1 (al menos en mayor medida que una glutamina) en el vestíbulo extracelular, ver Figura 23.

La información de CnErg1 sugiere un único sitio de unión con el canal. Con base en ajustes de curvas a partir de datos cinéticos, para obtener constantes de velocidad, se propuso un modelo de inhibición que explica por qué no es posible alcanzar el 100% de inhibición de la corriente eléctrica. Dicho modelo contempla la formación de al menos un intermediario no productivo del complejo canal-toxina (ver Figura 24); no se descarta la posibilidad de que el mecanismo sea común para inhibidores de hERG1 que no alcanzan el 100% de inhibición en condiciones saturantes (Hill et al. 2007). Finalmente, nuestro modelo de inhibición con Ap1a y Aa1a podría ser consistente con un estado intermediario no productivo dependiente de las interacciones entre la glicosilación de N388 y la toxina. Con el fin de refinar el modelo de inhibición se realizaron dinámicas moleculares con diferentes estados de glicosilación del residuo N388 con la toxina Ap1a y otra con N388 glicosilado y Aa1a. Se eligió la toxina Ap1a puesto que es la más potente de las toxinas consideradas en este estudio y Aa1a por ser su homóloga.

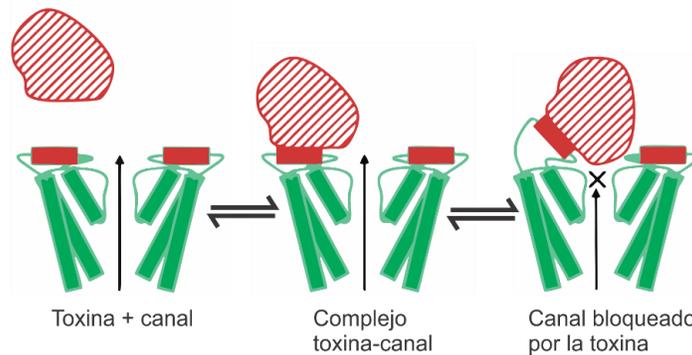


Figura 24. Esquema del modelo de inhibición de hERG por unión de CnErg1. Con líneas rojas paralelas se ilustra CnErg1, con un relleno sólido rojo el sitio de unión (hélice anfipática S5P). Imagen modificada de Hill et al. (2007).

## Resultados y discusión

---

---

### 5. Dinámica molecular del sistema con hEAG1 no glicosilado

---

#### 5.1. Toxina Ap1a (md1-md2)

---

La visualización de las trayectorias de dinámica molecular cuadro, de 16 ps cada uno, muestra que en general la región atomística (FG) queda correctamente excluida de la región CG, la membrana CG cumple con su función de barrera física al impedir la penetración de disolvente FG y CG. Sin embargo, la región de agua CG se ve invadida o equilibrada por moléculas de agua FG. También fue evidente que el canal tiende a hidratarse solo con agua FG (TIP3P), y la misma se deposita en dos cavidades de cada dominio sensor de voltaje así como en una parte del poro del canal. Tal comportamiento no habría sido observado con una membrana implícita puesto que la cavidad llega hasta la región media de la membrana, lo que podría suponer una ventaja en la implementación multiescala con SIRAH.

A pesar del corto tiempo de simulación (200 ns) se evidenció una enorme flexibilidad de las asas extracelulares del canal que a su vez movían la toxina en la región del vestíbulo extracelular; la cual se mantuvo unida al canal. Las gráficas del aseguramiento de la calidad sustentan que el sistema convergió en ambas réplicas, al menos en los términos energéticos y estructurales, dichas gráficas se muestran en la Figura S15.

## Resultados y discusión

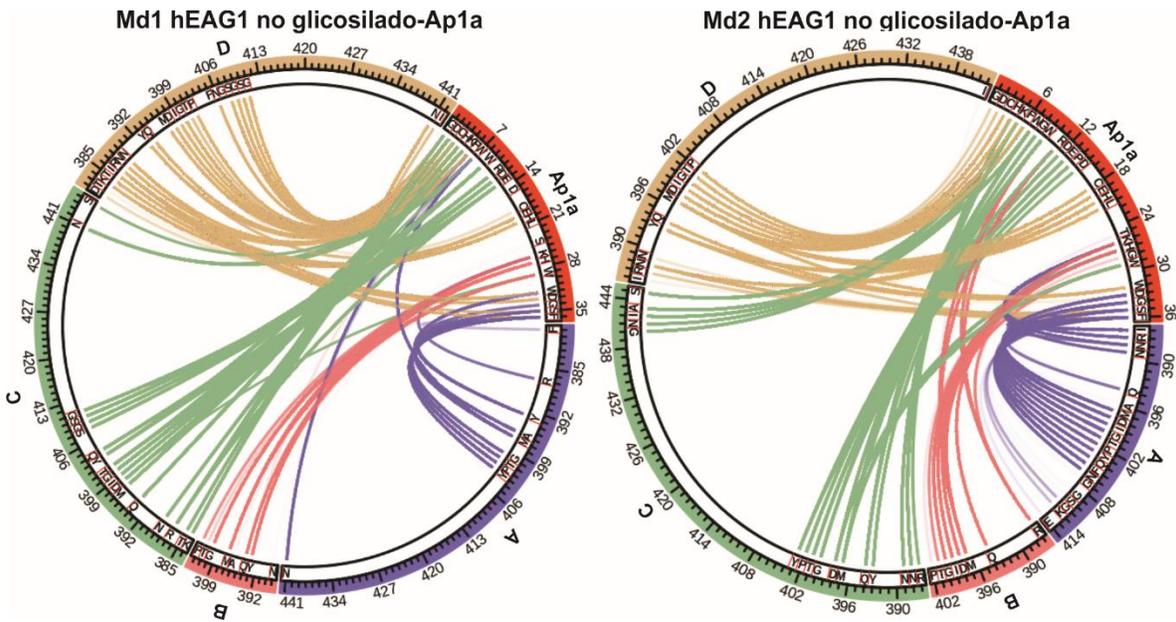


Figura 26. Gráfica circular de los contactos entre residuos del canal hEAG1 no glicosilado y la toxina Ap1a de los últimos 50ns de producción. Con las letras A, B, C, D se especifican los distintos monómeros (cadenas) del canal hEAG1.

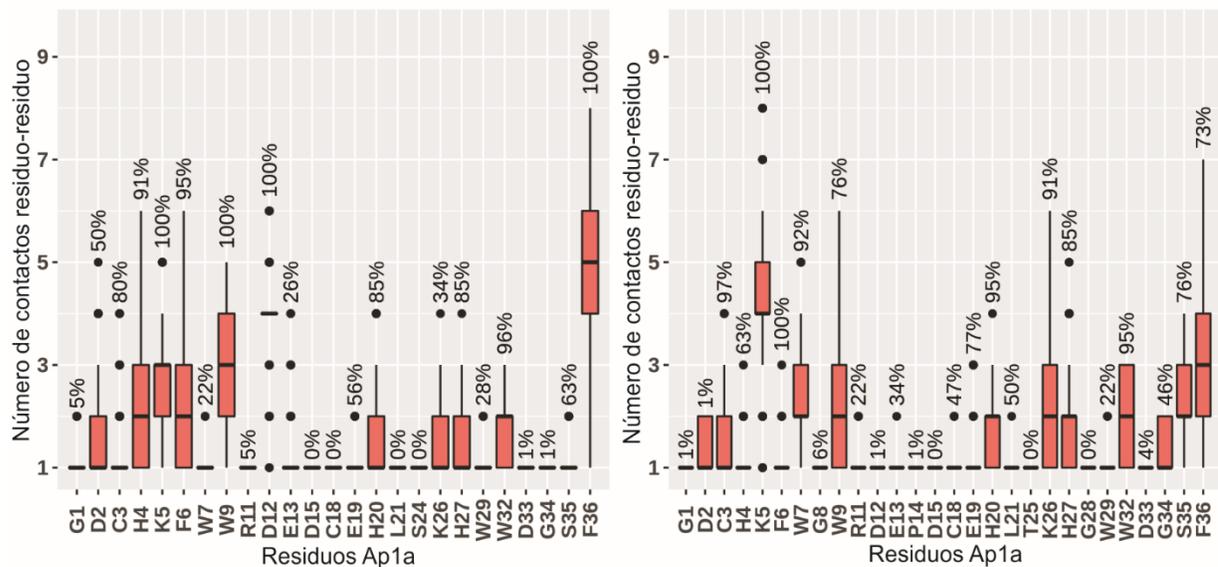


Figura 25. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos de cada residuo de la toxina Ap1a con hEAG1 no glicosilado a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.74.

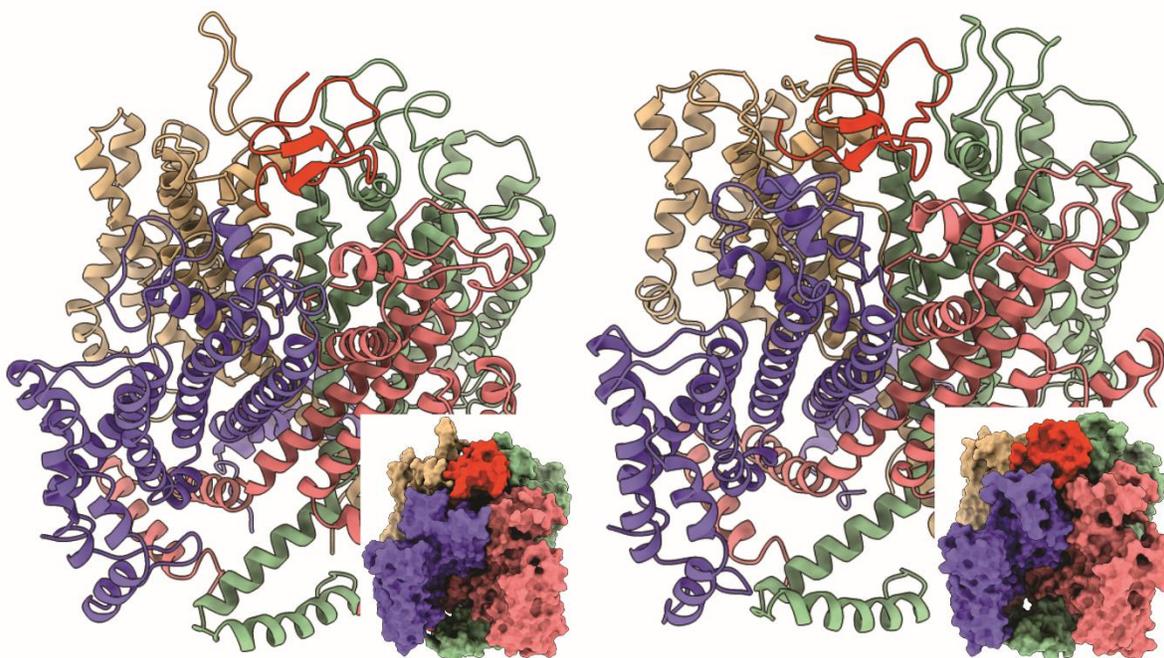


Figura 27. Estructuras representativas del canal hEAG1 y la toxina Ap1a de los últimos 50ns de producción. Se observa que las principales diferencias entre la réplica 1 (izquierda) y la réplica 2 (derecha) están en las cadenas laterales y en los extremos N y C terminal de la toxina así como en las asas extracelulares de las cadenas A y D del canal hEAG1. El RMSD de todos los átomos entre ambas estructuras es de 4.5 Å.

A partir del análisis de las Figuras 25-27 se infiere que el sitio de unión es consistente con lo propuesto por el acoplamiento en particular la región de la  $\alpha$ -hélice anfipática de los cuatro monómeros del canal estabiliza la unión a la toxina Ap1a. Con excepción de los extremos N y C terminal el esqueleto peptídico de la Ap1a mantiene la orientación a lo largo de ambas simulaciones y eso también se refleja en las tres regiones (residuos: 14-17, 22-25, 30-31) que no tienen contactos con la interfase (ver Figura 25) y que están expuestas al disolvente. Sin embargo, existen diferencias considerables en cuanto a que residuos del canal se ven involucrados en contactos, esto se atribuye a la flexibilidad de las asas extracelulares de las cadenas A, C, y D. En la réplica 1 las cadenas C y D contribuyen con un mayor número de residuos para estabilizar la unión de la toxina, mientras que en la réplica 2 la cadena A tiene un mayor número de residuos estabilizando la unión comparado con la réplica 1. De acuerdo con las permanencias de los residuos (ver Figura 26) se proponen los residuos 3-6,9,19-20,27,32,35-36 como residuos que estabilizan la unión de la toxina Ap1a al canal no glicosilado.

## Resultados y discusión

### 6. Dinámica molecular de los sistemas con hEAG1 glicosilado

Inicialmente se construyeron dos sistemas con hEAG1 glicosilado y las toxinas Ap1a y Aa1a como se describe en la metodología y se realizaron dos réplicas. Las réplicas en los sistemas glicosilados tienden a divergir, esto como consecuencia de una configuración inicial no optimizada por acoplamiento debido a que ningún programa de acoplamiento utilizado es capaz de tratar con proteínas con modificaciones postraduccionales. En teoría (hipótesis de ergodicidad) las dinámicas moleculares deben converger independientemente del punto de inicio siempre y cuando se utilicen tiempos de simulación que tiendan al infinito. En la práctica eso es técnicamente imposible, a continuación se describen la estrategia utilizada.

Tabla 5. Resumen de las configuraciones y resultados de las trayectorias de dinámica molecular

Toxina	hEAG1	Réplica	Inicio	Localización final de toxina y monómeros involucrados	Correlación Pearson	Correlación Pearson GlcNAc
Ap1a	Glicosilado	Md1	Acoplamiento desplazado 0.55nm	Centrada, 4 monómeros	0.83	0.55
		Md2	Extraído de trayectoria md1	Centrada, 4 monómeros		
		Md1*	Acoplamiento desplazado 0.55nm	No centrada, 3 monómeros	0.64	0.48
		Md2*	Extraído de trayectoria md1*	Centrada, 4 monómeros		
	No glicosilado	Md1	Acoplamiento	Centrada, 4 monómeros	0.74	--
		Md2	Acoplamiento	Centrada, 4 monómeros		
Aa1a	Glicosilado	Md1	Acoplamiento desplazado 0.55nm	Centrada, 4 monómeros	0.97	0.64
		Md2	Extraído de trayectoria md1	Centrada 4, monómeros		
		Md1*	Acoplamiento desplazado 0.55nm	No centrada, 1 monómero	0.51	0.47
		Md2*	Extraído de trayectoria md1*	No centrada, 3 monómeros		

## Resultados y discusión

---

---

En las réplicas que divergen (especificadas con un asterisco \*) del comportamiento esperado, la toxina se desplaza ligeramente del sitio de unión inicial; el desplazamiento ligero podría ser representativo de un estado intermediario (metaestable) no productivo. Para evaluar esta suposición se propuso tomar la configuración del sistema glicosilado representativa de los últimos 50 ns y utilizarla como punto de inicio (configuración optimizada) para nuevas réplicas, ver Tabla 5. De esta forma, para los sistemas glicosilados: md1 da origen al punto inicial de la réplica md2, y de igual forma md1\* da la configuración inicial de md2\*.

Si md1\* no representa un estado intermediario con 200 ns de simulación adicionales y el reinicio de velocidades de la trayectoria md2\* la toxina probablemente se disociaría; se observó el caso contrario. Al final de md2\* las toxinas se mantienen unidas o incrementan el número de monómeros a los cuales están unidas para asemejarse a md1, lo que sugiere que las configuraciones de md1\* representan un estado intermediario de mayor energía que el alcanzado por md1.

El aseguramiento de calidad mostrado en las Figuras suplementarias 16-19 garantiza que el cálculo efectuado en los sistemas con el canal hEAG1 glicosilado fue consistente en términos energéticos (temperatura, presión y energía potencial) y de la estructura de proteínas. En todos los sistemas el radio de giro fue aproximadamente constante lo cual es indicativo de que las proteínas no se están desplegando y el RMSD en los últimos 50 ns de simulación es aproximadamente constante, lo que sugiere que las configuraciones estudiadas son relativamente estables.

# Resultados y discusión

## 6.1. Toxina Ap1a (md1-md2)

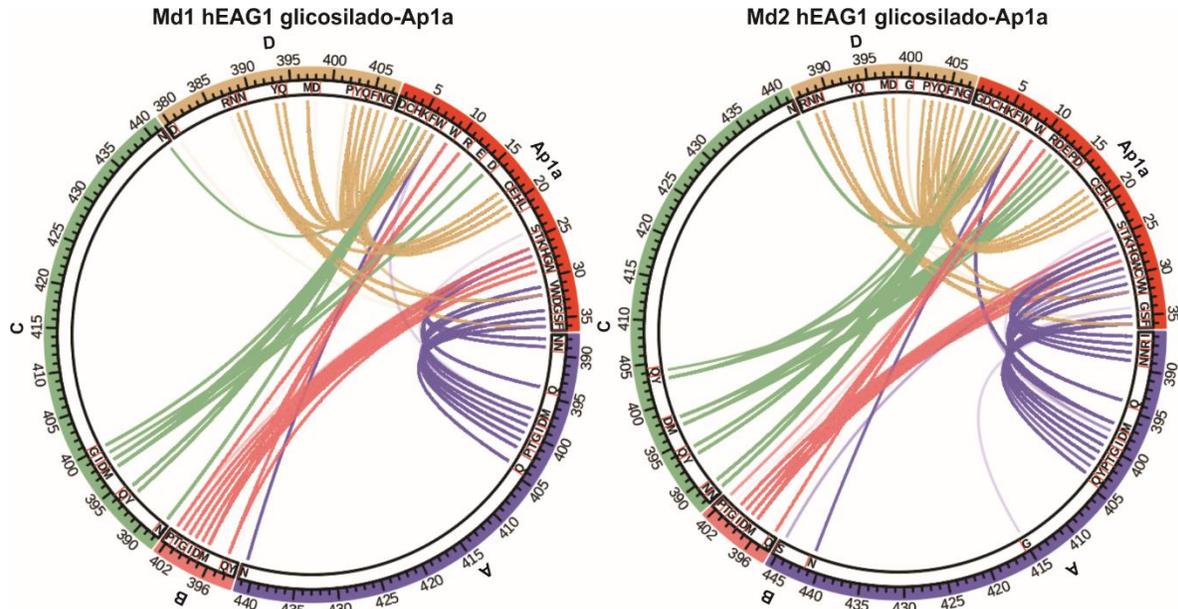


Figura 28. Gráfica circular de los contactos entre residuos del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Ap1a de los últimos 50 ns de producción. Con las letras A, B, C, D se especifican los distintos monómeros (cadenas) del canal hEAG1.

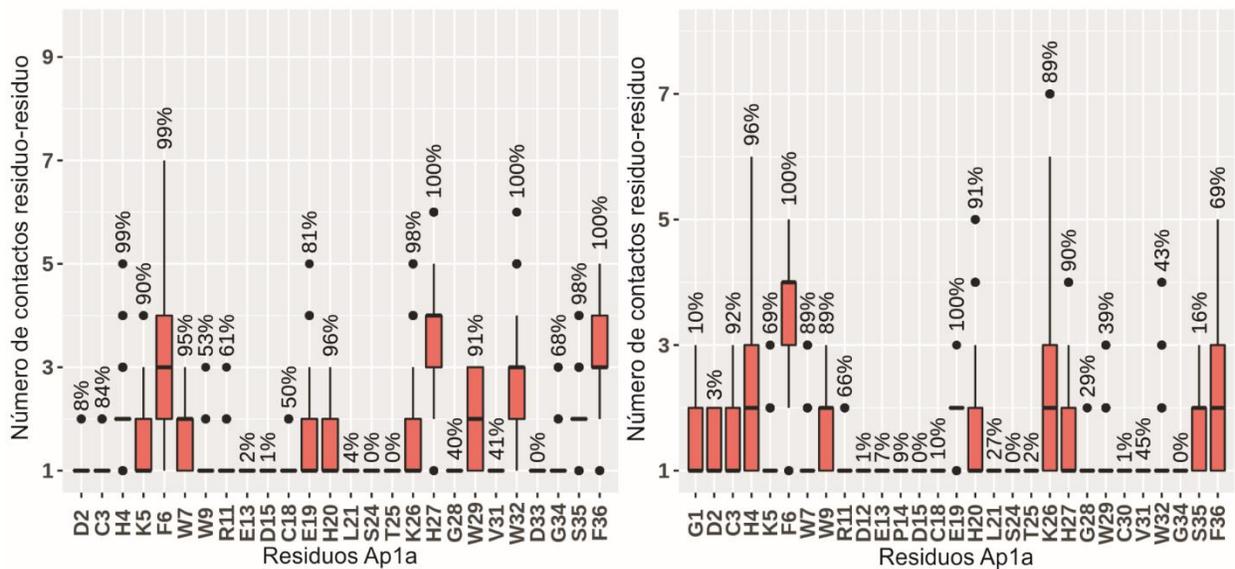


Figura 29. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos de cada residuo de la toxina Ap1a con hEAG1 glicosilado a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.82.

# Resultados y discusión

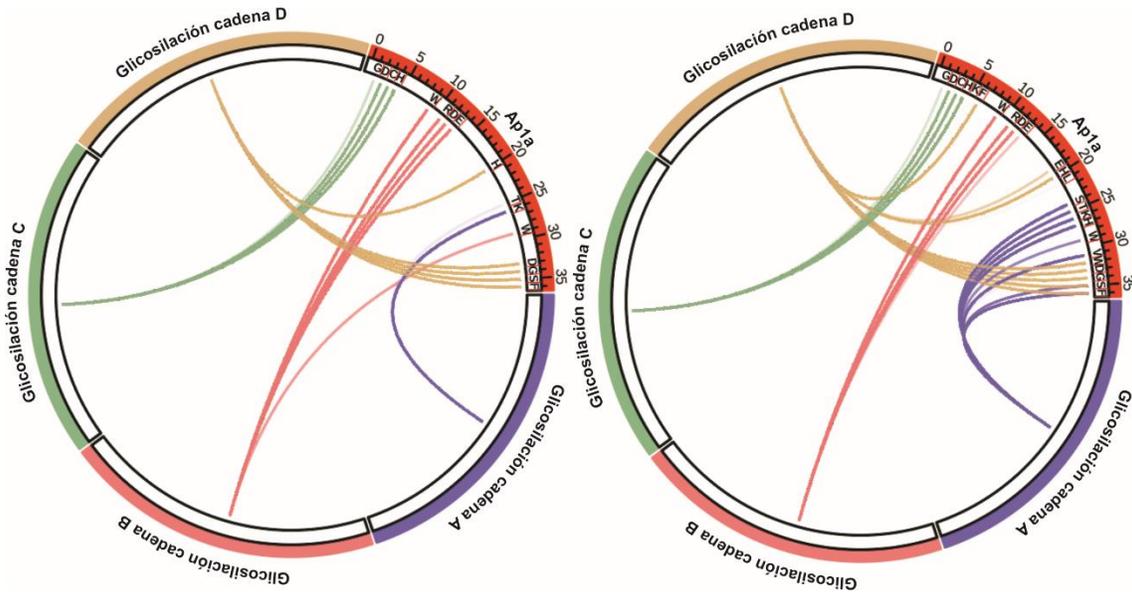
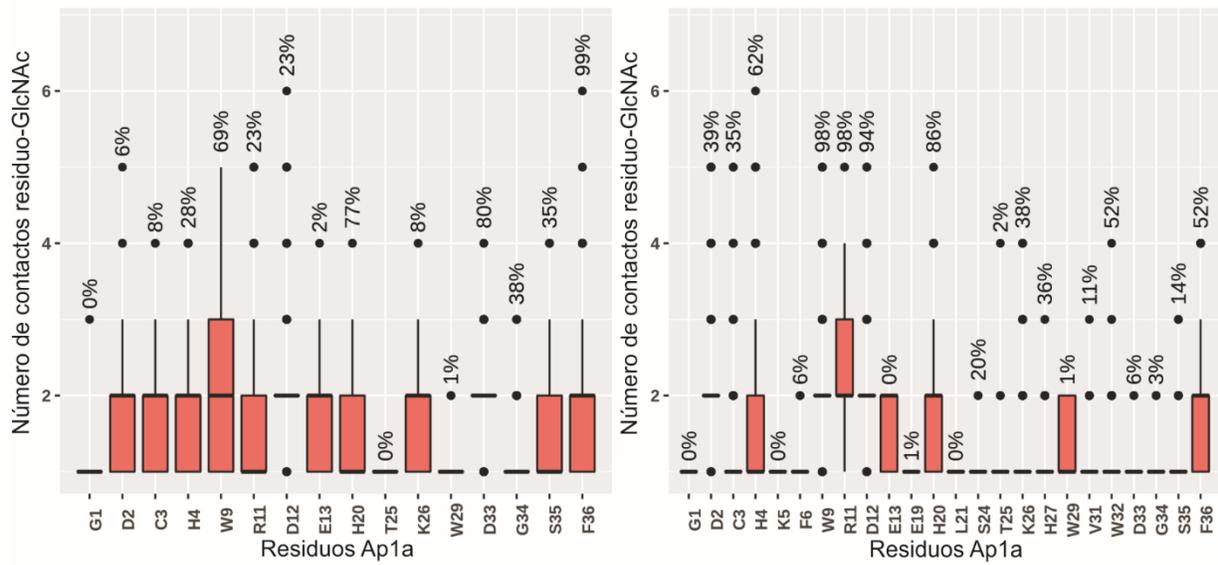


Figura 30. Gráfica circular de los contactos entre las glicosilaciones del canal hEAG1 y la toxina Ap1a. A la izquierda se muestra la réplica md1 y a la derecha la réplica md2.



## Resultados y discusión

---

---

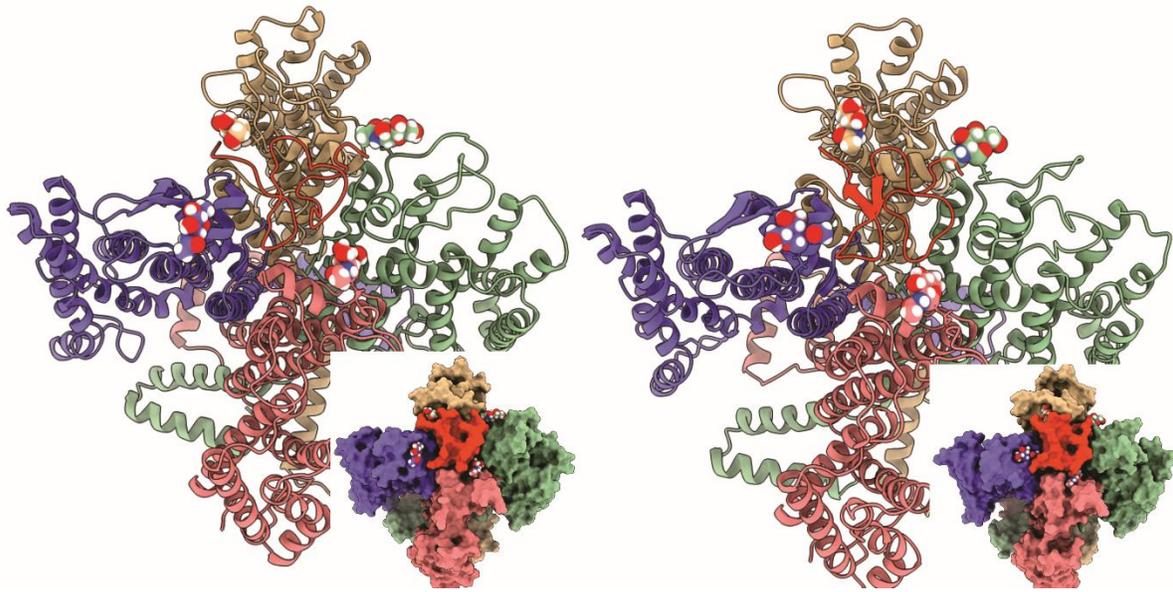


Figura 32. Estructuras representativas del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Ap1a de los últimos 50ns de producción. Se observa que las principales diferencias entre la réplica 2 (izquierda) y la réplica 4 (derecha) están en las cadenas laterales de la toxina. Las glicosilaciones se muestran en representación de esferas de Van der Waals. El RMSD de todos los átomos entre ambas estructuras es de 2.9 Å.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 28, es posible concluir que el modo de unión es de la toxina es similar al del sistema no glicosilado. La cadena A estabiliza principalmente el extremo C terminal, la cadena B estabiliza dos pequeñas regiones entre los residuos 9-11 y 26-27 de la toxina, la cadena C dos segmentos cortos cercanos al N terminal, y la cadena D interacciona con el extremo N terminal y la región compuesta por los residuos 18-21. En general, el patrón de interacción entre réplicas parece más consistente que para el sistema no glicosilado; además la permanencia de los residuos de la toxina muestra una mejor correlación, ver Figura 29. Esto puede deberse a dos causas: la primera, las glicosilaciones estabilizan las asas ya sea por impedimento estérico que limita la movilidad de las asas o por interacciones intramoleculares con la asa, segunda, debido a que el sistema de la réplica 2 parte de la estructura representativa obtenida de la réplica 1. Sin embargo, como se explicó anteriormente pequeñas variaciones (como las velocidades iniciales) tienden a hacer divergir las trayectorias en la dinámica molecular por lo cual si durante los 200 ns de la réplica no divergió la trayectoria estamos hablando de una conformación muy estable del sistema.

## Resultados y discusión

---

---

De acuerdo con ambas réplicas los residuos que consistentemente tiene una permanencia superior al 50% son 3-7, 9, 11, 19-20, 26-27 y 36. Si se considera al residuo W32 (con 43% de permanencia en la segunda réplica) se tiene un resultado que sugiere que la escalera hidrofóbica de Ap1a forma parte de la interfase canal-toxina. Los residuos W32 y F36 se caracterizaron por tener una permanencia del 100% en la primera de réplica y una menor permanencia en la segunda, esto se debe a que las cadenas laterales de estos residuos cumplen con la distancia para interactuar con el monómero A o con el monómero D (ver Figura 28); una de las configuraciones de las cadenas laterales ofrece un mayor número de contactos lo que influyó en la permanencia. Al analizar los contactos residuo-residuo y las permanencias de todos los sistemas (sin incluir glicosilaciones), se concluye que suele haber una correlación positiva entre el número de contactos y una mayor permanencia entre réplicas. Sin embargo, eso no necesariamente se cumple y hay residuos que tienen el comportamiento opuesto entre réplicas como E19.

Un análisis de los contactos de la toxina con las glicosilaciones muestra que no hay una clara tendencia entre interactuar con residuos hidrofóbicos como triptófano, fenilalanina o residuos cargados como aspartato, lisina o arginina, ver Figura 30. El bajo coeficiente de correlación de Pearson en los contactos con glicosilaciones sugiere que las interacciones con la glicosilación no son específicas y no influyen en el modo de unión más que la movilidad de las asas extracelulares.

# Resultados y discusión

## 6.2. Toxina Ap1a unida en un estado intermedio (md1\*-md2\*)

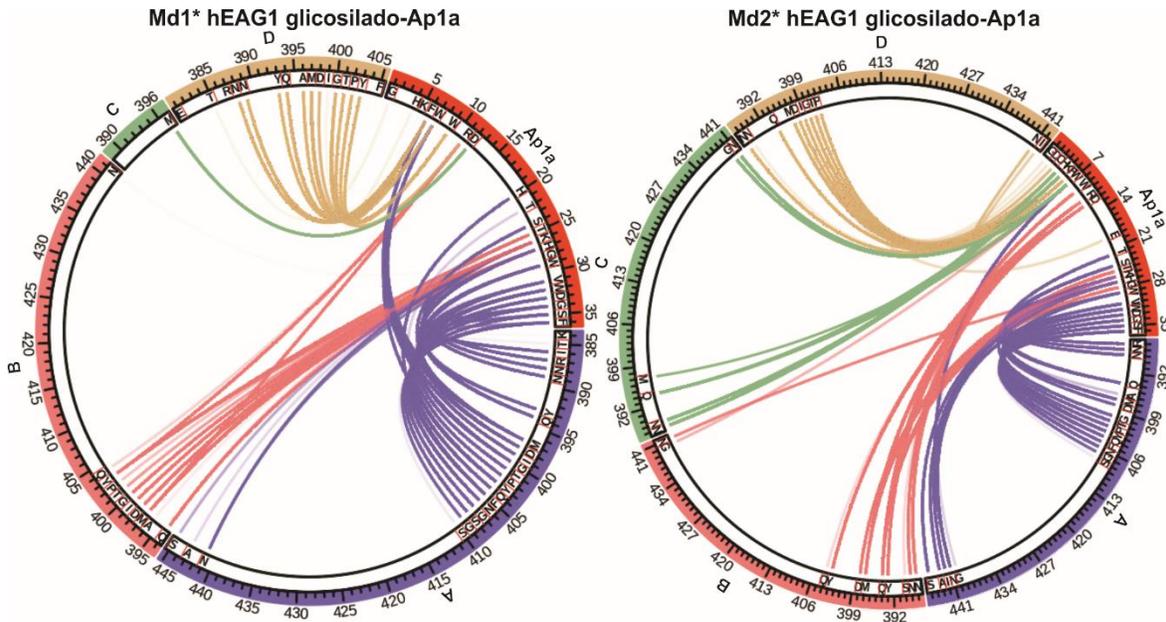


Figura 34. Gráfica circular de los contactos entre residuos del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Ap1a de los últimos 50 ns de producción. Con las letras A, B, C, D se especifican los distintos monómeros (cadenas) del canal hEAG1.

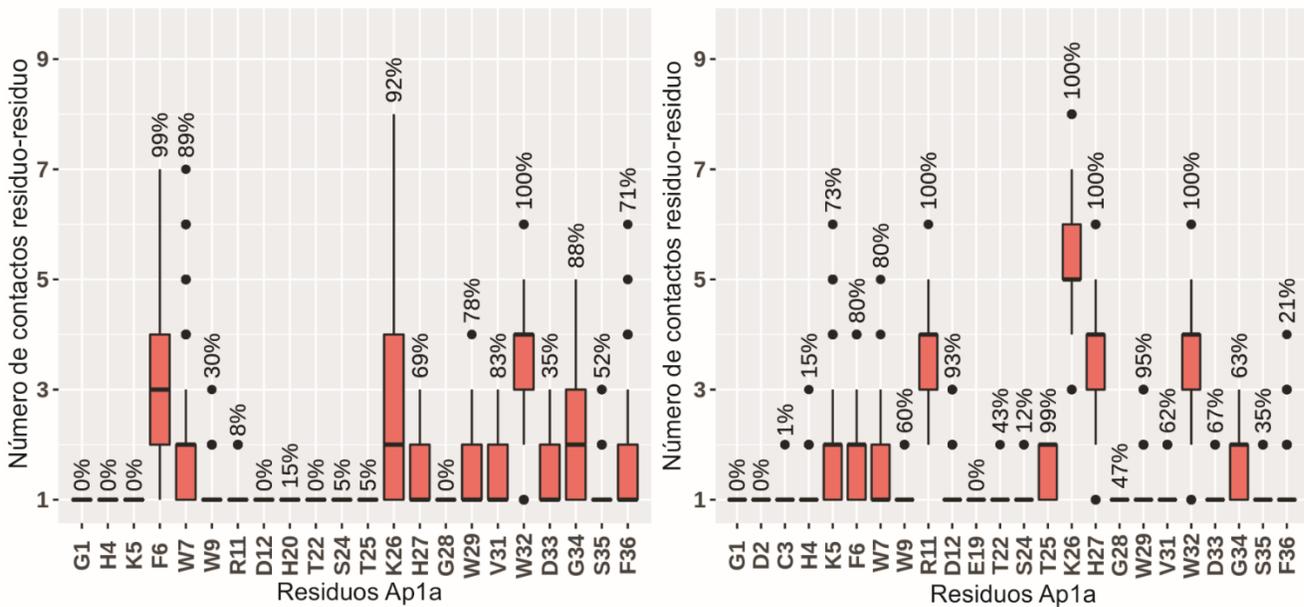


Figura 33. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos de cada residuo de la toxina Ap1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.64.

## Resultados y discusión

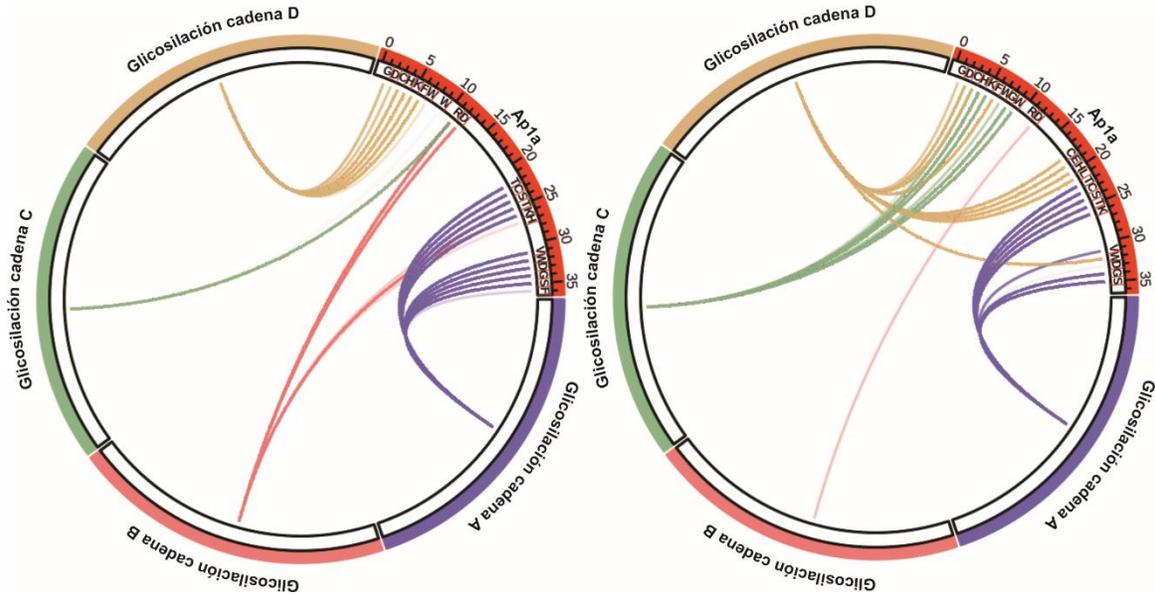


Figura 35. Gráfica circular de los contactos entre las glicosilaciones del canal hEAG1 y la toxina Ap1a. La réplica md1\* se muestra a la izquierda y a la derecha la réplica md2\*.

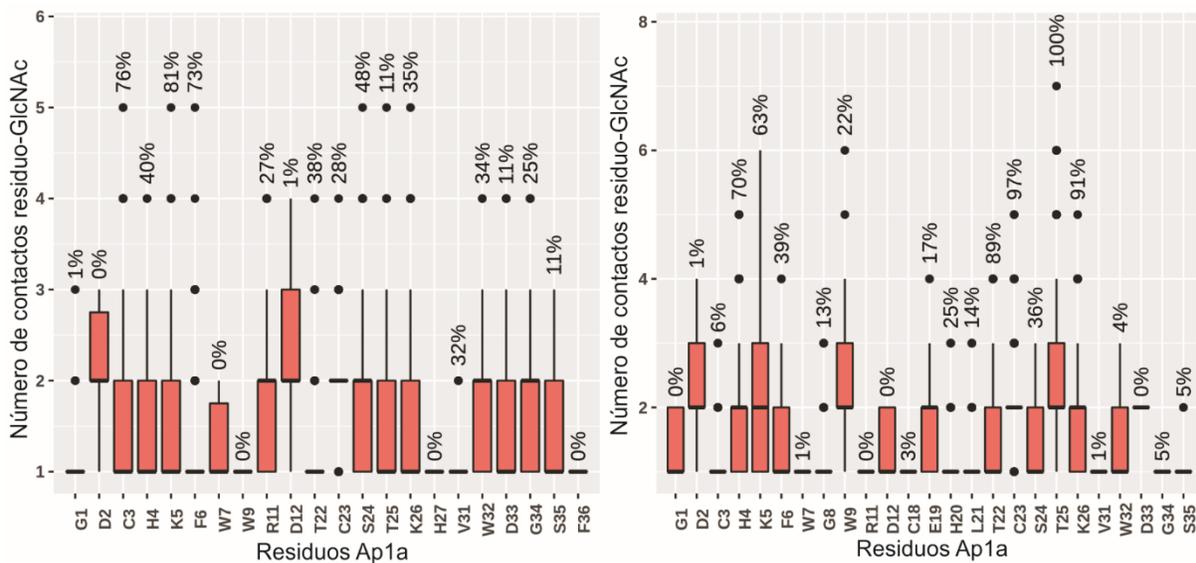
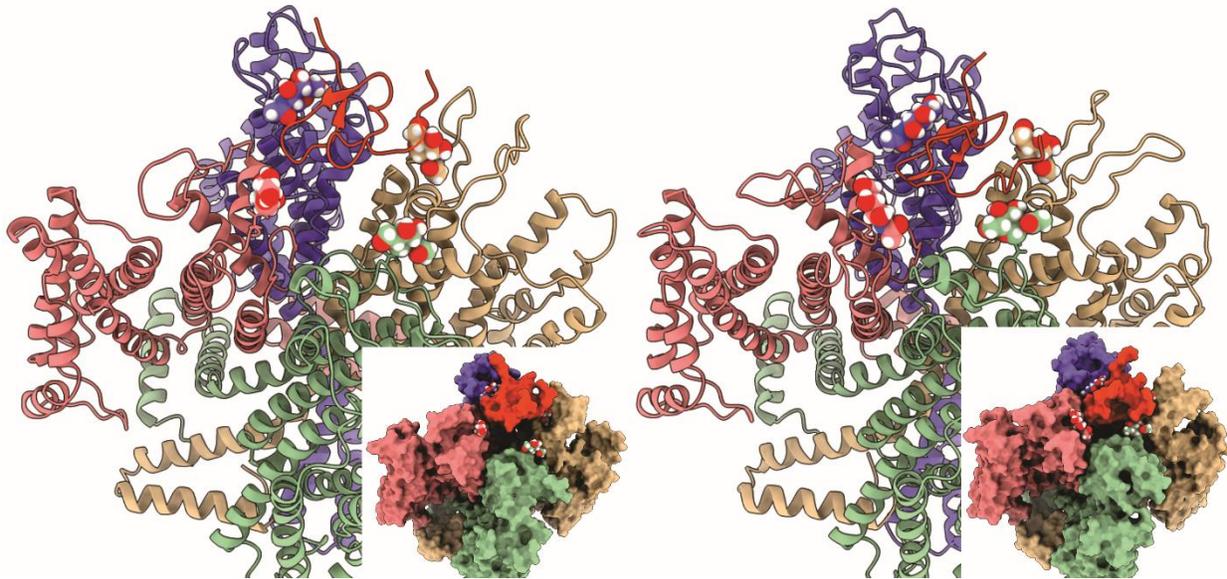


Figura 36. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos con glicosilación de cada residuo de la toxina Ap1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.48.



*Figura 37. Estructuras representativas del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Ap1a de los últimos 50ns de producción. Se observa que la principal diferencia entre la réplica md1\* (izquierda) y la réplica md2\* (derecha) es la separación entre la toxina y la cadena C. Además, se observa flexibilidad del extremo C terminal puesto que en md1\* la fenilalanina 36 interacciona con el asa de la cadena A y en md2\* se encuentra dirigida hacia el disolvente. Las glicosilaciones se muestran en representación de esferas de Van der Waals. El RMSD de todos los átomos entre ambas estructuras es de 3.2 Å.*

La réplica md1\* del sistema Ap1a con hEAG1 glicosilado se propone como modelo de un estado intermedio caracterizado por la poca interacción con uno de los monómeros del canal (en este caso la cadena C). A pesar de que la réplica md2\* es similar a la réplica md1\* es evidente que se acerca a la conformación de las réplicas md1 y md2. En consecuencia, el coeficiente de correlación de Pearson basado en permanencia de residuos es de 0.64. El modelo propone que la falta de contactos de la cadena C con el extremo N de la toxina es compensada por contactos con la glicosilación de la cadena D con el extremo N de la toxina, en especial los residuos 3-6 tienen una alta permanencia en md1 con la glicosilación; esto puede observarse al comparar la Figura 36 con la Figura 30 y la Figura 33 con la Figura 28. De igual forma la glicosilación y el asa extracelular de la cadena A interaccionan significativamente con la toxina. Las contribuciones de ambas glicosilaciones podrían facilitar la conformación del estado intermedio comparado con un sistema no glicosilado.

# Resultados y discusión

## 6.3. Toxina Aa1a (md1-md2)

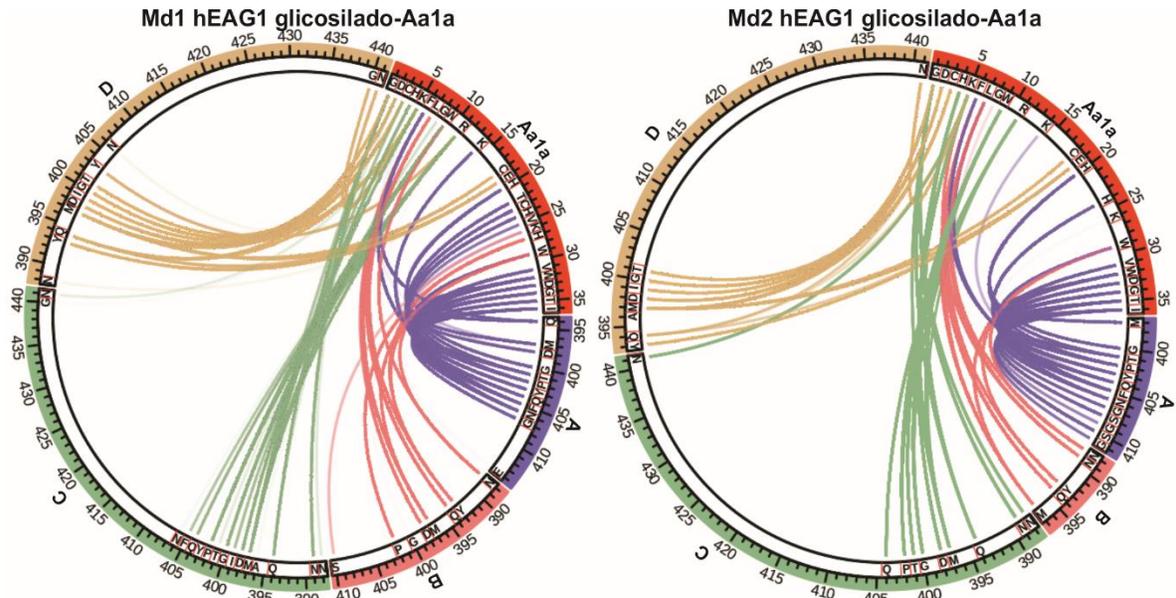


Figura 38. Gráfica circular de los contactos entre residuos del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Aa1a de los últimos 50ns de producción. Con las letras A, B, C, D se especifican los distintos monómeros (cadenas) del canal hEAG1. Los sectores correspondientes a cada monómero se ordenaron de manera equivalente por simetría a los monómeros de las gráficas circulares de Ap1a.

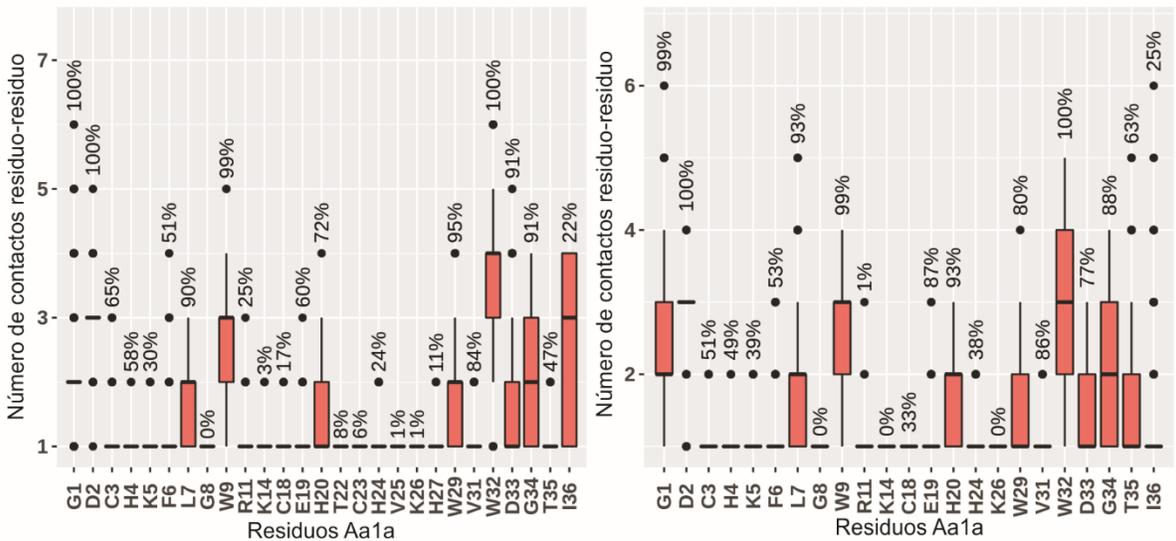


Figura 39. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos de cada residuo de la toxina Aa1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.97.

## Resultados y discusión

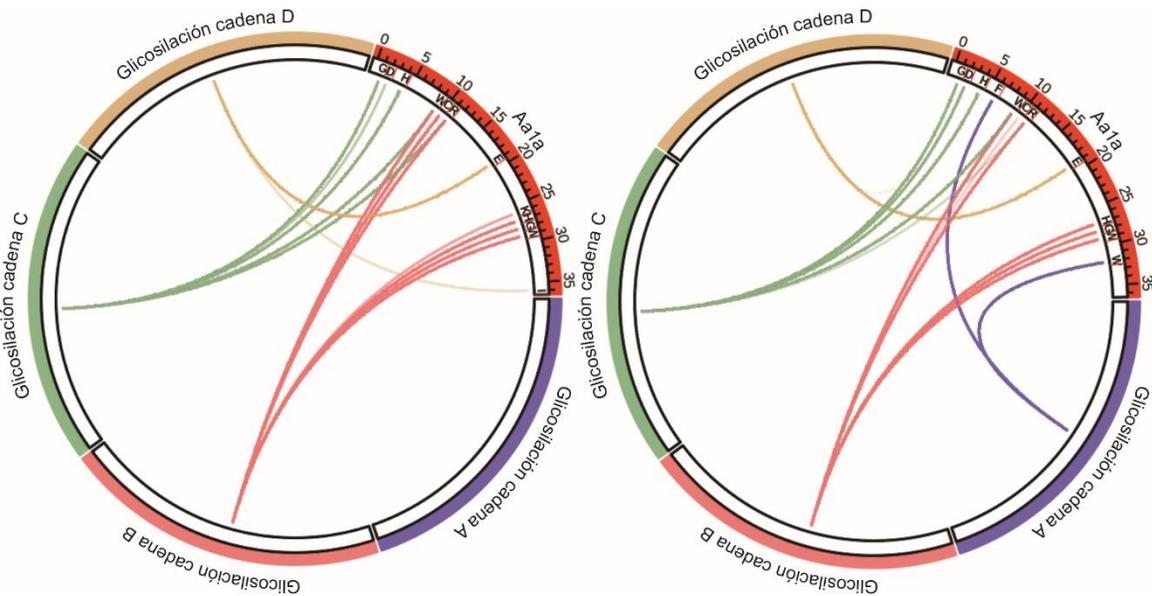


Figura 40. Gráfica circular de los contactos entre las glicosilaciones del canal hEAG1 y la toxina Aa1a. A la izquierda se muestra la réplica md1 y a la derecha la réplica md2.

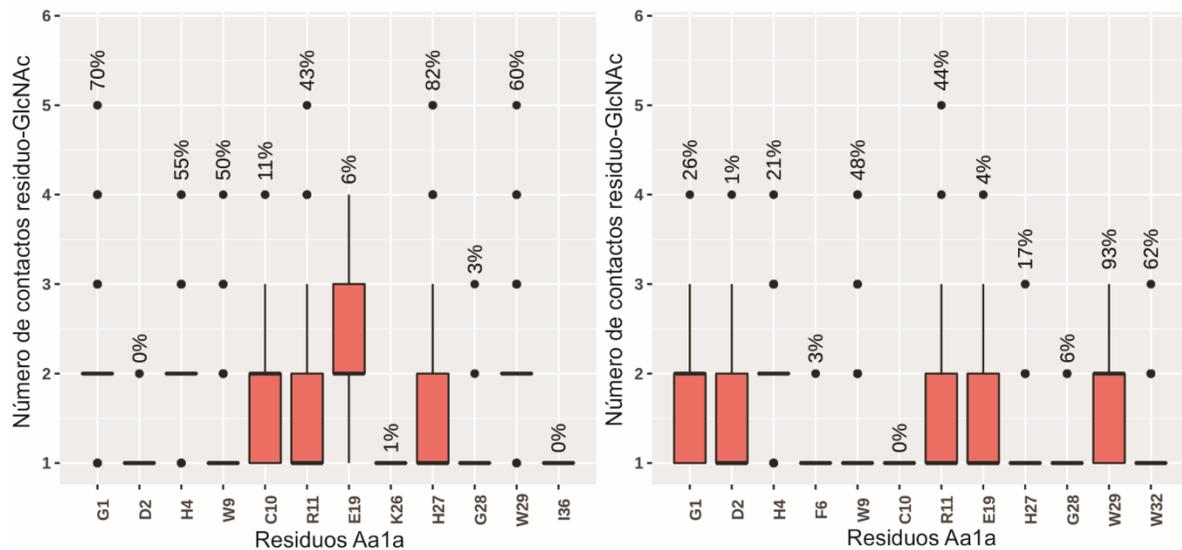


Figura 41. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos con glicosilación de cada residuo de la toxina Aa1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.64.

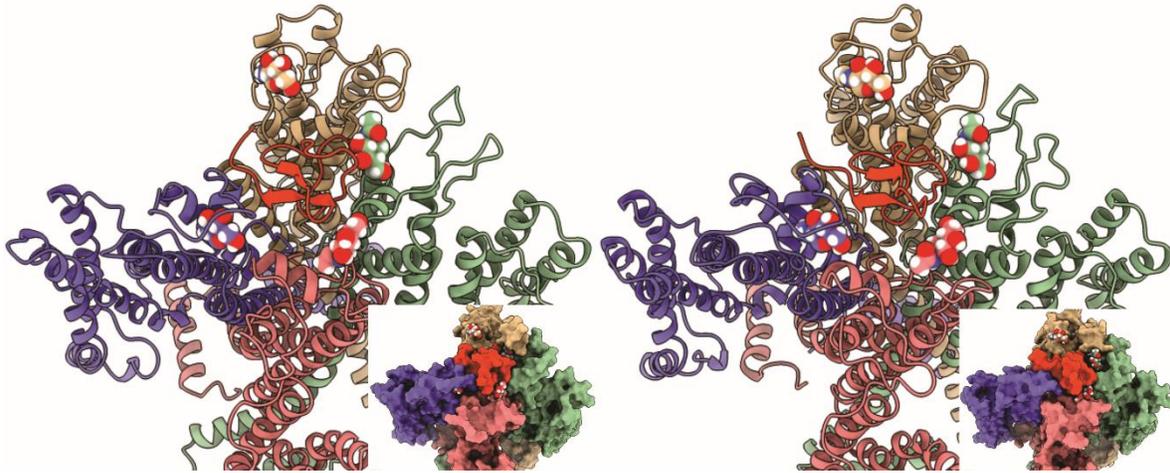


Figura 42. Estructuras representativas del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Aa1a de los últimos 50ns de producción. Se observa que la principal diferencia entre la réplica md1 (izquierda) y la réplica md2 (derecha) son las posiciones de las cadenas laterales de la toxina y del asa de la cadena C con respecto al asa de la cadena D. Las glicosilaciones se muestran en representación de esferas de Van der Waals. El RMSD de todos los átomos entre ambas estructuras es de 2.9 Å.

Al considerar solo el esqueleto peptídico del sistema se concluye que el modo de unión de Aa1a es muy similar al de Ap1a; es decir, la región de la  $\alpha$ -hélice anfipática de cada monómero del canal contacta la misma región de la toxina. Esto si se considera que por simetría las cadenas A, B, C y D del modo de unión de Aa1a equivalen a las cadenas A, B, C y D respectivamente del modo de unión de Ap1a. En general se observa que el grado de empaquetamiento del esqueleto peptídico de Aa1a es mayor que para la toxina Ap1a, esto se refleja ligeramente en el radio de giro total de Aa1a que es ligeramente menor que en Ap1a, ver Figuras suplementarias 15-18.

El alto coeficiente de correlación de Pearson entre ambas réplicas de Aa1a (0.97) así como el bajo RMSD entre las estructuras representativas (2.9 Å) sugiere que el modo de unión de la toxina Aa1a es menos dinámico que el modo de unión de la toxina Ap1a con el canal glicosilado. Esto apoyaría el hecho de que a pesar de que Aa1a es una toxina menos potente es capaz de inhibir por completo la corriente del canal hEAG1. De acuerdo con ambas réplicas, los residuos que participan en contactos de manera consistente (permanencia mayor a 50%) son 1-3, 6-9, 19-20, 29, 31-34. Nuevamente se observa la escalera hidrofóbica (F6, L7, W9, W29 y W32) sosteniendo contactos con el canal de manera consistente a lo largo de la dinámica; además, destaca la alta permanencia de los residuos G1 y D2 en comparación con los modos de unión de Ap1a, incluso siendo conservados en ambas toxinas. El sistema Aa1a ejemplifica que para los complejos menos dinámicos podría ser más sencillo proponer mutaciones a partir de experimentos *in silico*, mientras los sistemas más dinámicos como Ap1a podrían requerir un mayor número de réplicas.

# Resultados y discusión

## 6.4. Toxina Aa1a unida en un estado intermedio (md1\*-md2\*)

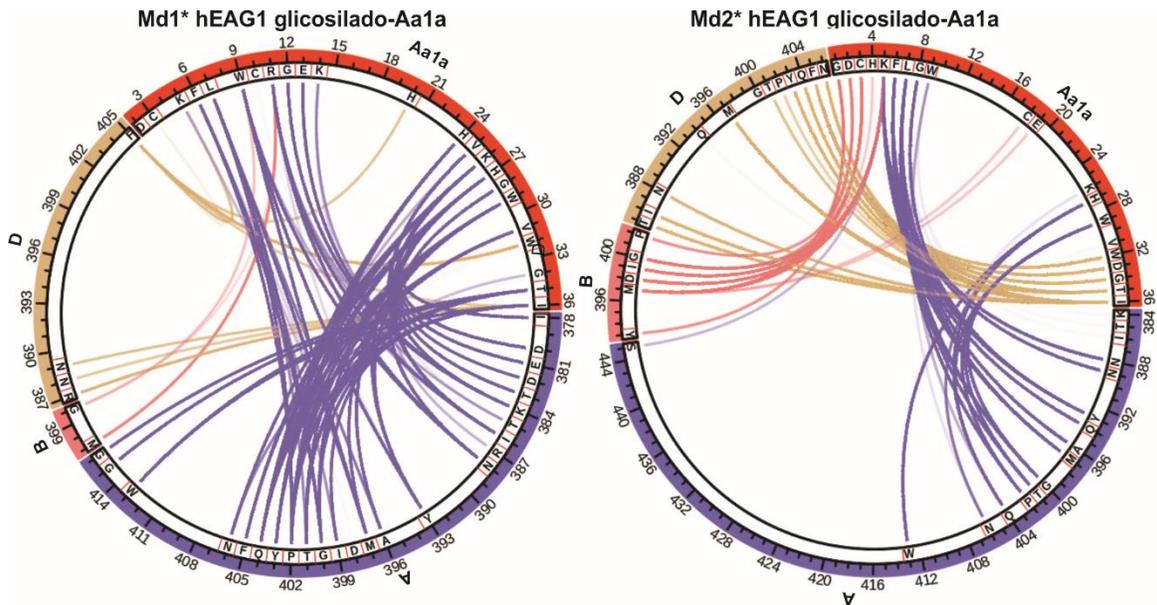


Figura 43. Gráfica circular de los contactos entre residuos del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Aa1a de los últimos 50ns de producción. Con las letras A, B, C, D se especifican las distintas cadenas del canal hEAG1. La cadena C no tuvo contacto con la toxina Aa1a. Los sectores correspondientes a cada monómero se ordenaron de manera equivalente por simetría a los monómeros de las gráficas circulares de Ap1a.

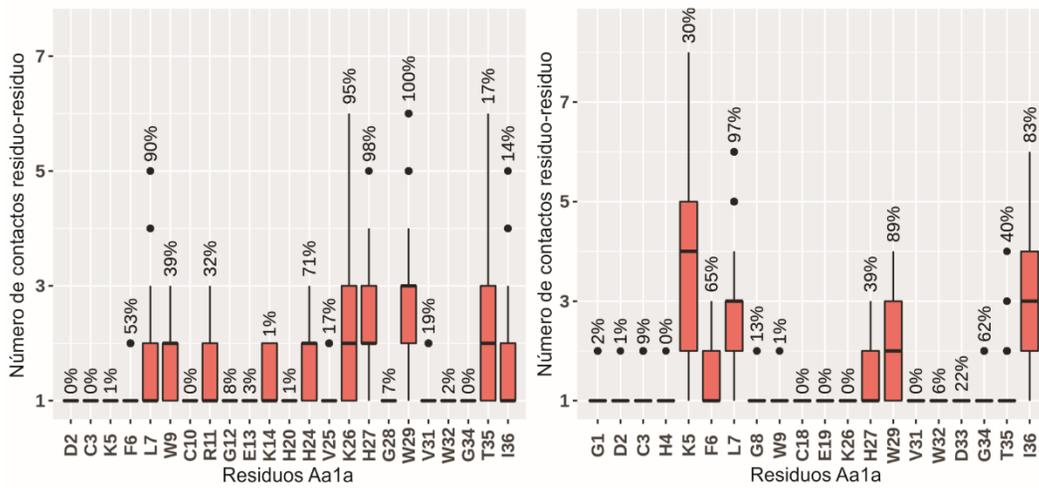


Figura 44. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos de cada residuo de la toxina Aa1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.51.

## Resultados y discusión

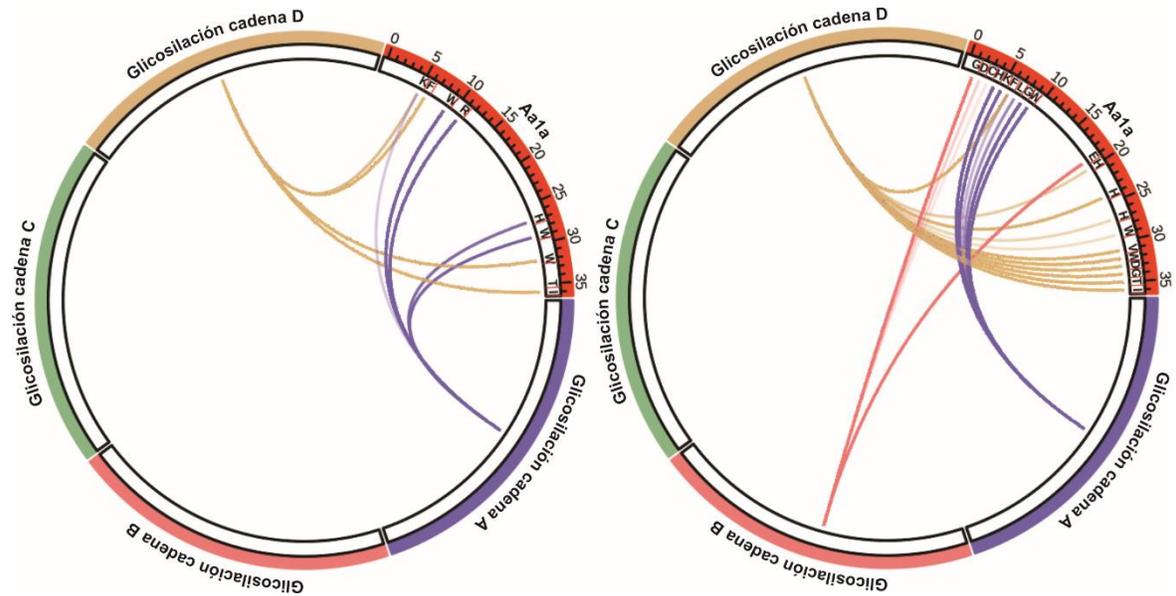


Figura 45. Gráfica circular de los contactos entre las glicosilaciones del canal hEAG1 y la toxina Aa1a. A la izquierda se muestra la réplica md1\* y a la derecha la réplica md2\*.

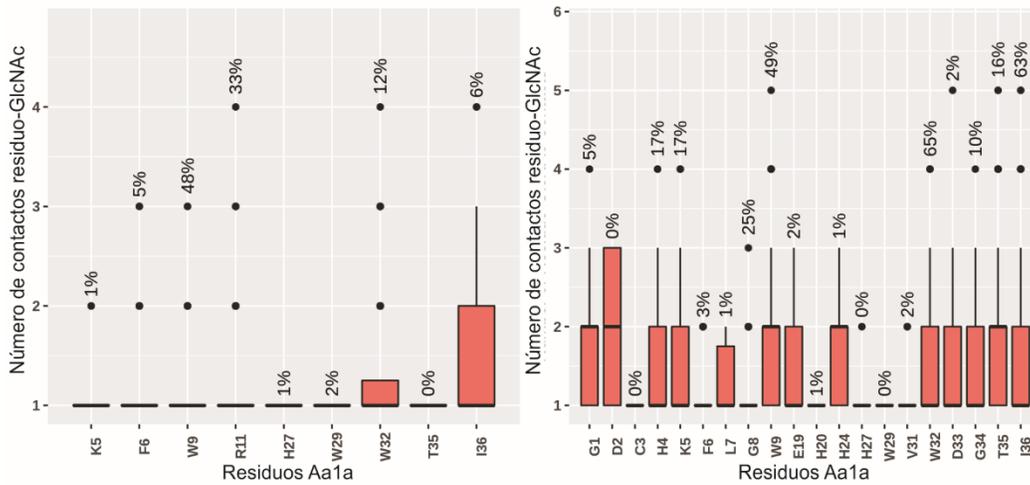


Figura 46. Gráfica de caja y bigotes del número de contactos con glicosilación de cada residuo de la toxina Aa1a a través de los últimos 50 ns de la corrida de producción. La caja representa el primer, segundo y tercer cuartil de los contactos. El número arriba de cada caja corresponde al porcentaje de cuadros analizados en el cual dicho residuo mantiene contactos con el canal hEAG1 (permanencia). A partir de las permanencias de las réplicas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson de 0.47.

## Resultados y discusión

---

---

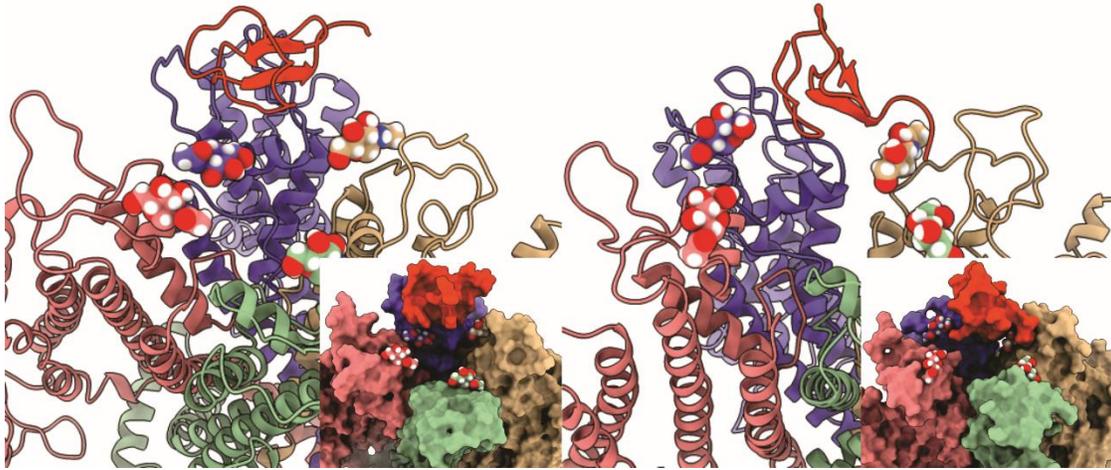


Figura 47. Estructuras representativas del canal hEAG1 glicosilado y la toxina Aa1a de los últimos 50ns de producción. El número de monómeros de hEAG1 que interacciona con hEAG1 Se observa que la principal diferencia entre la réplica md1\* (izquierda) y la réplica md2\* (derecha) es que en md1\* la interfase toxina-canal está compuesta principalmente por contactos con el monómero A (morado). Las glicosilaciones se muestran en representación de esferas de Van der Waals. El RMSD de todos los átomos entre ambas estructuras es de 3.6 Å.

La réplica md1\* como puede observarse en la Figura 43 y 47 muestra una configuración canal-toxina altamente dependiente del monómero A, la K26 se inserta entre las dos  $asas_{PD}$  del monómero C mientras los residuos W29 y H27 son principalmente estabilizados por contactos con la  $\alpha$ -hélice anfipática y por lo tanto tiene una alta permanencia. De manera similar en ambas réplicas de la toxina Ap1a se encuentra una alta permanencia de los residuos K26, W29 y H27. Durante la réplica md2\* de Aa1a, la K26 sale de la cavidad formada por las dos  $asas_{PD}$  y eso permite que se incremente el número de contactos con los monómeros B y D. Después de realizar el análisis por agrupamiento (clúster) de conformaciones de los últimos 50 ns se obtuvieron 9 grupos para Aa1a-md1\* y 3 grupos para Aa1a-md2\* esto aunado al bajo coeficiente de correlación de Pearson sugiere que Aa1a se podría unir a hEAG1 en un estado intermedio más dinámico (inestable) que el analizado para Ap1a. Previamente en el acoplamiento se sugirió que la unión de Ap1a era más dependiente del estado de glicosilación de N388 que Aa1a, esto es evidente al menos al analizar los estados intermedios de ambas toxinas. Para Ap1a la Figura 35 y 36 revelan que en ambas réplicas las glicosilaciones contactan con mayor permanencia un mayor número de residuos de la toxina Ap1a comparado con la toxina Aa1a (Figura 45 y 46). El comportamiento de Aa1a y Ap1a medido experimentalmente *in vitro* podría ser explicado molecularmente por dos mecanismos que involucran la glicosilación: el primero supone que la glicosilación favorece el modo de unión productivo (aquel que mantiene cerrado al canal) de Aa1a y el segundo supone que la glicosilación favorece o estabiliza el modo de unión no productivo (aquel que permite la apertura del canal) de Ap1a. El análisis de las trayectorias de los estados intermedios de Aa1a y Ap1a sugiere el segundo mecanismo.

## Resultados y discusión

### 7. Cálculo de la energía libre de unión de sistemas no glicosilados

Del trabajo de Patel y Ytreberg (2018) se reporta que el cálculo de la energía libre de unión de un complejo proteína-proteína a partir de un muestreo sombrilla con dinámica molecular CG (SIRAH) resulta en una buena aproximación a los valores reportados experimentalmente. Dicho enfoque tiene el potencial de distinguir si algunas mutaciones puntuales favorecen o decrecen la interacción de distintos complejos proteína-proteína. Sin embargo, para los propósitos de este trabajo se usó dicho enfoque para validar que los complejos propuestos son energéticamente favorables de acuerdo a un solo campo de fuerza; es decir que la interacción observada en las dinámicas multiescala no es el resultado de un artificio de la configuración multiescala. Primero, se reprodujo el protocolo de Patel e Ytreberg (2018) para calcular el PMF de las mutantes  $W_H98F$  y  $D_Y101K$  para un sistema antígeno-anticuerpo (PDBID:3HFM), ver Figura 48.

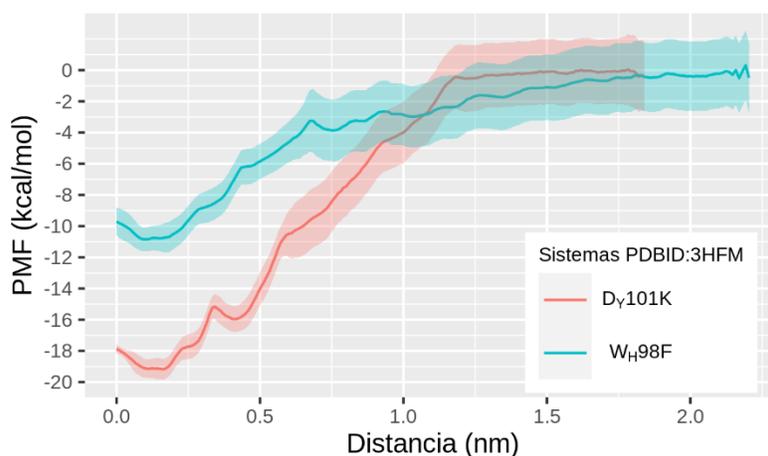


Figura 48. Potencial de fuerza media para las mutantes  $W98F$  (cadena H) y  $D101K$  (cadena Y) del complejo 3HFM. La diferencia de energía libre promedio entre las configuraciones unida y no-unida es  $\approx -11$  kcal/mol para  $W_H98F$  y  $\approx -19$  kcal/mol para  $D_Y101K$ .

Patel e Ytreberg (2018) reportaron una diferencia de energía libre de  $\approx -7.5$  kcal/mol para el complejo con la mutante  $W_H98F$  y  $\approx -17.4$  kcal/mol con la mutante  $D_Y101K$ . Entonces, los resultados reportados por Patel e Ytreberg (2018) se encuentran dentro del intervalo de confianza (95%) estimado en este trabajo.

## Resultados y discusión

Del cálculo del PMF para los sistemas canal-toxina, ver Figura 49, se concluyó que la formación de los complejos propuestos es favorable energéticamente. Sin embargo, el protocolo usado para calcular la energía libre de unión es muy sensible a los cambios conformacionales que puedan ocurrir en una de las proteínas del complejo. La diferencias en el PMF entre las réplicas md1 y md2 para los sistemas con la toxina Aa1a sugiere que los complejos estudiados con el canal hEAG1 podrían tener múltiples conformaciones con mayor o menor afinidad por las toxinas mientras el canal está cerrado. Esto es consistente con la noción de uno o varios estados intermedios del complejo canal-toxina.

Mientras que el protocolo utilizado garantiza un cálculo preciso de las energías libres de los complejos canal-toxina, la exactitud puede diferir significativamente de los resultados experimentales debido a que el análisis de energía libre de unión no considera los parámetros de el ácido piroglutamico del extremo N-terminal de la caribdotoxina, el extremo C-terminal amidado en Aa1a o Ap1a, así como los parámetros de las glicosilaciones en los residuos Asn388 y Asn406 de hEAG1. En particular, la falta de parámetros estructurales representa la modificación azarosa de una macromolécula activa que se sabe resulta con mayor probabilidad en una pérdida de la función (menor afinidad) que en una ganancia de función (mayor afinidad). De manera alternativa, es posible sobreestimar la afinidad de una toxina debido a cambios conformacionales (inducidos por rotación) del ligando a lo largo de la trayectoria. Por ejemplo, previamente se reportó que la energía libre de unión de la caribdotoxina-KcsA considerando el ácido piroglutámico es de alrededor de -17 kcal/mol utilizando el muestreo sombrilla y el campo de fuerza CHARMM22 (Chen y Kuyucak 2009). Sin embargo, el valor experimental era de -8.2 kcal/mol, mientras el costo energético de la rotación fue de 9.11 kcal, cantidad que al sumar a la predicción inicial arroja un valor de -7.9 kcal. De manera similar, en este estudio hay tres sistemas que muestran una energía libre de unión bastante baja (favorable) que podría ser consecuencia de cambios conformacionales de la toxina durante la trayectoria.

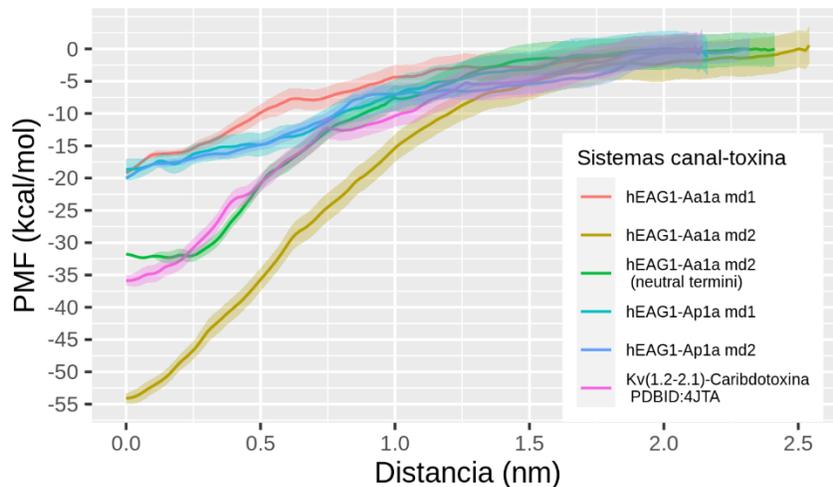


Figura 49. Potencial de fuerza media para distintos complejos canal-toxina. Todas las configuraciones muestreadas tienen una energía libre de unión negativa, lo que sugiere que todos los complejos canal-toxina son energéticamente favorables.

## Resultados y discusión

---

---

### 8. Unificación del modelo de inhibición con el mecanismo de *gating*

---

Las toxinas Aa1a y Ap1a se han reportado como modificadoras del *gating* y no como bloqueadoras del poro. De acuerdo con los cálculos de la dinámica molecular las asas del vestíbulo extracelular (incluyendo la  $\alpha$ -hélice anfipática) interaccionan con las toxinas inhibidoras formando el sitio de unión. Asimismo, los resultados de las dinámicas sugieren que ambas toxinas son modificadoras del *gating* puesto que los residuos de las toxinas cargados positivamente no se dirigen preferencialmente hacia el filtro de selectividad (o el poro).

Durante las dinámicas moleculares de las toxinas Aa1a y Ap1a fue evidente la flexibilidad de las dos asas del dominio formador del poro que flanquean a la  $\alpha$ -hélice anfipática de cada monómero ( $asas_{PD}$ ); esta flexibilidad también se ha confirmado en el canal hERG1 (Jiang et al. 2005). Sin embargo, también fue notable que cuando una de las dos  $asas_{PD}$  tenía una región extensa formando contactos con la toxina se reducía la movilidad de las  $asas_{PD}$ . De esta forma se observó que un  $asa_{PD}$  libre tenía la tendencia a acercarse al VSD para formar contactos intramoleculares, ver Figura 50. Este movimiento se asemeja en cierta forma al realizado por un percutor de una pistola; en realidad, las  $asas_{PD}$  pueden rotar un poco o incluso separarse una de otra en forma no coordinada.

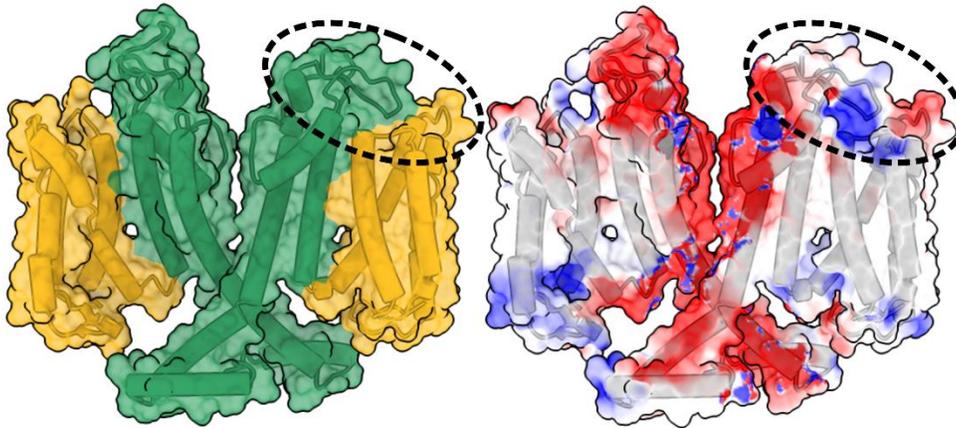


Figura 50. Dos monómeros de hEAG1 glicosilado extraídos de la dinámica molecular de Ap1a-md2. A la izquierda se divide el canal en el VSD (amarillo) y el dominio formador de poro (verde). A la derecha se muestra el potencial electrostático de superficie calculado por DelPhi (Smith et al. 2012; Sarkar et al. 2013). En la región punteada se delimita el contacto entre las asas del VSD y del dominio formador de poro.

## Resultados y discusión

Debido a que el efecto general de ambas toxinas estudiadas es reducir la movilidad de las  $asas_{PD}$  se propone que el mecanismo de *gating* es dependiente de la movilidad de las  $asas_{PD}$ , ver Figura 51. El canal cambia a su conformación abierta cuando las  $asas_{PD}$  de varios monómeros contactan el dominio sensor de voltaje y en consecuencia las toxinas estudiadas desplazan el equilibrio hacia la conformación cerrada del canal al atrapar las  $asas_{PD}$ .

La configuración utilizada en las dinámicas moleculares tenía la misma concentración de iones en ambos lados de la membrana lo que implica que el sistema utilizado era representativo de una membrana despolarizada, lo que explica la tendencia de las  $asas_{PD}$  libres a hacer contacto con el dominio sensor de voltaje. El canal se mantuvo cerrado probablemente por las restricciones en la hélice S1, la falta de la glicosilación en N406 y que estudiar el fenómeno de *gating* requiere de tiempos de simulación de al menos decenas de microsegundos (sin la implementación de otros algoritmos de muestreo conformacional).

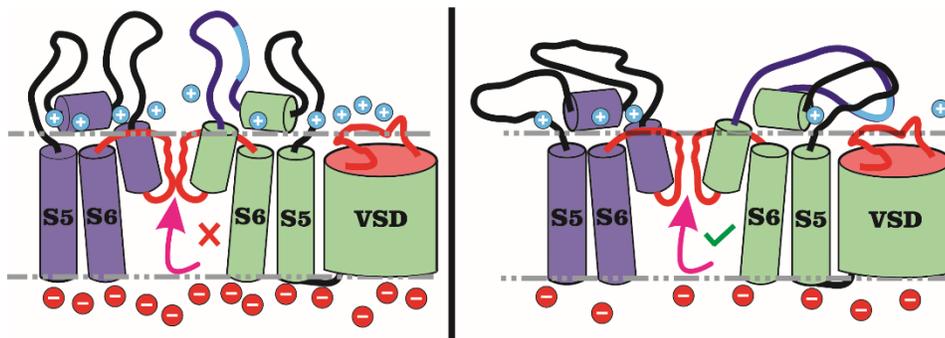


Figura 51. Esquema del modelo propuesto para el *gating* de hEAG1 y hERG. A la izquierda la membrana se encuentra hiperpolarizada y por lo tanto se acumulan iones cargados positivamente en la región extracelular y en consecuencia el canal se mantiene cerrado. En el escenario de la derecha la membrana se encuentra despolarizada y el canal abierto, puesto que disminuye la densidad de cargas positivas en el lado extracelular de la membrana se incrementa la probabilidad de interacción entre las asas del VSD y del dominio formador del poro.

## Resultados y discusión

Existen dos principales antecedentes del laboratorio húmedo que sostienen el mecanismo de *gating* dependiente de las *asas<sub>PD</sub>*. La primera molécula reportada capaz de inhibir al canal hEAG1 es un anticuerpo (mAb56) que reconoce los residuos que forman una de las *asas<sub>PD</sub>* (Gomez-Varela et al. 2007), es razonable suponer que al unirse al *asa<sub>PD</sub>* el anticuerpo es un impedimento estérico que previene el acercamiento del *asa<sub>PD</sub>* con el dominio sensor del voltaje, ver Figura 52. El segundo antecedente es la disminución de la amplitud de corriente e incremento en el tiempo de activación del canal hEAG1 al escindir enzimáticamente (*PNGase F*) la glicosilación compleja del residuo N406 en canales situados en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis* (Napp et al. 2005). El residuo N406 se encuentra en una de las *asas<sub>PD</sub>* (ver Figura 52) y probablemente la glicosilación compleja también forma contactos con el sensor de voltaje para estabilizar el estado abierto; la glicosilación N406 tiene su equivalente en hERG1 con el residuo N598.

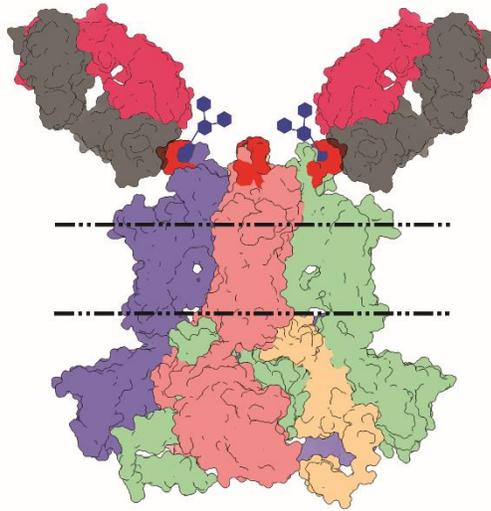


Figura 52. Esquema del mecanismo de inhibición de hEAG1 por el anticuerpo mAb56. En rojo se muestra la región reconocida por el anticuerpo y en azul el residuo N406 que lleva una glicosilación compleja. Es evidente que el impedimento estérico impide la interacción entre las asas del dominio formador del poro y el VSD. Además, se ha confirmado que la glicosilación N406 influye significativamente en la cinética del canal.

## Resultados y discusión

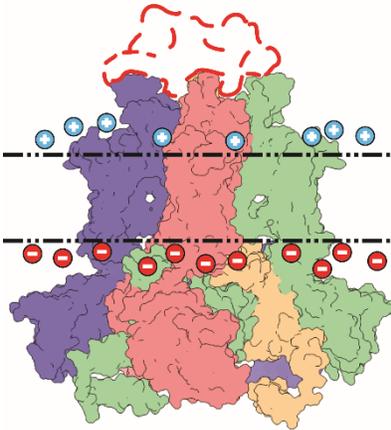
---

---

Antes de continuar discutiendo la propuesta del modelo de *gating* procederemos a describir el fenómeno Cole-Moore shift o desplazamiento Cole-Moore. En 1960, Cole y Moore publicaron los resultados de su investigación en las corrientes de potasio activadas por voltaje ( $I_K$ ) en el axón del calamar gigante (Cole y Moore 1960). Cole y Moore variaron el potencial de la membrana antes del pulso (potencial del prepulso) y mantuvieron el potencial de prueba constante e igual al potencial de equilibrio del ión  $\text{Na}^+$  (~67 mV). Se observó que  $I_K$  se desplazaba positivamente en el tiempo con prepulsos más hiperpolarizantes; sin embargo, la amplitud de corriente permaneció mayoritariamente sin cambios. Esto es, la activación se retrasaba con la hiperpolarización antes del pulso de prueba pero la forma de la curva  $I_K$  vs tiempo era insensible a los voltajes de los prepulsos (Cole y Moore 1960). De manera similar, el canal hEAG1 se caracteriza por tener una activación retardada después de prepulsos hiperpolarizantes y por eso algunos autores le han llamado erróneamente efecto Cole-Moore shift (Bauer y Schwarz 2018; Hoshi y Armstrong 2015). Sin embargo, el fenómeno parece ser distinto ya que la forma de la curva " $I_{hEAG1}$  vs tiempo" cambia significativamente en función de un componente rápido y un componente lento (Hoshi y Armstrong 2015). Además, se ha reportado que el desplazamiento de  $I_{hEAG1}$  en el tiempo es dependiente de la concentración extracelular de cationes divalentes tales como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y varias especies de cationes monovalentes y protones (Terlau et al. 1996).

De acuerdo con el modelo de *gating* aquí propuesto, cuando la membrana se polariza la acumulación local de iones genera una repulsión que hará que las  $asas_{PD}$  se separen del dominio sensor de voltaje y el canal pase a la conformación cerrada. Se infiere que si en un protocolo de pulsos se hiperpolariza la membrana, las  $asas_{PD}$  experimentarán mayor repulsión y se encontrarán más cercanas a la normal del plano de la membrana, lo que retardaría la activación del canal cuando se despolarice la membrana. En concordancia con esta propuesta, se ha interpretado previamente que el desplazamiento de  $I_{hEAG1}$  en el tiempo es el resultado de la existencia de múltiples estados "profundamente cerrados" (*deep-closed states*) que debe transicionar el canal hEAG1 para permitir el flujo de iones (Hoshi y Armstrong 2015; Terlau et al. 1996).

Entonces, aquí se propone que cuando la membrana está hiperpolarizada o polarizada las  $asas$  se acercan una a la otra formando el sitio de unión a toxina. Experimentos del laboratorio húmedo ha confirmado que las toxinas Ap1a, Aa1a aumentan significativamente el fenómeno similar al *Cole-More shift* (Ma et al. 2018) y que APETx4 se une al canal en la conformación cerrada (Moreels, Peigneur, Galan, et al. 2017). Probablemente Aa1a es capaz de inhibir al canal completamente a diferencia de Ap1a puesto que su modo de unión inmoviliza exitosamente las  $asas_{PD}$  (el análisis de contactos entre réplicas sugiere que es menos dinámico).



*Figura 53. La conformación del canal cerrado (asas<sub>PD</sub> arriba) construye el sitio de unión de las toxinas globulares modificadoras del gating.*

Es pertinente recordar que el *gating* de un canal es algo concertado entre varios monómeros o dominios y aún entre miembros de la familia EAG la cinética es distinta. Lo que implica que cada canal tiene otros sitios de unión a moléculas (como el dominio PAS) que contribuyen a modular la cinética que se observa en los experimentos de electrofisiología. El modelo propuesto no demerita la importancia de otras regiones del canal como las regiones transmembranales o citoplasmáticas.

## Conclusiones y perspectivas

---

---

A partir del modelado por homología se construyó un modelo de un canal que es un potencial blanco para el desarrollo de un tratamiento antineoplásico. Con técnicas de acoplamiento molecular basadas principalmente en la geometría se propuso un sitio de unión para los inhibidores reportados. Dado que el acoplamiento molecular prescinde en gran medida de la flexibilidad de las proteínas así como del comportamiento fuera del sitio de unión se utilizó dinámica molecular para validar y optimizar la predicción del acoplamiento. Debido a que la dinámica molecular es una técnica costosa computacionalmente se desarrolló un protocolo multiescala que permite estudiar con dinámica molecular un sistema de más de 1,300 residuos aminoácidos con cuatro cadenas transmembranales y una membrana explícita. Además, dicho protocolo cuenta con la implementación de TopoTools lo que facilita utilizar la amplia gama de modificaciones disponibles en CHARMM-GUI como son fosforilación, glicosilación, unión covalente a lípidos y a etiquetas de marcadores luminiscentes o fluorescentes. El sistema multiescala en su forma actual con 128 núcleos de 2.60 GHz tarda 24 horas de reloj en simular 55-64 ns, los resultados con el sistema glicosilado sugieren que hay posibilidades de mejorar el rendimiento actual ya que existe 35-50% de imbalance de carga entre los núcleos. Una estrategia a probar sería desplazar el uso de CPU con GPU, que de ser exitosa permitirá realizar el protocolo en computadoras de escritorio a un costo moderado.

La validación de los modos de unión propuestos por acoplamiento molecular de las toxinas Ap1a y Aa1a permitió proponer un modelo consistente de inhibición y de *gating* para los canales hEAG1 y hERG1. Dicho modelo está sustentado en información previamente reportada por experimentos de laboratorio húmedo, aunque se desconoce su relevancia para otros miembros de la familia EAG. Con los modelos propuestos se espera sentar antecedentes que permitan optimizar o diseñar moléculas para el tratamiento de canalopatías o incluso facilitar el descubrimiento y caracterización de nuevos canales.

El análisis de contactos de proteína con glicosilaciones revela que dichas interacciones son más dinámicas e inespecíficas que aquellas entre proteína-proteína y por lo tanto es un desafío predecir su efecto. En general, se propone que las glicosilaciones de hEAG1 contribuyen a la estabilización de las asas, en particular N388 estabilizaría la interacción entre ambas *asas<sub>PD</sub>* de un monómero y N406 la interacción de *asas<sub>PD</sub>* con el dominio sensor de voltaje. Además, se sugiere que la glicosilación N388 estabiliza el modo de unión no productivo de Ap1a en mayor medida que para Aa1a lo que podría explicar su incapacidad para inhibir el 100% de la corriente de hEAG1.

En futuros estudios se plantearán nuevas metodologías para analizar exclusivamente los residuos con menor número de contactos durante toda la interacción puesto que los estudios de ingeniería de proteínas podrían utilizarlos como blanco para la optimización de la actividad inhibitoria de la toxina; será necesario tomar en cuenta la vecindad del residuo a modificar. Finalmente, se recomienda estudiar la inhibición de hEAG1 por toxinas peptídicas *in vitro*, realizando mutagénesis dirigida a los residuos N388, M397, D398, N406 y escindiendo las glicosilaciones.

## Gráficos de Ramachandran de rEAG1

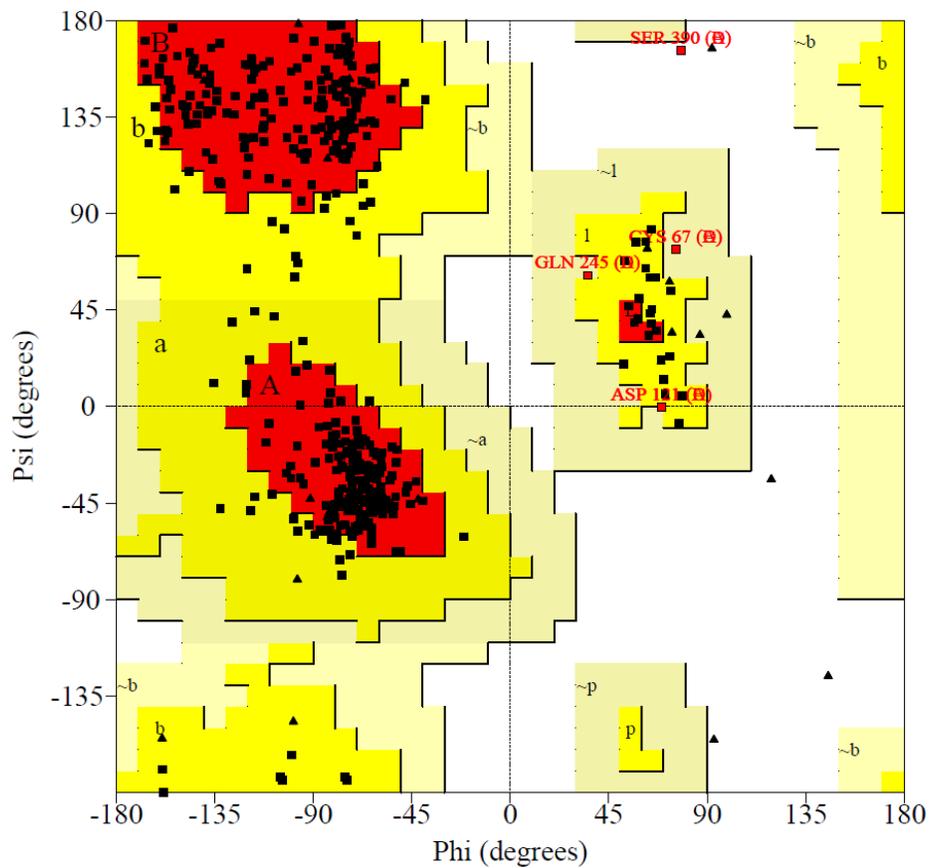


Figura S1. Gráfico de Ramachandran de rEAG1 generado por PROCHECK. 2556 residuos diferentes de glicina y prolina. De los cuales 88.9% están en regiones favorecidas [A,B,L], 10.5% en regiones permitidas [a,b,l,p], 0.5% en regiones generosamente permitidas [~a,~b,~l,~p] y 0.2% en regiones no permitidas.

Gráficos de Ramachandran de hEAG1

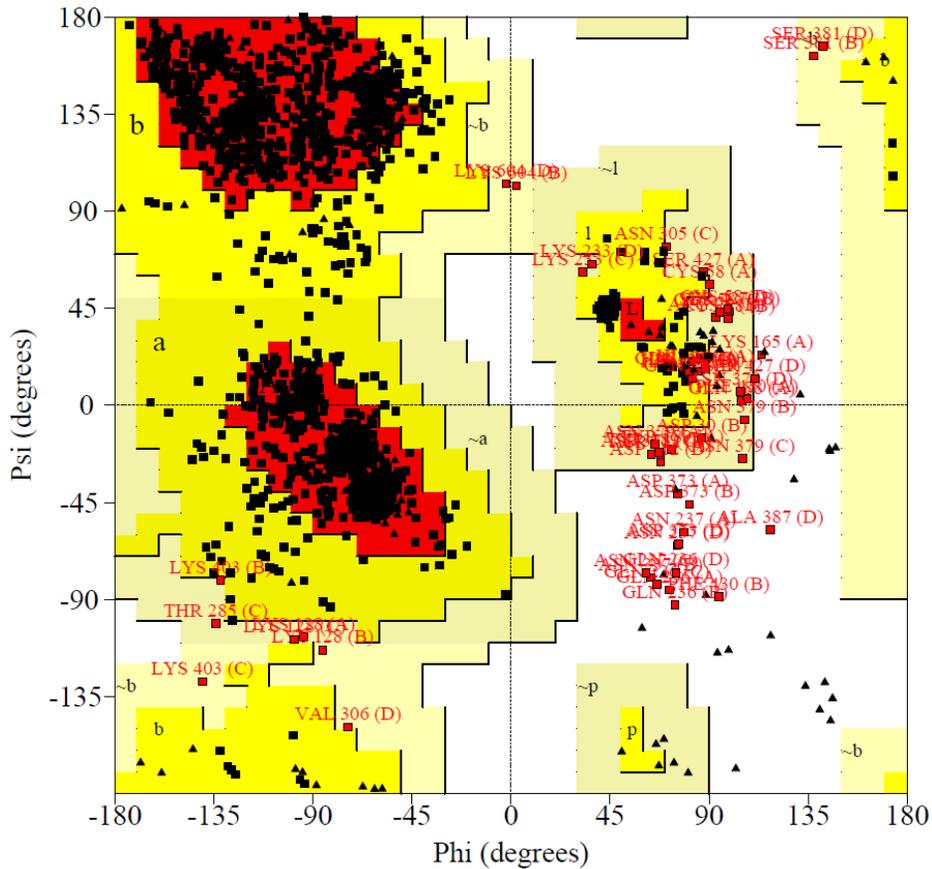


Figura S2. Gráfico de Ramachandran de hEAG1 generado por PROCHECK. 2604 residuos diferentes de glicina y prolina. De los cuales 89.8% están en regiones favorecidas [A,B,L], 8.1% en regiones permitidas [a,b,l,p], 1.5% en regiones generosamente permitidas [~a,~b,~l,~p] y 0.6% en regiones no permitidas

## Potencial electrostático hEAG1

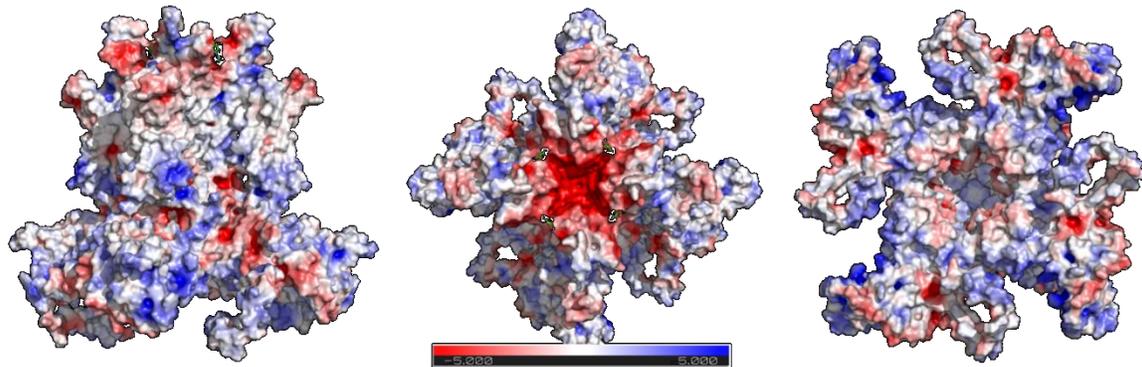


Figura S3. Potencial electrostático del canal hEAG1 minimizado.

## RMSD todos los modelos contra todos los modelos obtenidos por NMR

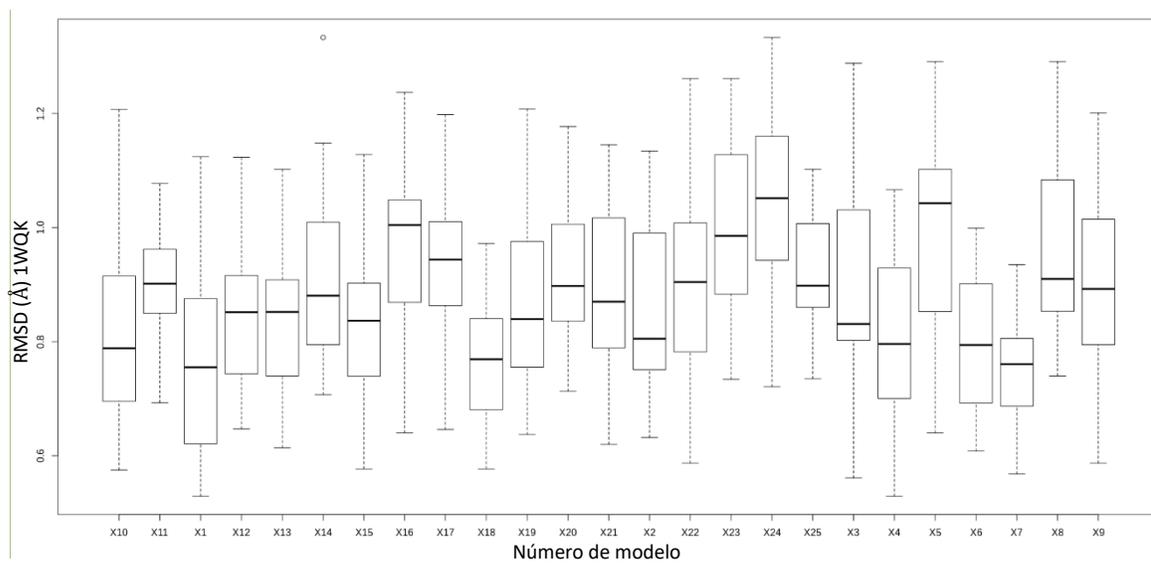


Figura S4. Gráfica de todos los modelos contenidos en el PDB:1WQK y su RMSD entre ellos. Se eligió el modelo 7 para ser el más representativo.

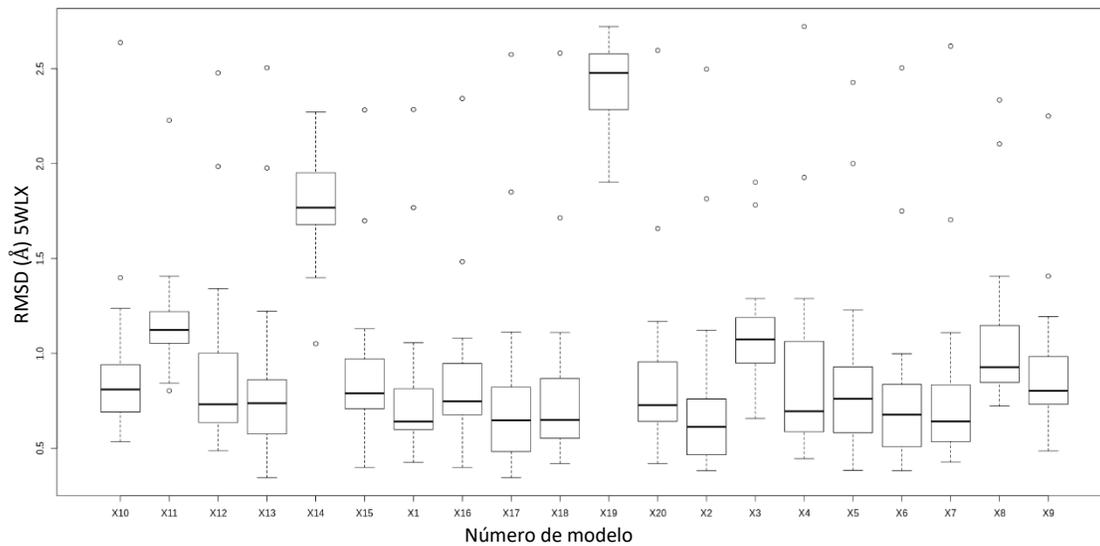


Figura S5. Gráfica de todos los modelos contenidos en el PDB:5WLX y su RMSD entre ellos. Se eligió el modelo 2 para ser el más representativo.

# Apéndice

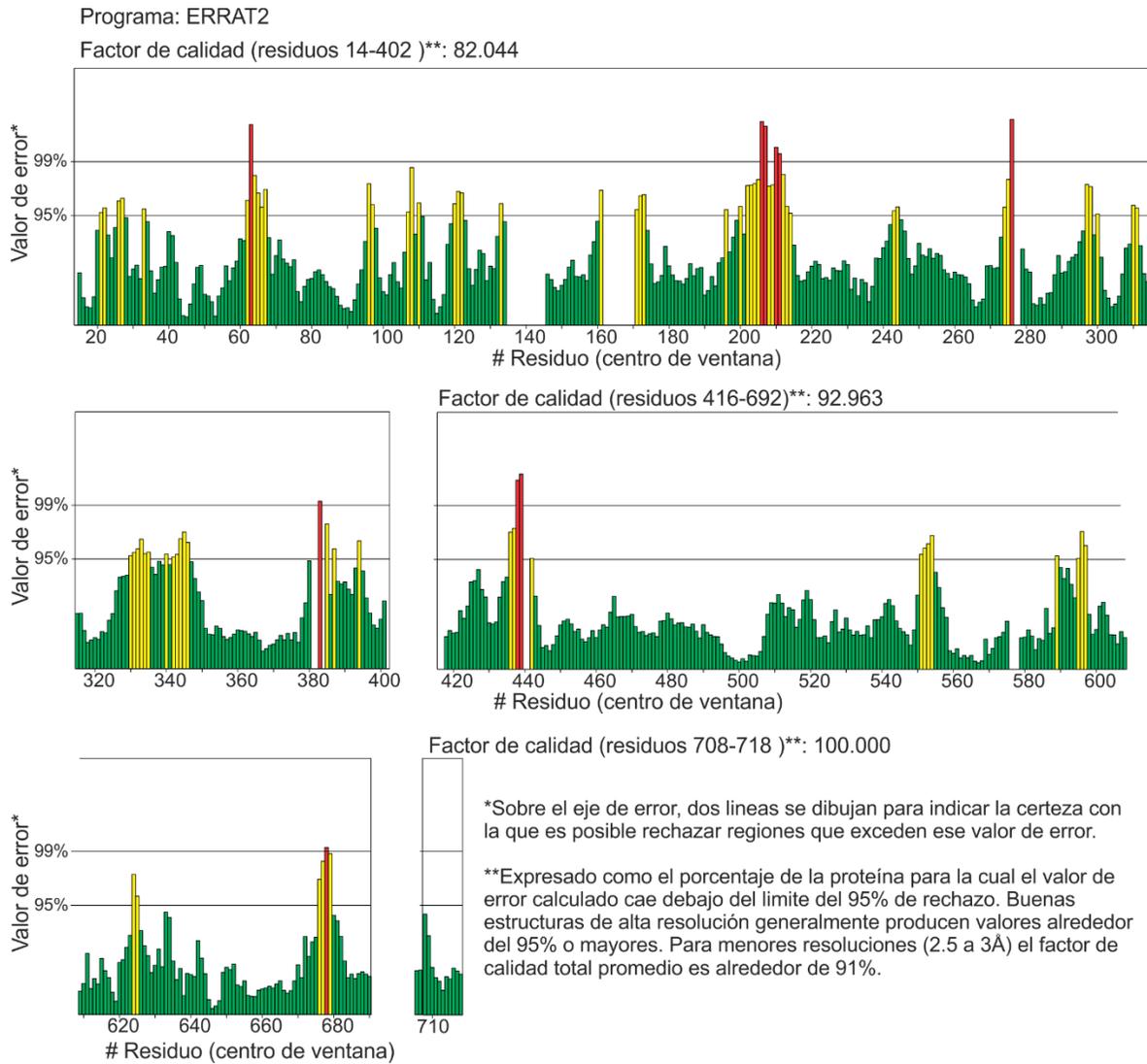


Figura S6. Evaluación ERRAT del monómero de rEAG1 (PDB:5K7L), se tienen distintos factores de calidad puesto que hay residuos faltantes en la estructura.

# Apéndice

Programa: ERRAT2  
Factor de calidad total (cadena A)\*\*: 91.739

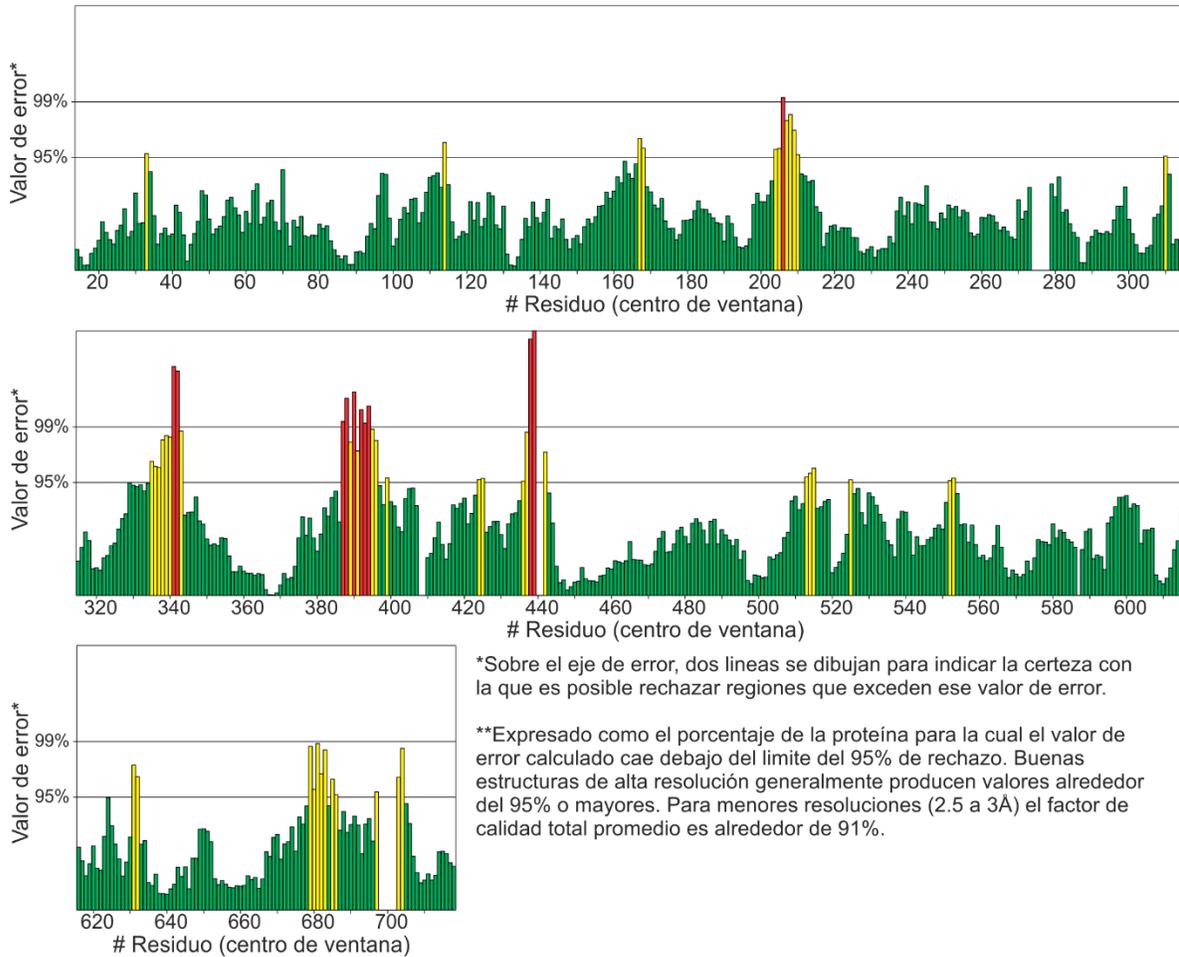


Figura S7. Evaluación ERRAT de la cadena A del modelo final hEAG1 minimizado.

# Apéndice

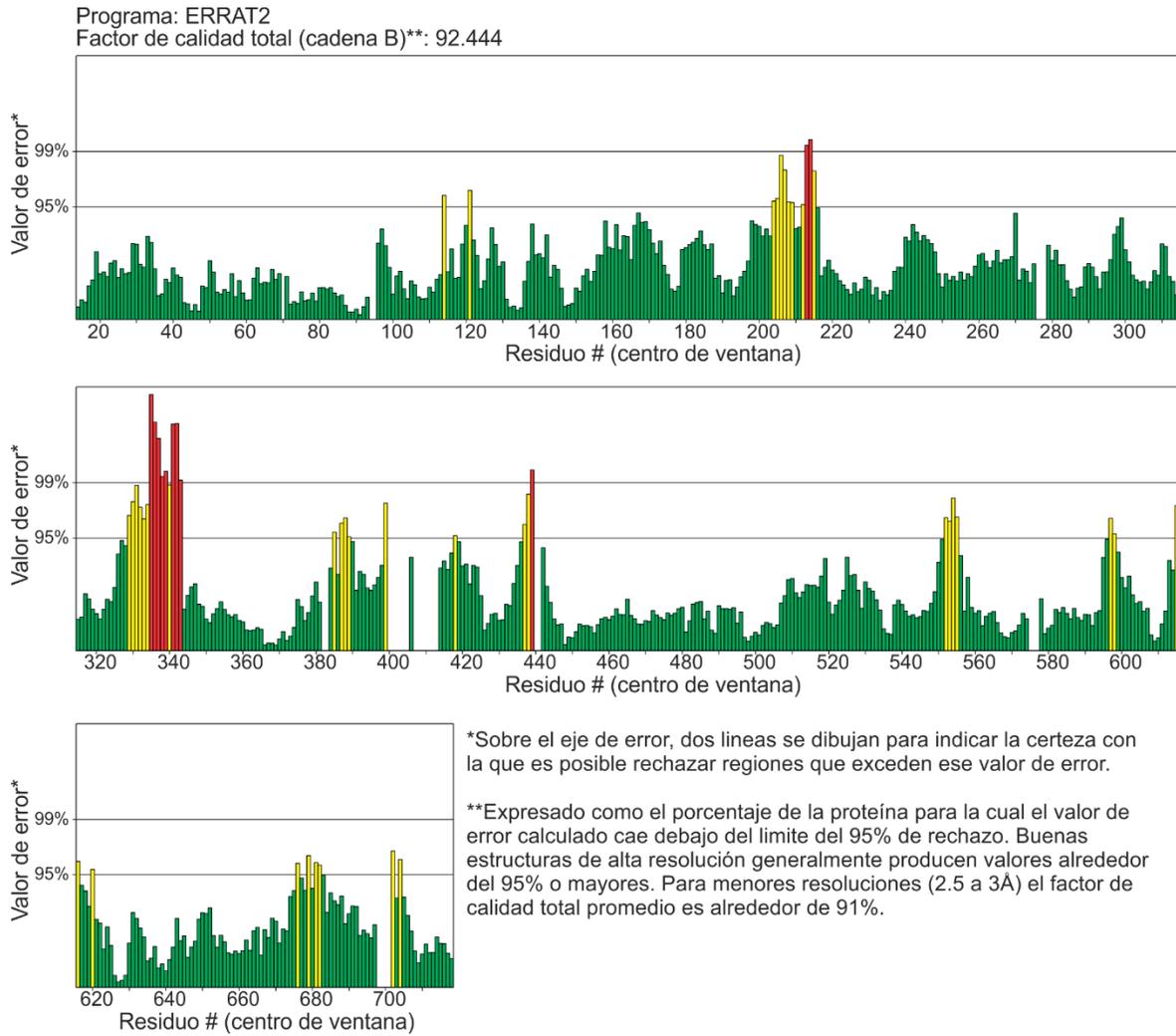


Figura S8. Evaluación ERRAT de la cadena B del modelo final hEAG1 minimizado.

## Apéndice

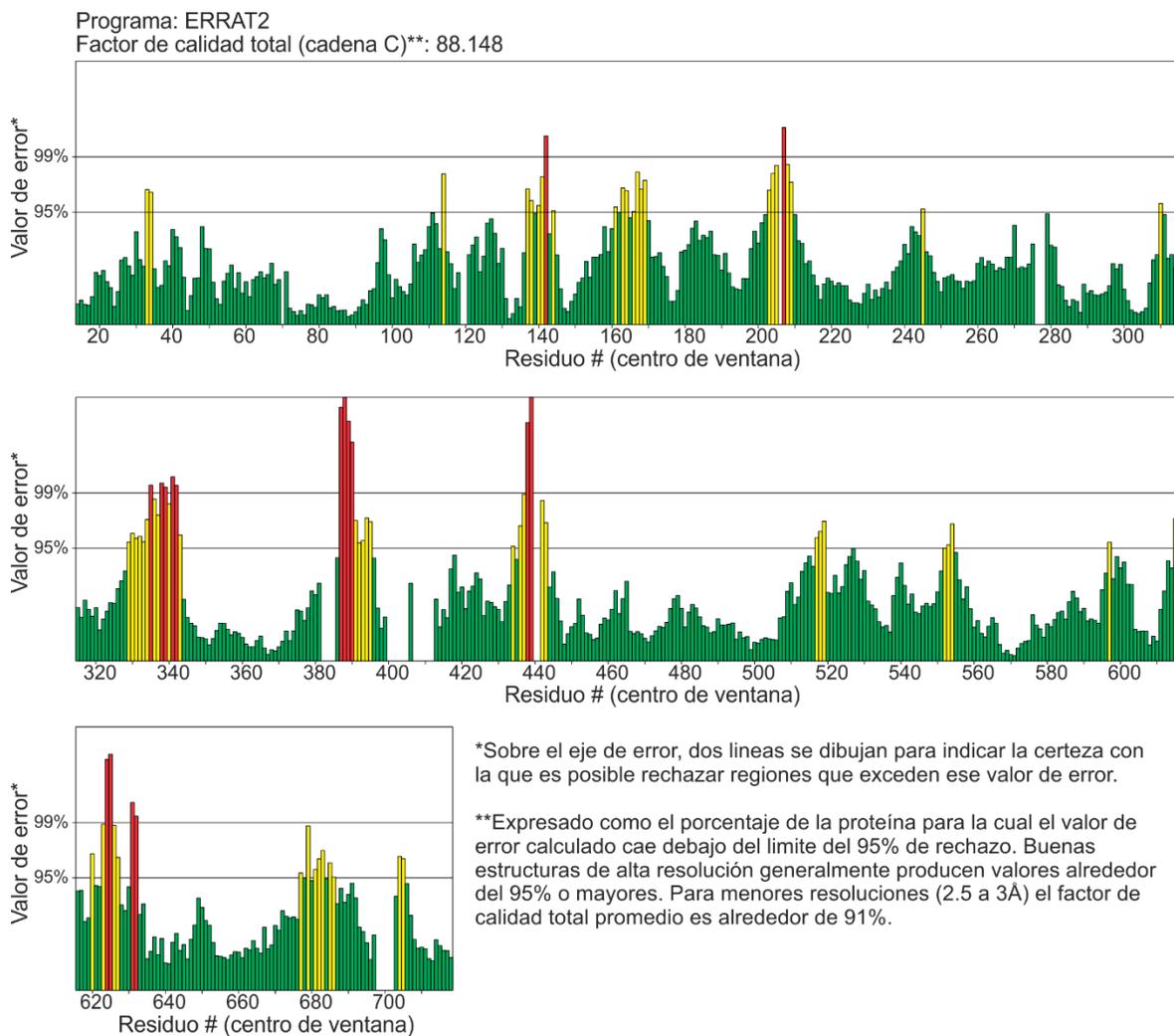


Figura S9. Evaluación ERRAT de la cadena C del modelo final hEAG1 minimizado.

## Apéndice

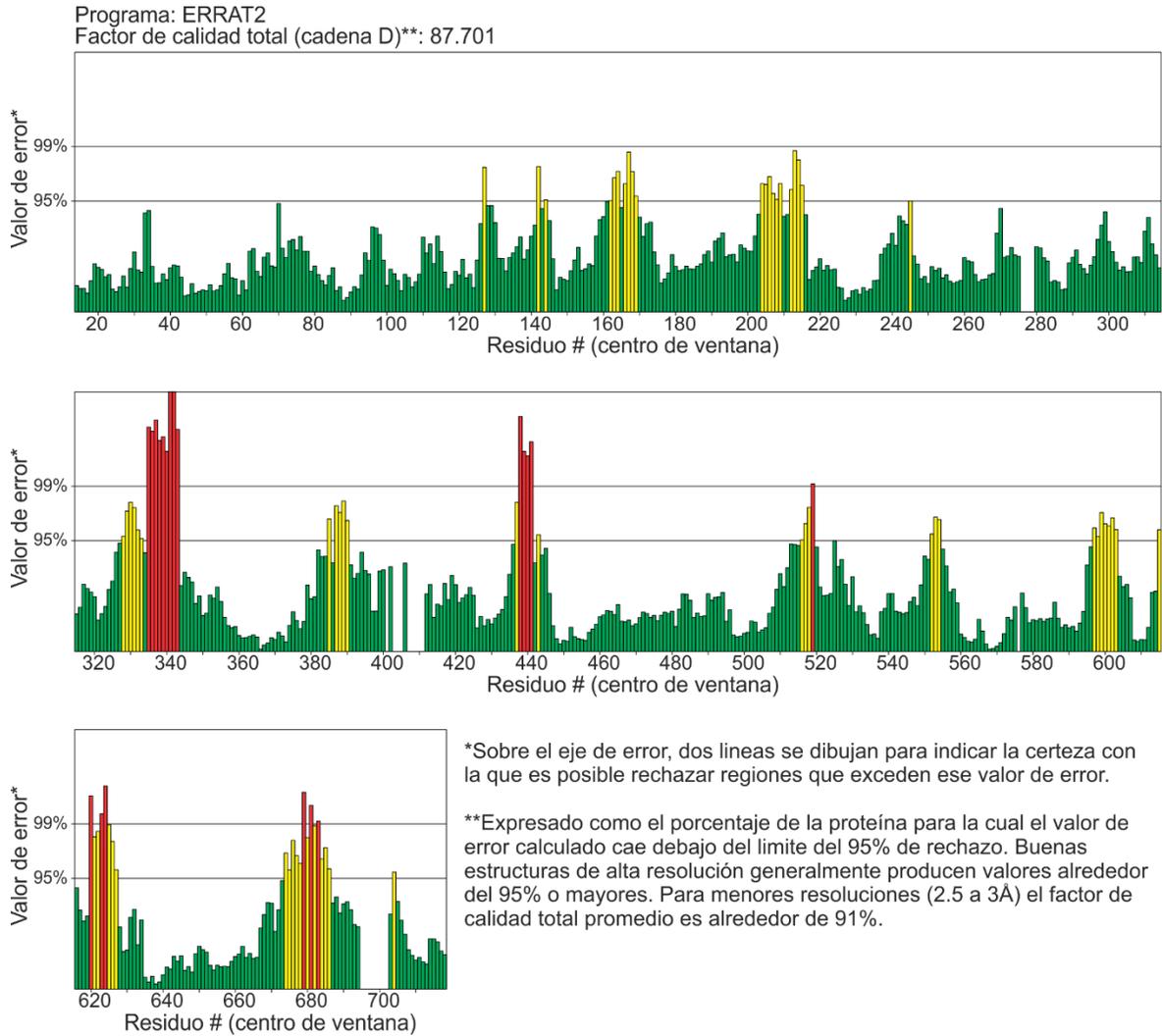


Figura S10. Evaluación ERRAT de la cadena D del modelo final hEAG1 minimizado.

# Apéndice

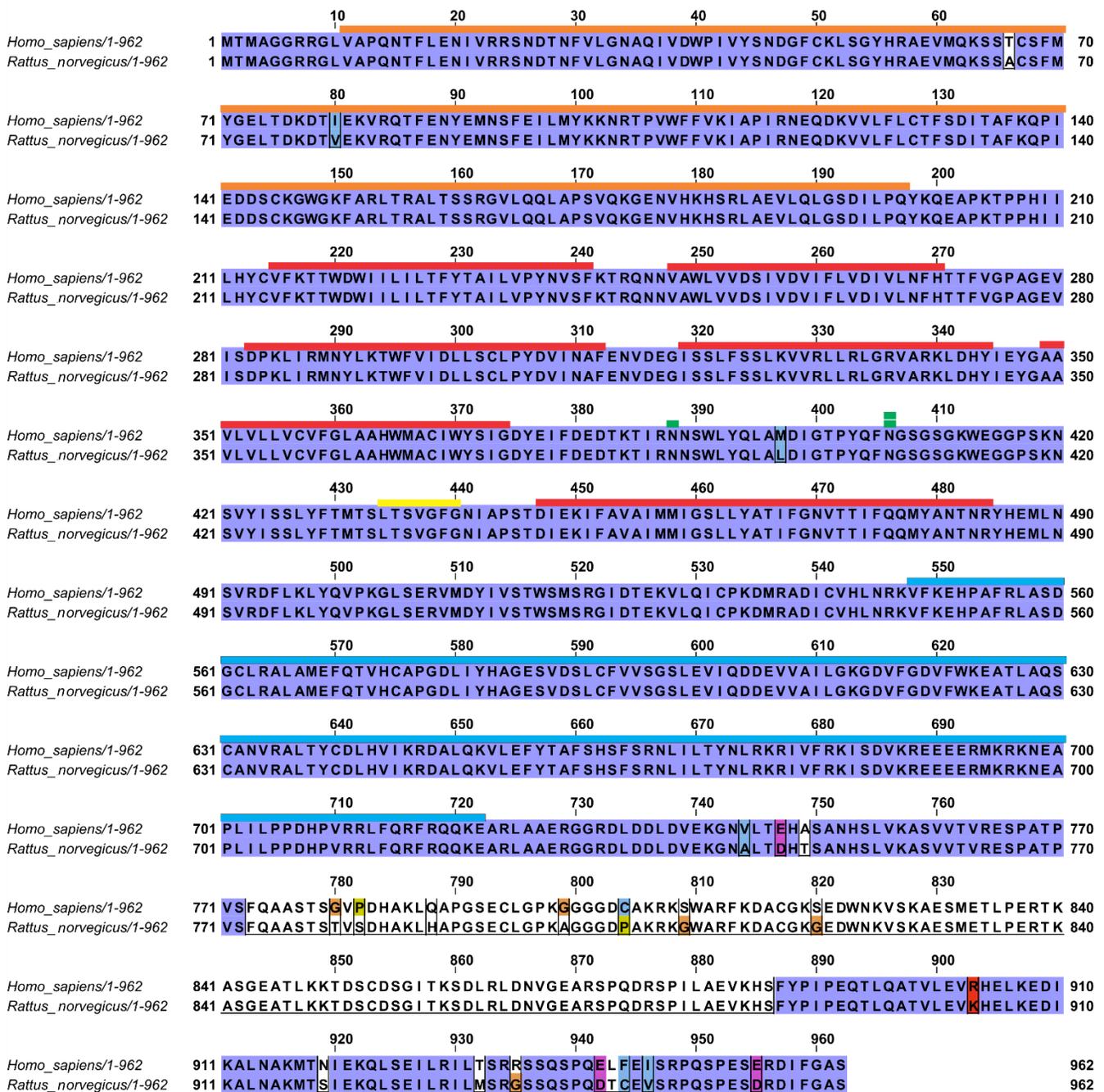


Figura S11. Alineamiento de la secuencia completa de rEAG1 y hEAG1. Naranja representa el dominio PAS, rojo las hélices transmembranales S1-S6, cian el dominio cNHBD, verde sitios de glicosilación y en amarillo secuencia firma de la región del poro.

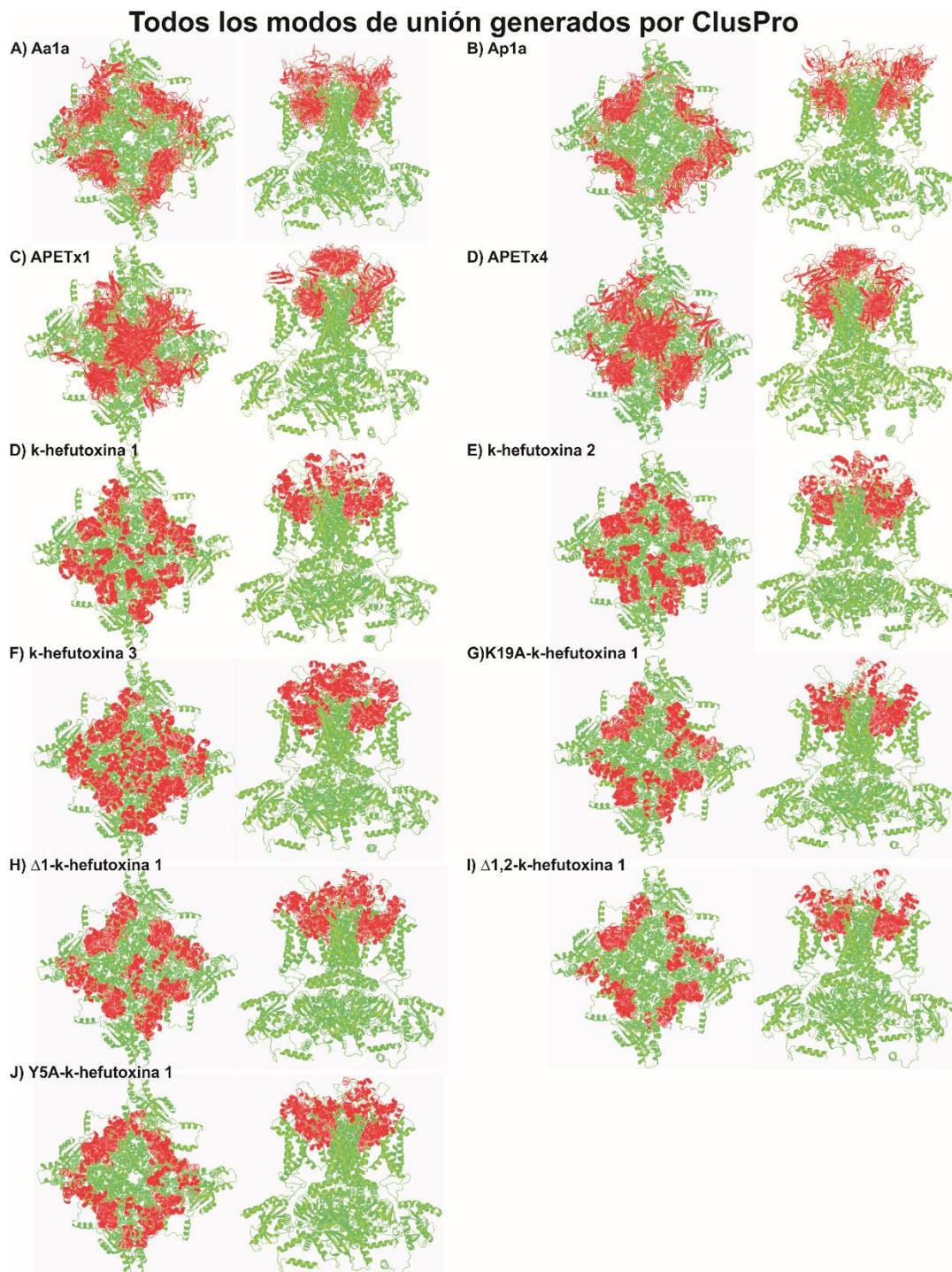


Figura S12. Esquema de los modos de unión generados por CLUSPRO. Se muestra la vista superior (desde el espacio extracelular) y la vista lateral de la membrana.

## Todos los modos de unión generados por PyDockWEB

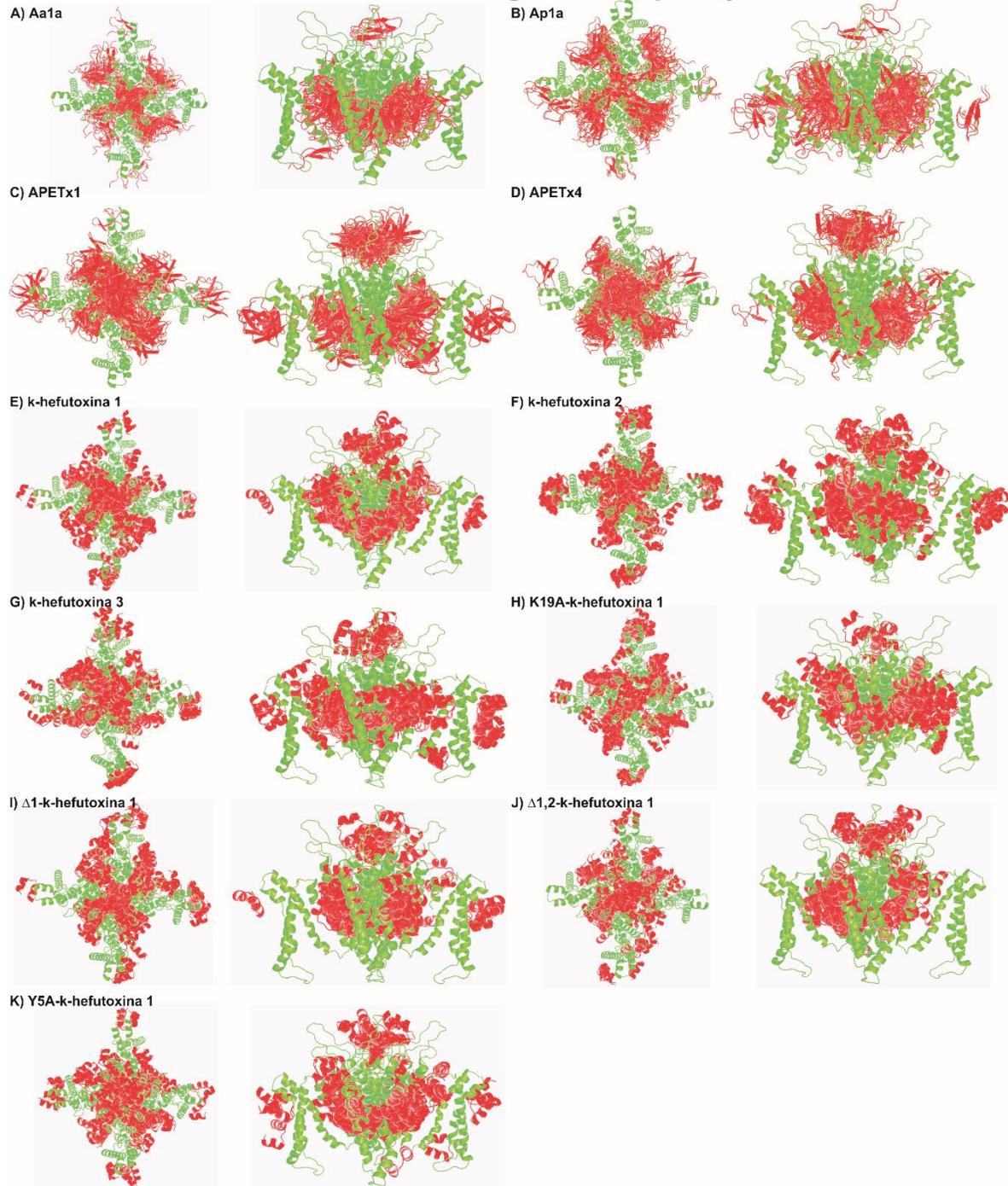


Figura S13. Esquema de todos los modos de unión generados por PyDockWEB. Se muestra la vista superior (desde el espacio extracelular) y la vista lateral de la membrana.

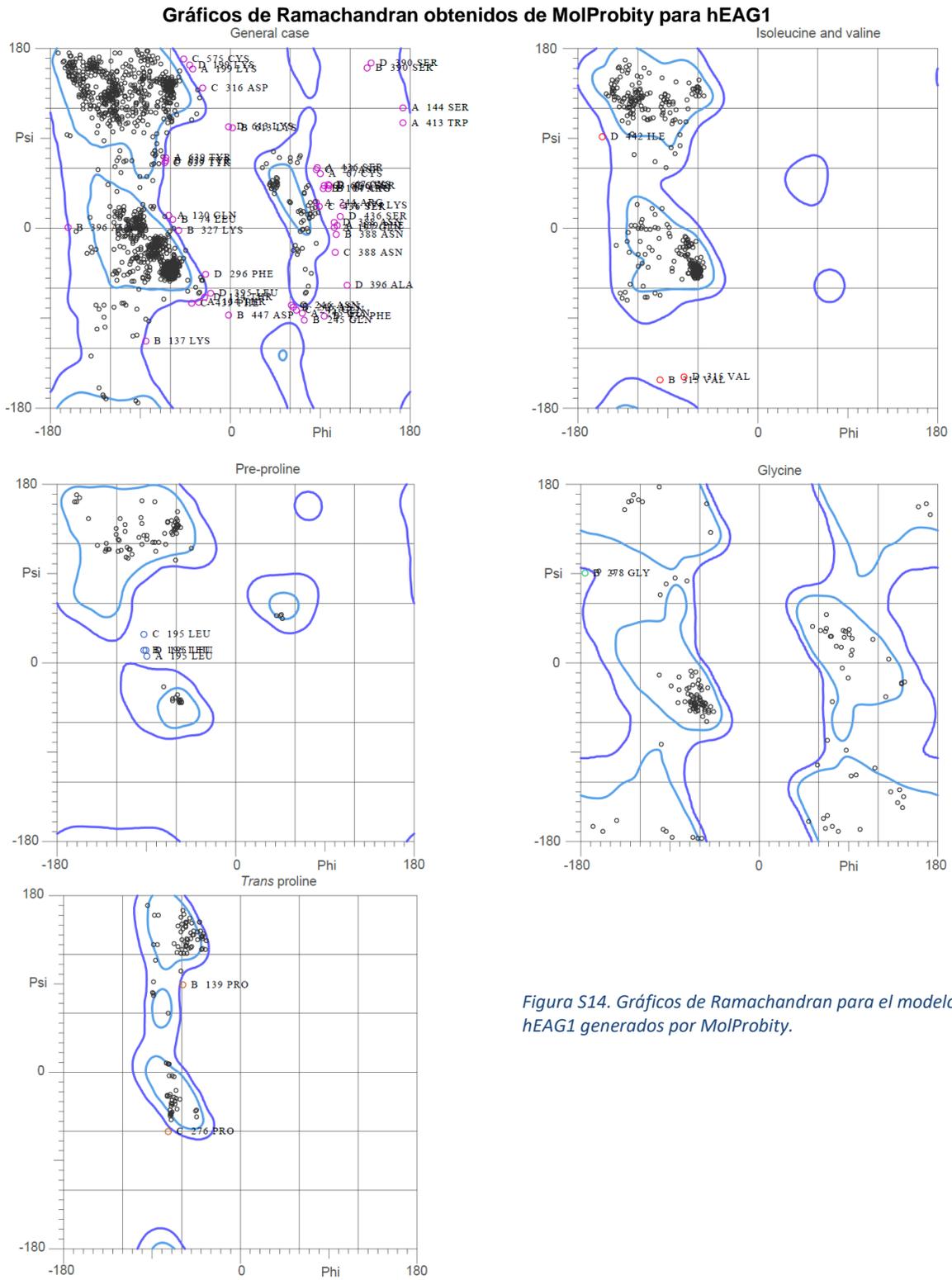


Figura S14. Gráficos de Ramachandran para el modelo hEAG1 generados por MolProbity.

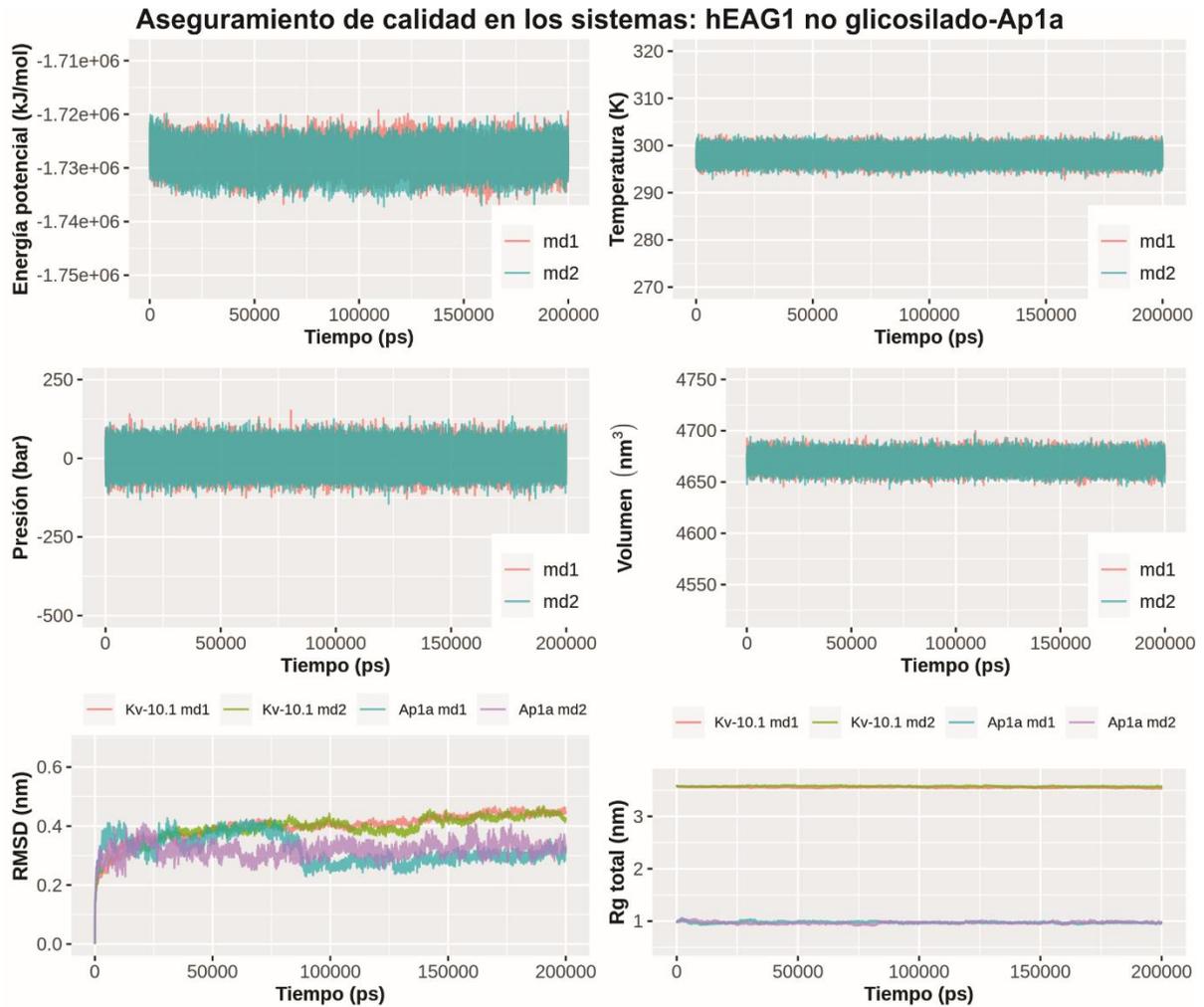


Figura S15. Convergencia de términos energéticos y estructurales de la dinámica molecular del sistema hEAG1 no glicosilado-toxina Ap1a. La réplica 1 y réplica 2 se denotan como md1 y md2 respectivamente.

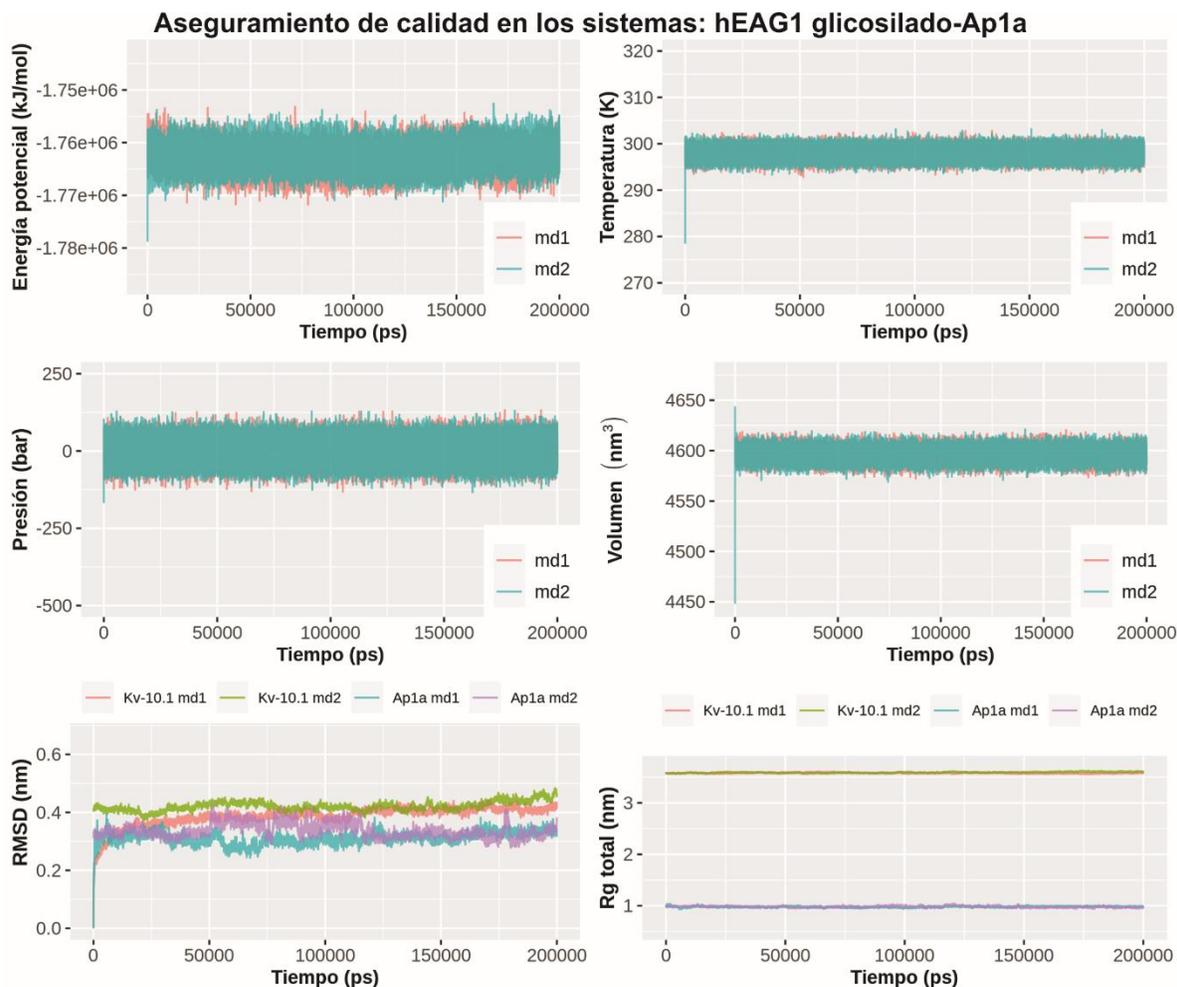


Figura S16. Convergencia de términos energéticos y estructurales de la dinámica molecular del sistema hEAG1 glicosilado-toxina Ap1a. La réplica 1 y réplica 2 se denotan como md1 y md2 respectivamente.

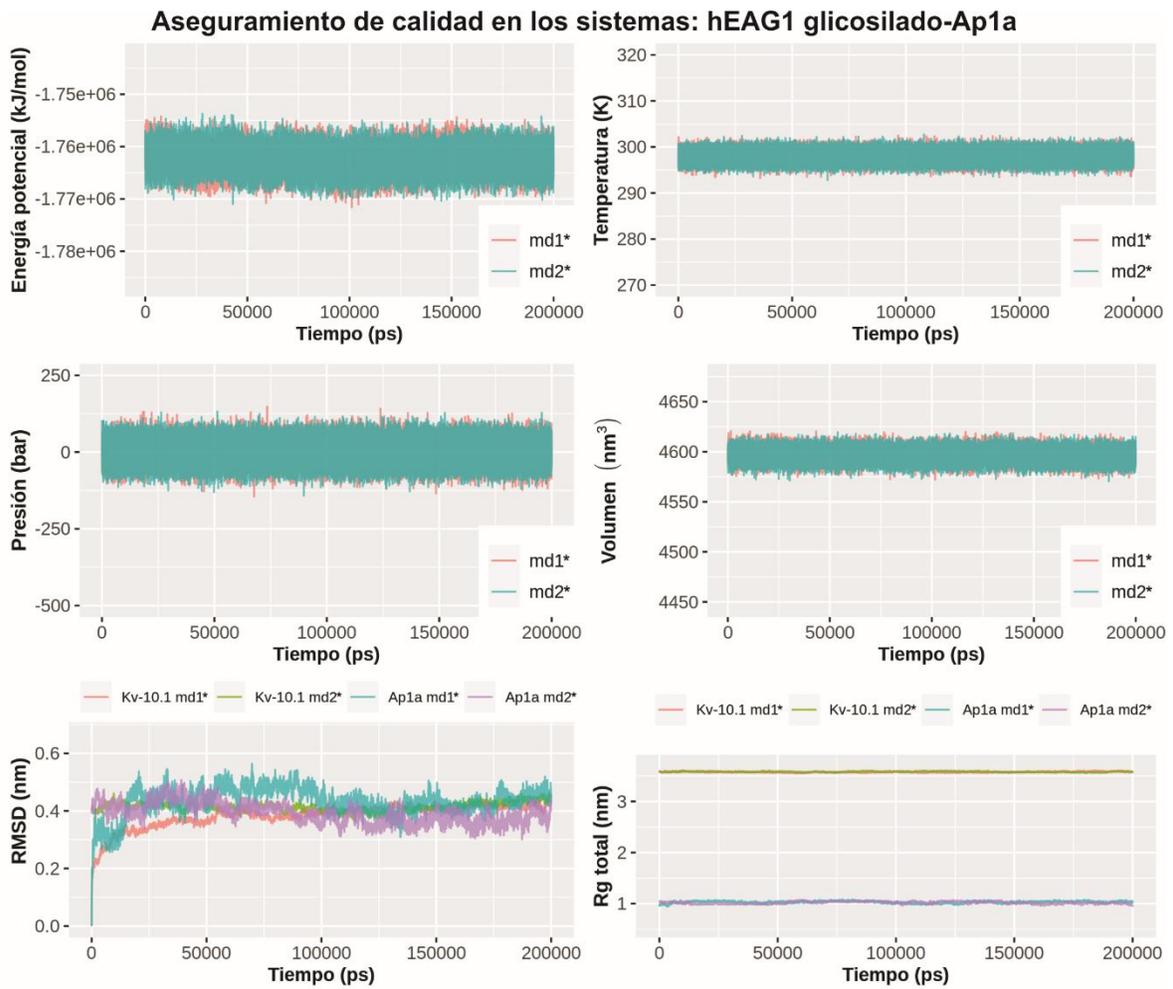


Figura S17. Convergencia de términos energéticos y estructurales de la dinámica molecular del sistema hEAG1 glicosilado-toxina Ap1a en un estado intermediario. La réplica 1 y réplica 2 se denotan como md1\* y md2\* respectivamente.

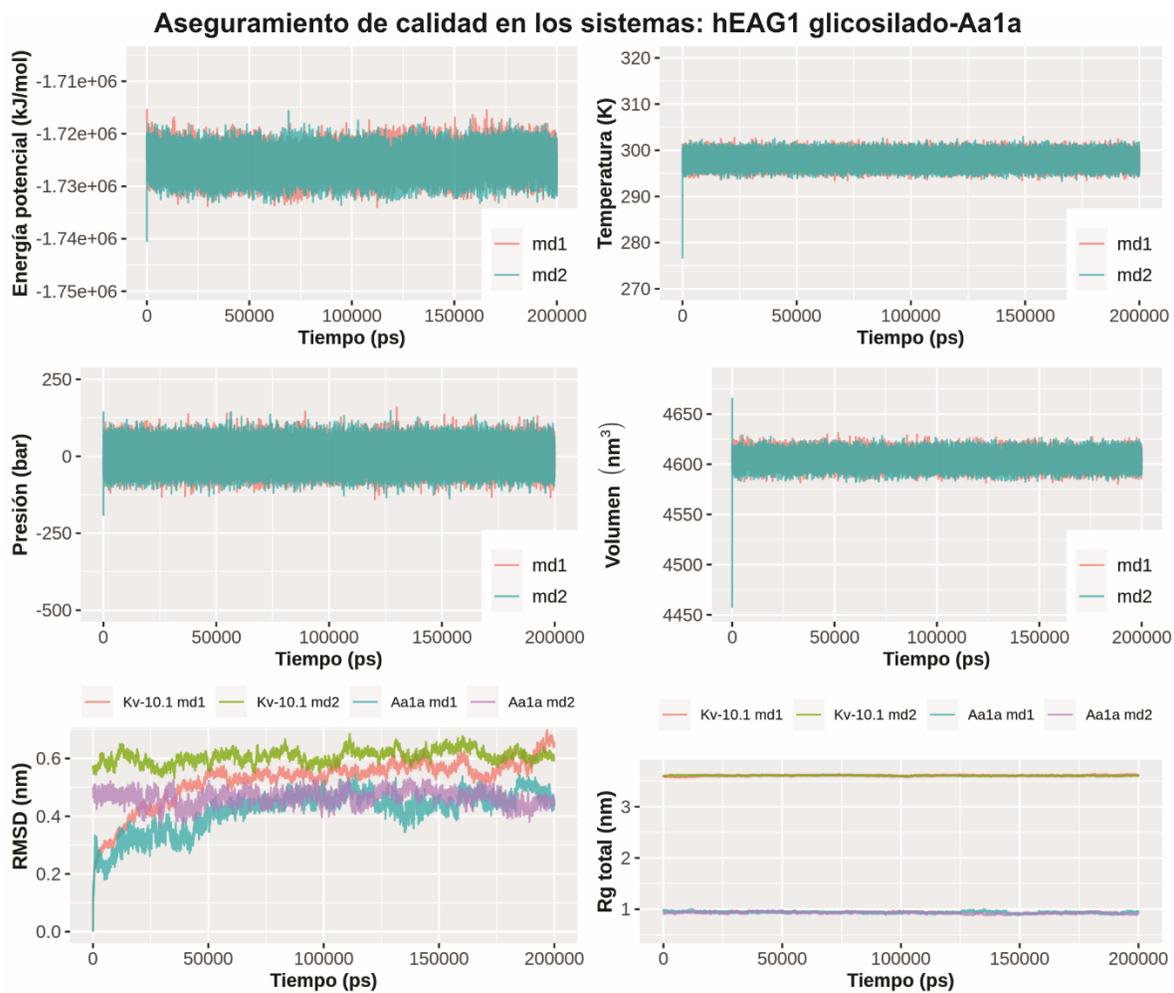


Figura S18. Convergencia de términos energéticos y estructurales de la dinámica molecular del sistema hEAG1 glicosilado-toxina Aa1a. La réplica 1 y réplica 2 se denotan como md1 y md2 respectivamente.

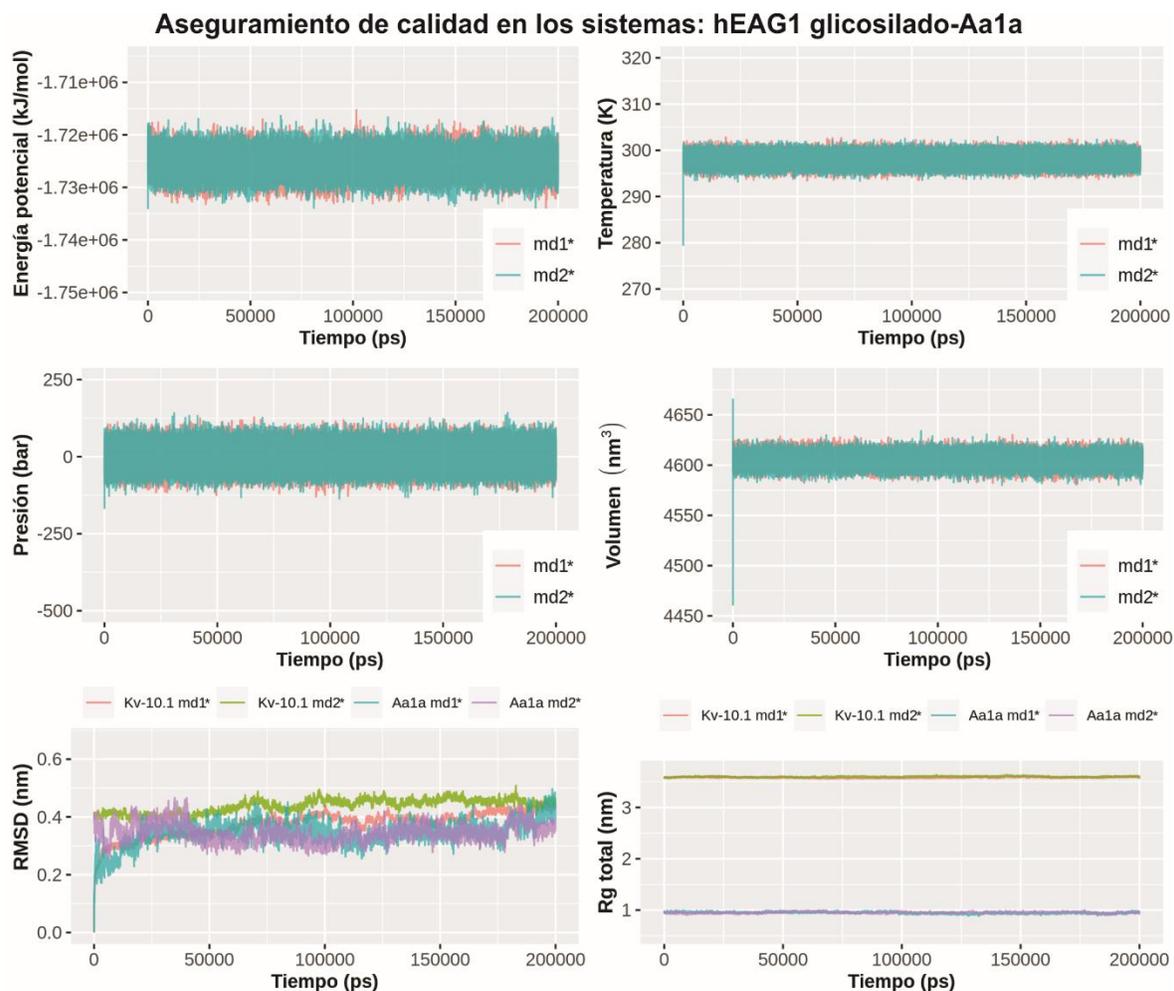


Figura S19. Convergencia de términos energéticos y estructurales de la dinámica molecular del sistema hEAG1 glicosilado-toxina Aa1a en un estado intermedio. La réplica 1 y réplica 2 se denotan como md1\* y md2\* respectivamente.

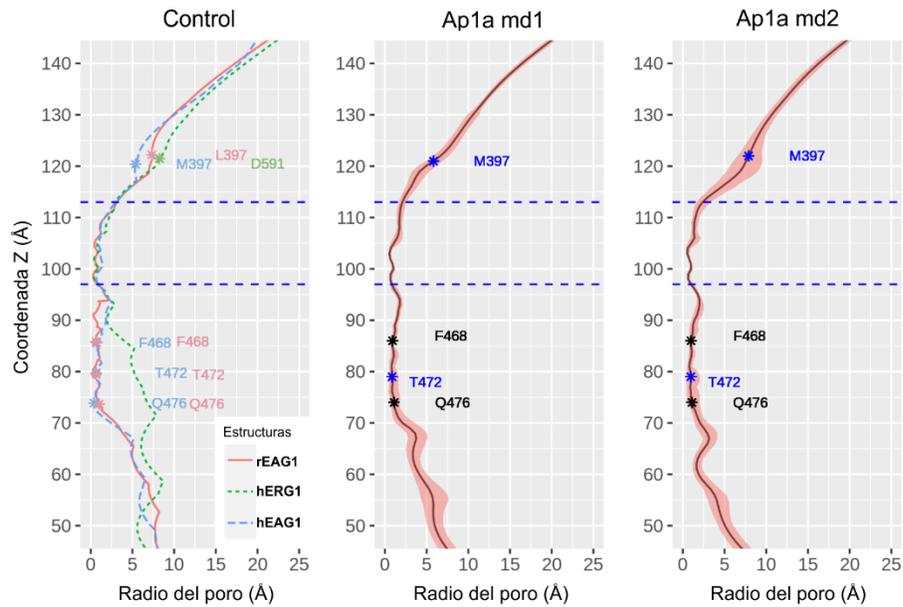


Figura S20. Radio del poro a través de los últimos 50 ns de simulación calculado con el programa HOLE (Smart et al. 1996). Las líneas punteadas azules delimitan el filtro de selectividad; la línea negra representa la media geométrica ( $\bar{x}^*$ ), y el contorno rojo representa la desviación estándar geométrica ( $s^*$ ). El intervalo se puede denotar como  $\bar{x}^{*X}/s^*$  de acuerdo a Limpert y Stahel (2011). El panel debajo del título “control” muestra las estructuras del molde rEAG1 (PDB:5K7L), el modelo minimizado construido hEAG1, y el canal abierto hERG1 (PDB:5VA1).

## Apéndice

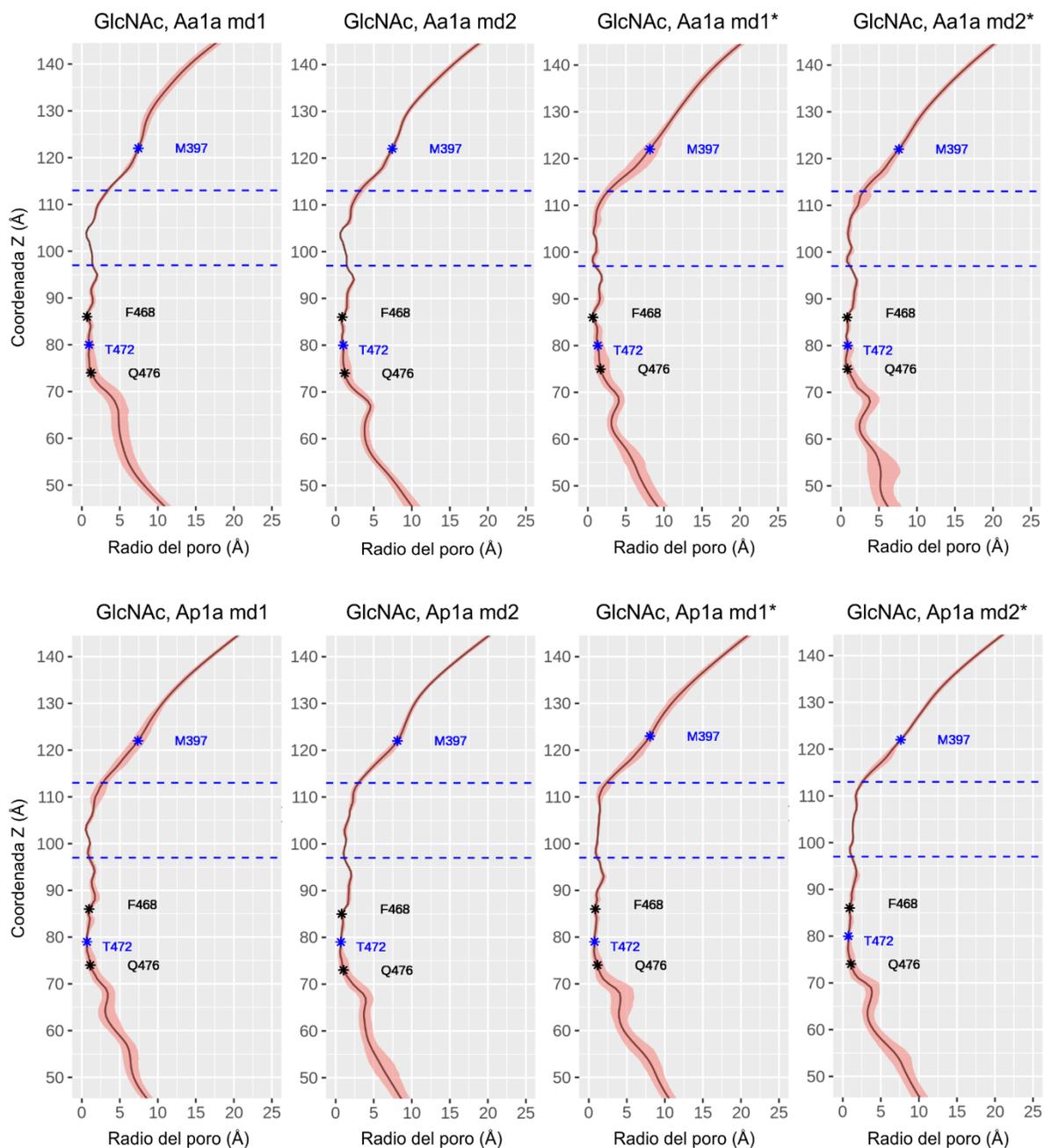


Figura S21. Radio del poro a través de los últimos 50 ns de simulación calculado con el programa HOLE (Smart et al. 1996). Las líneas punteadas azules delimitan el filtro de selectividad; la línea negra representa la media geométrica ( $\bar{x}^*$ ), y el contorno rojo representa la desviación estándar geométrica ( $s^*$ ). El intervalo se puede denotar como  $\bar{x}^{*X}/s^*$  de acuerdo a Limpert y Stahel (2011). GlcNAc denota que el canal hEAG1 estaba glicosilado en la posición Asn388 durante la trayectoria.

## Referencias

---

---

- Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, y Erik Lindahl. 2015. 'GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers', *SoftwareX*, 1-2: 19-25.
- Alberts, Bruce. 2015. *Molecular biology of the cell* (Garland Science, Taylor y Francis Group: New York, NY).
- Ashcroft, Frances M. 2000. *Ion channels y disease : channelopathies* (Academic Press: San Diego).
- Banerjee, A., A. Lee, E. Campbell, y R. Mackinnon. 2013. 'Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel', *eLife*, 2: e00594.
- Barros, Francisco, Luis A. Pardo, Pedro Domínguez, Luisa Maria Sierra, y Pilar de la Peña. 2019. "New Structures y Gating of Voltage-Dependent Potassium (Kv) Channels y Their Relatives: A Multi-Domain y Dynamic Question." In *International Journal of Molecular Sciences*.
- Bauer, C. K., y J. R. Schwarz. 2001. 'Physiology of EAG K+ channels', *J Membr Biol*, 182: 1-15.
2018. 'Ether-a-go-go K(+) channels: effective modulators of neuronal excitability', *J Physiol*, 596: 769-83.
- Brelidze, T. I., A. E. Carlson, y W. N. Zagotta. 2009. 'Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 y hERG1 channels revealed with fluorescence y electrophysiological methods', *J Biol Chem*, 284: 27989-97.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, A. D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, 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, y M. Karplus. 2009. 'CHARMM: the biomolecular simulation program', *J Comput Chem*, 30: 1545-614.
- Cabral, J. H. M., A. Lee, S. L. Cohen, B. T. Chait, M. Li, y R. Mackinnon. 1998. 'Crystal structure y functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: A eukaryotic PAS domain', *Cell*, 95: 649-55.
- Catterall, W. A., S. Cestele, V. Yarov-Yarovoy, F. H. Yu, K. Konoki, y T. Scheuer. 2007. 'Voltage-gated ion channels y gating modifier toxins', *Toxicon*, 49: 124-41.
- Cazares-Ordóñez, V., y L. A. Pardo. 2017. 'Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors', *Biochem Cell Biol*, 95: 531-36.
- Chen, P. C., y S. Kuyucak. 2009. 'Mechanism y energetics of charybdotoxin unbinding from a potassium channel from molecular dynamics simulations', *Biophys J*, 96: 2577-88.
- Chen, V. B., W. B. Arendall, 3rd, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, y D. C. Richardson. 2010. 'MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography', *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, 66: 12-21.
- Clairfeuille, T., A. Cloake, D. T. Infield, J. P. Llongueras, C. P. Arthur, Z. R. Li, Y. Jian, M. F. Martin-Eauclaire, P. E. Bougis, C. Ciferri, C. A. Ahern, F. Bosmans, D. H. Hackos, A. Rohou, y J. Payandeh. 2019. 'Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels', *Science*, 363: eaav8573.
- Cole, K. S., y J. W. Moore. 1960. 'Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic', *Biophys J*, 1: 1-14.
- Colovos, C., y T. O. Yeates. 1993. 'Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions', *Protein Sci*, 2: 1511-9.

## Referencias

---

---

- Darre, L., M. R. Machado, A. F. Brandner, H. C. Gonzalez, S. Ferreira, y S. Pantano. 2015. 'SIRAH: a structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation y long-range electrostatics', *J Chem Theory Comput*, 11: 723-39.
- Darre, L., A. Tek, M. Baaden, y S. Pantano. 2012. 'Mixing Atomistic y Coarse Grain Solvation Models for MD Simulations: Let WT4 Handle the Bulk', *J Chem Theory Comput*, 8: 3880-94.
- Dolinsky, T. J., P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe, y N. A. Baker. 2007. 'PDB2PQR: expanding y upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations', *Nucleic Acids Res*, 35: W522-5.
- Dolinsky, T. J., J. E. Nielsen, J. A. McCammon, y N. A. Baker. 2004. 'PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations', *Nucleic Acids Res*, 32: W665-7.
- Dominguez, C., R. Boelens, y A. M. Bonvin. 2003. 'HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information', *J Am Chem Soc*, 125: 1731-7.
- Dong, G. Q., H. Fan, D. Schneidman-Duhovny, B. Webb, y A. Sali. 2013. 'Optimized atomic statistical potentials: assessment of protein interfaces y loops', *Bioinformatics*, 29: 3158-66.
- Downie, B. R., A. Sanchez, H. Knotgen, C. Contreras-Jurado, M. Gymnopoulos, C. Weber, W. Stuhmer, y L. A. Pardo. 2008. 'Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis y induces angiogenesis in tumors', *J Biol Chem*, 283: 36234-40.
- Farhadi, Tayebbeh. 2018. 'Advances in protein tertiary structure prediction', *Biomedical y Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 2: 20-25.
- Gavrilova-Ruch, O., K. Schonherr, G. Gessner, R. Schonherr, T. Klapperstuck, W. Wohlrab, y S. H. Heinemann. 2002. 'Effects of imipramine on ion channels y proliferation of IGR1 melanoma cells', *J Membr Biol*, 188: 137-49.
- Gomez-Varela, D., E. Zwick-Wallasch, H. Knotgen, A. Sanchez, T. Hettmann, D. Ossipov, R. Weseloh, C. Contreras-Jurado, M. Rothe, W. Stuhmer, y L. A. Pardo. 2007. 'Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity', *Cancer Res*, 67: 7343-9.
- Gong, Q., C. L. Anderson, C. T. January, y Z. Zhou. 2002. 'Role of glycosylation in cell surface expression y stability of HERG potassium channels', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H77-84.
- Gonzalez, H. C., L. Darre, y S. Pantano. 2013. 'Transferable mixing of atomistic y coarse-grained water models', *J Phys Chem B*, 117: 14438-48.
- Goossens, K., y H. De Winter. 2018. 'Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins: An Overview', *J Chem Inf Model*, 58: 2193-202.
- Gu, Z., L. Gu, R. Eils, M. Schlesner, y B. Brors. 2014. 'circlize Implements y enhances circular visualization in R', *Bioinformatics*, 30: 2811-2.
- Hemmerlein, B., R. M. Weseloh, F. Mello de Queiroz, H. Knotgen, A. Sanchez, M. E. Rubio, S. Martin, T. Schliephacke, M. Jenke, Radzun Heinz Joachim, W. Stuhmer, y L. A. Pardo. 2006. 'Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours', *Mol Cancer*, 5: 41.
- Hill, A. P., M. Sunde, T. J. Campbell, y J. I. Vandenberg. 2007. 'Mechanism of block of the hERG K<sup>+</sup> channel by the scorpion toxin CnErg1', *Biophys J*, 92: 3915-29.
- Hille, Bertil. 2001. *Ion channels of excitable membranes* (Sinauer: Sunderland, Mass.).
- Hoshi, T., y C. M. Armstrong. 2015. 'The Cole-Moore Effect: Still Unexplained?', *Biophys J*, 109: 1312-6.

## Referencias

---

---

- Hub, Jochen S., Bert L. de Groot, y David van der Spoel. 2010. 'g\_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error y Autocorrelation Estimates', *Journal of Chemical Theory y Computation*, 6: 3713-20.
- Ingólfsson, Helgi I., Cesar A. Lopez, Jaakko J. Uusitalo, Djurre H. de Jong, Srinivasa M. Gopal, Xavier Periole, y Siewert J. Marrink. 2014. 'The power of coarse graining in biomolecular simulations', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 4: 225-48.
- Jiang, M., M. Zhang, I. V. Maslennikov, J. Liu, D. M. Wu, Y. V. Korolkova, A. S. Arseniev, E. V. Grishin, y G. N. Tseng. 2005. 'Dynamic conformational changes of extracellular S5-P linkers in the hERG channel', *J Physiol*, 569: 75-89.
- Jimenez-Garcia, B., C. Pons, y J. Fernandez-Recio. 2013. 'pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics y desolvation scoring', *Bioinformatics*, 29: 1698-9.
- Jo, S., T. Kim, V. G. Iyer, y W. Im. 2008. 'CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM', *J Comput Chem*, 29: 1859-65.
- Jo, S., K. C. Song, H. Desaire, A. D. MacKerell, Jr., y W. Im. 2011. 'Glycan Reader: automated sugar identification y simulation preparation for carbohydrates y glycoproteins', *J Comput Chem*, 32: 3135-41.
- Kaplan, W. D., y W. E. Trout, 3rd. 1969. 'The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*', *Genetics*, 61: 399-409.
- Kihara, Daisuke. 2014. "Protein structure prediction." In *Methods in Molecular Biology 1137*, xi, 253 p. New York: Humana Press ; Springer,.
- Kozakov, Dima, David R. Hall, Bing Xia, Kathryn A. Porter, Dzmitry Padhorny, Christine Yueh, Dmitri Beglov, y Sandor Vajda. 2017. 'The ClusPro web server for protein-protein docking', *Nat Protoc*, 12: 255.
- Krivov, G. G., M. V. Shapovalov, y R. L. Dunbrack, Jr. 2009. 'Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4', *Proteins*, 77: 778-95.
- Kuzmenkov, Alexey I., Nikolay A. Krylov, Anton O. Chugunov, Eugene V. Grishin, y Alexander A. Vassilevski. 2016. "Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom." In.
- Lee, J., X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. Brooks, 3rd, A. D. MacKerell, Jr., J. B. Klauda, y W. Im. 2016. 'CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, y CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field', *J Chem Theory Comput*, 12: 405-13.
- Limpert, E., y W. A. Stahel. 2011. 'Problems with using the normal distribution—and ways to improve quality y efficiency of data analysis', *PLoS ONE*, 6: e21403.
- Lorinczi, E., J. C. Gomez-Posada, P. de la Pena, A. P. Tomczak, J. Fernandez-Trillo, U. Leipscher, W. Stuhmer, F. Barros, y L. A. Pardo. 2015. 'Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing y pore domains', *Nat Commun*, 6: 6672.
- Ma, B., y R. Nussinov. 2007. 'Trp/Met/Phe hot spots in protein-protein interactions: potential targets in drug design', *Curr Top Med Chem*, 7: 999-1005.
- Ma, L., Y. K. Y. Chin, Z. Dekan, V. Herzig, C. Y. Chow, J. Heighway, S. W. Lam, G. J. Guillemin, P. F. Alewood, y G. F. King. 2018. 'Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target', *Biochem Pharmacol*, 158: 60-72.

## Referencias

---

---

- Machado, M. R., E. E. Barrera, F. Klein, M. Sonora, S. Silva, y S. Pantano. 2019. 'The SIRAH 2.0 Force Field: Altius, Fortius, Citius', *J Chem Theory Comput*, 15: 2719-33.
- Machado, M. R., y S. Pantano. 2016. 'SIRAH tools: mapping, backmapping y visualization of coarse-grained models', *Bioinformatics*, 32: 1568-70.
- Mallajosyula, Sairam S., Sunhwan Jo, Wonpil Im, y Alexander D. Mackerell. 2015. 'Molecular Dynamics Simulations of Glycoproteins Using CHARMM.' in Thomas Lütteke y Martin Frank (eds.), *Glycoinformatics* (Springer New York: New York, NY).
- Marques-Carvalho, M. J., N. Sahoo, F. W. Muskett, R. S. Vieira-Pires, G. Gabant, M. Cadene, R. Schonherr, y J. H. Morais-Cabral. 2012. 'Structural, biochemical, y functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel', *J Mol Biol*, 423: 34-46.
- McIntosh, B. E., J. B. Hogenesch, y C. A. Bradfield. 2010. 'Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation', *Annu Rev Physiol*, 72: 625-45.
- Miller, C. 1995. 'The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides', *Neuron*, 15: 5-10.
- Moreels, L., S. Peigneur, D. T. Galan, E. De Pauw, L. Beress, E. Waelkens, L. A. Pardo, L. Quinton, y J. Tytgat. 2017. 'APETx4, a Novel Sea Anemone Toxin y a Modulator of the Cancer-Relevant Potassium Channel KV10.1', *Mar Drugs*, 15.
- Moreels, L., S. Peigneur, Y. Yamaguchi, K. Vriens, E. Waelkens, S. Zhu, K. Thevissen, B. P. A. Cammue, K. Sato, y J. Tytgat. 2017. 'Expanding the pharmacological profile of kappa-hefutoxin 1 y analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1', *Peptides*, 98: 43-50.
- Napp, J., F. Monje, W. Stuhmer, y L. A. Pardo. 2005. 'Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking y functional consequences', *J Biol Chem*, 280: 29506-12.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis, y T. D. Halazonetis. 2010. 'Genomic instability--an evolving hallmark of cancer', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 220-8.
- Nowell, P. C. 1976. 'The clonal evolution of tumor cell populations', *Science*, 194: 23-8.
- Occhiodoro, T., L. Bernheim, J. H. Liu, P. Bijlenga, M. Sinnreich, C. R. Bader, y J. Fischer-Lougheed. 1998. 'Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion', *FEBS Letters*, 434: 177-82.
- Olamendi-Portugal, T., A. Bartok, F. Zamudio-Zuniga, A. Balajthy, B. Becerril, G. Panyi, y L. D. Possani. 2016. 'Isolation, chemical y functional characterization of several new K(+)-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*', *Toxicon*, 115: 1-12.
- Olsson, M. H., C. R. Sondergaard, M. Rostkowski, y J. H. Jensen. 2011. 'PROPKA3: Consistent Treatment of Internal y Surface Residues in Empirical pKa Predictions', *J Chem Theory Comput*, 7: 525-37.
- Paquet, E., y H. L. Viktor. 2015. 'Molecular dynamics, monte carlo simulations, y langevin dynamics: a computational review', *Biomed Res Int*, 2015: 183918.
- Pardo-Lopez, L., J. Garcia-Valdes, G. B. Gurrola, G. A. Robertson, y L. D. Possani. 2002. 'Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels', *FEBS Letters*, 510: 45-49.
- Pardo-Lopez, L., M. Zhang, J. Liu, M. Jiang, L. D. Possani, y G. N. Tseng. 2002. 'Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule', *J Biol Chem*, 277: 16403-11.
- Pardo, L. A., D. Gomez-Varela, F. Major, K. Sansuk, R. Leurs, B. R. Downie, L. F. Tietze, y W. Stuhmer. 2012. 'Approaches targeting K(V)10.1 open a novel window for cancer diagnosis y therapy', *Current medicinal chemistry*, 19: 675-82.

## Referencias

---

---

- Park, S. J., J. Lee, D. S. Patel, H. Ma, H. S. Lee, S. Jo, y W. Im. 2017. 'Glycan Reader is improved to recognize most sugar types y chemical modifications in the Protein Data Bank', *Bioinformatics*, 33: 3051-57.
- Park, S. J., J. Lee, Y. Qi, N. R. Kern, H. S. Lee, S. Jo, I. Joung, K. Joo, J. Lee, y W. Im. 2019. 'CHARMM-GUI Glycan Modeler for modeling y simulation of carbohydrates y glycoconjugates', *Glycobiology*, 29: 320-31.
- Patel, J. S., y F. M. Ytreberg. 2018. 'Fast Calculation of Protein-Protein Binding Free Energies Using Umbrella Sampling with a Coarse-Grained Model', *J Chem Theory Comput*, 14: 991-97.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, y T. E. Ferrin. 2004. 'UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research y analysis', *J Comput Chem*, 25: 1605-12.
- Pevsner, Jonathan. 2015. *Bioinformatics y functional genomics* (John Wiley y Sons, Inc.: Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, USA).
- Sali, A., y T. L. Blundell. 1993. 'Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints', *J Mol Biol*, 234: 779-815.
- Sarkar, S., S. Witham, J. Zhang, M. Zhenirovskyy, W. Rocchia, y E. Alexov. 2013. 'DelPhi Web Server: A comprehensive online suite for electrostatic calculations of biological macromolecules y their complexes', *Commun Comput Phys*, 13: 269-84.
- Schneider, J., K. Korshunova, F. Musiani, M. Alfonso-Prieto, A. Giorgetti, y P. Carloni. 2018. 'Predicting ligand binding poses for low-resolution membrane protein models: Perspectives from multiscale simulations', *Biochem Biophys Res Commun*, 498: 366-74.
- Sender, R., S. Fuchs, y R. Milo. 2016. 'Revised Estimates for the Number of Human y Bacteria Cells in the Body', *PLoS Biol*, 14: e1002533.
- Shen, H., D. Liu, K. Wu, J. Lei, y N. Yan. 2019. 'Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits y animal toxins', *Science*, 363: 1303-08.
- Shen, Huaizong, Zhangqiang Li, Yan Jiang, Xiaojing Pan, Jianping Wu, Ben Cristofori-Armstrong, Jennifer J. Smith, Yanni K. Y. Chin, Jianlin Lei, Qiang Zhou, Glenn F. King, y Nieng Yan. 2018. 'Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins', *Science*, 362: eaau2596.
- Smart, O. S., J. G. Neduelil, X. Wang, B. A. Wallace, y M. S. Sansom. 1996. 'HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models', *J Mol Graph*, 14: 354-60, 76.
- Smith, N., S. Witham, S. Sarkar, J. Zhang, L. Li, C. Li, y E. Alexov. 2012. 'DelPhi web server v2: incorporating atomic-style geometrical figures into the computational protocol', *Bioinformatics*, 28: 1655-7.
- Steinkellner, G., R. Rader, G. G. Thallinger, C. Kratky, y K. Gruber. 2009. 'VASCo: computation y visualization of annotated protein surface contacts', *BMC Bioinf*, 10: 32.
- Terlau, H., J. Ludwig, R. Steffan, O. Pongs, W. Stuhmer, y S. H. Heinemann. 1996. 'Extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates activation of rat eag potassium channel', *Pflugers Arch*, 432: 301-12.
- Ufartes, R., T. Schneider, L. S. Mortensen, C. de Juan Romero, K. Hentrich, H. Knoetgen, V. Beilinson, W. Moebius, V. Tarabykin, F. Alves, L. A. Pardo, J. N. Rawlins, y W. Stuehmer. 2013. 'Behavioural y functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice', *Hum Mol Genet*, 22: 2247-62.
- Vangone, A., y A. M. Bonvin. 2015. 'Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes', *eLife*, 4: e07454.

## Referencias

---

---

- Wang, J. M., S. H. Roh, S. Kim, C. W. Lee, J. I. Kim, y K. J. Swartz. 2004. 'Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels', *J Gen Physiol*, 123: 455-67.
- Wang, W., y R. MacKinnon. 2017. 'Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-a-go-go-Related K(+) Channel hERG', *Cell*, 169: 422-30 e10.
- Warmke, J., R. Drysdale, y B. Ganetzky. 1991. 'A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus', *Science*, 252: 1560-2.
- Warmke, J. W., y B. Ganetzky. 1994. 'A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* y mammals', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 3438-42.
- Whicher, J. R., y R. MacKinnon. 2016. 'Structure of the voltage-gated K(+) channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism', *Science*, 353: 664-9.
- Xu, H., T. Li, A. Rohou, C. P. Arthur, F. Tzakoniati, E. Wong, A. Estevez, C. Kugel, Y. Franke, J. Chen, C. Ciferri, D. H. Hackos, C. M. Koth, y J. Payandeh. 2019. 'Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin', *Cell*, 176: 702-15 e14.
- Xue, L. C., J. P. Rodrigues, P. L. Kastritis, A. M. Bonvin, y A. Vangone. 2016. 'PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes', *Bioinformatics*, 32: 3676-78.
- Ziechner, U., R. Schonherr, A. K. Born, O. Gavrilova-Ruch, R. W. Glaser, M. Malesevic, G. Kullertz, y S. H. Heinemann. 2006. 'Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding to the cytosolic N- y C-termini', *FEBS J*, 273: 1074-86.