



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LAS INTERACCIONES ENTRE
TOXINAS DE VENENO DE ALACRÁN Y EL CANAL DE POTASIO SK2**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

Abigail González Contreras



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: DEL RÍO PORTILLA JOSÉ FEDERICO
VOCAL: Profesor: GAVIÑO RAMÍREZ RUBÉN LUIS
SECRETARIO: Profesor: COVARRUBIAS HERRERA MARÍA DEL ROSARIO
1er. SUPLENTE: Profesor: TOBÓN CORNEJO SANDRA
2° SUPLENTE: Profesor: GONZÁLEZ ALBARRÁN RENÉ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
LABORATORIO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS 1.

ASESOR DEL TEMA:

José Federico del Río Portilla

SUPERVISOR TÉCNICO:

Carolina Monserrath Melchor Meneses

SUSTENTANTE:

Abigail González Contreras

AGRADECIMIENTOS

- A los proyectos DGAPA-PAPIIT-IN214722 y DGAPA-PAPIIT-IN210319 por la beca de titulación otorgada.
- Al proyecto de investigación regular LANCAD-UNAM-DGTIC-145 por los recursos de supercómputo y asesoría técnica.
- A mi familia, por todo el apoyo y ánimo recibidos a lo largo de la carrera.
- A los chicos del laboratorio 1 de Biomacromoléculas y mi tutor por la paciencia, comprensión y sonrisas que compartimos.
- A mis sinodales, amigos y profesores por los comentarios, sugerencias e ideas recibidas.
- Finalmente, a todas aquellas personas que contestaron mis preguntas y tuvieron paciencia.

ABREVIATURAS

AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement, 11
BK	Big-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels, 13
CAM	Calmodulina, 13
CAMBD	CaM-binding domain, 13
CASP	Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction, 9
CE 50	Concentración efectiva al 50%, 15
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics, 11
ChTx	Caribdotoxina, 17
DM	Dinámica Molecular, 11
FS	Filtro de selectividad, 13, 21
GROMACS	GRoningen MACHine for Chemical Simulations, 22
GROMOS	Groningen Molecular Simulation, 11
IK	Intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels, 13
PC	Phosphatidylcholine, 22
PDB	Protein Data Bank, 19
PE	Phosphatidylethanolamine, 22
PG	Phosphatidylglycerol, 22
PI	Phosphatidylinositol, 22
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, 22
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine, 22
POPG	[1-[[[(2S)-2,3-dihydroxypropoxy]-hydroxyphosphoryl]oxy-3-hexadecanoyloxypropan-2-yl] (Z)-octadec-9-enoate, 22
POPS	1-Hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoserine, 22
PS	Phosphatidylserine, 22
RMSD	Root Mean Square Deviation, 12
RMSF	Root Mean Square Fluctuation, 12
SK	Small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels, 13
SM	Sphingo, 22
VDW	Van Der Walls, 11
VMD	Visual Molecular Dynamics, 22

LISTA DE FIGURAS

ILUSTRACIÓN 1. SUBUNIDAD A DEL CANAL SK2 MODELADA POR ALPHA FOLD.....	10
ILUSTRACIÓN 2. ESTRUCTURA DE LOS CANALES SK.....	14
ILUSTRACIÓN 3. ESTRUCTURA DEL CANAL SK4 Y PORO DEL CANAL SK4 CERRADO, ACTIVADO I Y ACTIVADO II.....	14
ILUSTRACIÓN 4. ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS TAMAPINA (MORADO), LA SILATOXINA (ROSA) Y DOBLE MUTANTE DE TAMAPINA E25K/K27E (NEGRO).....	16
ILUSTRACIÓN 5. ESQUEMAS TÍPICOS DE BLOQUEO DE CANALES DE A-KTX EN CANALES DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	17
ILUSTRACIÓN 6. FILTRO DE SELECTIVIDAD DEL CANAL Kv 1.2 DE RATÓN CON ChTx BLOQUEANDO EL PORO DEL CANAL CON EL RESIDUO 27 DE LISINA.....	18
ILUSTRACIÓN 7. COMPLEJO FINAL TÍPICO ENTRE LA LEIUROTOXINA Y LOS CANALES SK. VISTA SUPERIOR DE LA LEIUROTOXINA EN (A) CANALES SK2 Y (B) SK3 (ESTADOS CERRADOS).	18
ILUSTRACIÓN 8. ALINEACIÓN DE SECUENCIA DE TAMAPINA, LA SILATOXINA Y E25K/K27E. 21	
ILUSTRACIÓN 9. MODELO DEL CANAL SK2 FUNCIONALMENTE ABIERTO BASADO EN LA ESTRUCTURA RESUELTA DEL CANAL SK4 DE CONDUCTANCIA INTERMEDIA.....	23
ILUSTRACIÓN 10. PORO DEL CANAL SK2.....	24
ILUSTRACIÓN 11. SUPERFICIE DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICA DEL CANAL SK2 Y SK3, RESPECTIVAMENTE.....	25
ILUSTRACIÓN 12. SUPERFICIE DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICA DE TAMAPINA, LA SILATOXINA Y DOBLE MUTANTE DE TAMAPINA E25K/K27E.....	25
ILUSTRACIÓN 13. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO DE TAMAPINA Y SK2.....	29
ILUSTRACIÓN 14. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO DE LA SILATOXINA Y SK2.....	30
ILUSTRACIÓN 15. ANÁLISIS DE ACOPLAMIENTO DE E25K/K27E Y SK2.....	31
ILUSTRACIÓN 16. CONFORMACIÓN TÍPICA ADOPTADA POR LAS TOXINAS EN EL ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	33
ILUSTRACIÓN 17. RMSD DE LOS MODELOS DE INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS TAMAPINA (NEGRO), LA SILATOXINA (ROJO) Y E25K/K27E (VERDE).....	34
ILUSTRACIÓN 18. RMSF DE LA CADENA A DEL CANAL SK2 EN LA DINÁMICA MOLECULAR DE TAMAPINA, LA SILATOXINA Y E25K/K27E.....	35

ILUSTRACIÓN 19. RMSF DE LAS TOXINAS TAMAPINA, LA SILATOXINA Y E25K/K27E.....	35
ILUSTRACIÓN 20. DISTANCIA DE ENLACE A LO LARGO DEL TIEMPO DE ENLACES DE HIDRÓGENO FORMADOS DESPUÉS DE 50 NS DE DINÁMICA MOLECULAR DE TAMAPINA CON EL CANAL SK2	36
ILUSTRACIÓN 21. DISTANCIA DE ENLACE A LO LARGO DEL TIEMPO DE ENLACES DE HIDRÓGENO FORMADOS DESPUÉS DE 50 NS DE DINÁMICA MOLECULAR DE LA SILATOXINA CON EL CANAL SK2.	37
ILUSTRACIÓN 22. DISTANCIA DE ENLACE A LO LARGO DEL TIEMPO DE ENLACES DE HIDRÓGENO FORMADOS DESPUÉS DE 50 NS DE DINÁMICA MOLECULAR DE E25K/K27E CON EL CANAL SK2.	38

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA DE TOXINAS DE VENENO DE ALACRÁN NOTIFICADA FRENTE A LOS CANALES SK2 Y SK3.....	15
TABLA 2. COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA LIPÍDICA DEL CANAL SK2, SE INCLUYE EL NÚMERO DE LÍPIDOS PARA UTILIZAR CHARMM-GUI.....	22
TABLA 3. FRECUENCIA DE INTERACCIÓN DE LOS COMPLEJOS TAMAPINA-SK2, LA SILATOXINA-SK2 Y E25K/K27E-SK2 RESULTANTES DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	27
TABLA 4. INTERACCIONES DE LOS COMPLEJOS TAMAPINA-SK2, LA SILATOXINA-SK2 Y E25K/K27E-SK2.....	31
TABLA 5. RESUMEN DE LAS INTERACCIONES Y SU RESULTADO A LO LARGO DE 50 NS DE SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR PARA LOS TRES MODELOS DE INTERACCIÓN DE LAS TOXINAS CON EL CANAL SK2.....	38

LISTA DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. CÁLCULO DE RMSD	12
ECUACIÓN 2. CÁLCULO DE RMSF.....	12
ECUACIÓN 3. FUNCIÓN DE PUNTUACIÓN DE CLUSPRO.....	39

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE ECUACIONES.....	6
CONTENIDO	7
1) RESUMEN	8
2) MARCO TEÓRICO	9
2.1 CONCEPTOS COMPUTACIONALES.....	9
2.1.1 MODELADO DE PROTEÍNAS	9
2.1.2 SUPERFICIE DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICA.....	10
2.1.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	10
2.1.4 SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR.....	11
2.2 CONCEPTOS BIOLÓGICOS	13
2.2.1 CANALES SK.....	13
2.2.2 TAMAPINA, LA SILATOXINA Y DOBLE MUTANTE DE TAMAPINA E25K/K27E.....	15
3) ANTECEDENTES.....	16
3.1 INTERACCIÓN DE CANALES SK CON TOXINAS DE VENENO DE ALACRÁN	16
4) HIPÓTESIS	19
5) OBJETIVO	19
6) METODOLOGÍA.....	19
5.1 COORDENADAS ATÓMICAS.....	19
5.2 MODELADO MOLECULAR Y PREPARACIÓN PARA ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	20
5.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR DIRIGIDO	21
5.4 DINÁMICA MOLECULAR	21
7) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1 ESTRUCTURA DE LOS CANALES	22
6.2 SUPERFICIE DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO	24
6.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	26
6.4 DINÁMICA MOLECULAR	32
6.4.1 RMSD Y RMSF	33
6.4.2 DISTANCIA DE ENLACE	35
8) CONCLUSIÓN.....	39
9) ANEXOS	39

8.1 ANEXO I. SERVIDOR CLUSPRO	39
10) REFERENCIAS	40

1) RESUMEN

La terapia contra el cáncer basada en péptidos de toxinas de escorpión es un campo de gran interés para el desarrollo de fármacos que modifiquen la actividad de canales iónicos. Para que una toxina pueda ser utilizada como fármaco debe poseer una actividad alta y específica sobre el blanco terapéutico.

Se sabe que los canales iónicos de potasio SK3 se expresan en líneas celulares altamente metastásicas de cáncer de mama humano ⁱ y promueven la motilidad celular de células de melanoma, ⁱⁱ por lo que estas proteínas son objetivos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos antimetastásicos. La toxina tamapina es un péptido aislado del veneno de alacrán rojo de la India *Mesobuthus tamulus* que tiene la cualidad de ser altamente específica y potente al inhibir el canal SK2. La interacción entre la tamapina y el canal SK2 es de especial interés por su alta afinidad y selectividad hacia este canal. Idealmente, un fármaco antimetastásico derivado de la tamapina es un bloqueador altamente selectivo y eficaz de canales SK3, por ello las mutaciones de la doble mutante E25K/K27E asemejan su estructura primaria a la silatoxina, una toxina de veneno de alacrán que inhibe el canal SK3 en mayor medida que la tamapina. La doble mutante de la tamapina E25K/K27E incrementa su eficiencia de bloqueo sobre los canales SK3 ~7 veces y disminuye el bloqueo de canales SK2 ~17 veces respecto a la tamapina.

El mecanismo de interacción entre la tamapina, la silatoxina y E25K/K27E con los canales iónicos SK2/SK3 es desconocido, al igual que la estructura de los canales iónicos, por lo que se recurrió al modelado por homología, acoplamiento y dinámica molecular para proporcionar información sobre el mecanismo de unión ligando-receptor analizando la ruptura y formación de las interacciones entre péptido-proteína.

2) MARCO TEÓRICO

2.1 *Conceptos computacionales*

2.1.1 *Modelado de proteínas*

Los métodos computacionales para predecir estructuras proteicas tridimensionales no resueltas utilizan dos enfoques principales: modelado con plantillas y sin plantillas.ⁱⁱⁱ

El enfoque con plantillas construye modelos de una proteína objetivo a partir de una proteína similar de estructura conocida (plantilla) con un porcentaje de identidad mayor al 30%.^{iv} Las plantillas estructurales potenciales se obtienen de bibliotecas de estructuras peptídicas determinadas experimentalmente, donde se elige una plantilla de acuerdo con criterios como el nivel de similitud entre las secuencias de consulta y la plantilla, o la calidad experimental de las estructuras resueltas.

También es posible modelar proteínas oligoméricas, es decir, complejos compuestos por más de una cadena polipeptídica, si se cuenta con un complejo homólogo de composición conocida.

Los enfoques de modelado sin plantillas requieren de una alineación de múltiples secuencias de la proteína objetivo y secuencias relacionadas. La alineación de secuencias se utiliza para predecir características estructurales, como la estructura secundaria y los ángulos de torsión de la columna vertebral, los contactos residuo-residuo o las distancias entre residuos a lo largo de la cadena polipeptídica.ⁱⁱⁱ Estas características predichas guían el proceso de construcción de modelos 3D de la proteína objetivo. Sin embargo, estas predicciones se limitan a proteínas relativamente pequeñas y se quedan cortas en términos de precisión en comparación con los modelados con plantilla.

Recientemente, la precisión de estructuras modeladas mejoró en gran medida con la red AlphaFold que predice las coordenadas 3D de todos los átomos pesados para una proteína determinada utilizando la secuencia de aminoácidos primaria y las secuencias alineadas de homólogos mediante el sistema de aprendizaje profundo.^v El programa fue desarrollado por DeepMind de AlphaFold/Google y en los últimos CASP, 2018 y 2020, destacó particularmente en las predicciones de estructuras para las que no existían modelos previos.

Para medir la confianza de los modelos, AlphaFold produce una estimación de confianza por residuo en una escala de 0 a 100 (Ilustración 1, lado izquierdo). Esta medida de confianza se denomina pLDDT.

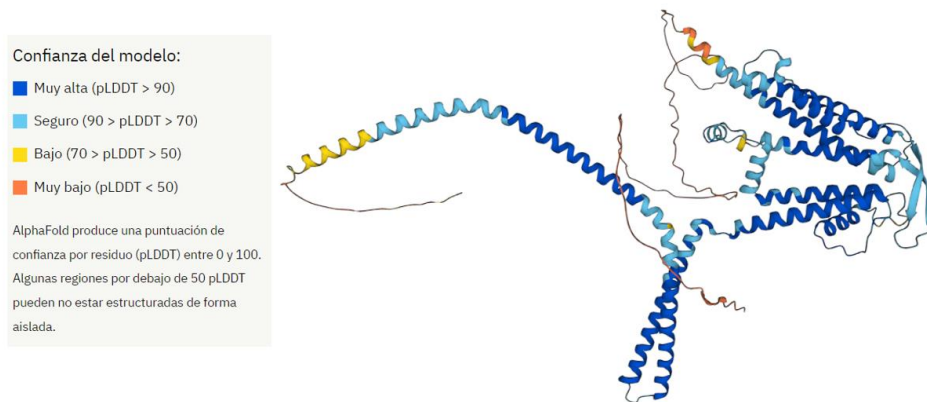


Ilustración 1. Subunidad α del canal SK2 modelada por AlphaFold.

De lado izquierdo se muestra la escala de confianza del modelo que proporciona AlphaFold.

2.1.2 Superficie de potencial electrostática

La electrostática juega un papel fundamental a lo largo de todo el ciclo de vida de una proteína, desde los primeros pasos de plegamiento hasta la maduración, está involucrado en la regulación de la localización de proteínas y las interacciones con otras moléculas. Las interacciones electrostáticas de corto y largo alcance, junto con otras fuerzas, brindan pistas de orientación esenciales en el ensamblaje molecular y macromolecular.^{vi}

En general, los potenciales electrostáticos se visualizan como mapas de potencial electrostático basados en la teoría de Poisson-Boltzmann, una ecuación diferencial parcial elíptica de segundo orden que describe el potencial electrostático alrededor de una distribución de carga fija en una solución iónica.^{vii}

2.1.3 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una técnica de modelado molecular utilizada para predecir la interacción de dos moléculas. Genera un modelo de unión entre un receptor y un ligando.^{viii}

El protocolo de acoplamiento molecular consiste en una búsqueda conformacional del complejo ligando-receptor (también puede ser acoplamiento por plantillas, que se basa en estructuras determinadas experimentalmente de complejos proteína-proteína) y la selección de una solución óptima según una función de puntuación.

Durante el muestreo espacial, el ligando y el receptor pueden considerarse estructuras rígidas o flexibles.^{ix} Muchos servidores de uso libre utilizan estructuras rígidas.

El acoplamiento de cuerpos rígidos produce un gran número de conformaciones acopladas que son analizadas por una función de puntuación. Las funciones de puntuación se utilizan luego para seleccionar las soluciones relevantes evaluando una gama de propiedades que incluyen interacciones intermoleculares, efectos electrostáticos y entrópicos, etc. Las energías mínimas de unión indican si la interacción es favorable.

Los métodos de acoplamiento dan una estimación con una función de puntuación para seleccionar la mejor solución.

2.1.4 *Simulación de dinámica molecular*

Es una simulación de sistemas que contienen átomos y moléculas en la cual se deja a los componentes del sistema interactuar entre sí por un determinado tiempo, mientras se monitorean las propiedades físicas del sistema. Las propiedades que se monitorean son: volumen (V), presión (P), temperatura (T), número de partículas (N), velocidades (v_i) y posiciones (r_i).^x

La dinámica molecular (DM) se basa en los principios de mecánica clásica: los núcleos atómicos son lo suficientemente pesados como para ser considerados partículas clásicas, cuya dinámica puede ser estudiada mediante la segunda ecuación de Newton, $F = ma$.^{xi} Al saber la posición de los átomos en un sistema, se puede determinar la fuerza que ejerce cada átomo hacia los demás átomos, así como establecer la posición atómica en un tiempo de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. Casi todos los métodos de simulación se basan en un campo de fuerza para el cálculo. El campo de fuerza es un campo de energía potencial a nivel atómico y molecular que describe la topología y el comportamiento del movimiento de los átomos en las moléculas. La mayoría de los campos de fuerza empleados para sistemas moleculares se pueden definir mediante una ecuación que describe enlaces covalentes, ángulos de torsión, interacciones de VDW e interacciones electrostáticas. Los campos de fuerza clásicos más utilizados para el modelado de macromoléculas son: GROMOS, AMBER y CHARMM.

Las simulaciones de DM constan de tres etapas: 1) preparación del sistema, 2) equilibrio y 3) producción.

La preparación del sistema consiste en asignar velocidades iniciales a los átomos a una determinada temperatura, volumen, presión y número de partículas, dada una configuración inicial. La etapa de equilibrio consiste en encontrar un estado de equilibrio a partir de la configuración inicial; durante esta fase se monitorean varios parámetros como la energía potencial y temperatura hasta que se estabilizan. El propósito de esto es relajar el sistema eliminando el exceso de energía del sistema. Finalmente, la etapa de producción permite la evolución del sistema con una trayectoria fija. ^{xii}

Algunas de las propiedades que se analizan después de una dinámica molecular de proteínas son, entre otras, RMSD, RMSF y distancia de enlace a lo largo del tiempo ^{xiii}:

RMSD o desviación de raíz cuadrada media es una medida estándar de distancia estructural entre dos coordenadas atómicas superpuestas, por ejemplo, dos puntos de tiempo en la trayectoria. Indica cuanto ha cambiado la conformación de la proteína y se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Cálculo de RMSD

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^n m_i \|r_i(t_j) - r_i^{ref}\|^2}$$

M: masa total

m_i: masa del átomo i – ésimo

r_i(t_j): posición del átomo i en el tiempo t_j

r_i^{ref}: Posición de referencia

RMSF, la fluctuación cuadrática media de la raíz mide la desviación promedio de una partícula (por ejemplo, un residuo de proteína o átomo) a lo largo del tiempo desde una posición de referencia. RMSF analiza las partes de la estructura que fluctúan más o menos con respecto a su estructura media. ^{xi} Se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2. Cálculo de RMSF

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{t_j=1}^n \|r_i(t_j) - x_i^{ref}\|^2}$$

t: tiempo que se quiere promediar

En conjunto, los gráficos de RMSD y RMSF permiten evaluar la estabilidad dinámica de los modelos generados en el acoplamiento molecular. El análisis de la distancia de enlace a lo largo del tiempo de las interacciones entre los residuos de interés del canal y las toxinas permite hacer un seguimiento del cambio general de las coordenadas iniciales utilizadas como referencia durante la simulación, así como evaluar el movimiento de estos residuos.

2.2 *Conceptos biológicos*

2.2.1 *Canales SK*

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana. Los iones entran o salen de la célula a través de un poro que atraviesa la proteína del canal. Se pueden abrir y cerrar en respuesta a estímulos de voltaje o por biomoléculas que se unen a ellos, como los neurotransmisores.

Los canales SK son canales iónicos de potasio que se expresan en células del sistema nervioso y en órganos como corazón, hígado y músculos. Se consideran independientes del voltaje (baja conductancia; ~4–14 pS) y activados por bajas concentraciones de calcio intracelular (≈ 0.5 nM) a través de un mecanismo que consiste en la existencia de un dominio de unión a calmodulina dentro de la proteína del canal.^{xiv} También existen canales de conductancia intermedia (IK) y de alta conductancia (BK).

La familia de canales SK contiene 3 miembros: SK1, SK2 y SK3.

Respecto a su estructura, se sabe que los canales SK consisten en la asociación de 4 subunidades α idénticas en forma de tetrámero.^{xv} Cada subunidad tiene seis segmentos transmembranales (Ilustración 2) unidos por enlazadores (S).^{xvi} Los segmentos 5 y 6 forman el poro del canal; a su vez el poro del canal contiene el filtro de selectividad (FS), secuencia GYG altamente conservada en los canales selectivos a potasio y una cavidad hidrofóbica debajo del filtro de selectividad capaz de albergar cationes hidratados.^{xvii}

En la región intracelular se encuentran los extremos N y C terminal, además de la zona de unión a calmodulina CAMBD. La calmodulina CAM está formada por dos lóbulos: el lóbulo C que permanece estático y unido a CAMBD, y el lóbulo N que es dinámico para cumplir su función de posible detector de calcio.

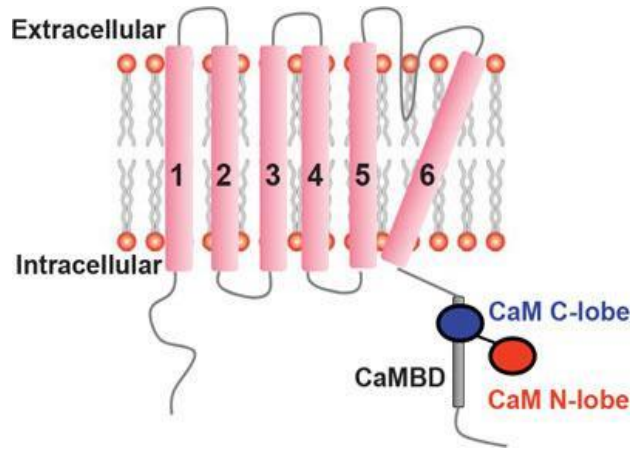


Ilustración 2. Estructura de los canales SK.

Cada subunidad del canal está formada por seis segmentos transmembranales. Unido al segmento seis se encuentra CAMBD, la zona de unión a calmodulina. Calmodulina (CaM) se compone de dos lóbulos: C y N.

Imagen modificada de la referencia xiv.

En 2018 MacKinnon y Lee determinaron la estructura de tres complejos de canales SK4-CaM humano en estado cerrado y estado activado I y II mediante microscopía crioelectrónica (Ilustración 3).^{xviii} El canal SK4 es un canal de conductancia intermedia. En estas estructuras es posible observar el ensanchamiento del radio del poro citoplasmático y distintas conformaciones de calmodulina dependientes de la concentración de calcio. Las estructuras del canal SK4 resueltas pueden utilizarse como plantillas para modelado de canales semejantes.

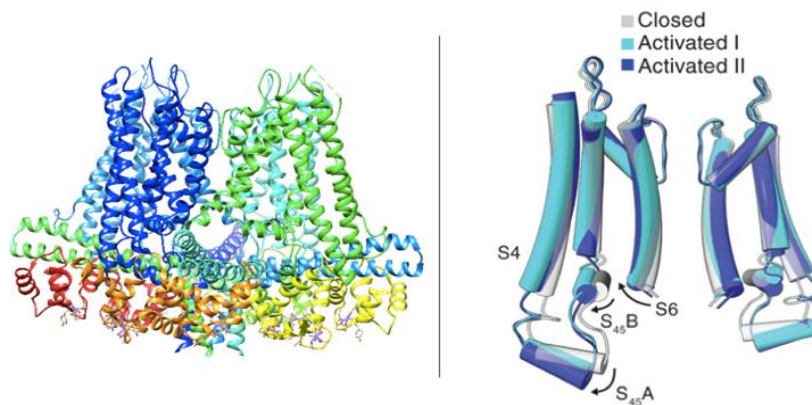


Ilustración 3. Estructura del canal SK4 y poro del canal SK4 cerrado, activado I y activado II.

El enlazador S₄₅ A y B es desplazado por las calmodulinas provocando el cierre y apertura del poro citoplasmático (Residuo Val 282, debajo del FS del canal). El poro externo y vestíbulo no presentan cambios conformacionales significativos al abrir o cerrar el canal, como muestra la superposición de las tres estructuras resueltas.

Imagen modificada de la referencia xvii.

2.2.2 Tamapina, silatoxina y doble mutante de tamapina E25K/K27E

Muchos péptidos de veneno alacranes y otros animales son inhibidores potentes y selectivos de canales iónicos y otros receptores unidos a la membrana. Entre los objetivos moleculares más comunes se encuentran los canales de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ sensibles al voltaje. Se sabe que la mayoría de las toxinas que bloquean los canales de potasio (*KTx*) contienen una topología que comprende una hélice α conectada a una lámina β antiparalela estabilizada por tres o cuatro puentes disulfuro, denominado motivo (Cs α/β).^{xxix}

Tamapina es un péptido de 31 aminoácidos con motivo Cs α/β y tres puentes disulfuro^{xxx} proveniente del veneno de alacrán rojo de la india *Mesobuthus tamulus* que bloquea potente y selectivamente el canal SK2. La afinidad de la tamapina por SK2 es de interés para diseñar una toxina que inhiba selectivamente el canal SK3, ya que es el canal SK3 el que se encuentra asociado a la metástasis celular. La mutante E25K/K27E es una mutante de tamapina que aumenta el bloqueo de canales SK3 y disminuye su actividad en canales SK2 (Tabla 1); efecto deseado para el fármaco anti metastásico. Las mutaciones 25 y 27 en tamapina se eligieron para asemejar su estructura a la silatoxina o leurotoxina, una toxina que inhibe en mayor medida al canal SK3 que tamapina.^{xxxi}

Tabla 1. Actividad electrofisiológica de toxinas de veneno de alacrán notificada frente a los canales SK2 y SK3.

Toxina	SK2 CE ₅₀ nM	SK3 CE ₅₀ nM
Tamapina	0.024	1.7
La silatoxina	0.29	1.1
E25K/K27E	0.028	0.38

La actividad electrofisiológica de la doble mutante de tamapina fue medida en células HEK 293 para el canal SK3 y HEK 293 T para el canal SK2.^{xxii}

La silatoxina también es un péptido de 31 aminoácidos con motivo Cs α/β que comparte un 79 % de identidad con tamapina. Proviene de alacrán blanco de la india *Leiurus quinquestriatus*.^{xxiii}

Tamapina, la silatoxina y E25K/K27E conservan un motivo Cs α/β y tres puentes disulfuro Cys3-Cys21, Cys8-Cys26 y Cys12-Cys28 (Ilustración 4) que les confieren una estructura relativamente rígida.



Ilustración 4. Estructura de las toxinas tamapina (morado), la silatoxina (rosa) y doble mutante de tamapina E25K/K27E (negro).

3) ANTECEDENTES

3.1 Interacción de canales SK con toxinas de veneno de alacrán

Por lo general, las toxinas de alacrán son péptidos básicos, ya que contienen muchos aminoácidos cargados positivamente, y las regiones del poro extracelular de canales de potasio suelen tener carga negativa. Las propiedades electrostáticas de las toxinas del escorpión y los canales de potasio sugieren una fuerte atracción electrostática en la que el centro de carga negativo en la estructura de la toxina permanece lejos de la carga negativa del vestíbulo del canal y el centro de carga positivo de la toxina es atraído por la carga negativa del canal. ^{xxiii}

Los esquemas típicos de bloqueo de canales de α -KTx en canales dependientes de voltaje (Ilustración 5) incluyen a) la obstrucción del poro del canal mediante un residuo crítico de Lys localizado en la hoja β de la toxina formando contactos con el filtro de selectividad del canal, b) interacciones entre la hélice α de la estructura de la toxina y el poro del canal y c) interacción de la hélice α con el vestíbulo del canal. ^{xxiv}

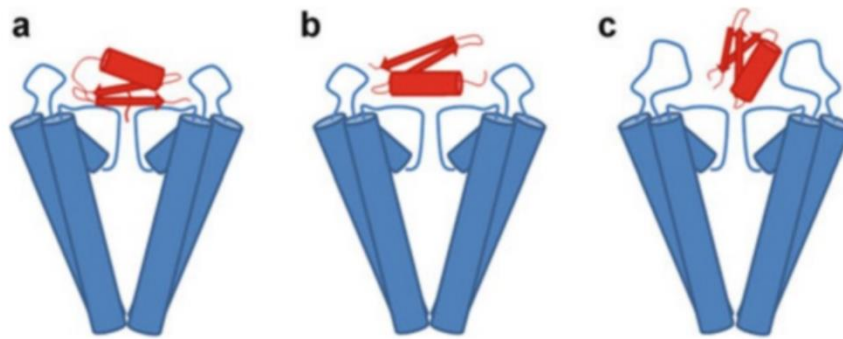


Ilustración 5. Esquemas típicos de bloqueo de canales de α -Ktx en canales dependientes de voltaje.

Imagen modificada de la referencia xv.

La caribdotoxina (ChTx, PDB: 2CRD) es una toxina de 37 aminoácidos del veneno de alacrán *Leiurus quinquestriatus* que bloquea los poros de canales de K^+ obstruyendo físicamente el poro del canal con un residuo de Lys. Al igual que los péptidos a estudiar tiene un motivo Cs α/β con tres puentes disulfuro en su estructura. En 2013, Banerjee caracterizó un complejo entre ChTx y un canal de potasio, la quimera de paleta Kv1.2/Kv2.1 (PDB:4JTA). Este canal es un mutante del canal K_v 1.2 del cerebro de rata en el que la paleta de sensor de voltaje fue reemplazada por la paleta del sensor de voltaje del canal Kv2.1 de ratón (PDB: 2R9R), es un canal de alta conductancia (BK).^{xxv, xxvi} Esta estructura, al igual que otras estructuras de canales de K^+ de alta resolución, contiene un filtro de selectividad con cuatro sitios o posiciones distintas de unión a iones, siendo el sitio uno el más extracelular del canal. La toxina caribdotoxina se une a la boca del poro posicionada de tal manera que proyecta la cadena lateral de Lys27 directamente hacia el poro (Ilustración 6), esto permite que el grupo amino se acerque a la parte superior del primer sitio del filtro de selectividad. Por lo tanto, Lys27 está dentro del rango de distancia para realizar interacciones de enlaces de hidrógeno con los cuatro átomos de oxígeno del carbonilo que, de lo contrario, constituirían una capa de ligandos de coordinación para un K^+ . El complejo canal-toxina se estabiliza aún más mediante enlaces de hidrogeno y puentes salinos entre la toxina y el vestíbulo exterior del canal.

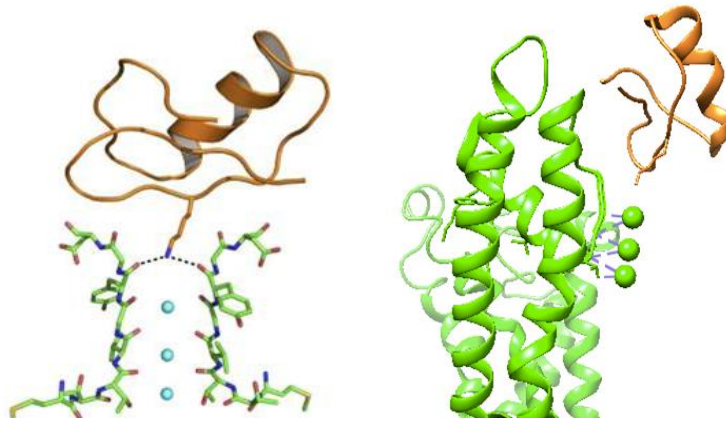


Ilustración 6. Filtro de selectividad del canal Kv 1.2 de ratón con ChTx bloqueando el poro del canal con el residuo 27 de lisina.

Imagen modificada de la referencia^{xxvi}

Los canales SK2 y SK3 han sido estudiados con anterioridad, al igual que su interacción con toxinas de veneno de alacrán.^{xxvii} . Un estudio computacional realizado por Andreotti, en el que se modelaron los canales SK2 y SK3 en su conformación de estado abierto/cerrado, y después se realizó un acoplamiento molecular con diversas toxinas, mostró que los péptidos tamapina y la silatoxina, interaccionan insertando un residuo básico en el filtro de selectividad del canal, con interacciones de la hélice α de su estructura en el vestíbulo del canal. (Ilustración 7). Tamapina interacciona con Lys20 en SK2, mientras que la silatoxina interacciona con Arg 13 en ambos canales.

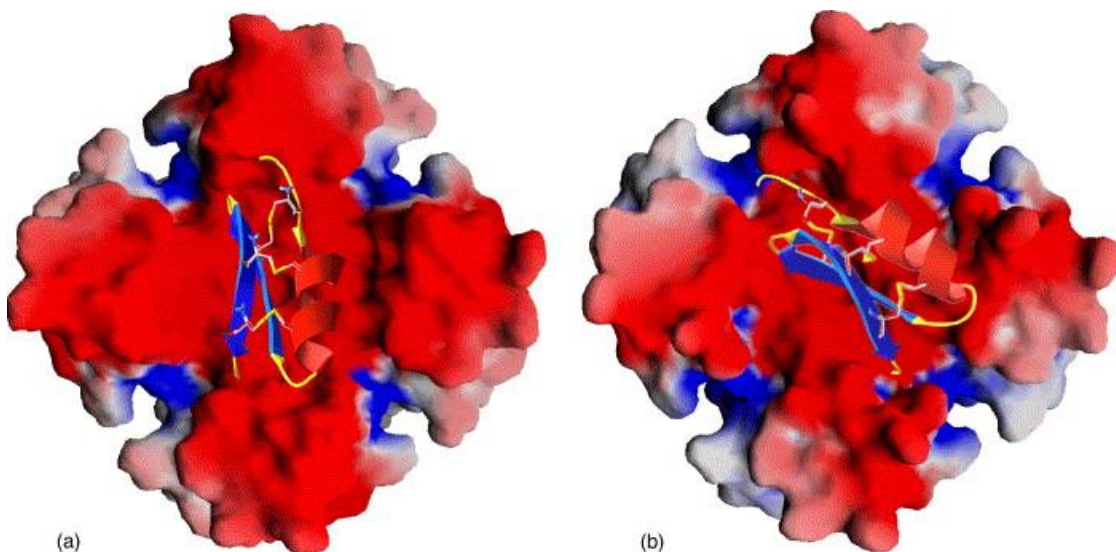


Ilustración 7. Complejo final típico entre la leiurotoxina y los canales SK. Vista superior de la leiurotoxina en (a) canales SK2 y (b) SK3 (estados cerrados).

Imagen modificada de la referencia^{xxiii}.

La estructura resuelta de Berenjee y el estudio de Andreotti sugieren un mecanismo de tapón en el que la cadena lateral de un residuo conservado de Lys o Arg se inserta en el poro del canal bloqueando el proceso de penetración selectiva de K^+ .

En este trabajo se busca realizar un estudio de interacción entre el canal SK2 con tamapina, la doble mutante de tamapina E25K/K27E y la silatoxina utilizando como estrategia de acoplamiento molecular dirigir los residuos de arginina o lisina de las toxinas al poro del canal SK2.

4) HIPÓTESIS

La interacción entre un residuo básico de la estructura de las toxinas de alacrán conservará los enlaces de hidrógeno formados con el filtro de selectividad del canal en la dinámica molecular.

Las mutaciones E25K y K27E de la tamapina asemejan en su estructura primaria a la silatoxina. Los estudios de electrofisiología indican que la doble mutante E25K/K27E inhibe a los canales SK3 en mayor medida que tamapina y la afinidad por SK2 disminuye, por lo que la interacción de la doble mutante será diferente a la interacción de la tamapina con el canal SK2 y similar a la silatoxina.

5) OBJETIVO

Modelar el canal SK2 y realizar un acoplamiento molecular de las toxinas tamapina, silatoxina y doble mutante de tamapina E25K/K27E, posteriormente evaluar la estabilidad de los modelos de acoplamiento molecular mediante una dinámica molecular.

Analizar las interacciones entre el canal SK2 y las toxinas de veneno de alacrán mencionadas.

6) METODOLOGÍA

6.1 Coordenadas atómicas

Las coordenadas atómicas de las toxinas utilizadas se obtuvieron de la base de datos PDB: tamapina (PDB: 2LU9), E25K/K27E (PDB: 6D8T) y la silatoxina (PDB:1SCY); al igual que la estructura del canal SK4 (PDB:6CNO).

Las secuencias de aminoácidos del canal SK2 y SK3 fueron obtenidas de la base de datos Uniprot: SK2 (Uniprot: Q9H2S1) y SK3 (Uniprot: Q9UGI6).

6.2 Modelado molecular y preparación para acoplamiento molecular

La secuencia de 579 aminoácidos de una de las cuatro subunidades α del canal iónico SK2 se obtuvo de la base de datos de secuencias Uniprot.

En primer lugar, se realizó una búsqueda de la estructura resuelta más cercana utilizando un BLAST. La estructura del canal SK4 de conductancia intermedia tiene 46% de identidad con el canal SK2 y 45% con canal SK3. El canal SK4 tiene una longitud de 427 aminoácidos; sin embargo, solo se encuentra reportada la secuencia 9-386 debido a que en el extremo C-terminal del segmento transmembranal 6, la región consecuente es flexible y no está bien resuelta. Tampoco se encuentra reportada la secuencia 124-141 correspondiente al enlazador de unión de los segmentos transmembranales 3 y 4 (S_{3-4}).

La estructura de la subunidad α del canal SK2 modelada se obtuvo de la base de datos de AlphaFold y se recortaron las zonas de baja confianza para obtener el mismo tamaño de la subunidad α del canal SK4 resuelta. La porción recortada del modelo incluye los aminoácidos 118-497 que abarcan los seis segmentos transmembranales formadores de la subunidad. Al modelo recortado se le aplicó una minimización de energía de descenso pronunciado para aliviar choques muy desfavorables, seguido de una minimización de gradiente conjugado para alcanzar un mínimo de energía con el software UCSF Chimera 1.16.

Para construir el homotetrámero se utilizó el software UCSF Chimera. La plantilla seleccionada es el canal SK4 de conductancia intermedia en estado activado II (PDB:6CNO), ya que se encuentra funcionalmente abierto. Cuatro subunidades α modeladas del canal SK2 fueron superpuestas estructuralmente al complejo del canal SK4 acoplado a calmodulinas resuelto para obtener la estructura del canal.

El canal SK2 acoplado a calmodulinas se preparó para acoplamiento molecular añadiendo los hidrógenos faltantes y corrigiendo las cargas de los aminoácidos, de igual manera, el modelo se afinó con una minimización de energía como la descrita anteriormente.

6.3 Acoplamiento molecular dirigido

Después de preparar la estructura, se realizó el acoplamiento molecular con tamapina, la silatoxina y con E25K/K27E utilizando el servidor ClusPro 2.0 *Dock* de cuerpo rígido, eligiendo interacción electrostática como predominante.

Para dirigir el acoplamiento, se restringieron los aminoácidos que interaccionan con el canal: Primero se seleccionaron los aminoácidos básicos de Arg o Lys de cada toxina (Ilustración 8) y se dirigieron al filtro de selectividad del canal. La presencia de alguno de estos residuos dentro de 5 Å de distancia de los residuos Gly362 y Tyr361 pertenecientes al filtro de selectividad del canal y el residuo Asp363 en el borde periplásmico, se utiliza como criterio para realizar el acoplamiento molecular. La finalidad es identificar el residuo de cada toxina con mayor probabilidad de interacción con el canal.

Tamapina	AFCNLRRC	EL	SCRSLG	LLGK	CIGEECKCVP	Y
Silatoxina	AFCNLRMC	QL	SCRSLG	LLGK	CIGDKCECVK	H
E25K_K27E	AFCNLRRC	EL	SCRSLG	LLGK	CIGEKCECVP	Y

Ilustración 8. Alineación de secuencia de tamapina, la silatoxina y E25K/K27E.

En azul se resaltan los aminoácidos que se dirigieron al poro del canal.

Se analizaron las primeras soluciones de acoplamiento de cada toxina utilizando el software LigPlot⁺ 2.2 para elegir un complejo de cada toxina a afinar con dinámica molecular.

6.4 Dinámica molecular

Se realizó una dinámica molecular a los complejos toxina-canal seleccionados. En cada modelo, se seccionó la zona del dominio formador del poro y vestíbulo del canal para las simulaciones de dinámica molecular. La estructura truncada incluye los aminoácidos 325-374 y 237-250. A cada complejo se le agregó una membrana lipídica con CHARMM-GUI *Membrane Builder*. La composición de la membrana simulada imita la composición de la membrana de células HEK-293^{xxviii} (Tabla 2). Las dimensiones de las cajas de simulación tienen forma rectangular y medidas de 85:85:100 nm. Se utilizó una caja de agua TIP3 para solvatar con moléculas de agua la caja cúbica y se añadieron iones de forma aleatoria con el fin de neutralizar la carga del sistema y mantener una concentración fisiológica de KCl 150 nM en el sistema. Se generaron los archivos para realizar una simulación de dinámica

molecular en GROMACS a 303.15 K y 1 bar de presión. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron utilizando el campo de fuerza CHARMM36m.

Tabla 2. Composición de la membrana lipídica del canal SK2, se incluye el número de lípidos para utilizar CHARMM-GUI.

Membrana de células HEK-293			Membrana modelada		
Tipo de lípido	Porcentaje de composición (%)	Lípido	Numero de lípidos Dorso inferior	Numero de lípidos Dorso superior	Porcentaje de composición (%)
PC	36	POPC	31	42	37
PE	16	POPE	10	22	16
PG	3	POPG	1	5	3
PS	18.4-23.4	POPS	19	23	21
SM	11	POPI	7	13	10
PI	7-13	PSM	11	11	11

El canal SK2 modelado con membrana y caja de agua se minimizó durante el primer paso de la dinámica molecular con GROMACS 2022.1. El equilibrio se llevó a cabo durante 125 ps para permitir la relajación del disolvente. Por último, la producción se llevó a cabo durante 50 ns a cada complejo canal-toxina en un paso de tiempo de 2fs. Esto permite que el sistema evolucione a un estado termodinámicamente estable.

Para la visualización de resultados se utilizaron los softwares VMD 1.9.4 y GRACE.

7) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estructura de los canales

El modelo del canal SK2 funcionalmente abierto acoplado a calmodulinas se logró sobre la base de la estructura cristalina del canal SK4 humano de conductancia intermedia resuelta.

El modelo estructural tridimensional del canal abierto se generó utilizando AlphaFold y Swiss Model (Ilustración 9).

El modelo de AlphaFold es estructuralmente similar a la plantilla, el canal SK4 de conductancia intermedia, y a los modelos de Andreotti y Swiss Model; sin embargo, a diferencia de estos dos, el enlazador de unión de los segmentos transmembranales 3 y 4 (S₃₄) presenta la forma de una hebra beta antiparalela tanto en el canal SK2 como en el canal SK3. En la plantilla, esta parte de la estructura se encuentra ausente y en los modelos de Andreotti y Swiss Model, este enlazador mantenía la forma de un bucle extracelular sin estructura definida, pero cuenta con una puntuación de $90 > \text{pLDDT} > 70$ en AlphaFold, por lo que es confiable utilizarlo. Debido a que este enlazador se posiciona sobre el poro del canal, se espera que el acoplamiento molecular de las toxinas se vea afectado.

Se eligió el modelo de AlphaFold sobre el de Swiss Model debido a los resultados de los últimos CASP.

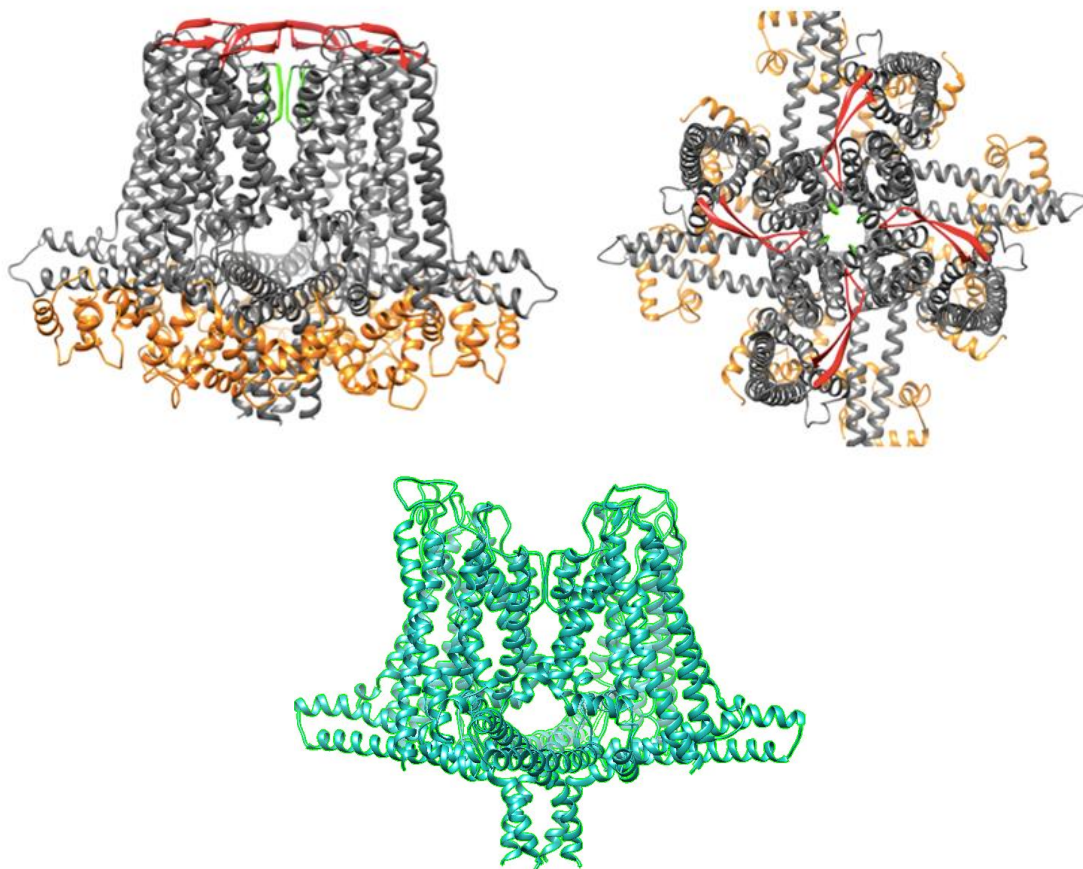


Ilustración 9. Modelo del canal SK2 funcionalmente abierto basado en la estructura resuelta del canal SK4 de conductancia intermedia.

En el mapa de la superficie de potencial se logró observar la distribución de cargas de los modelos de los canales iónicos y de las toxinas (Ilustración 11 y 12).

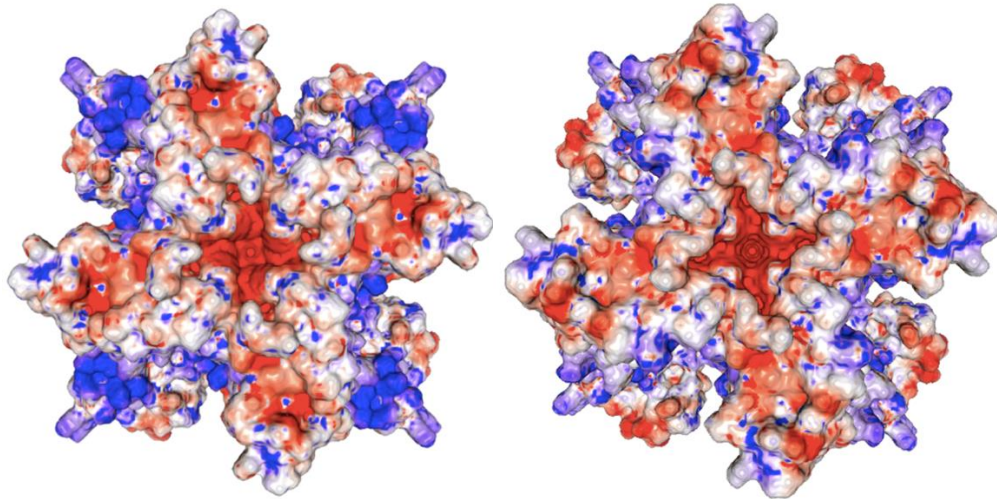


Ilustración 11. Superficie de potencial electrostática del canal SK2 y SK3, respectivamente.

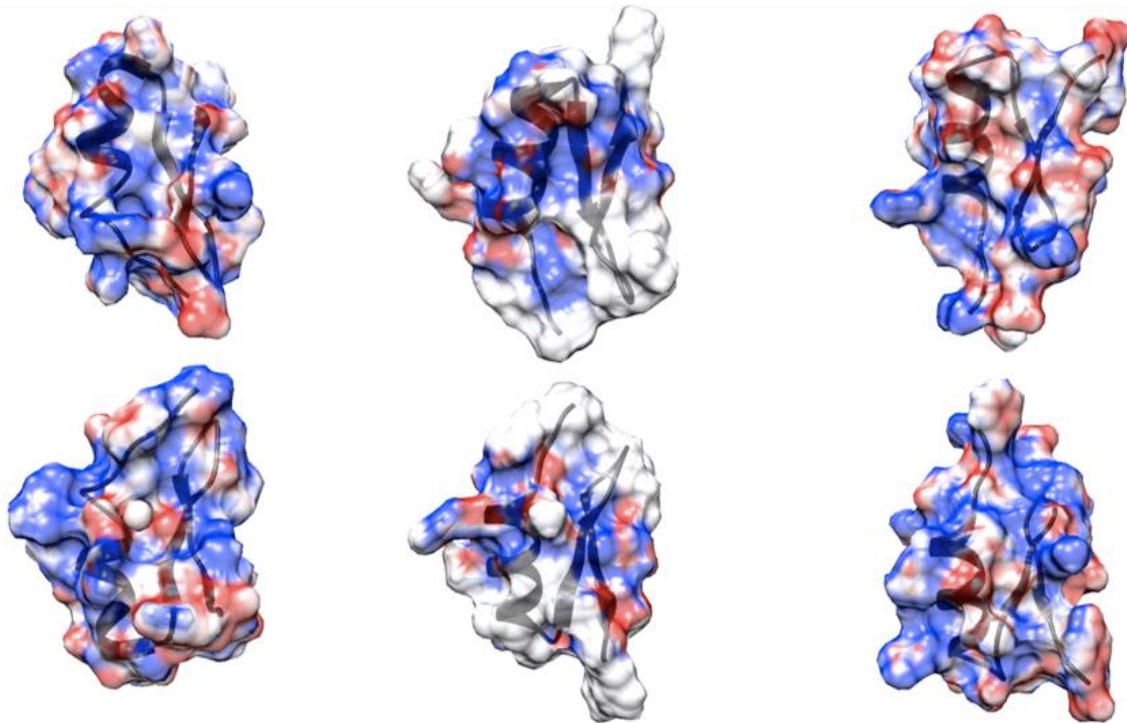


Ilustración 12. Superficie de potencial electrostática de Tamapina, La silatoxina y doble mutante de tamapina E25K/K27E.

En la parte de arriba se muestra la superficie de la estructura vista desde la segunda cadena de la hebra beta antiparalela y abajo la vista desde la primera cadena de la hebra beta antiparalela. Las superficies rojas, azules y blancas indican potenciales electrostáticos negativos (de -2, a 0 kcal/(mol·e)), positivos (de 0 a -2 kcal/(mol·e)) y neutros, respectivamente. Para calcular la superficie de potencial electrostático de Poisson-Boltzman se utilizó CHARMM-GUI PBEQ-Solver.

La superficie de potencial electrostática de los canales muestra que, en ambos casos, una distribución de carga negativa se concentra en el poro del canal donde atraviesan los iones. El canal SK2 cuenta con más zonas de superficie positivas en los bordes del canal.

Tamapina, la silatoxina y E25K/K27E tienen una superficie electrostática positiva en su mayoría con zonas dispersas de cargas negativas. En el caso de tamapina y la doble mutante, la vista lateral desde la primera y segunda cadena de la hebra beta antiparalela muestran una superficie similar. La silatoxina, en comparación con las otras dos toxinas, es la de menor superficie positiva y considerando que los valores de CE_{50} de la silatoxina en los estudios de electrofisiología son los más altos en ambos canales, excepto en el caso de tamapina SK3 (Tabla 1), se espera que esta toxina tenga menor interacción con los canales SK.

El análisis electrostático coincide con la estrategia de acoplamiento de dirigir los residuos de básicos de las toxinas al poro del canal, debido a una interacción electrostática predominante entre el poro negativo del canal y la superficie electrostática básica de las toxinas. La comparación de las diferencias observadas en la superficie de potencial electrostática de las tres toxinas sugiere que su actividad es distinta sobre el mismo objetivo.

6.3 Acoplamiento molecular

Se realizó acoplamiento molecular con el canal SK2 y las tres toxinas; tamapina, la silatoxina, E25K/K27E. Para el análisis se consideraron todas las soluciones ofrecidas de cada acoplamiento. ClusPro realiza un acoplamiento rígido: el ligando es rotado 70,000 veces respecto al receptor y se eligen las 1000 combinaciones de rotación/traslación con la puntuación más baja de acuerdo con la función de puntuación del servidor (Anexo I).^{xxix, xxx, xxxi, xxxii} Las 1000 estructuras se agrupan de acuerdo con un RMSD de C- α menor de 9 Å. Esto significa que encuentran la posición del ligando con mayor número de “vecinos” en 9 Å, luego está se convierte en un centro de grupo y sus vecinos en miembros de grupo. Los vecinos se eliminan, después se busca el siguiente centro de grupo y así sucesivamente. Las soluciones ofrecidas al final son los centros de grupo discriminados por ClusPro.

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular se clasificaron de acuerdo con la frecuencia de interacción de cada residuo básico de la estructura de la toxina con el poro del canal. También se analizó la variedad y cantidad de resultados.

La siguiente tabla muestra la clasificación de resultados de acoplamiento molecular. Los residuos del canal de potasio a los que se dirigió el acoplamiento son Gly362, Tyr361 y Gly360, característicos del filtro de selectividad de canales de potasio.

Tabla 3. Frecuencia de interacción de los complejos Tamapina-SK2, La silatoxina-SK2 y E25K/K27E-SK2 resultantes del acoplamiento molecular.

Complejo toxina-canal	Residuo insertado en el filtro de selectividad del canal	Frecuencia de interacción	Frecuencia de interacción (%)	Observaciones
Tamapina-SK2	Lys 20	3/9	33.3	-
	Arg 6	2/9	22.2	-
	Arg 6/13	2/9	22.2	Los residuos Arg 6 y 13 se encuentran en las inmediaciones del FS
	Ser 14	2/9	22.2	Este residuo en el filtro de selectividad del canal es debido a la interacción de Arg6 y Arg7 con Asp363.
La silatoxina-SK2	Arg 6	5/5	100	En uno de los resultados se observe la participación de Phe2
E25K/K27E-SK2	Arg 6	2/10	20	-
	Arg 13	1/10	10	-
	Arg 6/13	4/10	40	Los residuos Arg 6 y 13 se encuentran en las inmediaciones del FS
	Lys 20	1/10	10	-

	Ser 14	2/10	20	Este residuo en el filtro de selectividad del canal es debido a la interacción de Arg 13 con Asp363.
--	--------	------	----	--

No en todas las posiciones de acoplamiento es posible observar solamente un residuo insertado en el filtro de selectividad del canal. En las observaciones se menciona cuando existe la participación de más de uno.

En tamapina, el residuo Arg6 predomina en los resultados. En dos de ellos se observa la participación de Arg13, pero no hay ninguno en el que solo participe Arg13. Se elige una estructura en la que el residuo 6 esté insertado en el filtro de selectividad del canal y que también presente interacciones con Arg13 para analizar con dinámica molecular. El residuo de Lys20 también tiene una participación frecuente, como sugiere Andreotti.

La doble mutante también tiene una competencia de los residuos 6 y 13 de Arginina en el FS del canal. La probabilidad de participación de Lys20 disminuye respecto de tamapina, así que para dinámica molecular se eligió un modelo que presenta interacciones con el residuo 6 y cercanía del residuo 13. Por otro lado, la silatoxina inserta el residuo 6 de Arginina y no el 13 en todos los resultados de acoplamiento de ClusPro, además es la que menor número y variación de resultados tiene. Esto indica que para el resto de los residuos básicos de la silatoxina la interacción es poco favorable.

El residuo Ser 14 no se encuentra dentro de los residuos restringidos a interactuar, pero su posición es debida a la interacción de Asp363 con Arg13, 6 o 7.

Las tres toxinas tienen interacciones del residuo Arg6 con el FS del canal (Tabla 4). Los enlaces de hidrógeno se identificaron mediante el Software LigPlot⁺ 2.2.5 y se muestran en las ilustraciones 13, 14 y 15.

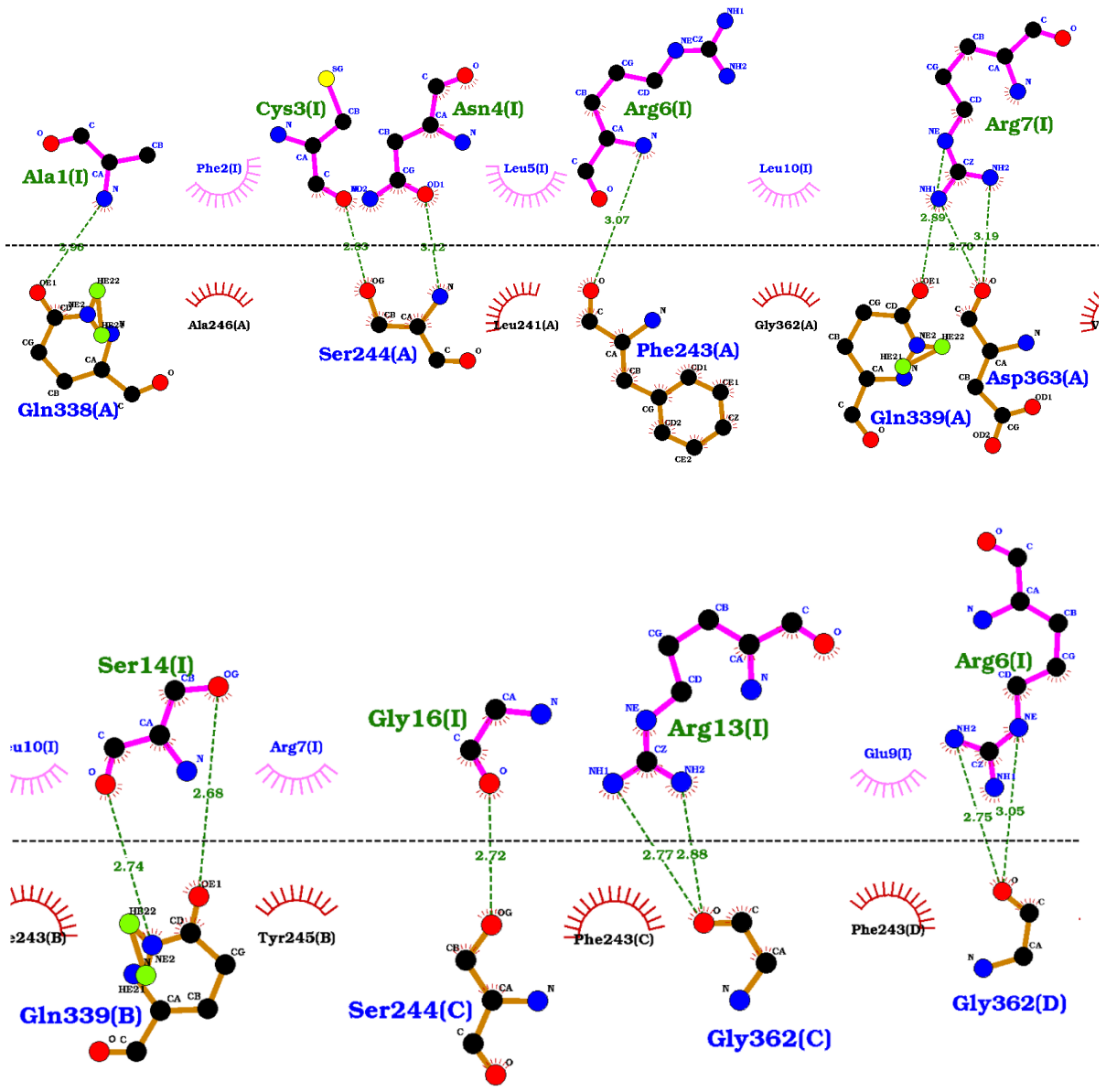


Ilustración 13. Análisis de acoplamiento de tamapina y SK2.

Representación generada por LigPlot⁺ 2.2.5 de las principales interacciones entre tamapina (I) y las cadenas A-B y C-D del canal SK2. La distancia se expresa en Å.

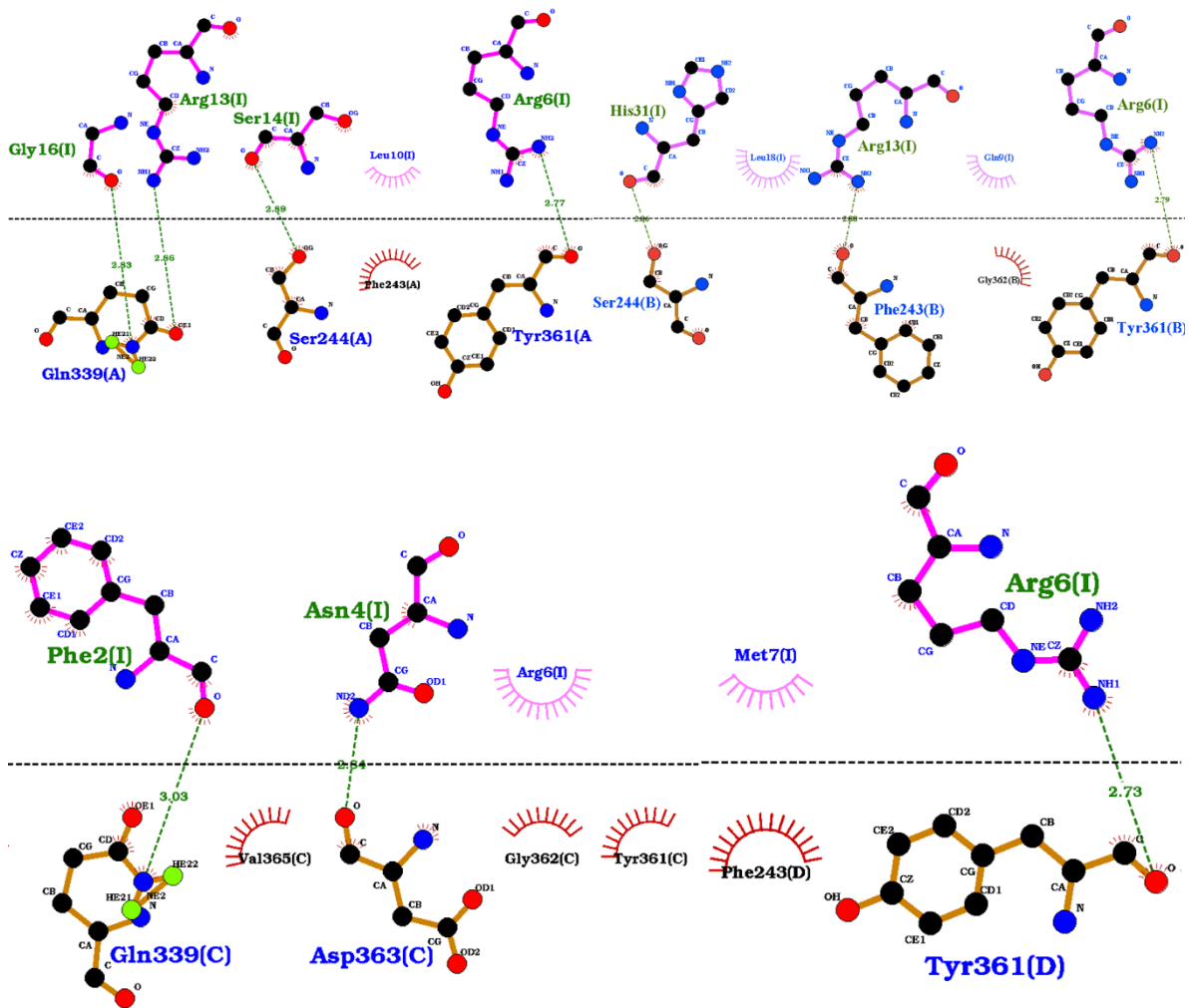


Ilustración 14. Análisis de acoplamiento de la silatoxina y SK2.

Representación generada por LigPlot⁺ 2.2.5 de las principales interacciones entre la silatoxina (I) y las cadenas A-B y C-D del canal SK2. La distancia se expresa en Å.

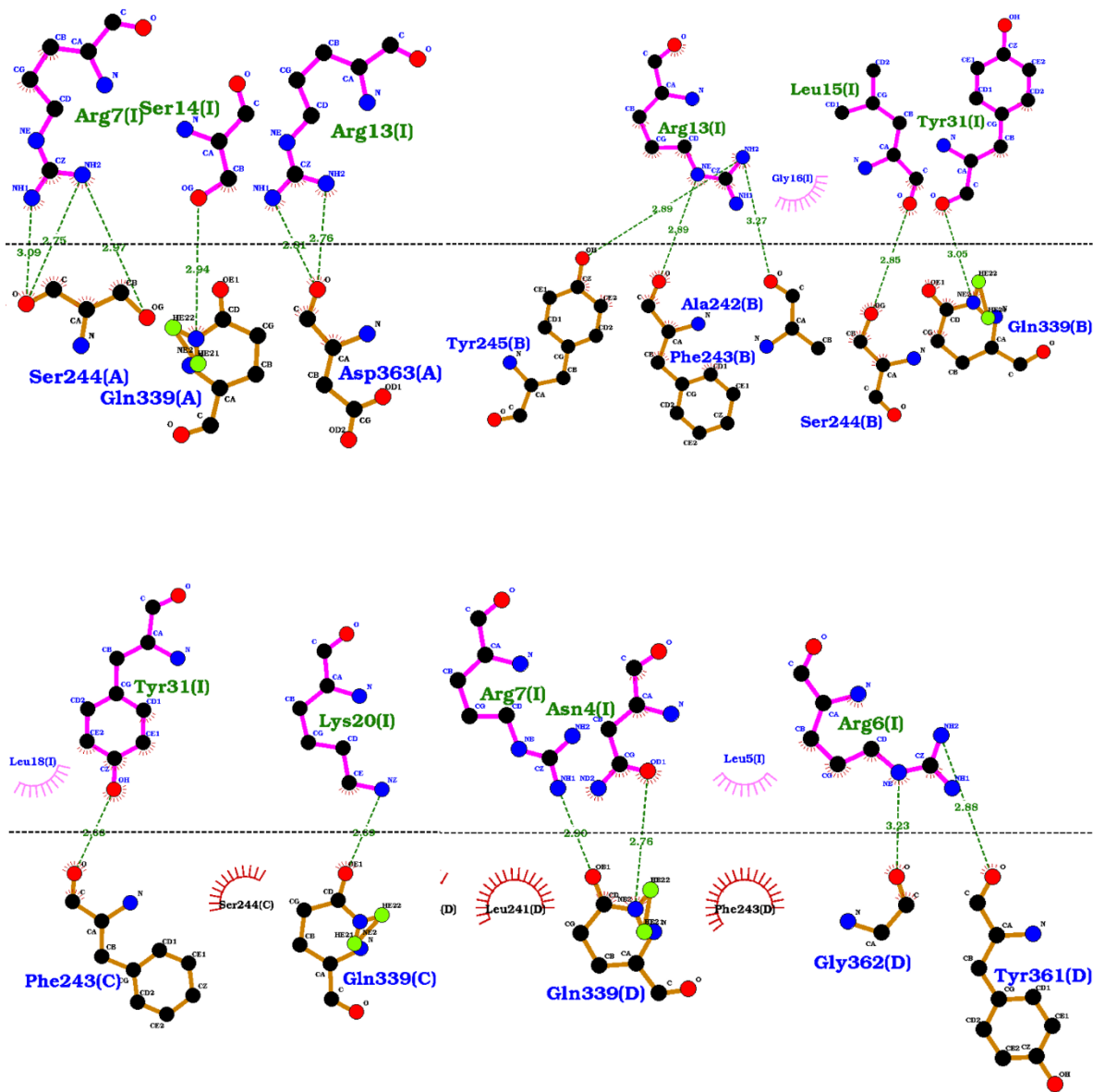


Ilustración 15. Análisis de acoplamiento de E25K/K27E y SK2.

Representación generada por LigPlot⁺ 2.2.5 de las principales interacciones entre E25K/K27E (I) y las cadenas A-B y C-D del canal SK2. La distancia se expresa en Å.

Las interacciones de interés se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4. Interacciones de los complejos Tamapina-SK2, La silatoxina-SK2 y E25K/K27E-SK2

Complejo toxina-canal	Número total de interacciones	Residuo insertado en el filtro de selectividad del canal	Interacciones entre el péptido y el filtro de selectividad del canal

Tamapina-SK2	14	Arg6 y Arg13	Gly362:O Arg13:NH1 Gly362:O Arg13:NH2 Gly362:O Arg16:NH2 Gly362:O Arg6:NE
La silatoxina-SK2	10	Arg6	Tyr361:O Arg6:NH2 Tyr361: Arg6:NH2 Tyr361:O Arg6:NH1
E25K/K27E-SK2	17	Arg6	Gly362:O Arg6:NE
			Tyr361:O Arg6:NH2
			Asp363:O Arg13:NH2
			Asp363:O Arg13:NH1

La notación de la tabla indica residuo, número y átomo entre los que se forma un enlace de hidrógeno.

En la tabla 4 también se identifican los enlaces de hidrógeno formados con los residuos del filtro de selectividad. El número total de interacciones se refiere al número total de puentes de hidrógeno entre los péptidos y el canal SK2. La tamapina y la doble mutante de tamapina presentan un número mayor de interacciones que la silatoxina, como sugería el análisis electrostático. El residuo Gly360 está demasiado impedido estéricamente para interactuar con las toxinas.

Una subunidad del canal SK2 pesa 63.76 kD. El canal tiene cuatro calmodulinas de 16. 838 kD cada una, según UniProt, y las toxinas pesan alrededor de 3 kD. El peso aproximado del sistema es de 325 kD, sin contar la membrana lipídica. Debido a que la dinámica molecular del canal completo ocupa demasiados recursos computacionales, el estudio se restringió al poro y vestíbulo del canal.

6.4 Dinámica molecular

Los enlaces que se forman con el residuo Gly362 son de especial interés, puesto que con estos el que el residuo de Lys27 de la estructura de Barenjee forma enlaces de hidrógeno. La dinámica molecular tiene como objetivo observar si estos enlaces se conservan pasado el tiempo de dinámica molecular, esto indicaría que los enlaces de hidrógeno del residuo 6 de Arg con el canal SK2 son favorables a lo largo del tiempo para bloquear el canal SK2.

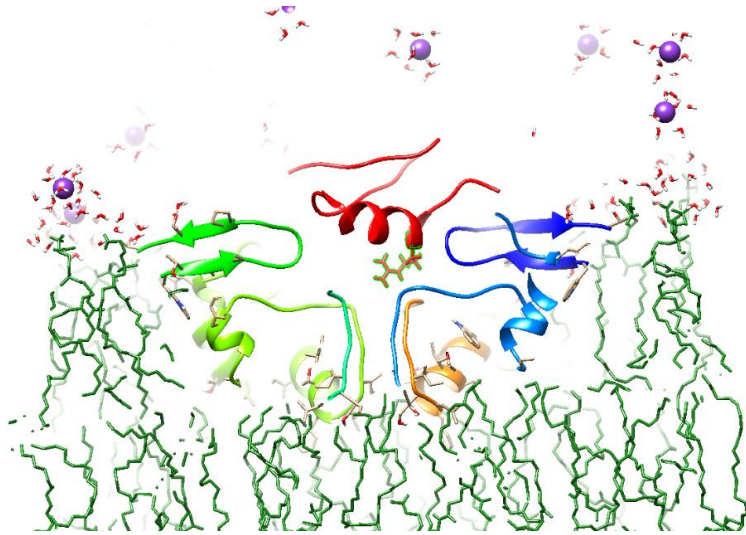


Ilustración 16. Conformación típica adoptada por las toxinas en el acoplamiento molecular.

Se muestra el poro del canal SK2 y en color rojo la toxina tamapina insertando el residuo Arg 6 en el filtro de selectividad del canal. En color verde se muestran los lípidos de la membrana y también se observan algunos iones.

6.4.1 RMSD y RMSF

La dinámica molecular tuvo una duración de 50 ns para cada modelo elegido del acoplamiento. A continuación, se muestra el gráfico de RMSD y RMSF de los tres sistemas con el canal SK2. El gráfico de RMSD indica la desviación de posición a lo largo del tiempo de la estructura respecto al modelo de acoplamiento (Ilustración 17). Los gráficos de RMSF corresponden a la subunidad A del canal SK2, para identificar los residuos de mayor movimiento en el canal (Ilustración 18) y a las toxinas (Ilustración 19), para comparar la fluctuación de cada residuo.

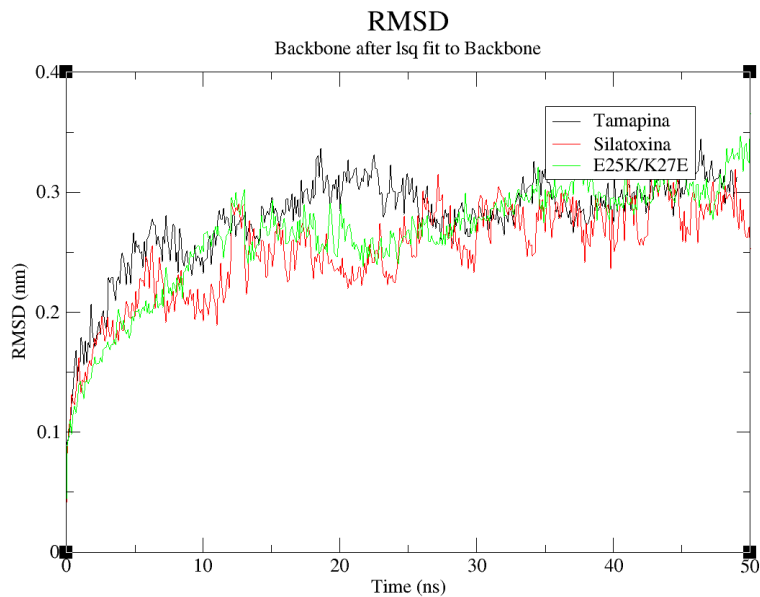


Ilustración 17. RMSD de los modelos de interacción de las toxinas tamapina (negro), la silatoxina (rojo) y E25K/K27E (verde).

Se observa una tendencia definida, sin cambios de amplitud significativos, a partir de 25 ns para la silatoxina y E25K/K27E. En tamapina, se observa una oscilación abrupta en 35 ns que podría significar un cambio de posición.

En los tres sistemas se mantiene un valor por debajo de 0.35 nm. La silatoxina tiene una tendencia creciente, es decir que es la que tiene un mayor número de cambios de movimiento. Los movimientos más notables se encuentran en las zonas de corte del poro (Ilustración 17). El resto de los residuos del canal SK2 mantiene un RMSD por debajo de 0.25 nm (Ilustración 18).

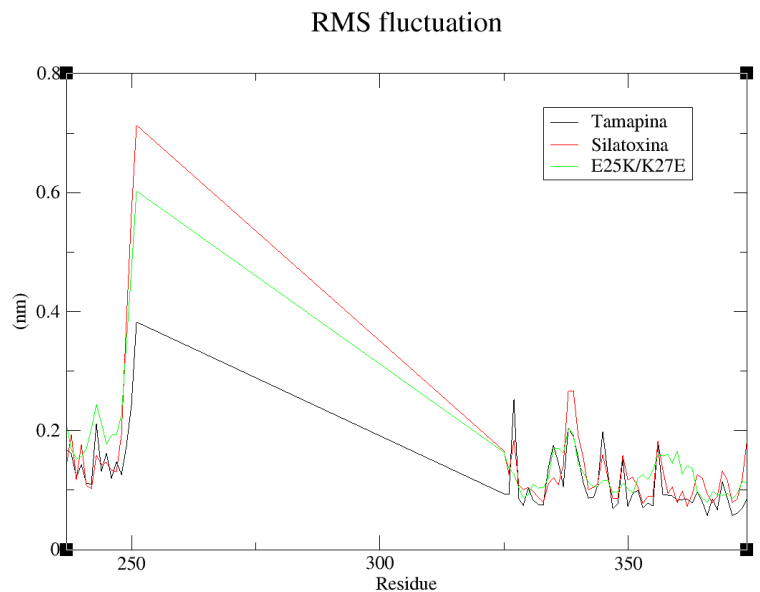


Ilustración 18. RMSF de la cadena A del canal SK2 en la dinámica molecular de tamapina, la silatoxina y E25K/K27E.

Los residuos Tyr245 y Gln338 muestran mayor fluctuación al interactuar con las tres toxinas, especialmente en la silatoxina.

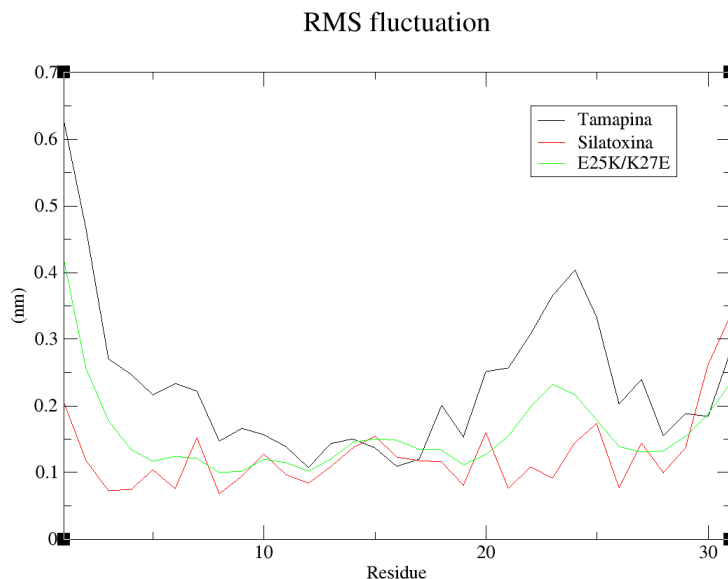


Ilustración 19. RMSF de las toxinas tamapina, la silatoxina y E25K/K27E.

El gráfico de RMSF muestra que los residuos con mayor fluctuación de tamapina son Ala1 y Glu24. En la silatoxina el residuo con mayor movimiento es His31. La doble mutante presenta un comportamiento intermedio entre tamapina y la silatoxina: el movimiento de los residuos Ala1 y Glu24 es importante pero menor a comparación de la tamapina, al igual que Tyr31 en la silatoxina.

6.4.2 Distancia de enlace

Tamapina

La distancia de enlace de los enlaces de hidrogeno se grafica a lo largo del tiempo para analizar la ruptura, formación o conservación a lo largo del tiempo de estos. Específicamente, los enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de Gly362 y Tyr361 del canal SK2, que es el residuo más externo del filtro de selectividad del canal y los residuos Arg 6 de cada toxina.

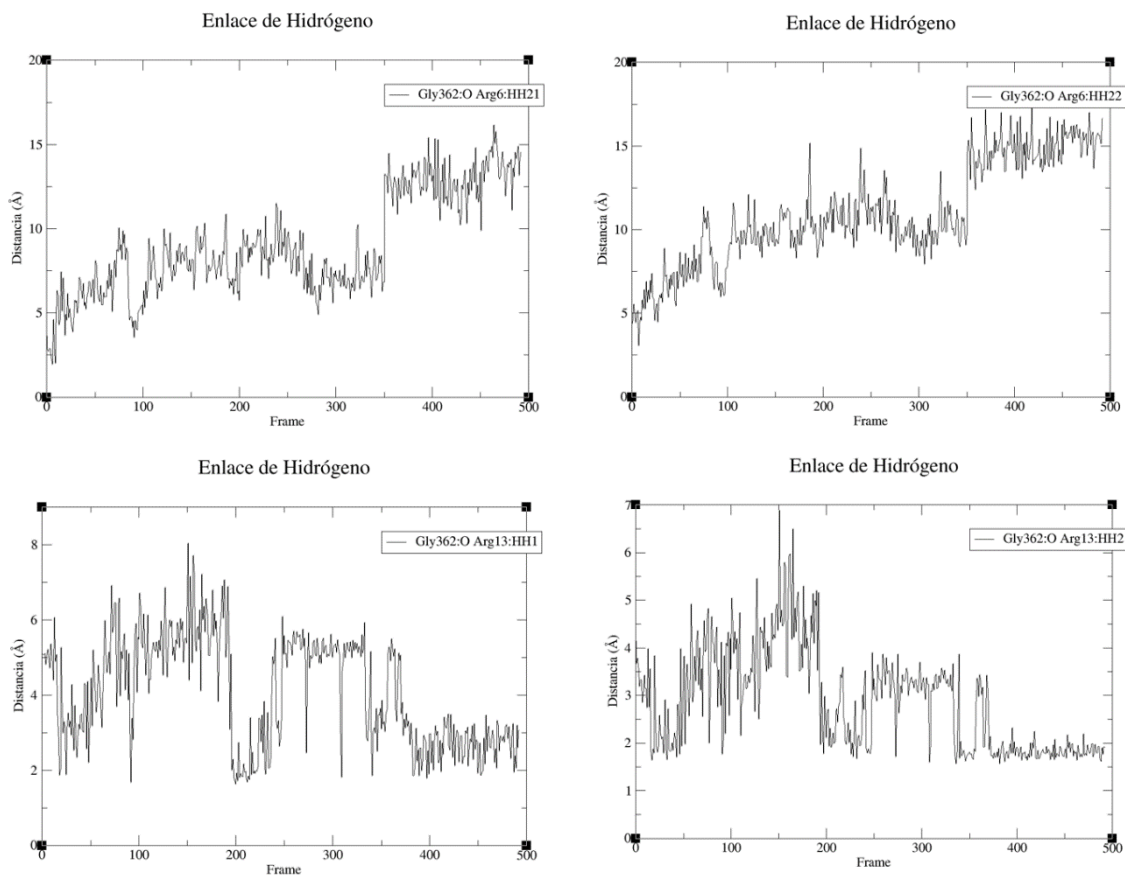


Ilustración 20. Distancia de enlace a lo largo del tiempo de enlaces de hidrógeno formados después de 50 ns de dinámica molecular de tamapina con el canal SK2

En el complejo de acoplamiento de tamapina, inicialmente, había dos enlaces de hidrógeno entre Gly362-Arg6 y dos enlaces de hidrógeno entre Gly362-Arg13. Durante el equilibrio y la minimización de energía se perdieron los enlaces de hidrógeno con Arg13, es decir solo se conservan dos enlaces de hidrógeno Gly362-Arg6. A pocos nanosegundos de iniciar la dinámica molecular se observa que la distancia de enlace Gly362-Arg6 aumenta y a partir del cuadro 350, es decir 35 ns, hay un cambio abrupto en la distancia de enlace que indica la ruptura de estos enlaces. En el último cuadro de la dinámica se encontraron dos enlaces de hidrógeno Gly362-Arg13 formados a partir de 400 nanosegundos. En total se rompen los enlaces entre el residuo Arg6 y se conservan con Arg13.

La silatoxina

Este modelo no presentaba enlaces de hidrógeno con Gly362, pero si tres enlaces de hidrógeno entre Tyr361 y Arg6. Se observa la formación de dos enlaces de hidrógeno, a lo largo del tiempo, entre Gly362 y Arg6.

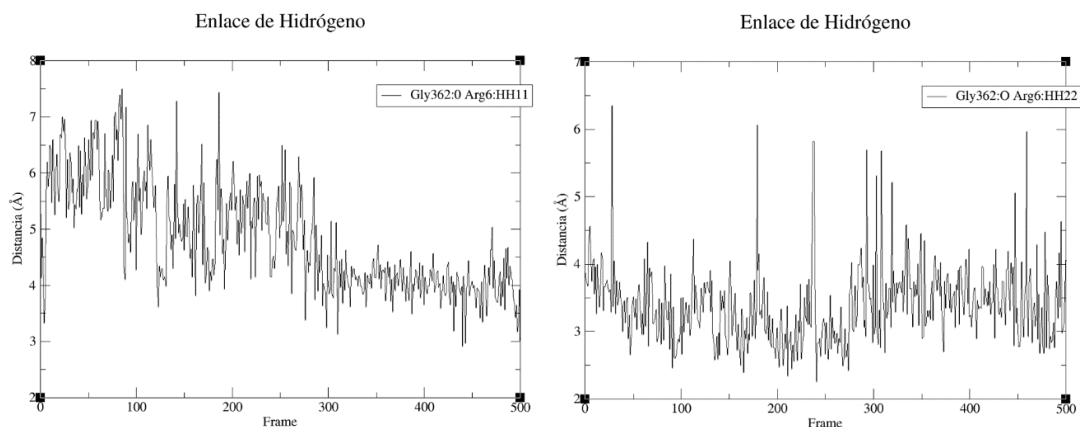


Ilustración 21. Distancia de enlace a lo largo del tiempo de enlaces de hidrógeno formados después de 50 ns de dinámica molecular de la silatoxina con el canal SK2.

E25K/K27E

El acoplamiento presentaba una interacción Arg6 y Gly362, que se rompió en los primeros nanosegundos de la dinámica. Al término, hay dos enlaces de hidrógeno formados entre estos residuos y uno formado durante la mayor parte del tiempo.

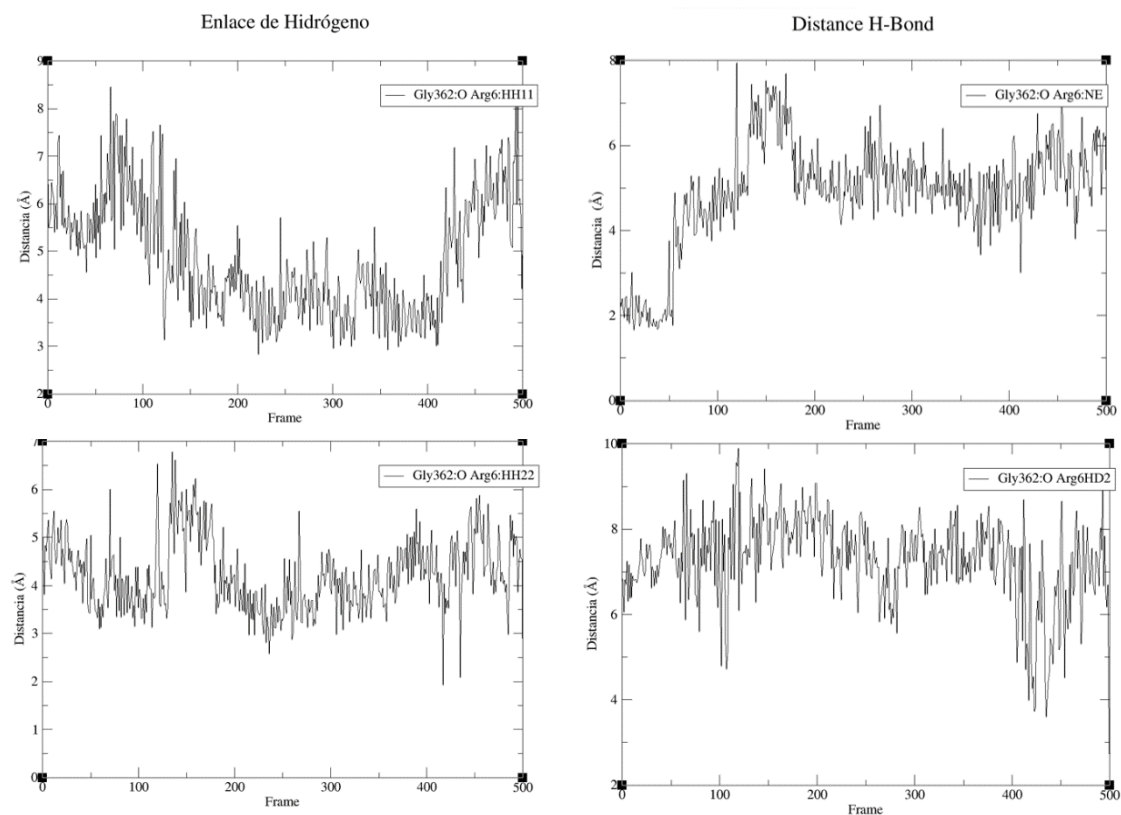


Ilustración 22. Distancia de enlace a lo largo del tiempo de enlaces de hidrógeno formados después de 50 ns de dinámica molecular de E25K/K27E con el canal SK2.

En la dinámica molecular se observó una ligera retracción de las toxinas sin perder interacción con el FS, es decir, los enlaces de hidrógeno son más favorables con el residuo más externo Gly362 que con Tyr361 debido a que se encuentra más expuesto a la superficie extracelular, este también es el residuo equivalente con el que la estructura resuelta de Barenjee interacciona. Las interacciones Gly362-Arg6 de tamapina, la silatoxina y la doble mutante se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Resumen de las interacciones y su resultado a lo largo de 50 ns de simulación de dinámica molecular para los tres modelos de interacción de las toxinas con el canal SK2.

Toxina	Interacción	Resultado
Tamapina	Gly362:O Arg6:HH21	Interacción perdida
	Gly362:O Arg6:HH22	Interacción perdida
	Gly362:O Arg13:HH1	Interacción perdida y formada
	Gly362:O Arg13:HH2	Interacción perdida y formada
La silatoxina	Gly362:O Arg6:HH11	Interacción formada
	Gly362:O Arg6:HH22	Interacción formada
E25K/K27E	Gly362:O Arg6:HH11	Interacción formada y perdida
	Gly362:O Arg6:HH22	Interacción formada
	Gly362:O Arg6:HD2	Interacción formada
	Gly362:O Arg6:NE	Interacción perdida

La notación de la tabla indica el residuo, número y átomo entre los que se forma un enlace de hidrógeno.

En la tamapina los residuos Arg6 y 13 presentaron competencia de interacción con el filtro de selectividad del canal en los resultados de acoplamiento y la dinámica molecular muestra que el residuo Arg6 interacciona con el filtro de selectividad del canal durante 35 nanosegundos, para luego cambiar al residuo Arg13, sugiriendo que esté su interacción es favorable sobre el residuo 6, o bien que ambos son aptos para interactuar con SK2 ya que Arg13 formó dos interacciones con el canal SK2 que se rompen durante la minimización y equilibrio y se vuelven a formar pasado el tiempo de dinámica; las interacciones de Arg6 permanecieron un tiempo considerable de la dinámica. La silatoxina, interacciona con el residuo Arg6 en todos los resultados de acoplamiento y este residuo permaneció sobre el FS finalizado el tiempo de observación prefiriendo formar dos enlaces de hidrógeno con Gly362 que con Tyr361. La doble mutante de tamapina E25K/K27E también presenta competencia

de interacción entre los residuos Arg6 y 13, pero a diferencia de la tamapina parece solo presentar interacciones favorables con Arg 6, al igual que la silatoxina.

El carácter de la doble mutante de tamapina E25K7K27E presenta un comportamiento dinámico intermedio entre tamapina y la silatoxina, como se mostró en el movimiento de residuos del gráfico RMSF, y el modo de unión con el canal SK2 muestra mayor parecido con la silatoxina que con tamapina como mostraron los resultados de acoplamiento y dinámica molecular. El tiempo de dinámica molecular es suficiente para observar la ruptura y formación de enlaces, incluso de cambiar de residuo insertado en el filtro de selectividad del canal como fue el caso de tamapina.

8) CONCLUSIÓN

Se realizó el modelo de interacción entre tamapina y el canal SK2 al insertar un residuo básico de Arg en el filtro de selectividad del canal.

Se llevó a cabo un acoplamiento molecular para determinar el residuo más frecuente de interacción mediante la simulación por dinámica molecular para determinar la estabilidad del sistema con la interacción Arg6 en el filtro de selectividad.

El residuo Arg13 es estable sobre el residuo Arg6, de acuerdo con el análisis de ruptura y formación de enlaces de hidrógeno durante la dinámica molecular.

La silatoxina y la doble mutante de tamapina E25K/K27E presentan un modelo estable de interacción entre el residuo Arg6 y el canal SK2.

El comportamiento de la doble mutante E25K/K27E con el canal SK2 es similar a la silatoxina y no a la tamapina.

9) ANEXOS

8.1 Anexo I. Servidor ClusPro

Ecuación 3. Función de puntuación de ClusPro

$$E = 0.40 E_{rep} + (-0.4 E_{att}) + 1200 E_{elec} + 1.00 E_{DARS}$$

E_{rep} y E_{att} denotan las contribuciones repulsivas y atractivas de energía de interacción de Van der Waals.

E_{elec} es un término de energía electrostática.

E_{DARS} representa contribuciones de desolvatación, es decir, el cambio de energía libre debido a la eliminación de las moléculas de agua de la interfaz.

10) REFERENCIAS

ⁱ Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.-L., Leguennec, J.-Y., Bournoux, P., & Vandier, C. (2006). Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2946–2953. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0194>

ⁱⁱ Chantome, A., Girault, A., Potier, M., Collin, C., Vaudin, P., Pagès, J.-C., Vandier, C., & Joulin, V. (2009). KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Experimental Cell Research*, 315(20), 3620–3630. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.07.021>

ⁱⁱⁱ Kuhlman, B., & Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 681–697. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>

^{iv} *Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace* | *Nature Protocols*. (n.d.). Retrieved February 23, 2022, from <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.197>

^v *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold* | *Nature*. (n.d.). Retrieved

^{vi} Vascon, F., Gasparotto, M., Giacomello, M., Cendron, L., Bergantino, E., Filippini, F., & Righetto, I. (2020). Protein electrostatics: From computational and structural analysis to discovery of functional fingerprints and biotechnological design. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1774–1789. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.029>

vii Pang, X., & Zhou, H.-X. (2013). Poisson-Boltzmann Calculations: Van der Waals or Molecular Surface? *Communications in Computational Physics*, 13(1), 1–12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535440/>

viii Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Chapter 10 - Other Related Techniques. In K. Roy, S. Kar, & R. N. Das (Eds.), *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment* (pp. 357–425). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00010-7>

ix Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., & Alvala, M. (2019). *Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85991>

x Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K., & Mu, Y. (2019). Molecular Dynamics and Simulation. In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 550–566). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20284-7>

xi Bueren-Calabuig, J. A. (2014). 17 - *Dinámica molecular*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1066360>

xii *Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations | Springer Nature Experiments*. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-9752-7_2

xiii Martínez, L. (2015). Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. *PLoS ONE*, 10(3), e0119264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119264>

xiv Kshatri, A. S., Gonzalez-Hernandez, A., & Giraldez, T. (2018). Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca²⁺ Activated Potassium Channels in the Nervous System.

^{xv} Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>

^{xvi} Cui, M., Qin, G., Yu, K., Bowers, M. S., & Zhang, M. (2014). Targeting the Small- and Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated Potassium Channels: The Drug-Binding Pocket at the Channel/Calmodulin Interface. *Neurosignals*, 22(2), 65–78. <https://doi.org/10.1159/000367896>

^{xvii} Thompson, A. N., & Nimigean, C. M. (2013). Potassium Channels, Structure and Function. In R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, & E. A. Permyakov (Eds.), *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp. 1790–1794). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_226

^{xviii} Lee, C.-H., & MacKinnon, R. (2018). Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6388), 508–513. <https://doi.org/10.1126/science.aas9466>

^{xix} Bergeron, Z. L., & Bingham, J.-P. (2012). Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins*, 4(11), 1082–1119. <https://doi.org/10.3390/toxins4111082>

^{xx} Ramírez-Cordero, B., Toledano, Y., Cano-Sánchez, P., Hernández-López, R., Flores-Solis, D., Saucedo-Yáñez, A. L., Chávez-Urbe, I., Briebe, L. G., & del Río-Portilla, F. (2014). Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, 27(6), 960–967. <https://doi.org/10.1021/tx4004193>

^{xxi} Mayorga-Flores, M., Chantôme, A., Melchor-Meneses, C. M., Domingo, I., Titau-Delgado, G. A., Galindo-Murillo, R., Vandier, C., & del Río-Portilla, F. (2020). Novel Blocker of Onco SK3 Channels Derived from Scorpion Toxin Tamapin and Active against Migration of Cancer Cells. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(8), 1627–1633. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00300>

^{xxii} Auguste, P., Hugues, M., Mourre, C., Moinier, D., Tartar, A., & Lazdunski, M. (1992). Scyllatoxin, a blocker of calcium-activated potassium channels: structure-function relationships and brain localization of the binding sites. *Biochemistry*, *31*(3), 648–654. <https://doi.org/10.1021/bi00118a003>

^{xxiii} Zuo, Z., Chen, Z., Cao, Z., Li, W., & Wu, Y. (n.d.). Scorpion Toxin-potassium Channel Interaction Law and its Applications. *Venoms and Toxins*, *1*(1), 15–26. Retrieved February 24, 2022, from <https://www.eurekaselect.com/article/106999>

^{xxiv} Bartok, A., Panyi, G., & Varga, Z. (2014). Potassium channel blocking peptide toxins from scorpion venom. *Scorpion Venoms; Gopalakrishnakone, P., Possani, LD, Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, CR, Eds*, 493-527.

^{xxv} Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., & MacKinnon, R. (2013). Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *ELife*, *2*, e00594. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>

^{xxvi} *Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment* | *Nature*. (n.d.). Retrieved May 5, 2022, from <https://www.nature.com/articles/nature06265>

^{xxvii} Andreotti, N., di Luccio, E., Sampieri, F., De Waard, M., & Sabatier, J.-M. (2005). Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides*, *26*(7), 1095–1108. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.022>

^{xxviii} Dawaliby, R., Trubbia, C., Delporte, C., Noyon, C., Ruyschaert, J.-M., Antwerpen, P. V., & Govaerts, C. (2016). Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(7), 3658–3667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706523>

^{xxix} *Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking - ScienceDirect.* (n.d.). Retrieved June 16, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212620302094?via%3Dihub>

^{xxx} Vajda, S., Yueh, C., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Kozakov, D. (2017). New Additions to the ClusPro Server Motivated by CAPRI. *Proteins*, 85(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>

^{xxxi} *The ClusPro web server for protein–protein docking | Nature Protocols.* (n.d.). Retrieved June 16, 2022, from <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.169>

^{xxxii} Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (2013). How Good is Automated Protein Docking? *Proteins*, 81(12), 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>