



Centro Interdisciplinario de  
Neurociencia de Valparaíso



# "UNIÓN DE IONES POTASIO ( $K^+$ ) AL PORO DE LOS CANALES DE POTASIO *SHAKER*, WT Y P475Q, Y SU RELACIÓN CON LA CONDUCTANCIA: UN ENFOQUE DE DINÁMICA MOLECULAR"

Unidad de Investigación I y II para obtener el grado de:  
Licenciada en Ciencias mención Química

**Luisa Giselle Montoya Lara**

**Profesor Guía**

Dr. David Naranjo

**Profesores Informantes**

Dr. Gonzalo Riveros

Dr. Fernando Danilo González

**MARZO 2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos especiales al Dr. David Naranjo, por la enseñanza, amabilidad, y gestión en este trabajo. Porque me orientó como profesor guía de esta tesis con mucha dedicación.

Al Dr. Gonzalo Riveros, y al Dr. Fernando Danilo González, por estar gentilmente dispuestos a las gestiones de esta tesis como profesores informantes.

Al proyecto 1090493 de FONDECYT dirigido por el Dr. Naranjo para el desarrollo de esta investigación.

A Romina Sepúlveda, Ingeniera Informática. Por cooperarme en este proyecto compartiendo conmigo su conocimiento, y por darme fuerza y consuelo cuando ya creía no poder más.

A Ariela Vergara, por amablemente compartir su memoria y trabajo de tesis.

A Gustavo Contreras e Ignacio Valencia, alumnos de doctorado del departamento de Neurociencias de la Universidad de Valparaíso. Porque siempre que les solicité ayuda fueron gentiles, y desinteresadamente compartieron su conocimiento conmigo.

A la Dra. Marisol Tejos, por ser una excelente profesora, y enseñarme de una manera dinámica y motivante las distintas asignaturas que cursé con ella durante la carrera.

A la Dra. Marcela Zahr, Directora de la carrera Licenciatura en Ciencias mención Química ó Biología. Por su disposición a las distintas gestiones durante mis años como alumna de esta carrera.

## DEDICATORIA

Al estar finalizando un largo camino lleno de luchas, esfuerzo, y alegrías, doy gracias y dedico esta investigación:

Primero, a Dios por siempre estar en mi camino, por responder en el momento indicado, y amarme de una forma inexplicable. Porque todo lo que un día me pronosticaron los médicos para mi vida Él lo revirtió.

A mi madre Genoveva Lara, por todo su amor, y cuidados de tantos años conmigo luchando. Sé que siempre has estado orgullosa de mí y más aun en esta etapa de mi vida. Todo lo que hago, lo hago pensando en ti.

A mí querido Dangelo Guidotti. Mi mejor amigo y mi novio. El que me soporta, me cuida, me mimas, me alegra, me protege, me acompaña, me apoya, y me consuela. Por llenar de amor mi corazón.

Al Dr. Patricio Vélez por siempre ser un excelente profesor, y una excelente persona. Gracias por siempre impulsarme a luchar por mis sueños.

A Erick Pizarro Cortes, compañero de carrera. Por darme apoyo, consuelo y motivación para seguir en pie, por hacer darme cuenta que debía seguir adelante con mis proyectos.

A los auxiliares de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso por siempre ser muy amables conmigo en todo lo que necesitaba cuando debía desplazarme por la universidad. Gracias por ser mis piernas en muchas ocasiones.

Y a todos aquellos incluyendo familia y amigos, que en algún momento de mi vida y etapa de universitaria compartieron conmigo brindándome su apoyo y cariño.

*“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios, estará contigo donde quiera que vayas”*

**Josué 1:9**

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
• Clasificación general de los canales de K <sup>+</sup>	5
• Estructura general de los canales <i>Shaker</i>	6
• Pasos de la conducción iónica	7
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>10</b>
<b>RESULTADOS ESPERADOS</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍAS</b>	<b>11</b>
• Dinámica Molecular (DM)	11
• Calculo de HOLE	13
• Potencial Electroestático: Calculo APBS	14
• Densidad Iónica	15
<b>RESULTADOS</b>	<b>16</b>
• Dinámica Molecular: Trayectorias de equilibrio	16
• Densidad Iónica	17
<b>APBS</b>	<b>17</b>
• Cálculo de HOLE	18
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>25</b>

## RESUMEN

Todos los canales de potasio ( $K^+$ ) son miembros relacionados de una sola familia de proteínas y son muy fáciles de reconocer porque contienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada llamada secuencia firma del canal de  $K^+$ , de estructura primaria: T/SXGXGD. Esta secuencia firma determina la selectividad del canal al ión  $K^+$  y forma parte de una estructura denominada filtro de selectividad el cual es el encargado de filtrar del canal a otros iones que no sean  $K^+$ . Sin embargo, la conductancia entre los distintos canales de  $K^+$  varía ampliamente (entre 3-300 pS en condiciones iónicas similares).

El sexto y último segmento transmembranal, S6, origina la compuerta de acceso iónico del canal *Shaker*, un canal de  $K^+$  de baja conductancia presente en eucariontes. En esta región existe una secuencia conservada PVP (Pro<sub>473</sub>-Val<sub>474</sub>-Pro<sub>475</sub>), presente también en otros canales de  $K^+$ . El remplazo de Prolina (P) por Glutamina (Q) en la posición 475 de la secuencia hace que el canal mutado (*Shaker*-P475Q) muestre una conductancia ~7 veces mayor a la del canal silvestre (*Shaker*-WT).

Se realizaron estudios de Dinámica Molecular (DM) en el canal *Shaker*, WT y P475Q, para intentar comprender la correlación entre la estructura de los aminoácidos ubicados en S6 con la variación en la conductancia unitaria del canal.

## MARCO TEÓRICO

Debido a que la membrana celular esta constituida de fosfolípidos, esta tiene una permeabilidad muy baja a iones. Por esto, el transporte de iones  $K^+$ , hacia y desde el interior de la célula debe ser realizada a través de proteínas especializadas que están insertadas en la membrana, denominadas canales iónicos.

- **Clasificación General de los Canales de  $K^+$**

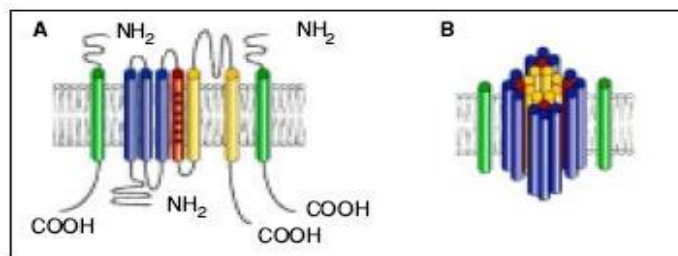
Según el mecanismo de activación se puede subdividir a los canales de  $K^+$  en dos grandes grupos, dependiendo si son activados por cambio de voltaje (Kv) o por agonistas. Los canales Kv son canales que se abren o cierran en respuesta a un cambio en el potencial de membrana. En este tipo de canales la despolarización de la membrana causa un cambio conformacional que produce la apertura del poro, permitiendo el paso de iones de un lado a otro de la célula. Dentro del grupo de canales Kv se incluye los miembros de las familias *Shaker*.

Otra clasificación habitual agrupa a los canales de  $K^+$  atendiendo al número de dominios de poro y de segmentos transmembranales del canal, (denominados S o TM en los canales  $K_v$ ). Desde este punto de vista, podemos denominar a los canales *Shaker* como del tipo (6S-1P), ya que presentan 6 segmentos transmembranales y 1 dominio poro.

- **Estructura de los canales *Shaker***

El canal *Shaker* forma una estructura tetrámerica, constituida por 4 subunidades  $\alpha$  agrupadas alrededor de un poro central. Cada subunidad  $\alpha$  cuenta con 6 segmentos transmembranales (S1-S6). De estos 6 segmentos que atraviesan la membrana, cinco son hidrofóbicos (S1-S3, S5, S6), y uno (S4) contiene varios aminoácidos de carga positiva (Fig.1). El lazo que une los segmentos S5 y S6 (segmento P) contiene la secuencia que determina la selectividad del poro para el  $K^+$  (Heginbotham L y cols 1994).

El poro, ubicado en el eje de simetría de la proteína, se divide en tres regiones desde la región extracelular. Desde afuera hacia dentro de la célula, se ubica primero una región estrecha correspondiente al filtro de selectividad, que separa al poro de la solución extracelular, luego una cavidad acuosa en la mitad de la membrana que estabiliza la presencia de los iones  $K^+$  (cavidad central) (Doyle y cols 1998), y por último, y un túnel interno de  $\sim 18$  Å de longitud, en donde se encuentra la compuerta de apertura de canal, conformada por el segmento S6 de las subunidades  $\alpha$ . En esta región de *Shaker* se encuentra el residuo 475.



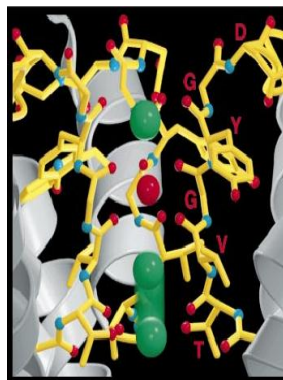
**Fig. 1. A.** Cada subunidad  $\alpha$  de los canales de  $K^+$  contiene seis segmentos transmembranales. El segmento S4 constituye el sensor de voltaje (rojo), S5 y S6 corresponden a las regiones del poro del canal (dominio de poro). En verde se muestran las subunidades  $\beta$ . **B.** Configuración esquemática del canal en la membrana celular, generado al asociarse las 4 subunidades  $\alpha$ .

## ▪ Pasos de la Conducción iónica

El radio iónico del  $K^+$  es 1.33 Å, y el del ión sodio ( $Na^+$ ) es 0.95 Å. A pesar de esta sutil diferencia en radios iónicos los canales de Kv manejan la selección de iones  $K^+$  por sobre los iones de  $Na^+$  en un factor de más diez mil (Doyle y cols 1998). Además su actividad es controlada a escala de milisegundos por compuertas de activación sensibles al potencial de membrana.

Para comprender como los iones  $K^+$  logran atravesar el poro con tal eficiencia resulta esencial comentar algo sobre el mecanismo por el cual un ión  $K^+$  puede entrar y viajar a lo largo del canal. Un canal de Kv no esta siempre abierto. Una vez que responde a un cambio de potencial y se abre, el poro no sólo debe ofrecerle al  $K^+$  un espacio adecuado para que entre, sino también un ambiente que no sea muy distinto al que ión tenía fuera del canal, para que así le resulte “cómodo” su viaje a lo largo del poro. Para que un ión  $K^+$  quepa y entre al canal debe perder las moléculas de agua que lo rodeaban a la entrada del poro, es decir debe entrar deshidratado (sin su capa de solvatación o esfera de hidratación). Esto implica un gasto energético que debe ser compensado para que el proceso de conducción siga siendo factible.

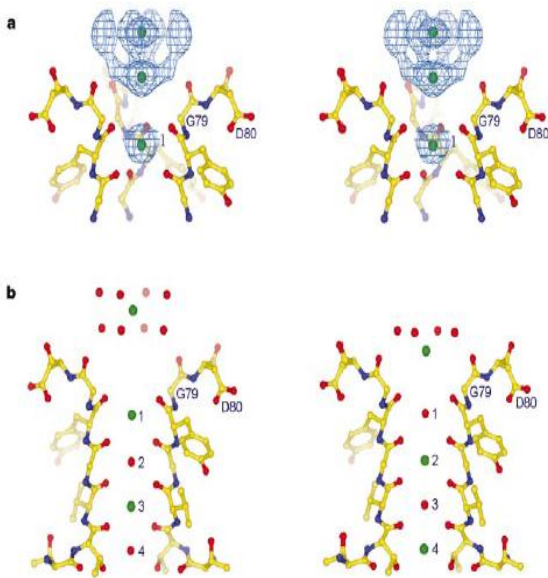
Gracias a mapas de densidad electrónica a lo largo del eje del poro se observó que en el filtro de selectividad las hélices del poro se orientan de manera que el extremo amino (-NH<sub>2</sub>) del aminoácido queda alejado de la cavidad, mientras que los grupos carbonilos (-C=O) de la cadena principal quedan expuestos “mirando” hacia donde está alojado el ión  $K^+$ , quedando este con 8 cargas parciales negativas que reemplazarían a la acción de agua, y con una configuración similar a un antiprisma cuadrado, tal como la geometría que tenía el  $K^+$  antes de su entrada al filtro. (Fig. 2) (Zhou y cols, 2001).



**Fig. 2.** Por estudios de densidad electrónica se ha observado que los carbonilos (-C=O) de la secuencia G-Y-G (glicina, tirosina, glicina) del filtro de selectividad apuntan hacia el poro y actúan como aguas postizas. Las cadenas laterales de V (valina), Y, y G se apartan de la vía de conducción de los  $K^+$  (representados por esferas verdes), los cuales son alineados por los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la cadena principal de la secuencia firma (Zhou y cols. 2001).

Puesto que los iones como primer paso deben entrar en el filtro de selectividad, esta estructura actuará en primera instancia como un filtro físico puesto que, aquellos iones que tengan un radio iónico mayor que el radio del  $K^+$  no van a poder pasar por el canal ya que el filtro no resulta lo suficientemente amplio para estos. Tampoco podrán pasar los más pequeños como el ión  $Na^+$  debido a que no “calzan” bien, puesto que como la distancia entre los carbonilos de las cadenas principales y los iones  $K^+$  se hace mayor, se reduce la estabilización del  $Na^+$  dentro del canal.

Ya que por razones de electroestática 2 o más iones  $K^+$  cercanos se repelen entre sí, las configuraciones que se proponen para minimizar la repulsión dentro del filtro de selectividad, son: 1) la configuración  $K^+$ -agua- $K^+$ -agua (configuración 1,3) y la configuración agua- $K^+$ -agua- $K^+$  (configuración 2,4), ambas equivalentes energéticamente (Fig. 3) (Zhou y cols 2001).



**Fig. 3. A.** Un ión  $K^+$  (denotado con esfera verde) a la entrada del canal esta hidratado por moléculas de agua. Dentro del filtro los residuos interactúan con el ión  $K^+$  para desplazarlo de su esfera de hidratación.

**B.** Configuraciones 1,3 y 2,4 que puede adoptar el ión  $K^+$  dentro del filtro de selectividad. Ión  $K^+$  a la entrada con 8 moléculas de agua en configuración 1,3, y ión  $K^+$  con 4 moléculas de agua en configuración 2,4. (Zhou y cols 2001).

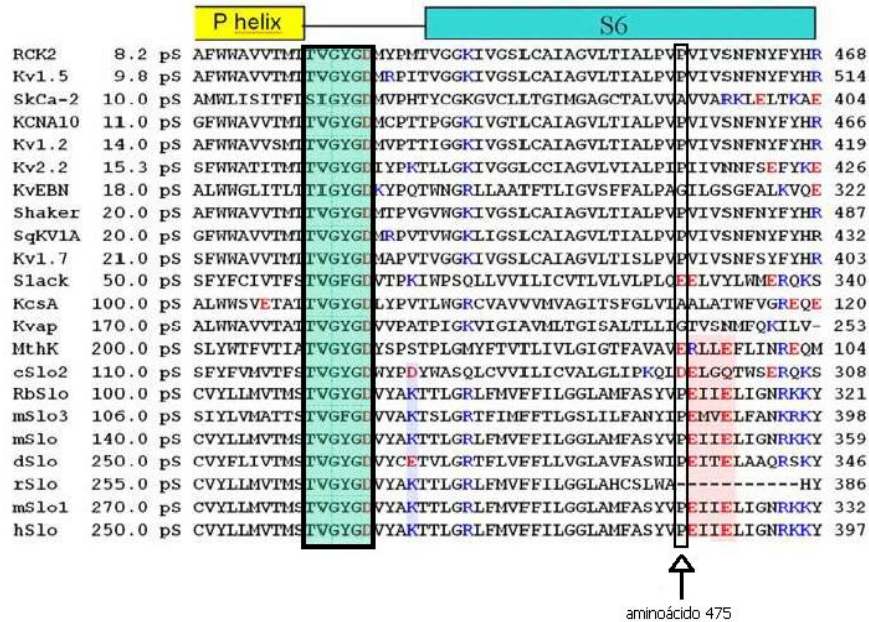
## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base al amplio rango de conductancia unitaria que presentan los distintos canales de  $K^+$  en similares condiciones de experimentales (Fig. 4), surge la pregunta:

¿Por qué existe una marcada variabilidad de conducción entre los distintos canales de  $K^+$  si es que todos en esencia provienen de la misma familia, y poseen el mismo filtro de selectividad?, o en definitiva: ¿Qué es lo que hace que un canal de  $K^+$  conduzca más o conduzca menos?.



Esto hace pensar que la conducción iónica está determinada también por otras regiones del poro. La posición 475 está ubicada en la región S6 de los canales y la polaridad del residuo allí encontrado se cree es clave en la mayor o menor conductancia del canal.



**Fig. 4.** Alineamiento de la estructura primaria para distintos canales de  $K^+$ . En la primera columna se muestra los distintos tipos de canales de  $K^+$ , mientras que en la segunda columna aparecen las conductancias unitarias respectivas. Encerrado en cuadro con color de fondo se indica la región correspondiente al filtro de selectividad y encerrado en cuadro y con flecha se indica el aminoácido de S6 equivalente al sitio 475 con respecto a *Shaker*.

Channel	Conductance	INNER HELIX ( S6 or M2 )	
Shaker	12 pS	KIVGSLCAIAGVLTIALPVEVIVSNFN	482
KcsA	50 pS	RLVAVVVMVAGITSFGLVT-AALATWF	114
MSlo	300 pS	RLFMVFFILGGLAMFASYVPEIIEELI	326
MthK	200 pS	MYFTVTTLIVLGIGTFAVAV-ERLLEFL	98
KvAP	200 pS	KVIGIAVMLTGISALTLTLLIGTVSNMFQ	235

**Fig. 5.** Alineamiento del segmento S6 de diversos canales de  $K^+$ . En los canales de más alta conductancia se ha observado la presencia de dos ácidos glutámicos (E) en la región S6, lo que formaría dos anillos de cargas negativas en el interior de la cavidad.

Se sabe que el mutante P475Q de *Shaker*, conduce ~7 veces mayor a la del canal silvestre (Shukareva et al, 2003). Esto último sería atribuible al reemplazo de Pro<sub>475</sub> por algún residuo hidrófilico o polar, siendo más significativa el alza de conductancia en los mutantes P475D y

P475Q, puesto las alzas más significativas en la conducción unitaria se observa en donde el reemplazo fue por ácido aspártico (D) y glutamina (Q) (Vergara 2009).

Se apuntó a la región PVP porque es una región conservada es decir, canales de K<sup>+</sup> de baja conducción poseen esta secuencia, por lo que a través de los estudios de *Shaker*-P475Q se podría dar luz para el entendimiento de las causas en la amplia variación de conductancia unitaria entre los diversos canales de Kv.

A través de experimentos de bloqueo con tetraalquilamonios (Thompson y Begenisich, 2003) fue posible demostrar la existencias de un sitio adicional para la unión de un ión K<sup>+</sup> en el vestíbulo intracelular de S6. Se cree que por la presencia de residuos polares o cargados en la posición 475, la coordinación de los iones K<sup>+</sup> al poro sería más probable, aumentando la tasa de transporte (Naranjo D., datos no publicados).

Por medio de herramientas bioinformáticas como la Dinámica Molecular (DM), se buscará estudiar el posible efecto estabilizante de iones K<sup>+</sup> que causa el residuo polar glutamina en el mutante P475Q.

## **HIPÓTESIS**

“El incremento en la conductancia de *Shaker*-P475Q, se debería a la mayor ocupación del poro por iones K<sup>+</sup>”.

## **RESULTADOS ESPERADOS**

Las mediciones de Dinámica Molecular (DM) debieran reportar mayor densidad de K<sup>+</sup> en el poro del canal.

## **OBJETIVOS**

- 1) Construir un sistema molecular de *Shaker* P475Q a partir de modelo por homología (Vergara 2009) para realizar Dinámica Molecular
- 2) Determinar y caracterizar la ocupación por K<sup>+</sup> de los canales de *Shaker*-WT y *Shaker*-P475Q en conformación abierta, realizando cálculos de diámetro del poro (HOLE), potencial electrostático (APBS) y Densidad Iónica a lo largo del poro.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍAS

Realizar a través de la mutación un cambio de estructura química o una “perturbación estructural” al poro de *Shaker* y por simulación molecular observar los posibles cambios en conformación y afinidad por iones  $K^+$  de este “nuevo” canal, P475Q.

### Dinámica Molecular (DM)

La Dinámica Molecular es una técnica computacional basada en la química teórica. Estos son utilizados para imitar el comportamiento de las moléculas, por lo que puede ser aplicada para analizar y/o predecir propiedades moleculares de un sistema biológico. Se basa en los postulados de la mecánica clásica y para ello interpreta los átomos de una molécula como esferas unidas por enlaces elásticos.

La DM consiste en la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton para determinar cómo varía la posición y velocidad de las partículas en función del tiempo.

Considerando el sistema canal de  $K^+$  existen métodos numéricos basados en la mecánica clásica que proporcionan la posición y la velocidad (ó el momento) de las partículas del sistema a un tiempo posterior muy pequeño  $t + \Delta t$ .

Para una partícula como un ión  $K^+$  que se mueve en una dimensión dentro del canal se tiene la siguiente expresión para asignar las velocidades iniciales:

$$P(v_{ix}) = \left( \frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right]$$

La ecuación entrega la probabilidad  $P(v_{ix})$  de que la partícula  $i$ -ésima de masa  $m_i$ , tenga una velocidad  $v_{ix}$  en la dirección  $x$ , a una temperatura de interés  $T$ .  $K_B$  corresponde a la constante de distribución de Maxwell-Boltzmann.

Las conformaciones de las macromoléculas dependen de las torsiones, repulsiones, atracciones de van der Waals y de las interacciones electrostáticas, etc.

Por esto, es fundamental para cualquier cálculo de mecánica clásica calcular la variación de energía potencial de un sistema con su geometría (potencial de interacción).

$$E = E_{\Delta \text{long.enlace}} + E_{\Delta \text{flexión}} + E_{\Delta \text{torsión}} + E_{\Delta \text{no-enlazante}} + E_{\Delta \text{otros}}$$

Donde E representa la energía potencial total del sistema, y resulta como una suma de términos de variaciones de energía de todas las interacciones asociadas como las tensiones de los enlaces, los ángulos, las interacciones electroestáticas, interacciones de Van der Waals, puentes de hidrogeno, etc. de una partícula específica con el resto de estas. Se asume que el sistema termodinámico no intercambia energía ni materia con el ambiente, y su temperatura y número de partículas permanece constante.

Esto integrado resulta en:

$$\begin{aligned} \mathcal{V}(\mathbf{r}^N) = & \sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \end{aligned}$$

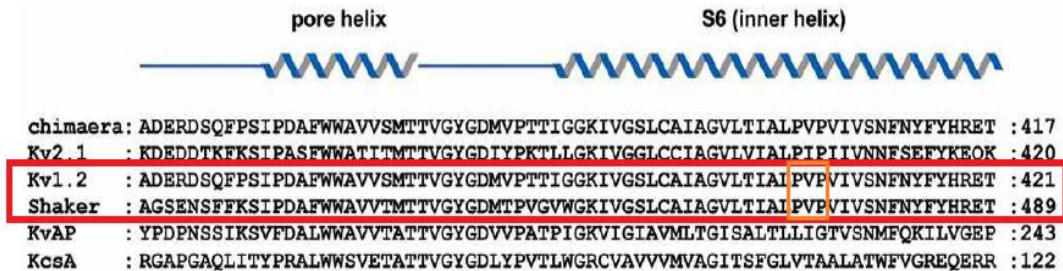
Donde  $\mathcal{V}(\mathbf{r}^N)$  es una función de energía del sistema de N partículas.

## Modelos moleculares

Se utilizó para los estudios el canal *Shaker* en su conformación abierta. El modelo molecular del canal *Shaker*-WT y *Shaker*-P475Q fue construido usando la estructura cristalográfica del canal Kv1.2 como templado (PDB ID: 2A79). Debido a que este canal aún no ha sido totalmente cristalizado, para ahorrar tiempo de trabajo se aisló solo el dominio que conforma el poro del canal. Por modelamiento comparativo, se pudo obtener los modelos sin arrojar problemas de computo pues ambos son muy similares en la región del poro (73% de identidad), permitiendo obtener un buen modelo.

El canal *Shaker*-WT había sido anteriormente tetramerizado por alineamiento estructural con respecto a cada uno de los monómeros del canal Kv1.2, en donde el poro fue alineado con respecto al eje Z y el filtro de selectividad por convención quedó orientado con respecto al eje Z positivo (Vergara, 2009). Los modelos fueron embebidos en una bicapa lipídica POPC (palmitoyl-oleyl-*sn*-phosphatidyl-choline) hidratada. Para construir el sistema de mutante sobre la misma estructura de WT se introdujo mutación en 475 del poro a través del *script* 01build\_modificado.tcl. Gracias a esto y al empleo de los *scripts* de extensión .tcl: 02combine, 03Water\_Box, 04borrador\_aguas\_membran, 06fixing\_atoms, más el uso del modo “Add Ions” de VMD, fue posible

construir y visualizar en VMD al canal *Shaker*, WT y P475Q, como un tetrámero, con toda su información estructural y de conectividad, instalándolo además en un ambiente que cumple con las condiciones propias referentes al estado energético del sistema en su estado natural, e integrado en una caja de condiciones periódica de borde (PCB) de dimensiones para *Shaker*-WT y P475Q, X~92.9 Å Y~ 93.6 Å, Z~ 87.7 Å. El modo “Add Ions” de VMD permitió agregar al sistema una concentración de sal KCl (0.2 M), para establecer el número y posición de iones K<sup>+</sup> dentro del filtro de selectividad (configuración 2,4), y la concentración de iones K<sup>+</sup> al exterior del poro.



**Fig. 6.** Alineamiento en región del poro y S6 de distintos canales de K<sup>+</sup>. La figura representa la similitud en aminoácidos que existe entre Kv1.2 y *Shaker*. Con cuadro rojo se encierran ambos canales con sus aminoácidos respectivos, y con cuadro naranja la región PVP en cuestión.

La conformación más estable para las cadenas laterales de los aminoácidos de ambos sistemas fue encontrada realizando 1000 pasos de dinámica utilizando el algoritmo de gradientes conjugados. Cada sistema fue equilibrado, utilizando el *ensamble* NPT (isotérmico -isobárico), en donde el número de partículas (N), la temperatura (T), y la presión (P) se mantienen constantes.

La DM fue realizada por un tiempo de 10 nanosegundos para *Shaker*, WT y P475Q, y sobre 1000 *frames* (etapas en la trayectoria) corridos en el software NAMD (NANoscale Molecular Dynamics), para observar las posiciones en el tiempo de los iones K<sup>+</sup> en el poro.

## Cálculo de HOLE

Este cálculo se realizó gracias a un *script* especial diseñado por Justin Gullingsrud, 2003, y modificado por Daniel Aguayo en el año 2007. Este *script* fue ejecutado en el software VMD para los modelos moleculares de *Shaker*, WT y P475Q, determinándose el radio máximo del poro iónico de *Shaker*, WT y P475Q en cada paso de la trayectoria de DM (*frame*), a lo largo del eje Z del canal. Los radios de los átomos localizados al interior y a la largo del canal corresponden a la superficie de van der Waals del campo de fuerza AMBER. Los planos de muestreo para evaluar las

dimensiones del poro fueron espaciados de manera uniforme cada 0,5 Å en dirección a lo largo de la coordenada de simetría del poro (eje Z). Se realizó un análisis estadístico de todos los *frames*, utilizando programación en Bash y el software OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

El cálculo de HOLE fue utilizado por primera vez para determinar el radio del poro de la gramidicina A (Smart y cols 1993) y se basa en la siguiente expresión.

Iterando en base a una esfera de radio R centrada en  $\mathbf{p}$ .

$$R(\mathbf{p}) = \min_{i=1}^{N_{\text{atom}}} [|\mathbf{x}_i - \mathbf{p}| - vdW_i]$$

La expresión representa la relación entre el radio R de una esfera dentro del poro con:  $\mathbf{p}$ ; vector centro de la esfera,  $\mathbf{x}_i$  vector de posición de un átomo particular i de radio de van der Waals:  $vdW_i$ , y  $N_{\text{atom}}$ : número total de átomos. Para encontrar el radio máximo de la esfera se buscan nuevas posiciones de  $\mathbf{p}$  a lo largo de todo el canal. Si el cambio del nuevo punto genera un incremento en el tamaño de la esfera entonces éste es aceptado.

Los datos permiten construir una gráfica de radio del poro v/s distancia a lo largo del eje del canal.

### Potencial Electroestático: Cálculo APBS

Las energías de interacción fueron calculadas en base al potencial electrostático por medio de la Ecuación de Poisson-Boltzmann, que da información sobre las propiedades electroestáticas del sistema, en este caso de la energía electroestática de unión entre un ión  $K^+$  y los canales *Shaker*, WT y P475Q.

La ecuación se puede escribir como:

$$-\nabla[\epsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = \rho_m(\mathbf{r}) + \rho_s(\mathbf{r})$$

Dónde:

$$\rho_s(\mathbf{r}) = \sum_i q_i n_i^0 e^{-q_i\phi(\mathbf{r})/kT}$$

$n_i^0$  es la densidad de iones en el seno de la solución,  $q_i$  es la carga del ión  $i$ ,  $\Phi(\mathbf{r})$  es el potencial electrostático en esa región del espacio,  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura.  $\rho_m(\mathbf{r})$  es la densidad de carga debida a las posiciones fijas de todas las cargas dentro del canal y  $\rho_s(\mathbf{r})$  es la densidad debida a la presencia de la sal (KCl) en el agua.

Para resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann, se emplea el software APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver), utilizando los archivos generados por el programa PDB2PQR que convierte archivos de extensión PDB a PQR, para incluir las cargas y radios de los átomos de *Shaker*, WT y P475Q.

## Densidad Iónica

El cálculo de densidad iónica fue realizado tanto para WT como para P475Q por VDM.

Para correr el cálculo fue necesario cargar los archivos de extensión .psf y .dcd de ambos canales, que informan conectividad y trayectoria respectivamente. El cálculo realizó mediciones a través del poro con respecto al eje Z, y a lo largo de un cilindro de radio 5 Å. Cada medición realizada a través del eje del poro fue llevada a cabo por capas de 1.5 Å de espesor. El script ejecutado en VMD permite calcular la razón: densidad local/densidad total, donde la densidad local y total están determinadas por:

$$\text{Densidad local} = \frac{\text{(Promedio de K+)}}{\text{Volumen de capa}}$$

$$\text{Densidad total} = \frac{\text{(Número total de cargas +)}}{\text{(Volumen de caja completa - Volumen de lípidos)}}$$



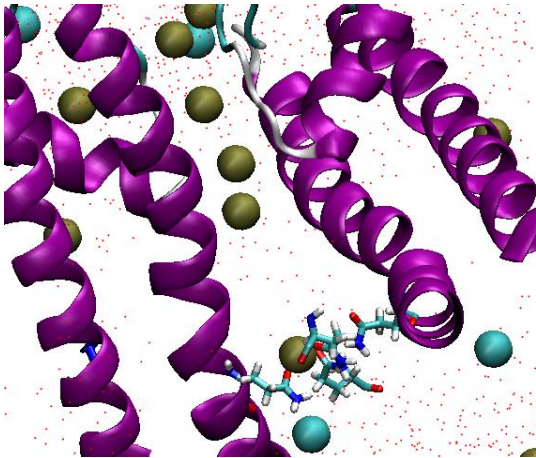
## RESULTADOS

### Dinámica Molecular (DM): Trayectorias de equilibrio

Una serie de etapas de trayectorias en equilibrio se pudieron componer obteniéndose una especie de “video” en donde se ven las posiciones de los iones  $K^+$  en un tiempo de 10 nanosegundos.

Por la DM se pudo obtener la trayectoria de equilibrio de *Shaker*, WT y P475Q, que permitieron seguir el movimiento de los iones  $K^+$  a través del poro. Por DM fue posible observar que para *Shaker*-P475Q hubo algunos *frames* (a diferencia de la dinámica del canal WT) que mostraron que en S6 los iones  $K^+$  interactuaban con el residuo 475 (Q) de cada subunidad. Los iones  $K^+$  se situaban cerca de las cadenas laterales del poro de Q para luego seguir su camino hacia la cara intracelular del sistema.

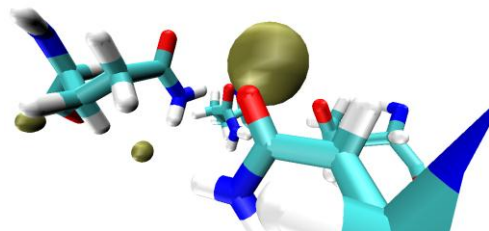
A



**Fig 7. Representación por VDM de uno de los *frames* de la trayectoria de equilibrio de *Shaker*-P475Q.**

A. Se visualiza la interacción entre los residuos Q y un ión  $K^+$ , y las cadenas A y C del canal (Coloring Method: Secondary Structure, Drawing Method: New Cartoon).

B



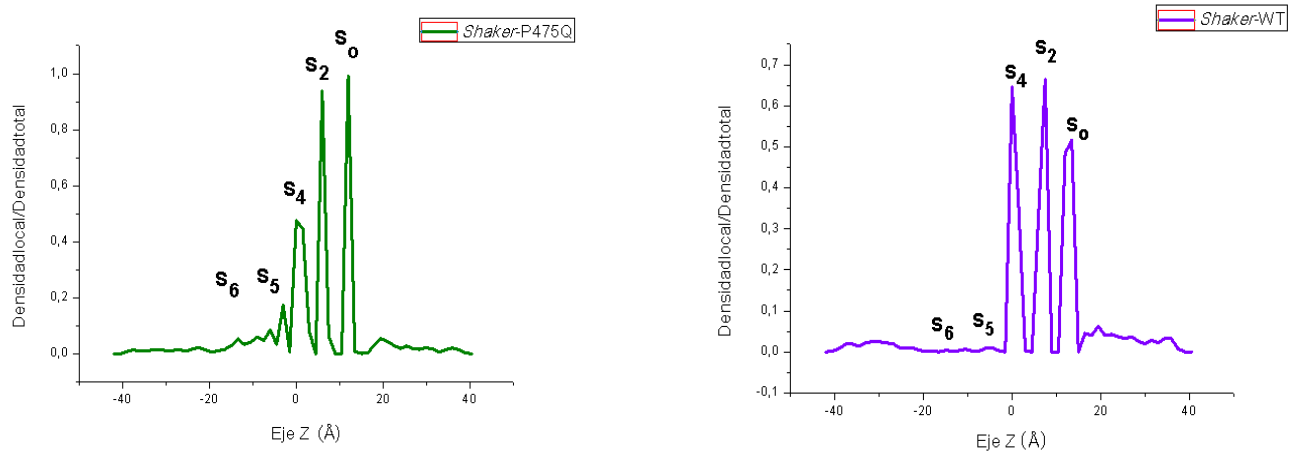
B. Un ión  $K^+$  (Drawing Method: VDW, Coloring Method: Name) interactuando en las con las cadenas laterales de glutamina (Q) del sitio 475. (Los oxígenos del grupo carbonilo son representados con color rojo, Drawing Method: Licorice, Coloring Method: Name)



## Densidad Iónica

Los datos obtenidos permitieron realizar una gráfica a lo largo del eje Z, observando los valores de alta densidad iónica como picos correspondientes a posiciones estables para el ión  $K^+$ . Se observa que los sitios  $s_0$ ,  $s_2$ , y  $s_4$  en *Shaker*-P475Q no mantienen valores constantes con respecto a los observados en *Shaker*-WT.

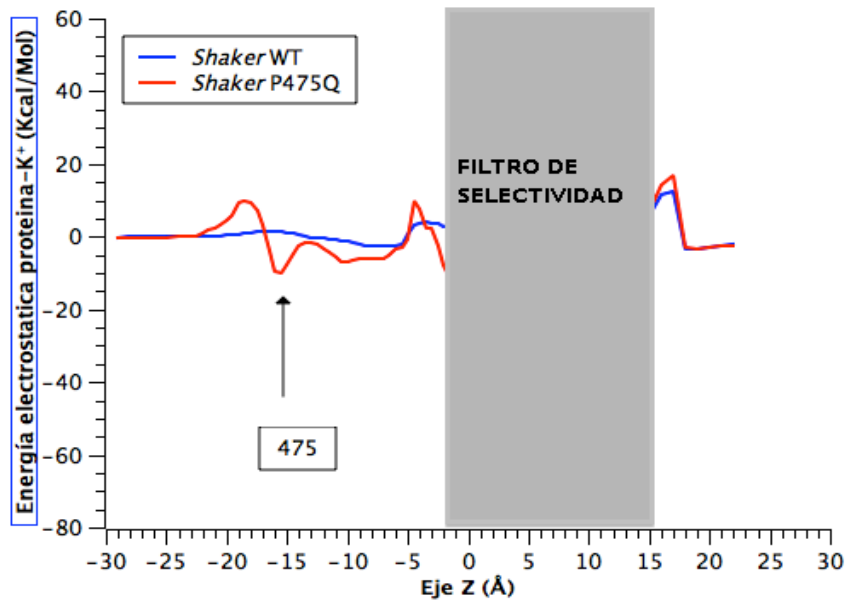
Además, en la región  $s_6$  de *Shaker*-P475Q, no hay un cambio visible con respecto a *Shaker*-WT. En ambos la concentración de iones  $K^+$  es casi nula, no pudiendo reportar una mayor ocupación del poro en aquella región.



**Fig. 8. Densidad iónica v/s Eje Z para *Shaker*, P475Q y WT.** Las posiciones  $s_0$ ,  $s_2$ , y  $s_4$  son representados como picos de alta densidad iónica y corresponden a posiciones de coordinación para un ion  $K^+$ . Comparando *Shaker*-P475Q y *Shaker*-WT no se observan cambios notables con respecto a la concentración iónica de la región  $s_6$ .

## APBS

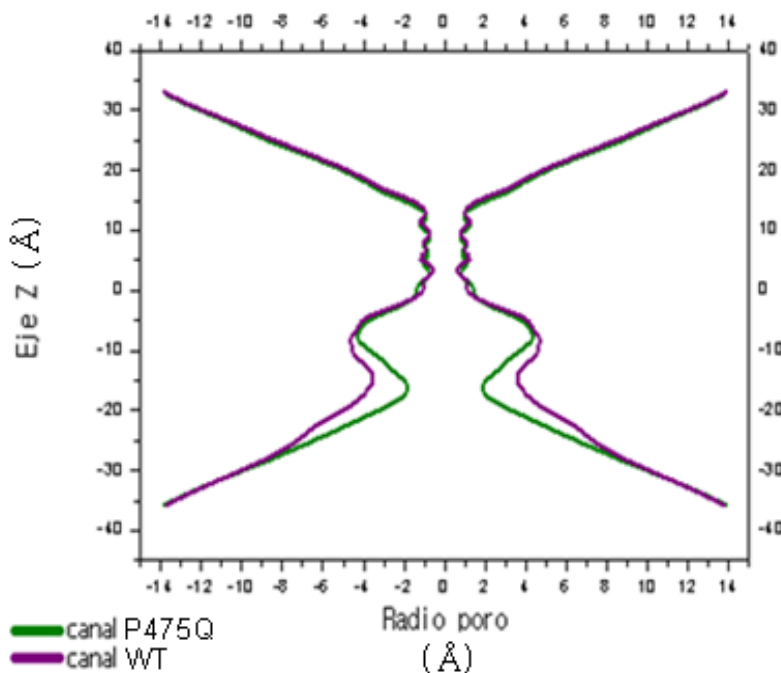
En el perfil de energía libre de unión calculada con APBS se muestra la energía electrostática de unión (Kcal/mol) entre un ión  $K^+$  y el canal *Shaker*, WT y P475Q, a lo largo de la coordenada de reacción Z. Según los resultados para *Shaker*-P475Q en el sitio 475 existe un cambio de energía libre de unión, con un valor de magnitud negativa y por debajo de *Shaker*-WT en la región  $s_6$  del canal. Mientras que para *Shaker*-WT en el sitio 475 la energía libre de unión es  $\sim$  a 0 Kcal/mol, se tiene que para *Shaker*-P475Q la energía libre alcanza su valor más bajo ( $\sim$  -10 Kcal/mol). Por ende, si se calcula  $\Delta\Delta G$  entre ambos canales, se tiene que este es  $\sim$  10 Kcal/mol. Esta disminución en el potencial electrostático haría que en el mutante P475Q exista una mayor interacción atractiva Q- $K^+$ , lo que se traduciría como un mayor favorecimiento al paso de iones  $K^+$  por el canal.



**Fig. 9. Energía electrostática de Unión v/s Eje Z.** La grafica muestra una disminución del potencial electrostático de unión entre *Shaker-P475Q* y un ión  $K^+$  en el sitio 475 de la proteína.

### CÁLCULO DE HOLE

Por HOLE, es posible confirmar que se produce una perturbación estructural en el poro cuando *Shaker* esta mutado en el residuo 475 por Q. En la región 475 se observa radios cercanos a 1.9 Å, mientras que para *Shaker-WT* en esta región se observan radios de aproximadamente 3,8 Å. Aunque el radio en S6 sea menor, este seguiría permitiendo el flujo de iones  $K^+$  ya que las dimensiones del poro siguen siendo más grandes que el tamaño de un ión  $K^+$



**Fig. 10. Radio poro v/s Eje Z.** El análisis por HOLE muestra la perturbación estructural del poro del canal *Shaker-P475Q* en donde el radio en la región S6 se reduce considerablemente.

## DISCUSIÓN

Se sabe que tan sólo por el cambio de un aminoácido en el residuo 475 del poro, el canal *Shaker*-P475Q se hace más conductor (~7 veces más) con respecto a *Shaker*-WT, en mismas condiciones de experimentación.

La función biológica de los sistemas biomoleculares esta íntimamente ligada a la estructura primaria química que estas poseen. Los canales *Shaker* poseen en su estructura primaria una secuencia de aminoácidos que determina la eficiencia con que el canal conduce iones. El aminoácido en el sitio 475, es un sitio sensible que viene a determinar la forma en que esta estructura supramolecular se dispone interaccionando consigo misma y con su entorno en el transporte de iones  $K^+$ . Así, los canales resultan ser microestructuras químicas sofisticadas muy interesantes de estudiar a nivel químico. Por esto, resultó fundamental realizar un estudio de la correlación entre la conductancia y la estructura química en el segmento S6 del poro del canal, comparándose los canales *Shaker*, WT y P475Q en base a los resultados obtenidos.

La trayectoria de DM y los cálculos realizados (cálculos de HOLE, potencial electroestático y densidad iónica) para *Shaker*, WT y P475Q, apuntaron a observar posibles cambios en la unión de los iones  $K^+$  dentro del canal, y con esto visualizar si existe unión de los iones  $K^+$  en un sitio adicional pre-existente (s6) que coincida con la posición del residuo 475, o proponer otra factor como causa para responder por qué el canal *Shaker*-P475 conduce iones más rápidamente que *Shaker*-WT.

Dentro de los parámetros que se tuvieron que establecer para la simulación del ambiente nativo del canal, se encontró: el número y posición de iones  $K^+$  dentro del poro. En VMD se utilizó una concentración determinada de sal KCl, para colocar los iones dentro del poro. Así se pudo observar cuales son las zonas que producen alta densidad de  $K^+$  en el poro, es decir sitios en donde los iones  $K^+$  son coordinados por los residuos de la proteína para su paso hacia dentro o fuera de la célula.

La trayectoria en equilibrio mostró las posiciones de los iones  $K^+$  dentro del poro para *Shaker*, WT y P475Q durante el tiempo de simulación. Al realizar la mutación de *Shaker* en el residuo 475, por simulación molecular se observó cambios en la trayectoria de equilibrio, conformación del poro (HOLE), y afinidad (APBS) por iones  $K^+$  en el mutante P475Q.

A través de un análisis con VMD los resultados de densidad iónica buscaron determinar en *Shaker-P475Q* una mayor ocupación en el poro del canal que permitiera explicar la más alta conducción en este mutante. De acuerdo a los datos obtenidos por densidad iónica para *Shaker-WT* y *Shaker-P475Q* (realizados bajo las mismas condiciones), no se puede explicar la mayor conductancia del canal *Shaker-P475Q* en razón a una mayor ocupación del poro sólo en la región S6, ya que en S6 existe una variación casi nula en la densidad iónica. Sin embargo, el efecto del cambio en la hidrofobicidad del poro si se pudo visualizar por DM, a través de la trayectoria de equilibrio, HOLE, y APBS de *Shaker-P475Q*.

Por la trayectoria en equilibrio de *Shaker-P475Q* fue posible observar una cierta cantidad de iones  $K^+$  que se posan cerca de grupos carbonilos de las cadenas laterales de  $Gln_{475}$  para interactuar con esta. La trayectoria en equilibrio mostró las posiciones en el tiempo para *Shaker*, WT y P475Q, en donde este último parecía coordinar el paso de ciertos iones  $K^+$  que se posicionaban cerca de las cadenas laterales del residuo  $Gln_{475}$  en algunos *frames*, a diferencia de *Shaker-WT*, en donde no se vio iones  $K^+$  posicionados cerca del residuo  $Pro_{475}$ . Puede resultar que la interacción  $Gln_{475}-K^+$  no sea reflejada en la densidad iónica, porque el tiempo de simulación no fue lo suficientemente largo considerando que los iones residen el poro centenas de nanosegundos. Además, ya que el sistema estuvo siempre estático con relación al transporte iones  $K^+$  (puesto que no se aplicó voltaje en el canal), no fue posible ver a aquellos iones  $K^+$  salir o entrar por el poro. En este sentido es importante destacar que lo que se observó en la densidad iónica no posibilita obtener alguna relación fiable entre la mayor conductancia del canal y los sitios de alta densidad iónica, ya que hablar de conductancia puede parecer un tanto difícil dentro de este contexto. Trabajos para *Shaker-P475Q* aplicando voltaje, podrían dar una mayor claridad de lo que en realidad esta sucediendo en el poro del mutante.

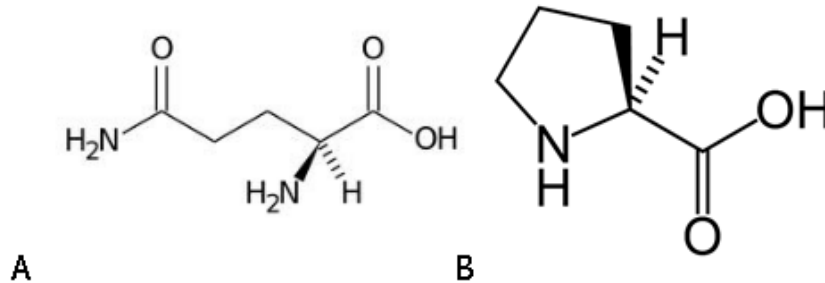
Por APBS se puede inferir que en *Shaker-P475Q* existe favorecimiento al paso de iones  $K^+$  por el canal en el sitio 475. Una mayor afinidad de los iones  $K^+$  a Q, podría resultar por la menor energía electrostática cerca del sitio 475 que refleja un menor trabajo que debe realizar el canal para traspasar iones  $K^+$  de un lado a otro de la membrana. Ya que  $\Delta G$  no es espontaneo cuando en el poro los iones  $K^+$  realizan interacciones de repulsión entre sí, los valores de  $\Delta G$  negativos en *Shaker-P475Q* podrían hacer que el proceso de conducción resulte más espontaneo y probable de suceder. Los residuos de Q podrían coordinar iones  $K^+$  haciendo favorable el transporte de iones  $K^+$  por el canal. Esta podría ser una de las causas de que *Shaker-P475Q* conduzca más rápidamente que *Shaker-WT*.

Por otro lado, para explicar por qué *Shaker*-P475Q conduce más, hay que tener en cuenta además que al remplazar a P por Q en el residuo 475, la “perturbación estructural” que produce la mutación en el poro, esta dada tanto por la presencia de Q; nuevo aminoácido de estructura atómica distinta a P y por ende poseedor de otras características y propiedades químicas, como por la ausencia de P. El aumento en la conducción unitaria del canal *Shaker* se debería entonces también al rol que cumple P en la formación de estructuras secundarias. Esto se puede entender si se analiza su estructura química, ya que se puede observar que este aminoácido, se trata de un anillo que se forma cuando el átomo de nitrógeno de la secuencia primaria se enlaza a la cadena lateral formando un ciclo de 5 carbonos. Por tratarse de un anillo, esta molécula se encuentra energéticamente tensionada, habiendo impedimento de giro e impedimento angular. La presencia del anillo impide el giro sobre ese enlace, y consecuentemente dirige la organización de la estructura secundaria de la proteína, formando una región bisagra. Al no poder establecer el ángulo característico de 104,5° grados, típica de los carbonos sp<sup>3</sup>, sucede un llamado “quiebre de cadena”, que se puede afectar fuertemente al proceso de apertura-cierre del canal. Como los residuos de P dirigen a las cadenas polipeptídicas a adoptar conformaciones específicas determinantes para la función de conducción de K<sup>+</sup>, cuando la secuencia P<sub>473</sub>V<sub>474</sub>P<sub>475</sub> es mutada en Pro<sub>475</sub> puede suceder una perturbación estructural que hace al poro cambiar de dimensiones.

La posibilidad de un cambio estructural causado por el cambio de P por Q en el sitio 475 se evaluó mediante el cálculo HOLE. Este cálculo reveló una disminución del volumen del poro en el canal P475Q. Este efecto podría ser explicado en base al papel ya descrito realizado por las cadenas laterales de los residuos de Q en el fenómeno de la conducción. Como los grupos carbonilos de las cadenas laterales se exponen al paso de los iones, interactúan más fuertemente con los iones K<sup>+</sup> (de radio 1,33 Å), estabilizando y coordinando su paso a través del canal, y disminuyendo por ende el radio del poro. Un radio del poro menor en S6 permitiría interacción con los iones K<sup>+</sup> para coordinar su paso por el canal.

En definitiva, pareciera ser que en el aumento de conductancia en el canal *Shaker*-P475Q, jugaría un rol fundamental la ausencia de un aminoácido como la P que posee la capacidad de cerrar el poro, y por ende forma una interacción hidrófoba en el canal cerrado. La presencia del residuo Q no juega un rol en la determinación de un estado abierto o cerrado, pero sí podría ser determinante para el paso de los iones K<sup>+</sup> por el poro ya abierto haciendo que el flujo sea más rápido.

Es posible que los cambios hayan sido mucho más considerables si se hubiese realizado la mutación reemplazando a P por E, un aminoácido que además de ser polar presenta carga neta negativa en su cadena lateral, al igual que el Aspartato (Asp ó D), residuo con el cual se han observado cambios aún mas sustanciales con respecto al aumento de afinidad de  $K^+$ -proteína, disminución de radio del poro, densidad iónica, y por ende de conducción unitaria.



**Fig. 11 Aminoácidos presente en el residuo 475 del poro de *Shaker-P475Q* y *Shaker-WT*.**

**A.** Estructura química de Q; aminoácido presente en la región S6 de *Shaker-P475Q* y otros canales de alta conducción iónica. Juega un rol importante en la estabilización de los iones  $K^+$  para su paso por el canal. Su cadena lateral, de carácter polar, por fuerzas dipolo-ión puede interaccionar con los iones  $K^+$  en el poro de *Shaker-P475Q*.

**B.** Estructura química de P, aminoácido apolar que juega un rol importante en el cierre de canal *Shaker* a través de un “quiebre” de cadena en S6, dándole a la vez carácter hidrófobo al sitio 475 del vestíbulo intracelular.

Los resultados de *Shaker-P475Q* son importantes ya que podrían explicar la alta conductancia en canales sin mutar. Pareciera ser que en realidad, en canales que son nativos y presentan una alta conducción unitaria la región PVP no está tan conservada. En varios de estos, existe un cambio fundamentalmente en  $P_{475}$ , que es reemplazada por el residuo E. Además, en aquellos que conservan la región PVP y presentan alta conducción, existen aminoácidos polares con carga como E o D en las posiciones cercanas y posteriores a la región PVP, intercaladas por 2 residuos de carácter apolar, probablemente para evitar la repulsión electrostática entre las cadenas laterales cargadas. Es posible que si un canal conduce más, es porque en realidad tiene otros aminoácidos equivalentes a la región PVP, ó estos están cercanos a esta, reduciéndose la hidrofobicidad de la región S6. Estudios realizados con *Shaker-P475E* podrían dar una mejor noción de los factores que determinan la alta conducción de algunos canales.

## CONCLUSIÓN

La Dinámica Molecular permitió modelar e imitar el comportamiento molecular de *Shaker*, WT y P475Q. A través de la simulación en equilibrio se pudo observar a nivel atómico lo que sucede en el poro de *Shaker*, WT y P475Q, permitiendo analizar desde un punto de vista químico al fenómeno de la conducción de los iones  $K^+$  en donde el cambio en S6 de un aminoácido de cadena lateral apolar por otro de carácter polar pudo reflejar cambios en el comportamiento de *Shaker*-P475Q con respecto a *Shaker*-WT. Los resultados de densidad iónica no permitieron inferir que el aumento en conducción de *Shaker*-P475Q se debería a un nuevo sitio de unión a  $K^+$  en S6, o a una mayor ocupación del poro en esta región. Sin embargo los demás cálculos realizados sugieren que una de las causas en el incremento de la conducción unitaria de *Shaker*-P475Q se debería a la presencia de Q en el sitio 475, el que reduce la hidrofobicidad en la cavidad interna del poro, y cambia sus dimensiones. La disminución de  $\Delta G$  en el proceso de conducción iónica., favorecería la mayor interacción entre las cadenas laterales de Q y los iones  $K^+$ , coordinando el flujo de iones  $K^+$  en la región S6. La DM permitió obtener una idea global del comportamiento de los iones  $K^+$  en la compuerta de acceso iónico, ofreciendo una noción para el entendimiento del papel de la región S6 y la secuencia PVP en la alta conducción iónica de otros canales  $K^+$  en estado nativo y en condiciones de experimentación similares a *Shaker*.

## REFERENCIAS

Roderick MacKinnon (1991). The determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 235.

Declan A. Doyle, Joao Morais-Cabral, Richard A. Pfuetzner, Anling Kuo, Jacqueline M. Gulbis, Steven L. Cohen, Brian T. Chait, Roderick MacKinnon (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-76

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T y cols. (1994) . *Biophys J*; 66: 1061-1067

Yufeng Zhou, Joao H. Morais-Cabral, Amelia Kaufman & Roderick MacKinnon (2001), Chemistry of ion coordination and hydration revealed by K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution, *Nature* 414, 43-48

Thompson & Begenisich (2003), Functional identification of ion binding sites at the internal end of the pore in *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Journal of Physiology* 541, 118.

Ariela P. Vergara (2009). Propiedades estructurales y electrostáticas en la vía de conducción del canal de potasio (K<sup>+</sup>) *Shaker* y los mutantes P475D y P475Q. Tesis de Ingeniero Informático, Facultad de Ingeniería, Universidad de Talca. 22-26, 63.

Oliver S. Smart, Julia M. Goodfellow, and B. A. Wallace (1993). The Pore Dimensions of Gramicidin A. *Biophysical Journal* 65, 2456

Manana Sukhareva, David H. Hackos, Kenton J. Swartz (2003), Constitutive Activation of the *Shaker* Kv Channel , Octubre 13, *JGP* vol. 122, n5, 541-550



## ANEXOS

### Algunas propiedades físicas y químicas de la Glutamina y Prolina

Aminoácido	Glutamina	Prolina
Nombre IUPAC	Ácido 2-amino-4-carbamoilbutanoico	Ácido 2-pirrolidincarboxílico
Abreviación	Q, Gln	P, Pro
Fórmula Molecular	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Masa Molecular (g/mol)	146.14	115.13
Índice de Hidrofobicidad*	-3.5	1.6
Punto Isoeléctrico(pI)	5.65	6.3
Acidez (pKa)	2.18, 9.00	1.95, 10.47

Valores en el SI a 0 °C y 1 atm

\*Tomado de Kyte, J. and Doolittle R. F (1982). A simple method for displaying the hidropathic character of a protein *J. Mol. Biol*, 157:105-132.

CRC Handbook of Chemistry and Physics(2003). Editor-in-Chief David R. Lide, Former Director, Standard Reference Data, National Institute of Standards and Technology

## ANEXOS TCL

### Script para realizar mutación en el sitio 475

```
package require psfgen
topology top_all36_lipid.rtf
topology top_all27_prot_na.rtf
pdbalias residue HIS HSE
pdbalias atom ILE CD1 CD

mol load pdb shaker_wt.pdb

set chainA [atomselect top "chain A"]
$chainA writepdb A.pdb
segment A {first NTER; last CTER; pdb A.pdb; mutate 475 GLN}
coordpdb A.pdb A

set chainB [atomselect top "chain B"]
$chainB writepdb B.pdb
segment B {first NTER; last CTER; pdb B.pdb; mutate 475 GLN}
coordpdb B.pdb B

set chainC [atomselect top "chain C"]
$chainC writepdb C.pdb
segment C {first NTER; last CTER; pdb C.pdb; mutate 475 GLN}
coordpdb C.pdb C

set chainD [atomselect top "chain D"]
$chainD writepdb D.pdb
segment D {first NTER; last CTER; pdb D.pdb; mutate 475 GLN}
coordpdb D.pdb D

segment IONS {pdb IONS_CENTRADO1.pdb;}
```

```
coordpdb IONS_CENTRADO1.pdb IONS

segment SOLV {pdb SOLV_CENTRADO2.pdb;}
coordpdb SOLV_CENTRADO2.pdb SOLV

guesscoord
writepdb shaker_wt01.pdb
writepsf shaker_wt01.psf

mol load psf shaker_wt01.psf pdb shaker_wt01.pdb
```

### **Script 02combine.tcl para embeber proteína en la membrana lipídica**

```
#!/usr/local/bin/vmd -dispdev text

# embed (parts of) protein into a membrane
# Ilya Balabin (ilya@ks.uiuc.edu), 2002-2003
#
# You need: a) membrane structure (membrane.psf/pdb);
# b) properly oriented and aligned to the membrane
# protein structure (protein.psf/pdb)

# set echo on for debugging
echo on

# need psfgen module and topology
package require psfgen
topology top_all36_lipid.rtf
topology top_all27_prot_na.rtf

# load structures
```

```

resetpsf
readpsf membrane.psf
coordpdb membrana_centrada.pdb
readpsf shaker_wt01.psf
coordpdb shaker_wt01.pdb

# can delete some protein segments; list them in brackets on next line
set pseg2del { }
foreach seg $pseg2del {
    delatom $seg
}

# write temporary structure
set temp "temp"
writepsf $temp.psf
writepdb $temp.pdb

# reload full structure (do NOT resetpsf!)
mol load psf $temp.psf pdb $temp.pdb

# select and delete lipids that overlap protein:
# any atom to any atom distance under 0.8A
# (alternative: heavy atom to heavy atom distance under 1.3A)
set sellip [atomselect top "resname POPC"]
set lseglist [lsort -unique [$sellip get segid]]
foreach lseg $lseglist {
    # find lipid backbone atoms
    set selover [atomselect top "segid $lseg and within 0.8 of protein"]
    # delete these residues
    set resover [lsort -unique [$selover get resid]]
    foreach res $resover {
        delatom $lseg $res
    }
}
}

```

```

# delete lipids that stick into gaps in protein
foreach res { } {delatom $LIP1 $res}
foreach res { } {delatom $LIP2 $res}

# delete lipids that fall out of the PBC box
# the following numbers are for example only; yours are different!
set xmin -50
set xmax 50
set ymin -50
set ymax 50
foreach lseg {"LIP1" "LIP2"} {
  # find lipid backbone atoms
  set selover [atomselect top "segid $lseg and (x<$xmin or x>$xmax or
y<$ymin or y>$ymax)"]
  # delete these residues
  set resover [lsort -unique [$selover get resid]]
  foreach res $resover {
    delatom $lseg $res
  }
}

# write full structure
writepsf shaker_membrane.psf
writepdb shaker_membrane.pdb

# clean up
file delete $temp.psf
file delete $temp.pdb
file delete A.pdb
file delete B.pdb
file delete C.pdb
file delete D.pdb

# non-interactive script
mol load psf shaker_membrane.psf pdb shaker_membrane.pdb

```

## Script Water.box.tcl para colocar caja de agua al sistema

```
resetpsf
# solvate 1.1 has a bug, either 1.1.1 (downloaded) or 1.2 will work
package require solvate

solvate shaker_membrane.psf shaker_membrane.pdb -o solvate_shaker -s WT -
b 2.4 -t 0 -z 15 +z 15

#Se elimina todo y se cargan los archivos generados

mol delete all
mol load psf solvate_shaker.psf pdb solvate_shaker.pdb
```

## Script 04borrador\_aguas\_membran.tcl para borrar moléculas de agua ubicadas entre la proteína y membrana

```
resetpsf
mol load psf solvate_shaker.psf pdb solvate_shaker.pdb

set del [atomselect top "water and (z<23 and z>-23) and not ( (x < 10 and
x > -10) and (y < 10 and y > -10) and (z<23 and z>-23))"]

package require psfgen
readpsf solvate_shaker.psf
coordpdb solvate_shaker.pdb

foreach seg [$del get segname] res [$del get resid] {
    delatom $seg $res
}

writepsf shaker_agua_shaker.psf
writepdb shaker_agua_shaker.pdb
```

```
mol load psf shaker_agua_shaker.psf shaker_agua_shaker.pdb
```

### **Script 06Fixing\_Atoms para volver a fijar los átomos ante posibles movimientos**

```
set all [atomselect top all]
$all set beta 0
set to_fix [atomselect top "name CA and not (resid 441 to 447)"]
$to_fix set beta 0.5
$all writepdb Restrain.pdb
```

### **Equil para obtener trayectoria por NAMD**

```
pairlistdist 13.5
```

#### **# Integrator Parameters**

```
timestep 2 ;# 1fs/step (2)
```

```
rigidBonds all ;# needed for 1fs steps (2)
```

```
nonbondedFreq 1
```

```
fullElectFrequency 1
```

```
stepspercycle 20
```

```
cellBasisVector1 92.91 00.00 00.00 #dimension en X
```

```
cellBasisVector2 00.00 93.59 00.00 #dimension en Y
```

```
cellBasisVector3 00.00 00.00 87.73 #dimension en Z
```

```
cellOrigin 00.00 00.00 00.00 #CENTRO DEL SISTEMA
```

```
Pme on
```

```
PmeGridsizeX 94
```

```
PmeGridsizeY 96
```

```
PmeGridsizeZ 90
```

```
useGroupPressure    yes    # smaller fluctuations
useFlexibleCell     yes    # allow dimensions to fluctuate independently
useConstantRatio    no     # fix shape in x-y plane
```

```
margin 4
```

```
wrapAll            on
```

```
#Output
```

```
binaryoutput       no
outputEnergies     100
outputTiming       1000
xstFreq            1000
dcdFreq            5000
restartfreq        1000
```

```
langevin           on
langevinDamping    0.1
langevinTemp       300
langevinHydrogen   no
```

```
langevinPiston     on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100.0
langevinPistonDecay 50.0
langevinPistonTemp 300
```

```
#####
```

```
if {0} {
fixedAtoms         on
fixedAtomsFile     Fix.pdb
```



```
fixedAtomsCol B
```

```
}
```

```
if {1}{
```

```
constraints      on
```

```
consRef          Restrain.pdb
```

```
consKFile        Restrain.pdb
```

```
consKCol         B
```

```
}
```

```
minimize         1000
```

```
run 5000000
```

### Script Densidad Iónica

```
#####
```

```
#OBTENIENDO PARAMETROS
```

```
#####
```

```
#mol load psf ionized.psf pdb ionized.pdb
```

```
#mol addfile Equil_efield_II.dcd type dcd step 5 waitfor -1
```

```
#OBTENIENDO CANTIDAD DE FRAMES
```

```
set n_frames [molinfo top get numframes]
```

```
#OBTENIENDO EJE A MUESTREAR
```

```
#z
```

```
puts "Ingrese el eje a muestrear: "
```

```
set axis [gets stdin]
```

```
while { $axis != "x" && $axis != "y" && $axis != "z" } {
```

```
    puts "El eje debe ser 'x', 'y' o 'z'"
```

```
    puts "Ingrese el eje a muestrear: "
```

```
    set axis [gets stdin]
```

```
}
```

```
#OBTENIENDO ESPESOR DE CAPA
```

```

#espesor =1
puts "Ingrese el espesor de cada capa: "
set thick_layer [gets stdin]
while { $thick_layer <= 0 } {
    puts "El espesor debe ser mayor que cero"
    puts "Ingrese el espesor de cada capa: "
    set thick_layer [gets stdin]
}
#OBTENIENDO RADIO DE CAPA
#radio 4
puts "Ingrese el radio para cada capa: "
gets stdin radius_layer
while { $radius_layer <= 0 } {
    puts "El radio debe ser mayor que cero!"
    puts "Ingrese el radio para cada capa: "
    gets stdin radius_layer
}
#OBTENIENDO INTERVALO DEL CALCULO
puts "Ingrese coordenada $axis inferior: "
gets stdin min
puts "Ingrese coordenada $axis superior: "
gets stdin max
while { [expr $max - $min] <= 0 } {
    puts "Parametros incorrectos!"
    puts "Ingrese coordenada $axis inferior: "
    gets stdin min
    puts "Ingrese coordenada $axis superior: "
    gets stdin max
}

#OBTENIENDO EL VOLUMEN DE LA CAJA
puts "Ingrese el volumen de la caja (en A^3): "
gets stdin v_box
while { $v_box <= 0 } {
    puts "volumen incorrecto..."
}

```

```

    puts "Ingrese el volÃ³men de la caja (en A^3): "
    gets stdin v_box
}
#####
#CALCULANDO OTROS PARAMETROS
#####
#CALCULANDO LOS OTROS DOS EJES, PARA EL CALCULO DE DISTANCIAS
set axis_a x
set axis_b y
if { $axis == "x" } {
    set axis_a z
} else {
    if { $axis == "y" } {
        set axis_b z
    }
}
#CALCULANDO EL VOLUMEN DE LAS CAPAS
set PI [expr 2*asin(1.0)]
set v_layer [expr $PI * pow($radius_layer, 2) * $thick_layer]
puts "El volumen de cada capa es de $v_layer A^3"
#CALCULANDO LA CANTIDAD DE CAPAS
set n_layers [ expr round(($max - $min) / $thick_layer) ]
puts "Se calcularÃ¡n $n_layers capas..."
#INICIALIZANDO LOS CONTADORES PARA CANTIDAD DE IONES POR CAPA
for { set i 0 } { $i <= $n_layers } { incr i } {
    set n_ions_inside($i) 0
    set n_ions_outside($i) 0
}
#CALCULANDO LA DENSIDAD DE IONES EN LA CAJA
set num_pot [[atomselect top "resname POT or resname MG" frame 0] num]
#densidad de iones POT y MG totales en la caja
set density [expr 1.0 * $num_pot / $v_box]
#####
#COMENZANDO LAS ITERACIONES
#####
for { set i 0 } { $i < $n_frames } { incr i } {

```

```

puts "Iteracion $i"
#SELECCIONANDO LOS IONES QUE SE CONTARAN
#solo selecciona potasio
    set ions [atomselect top "name POT and same residue as $axis <=
$amax and $axis >=$amin" frame $i]
#CREANDO LISTA DE COORDENADAS DE LOS IONES
    set l_axis [$ions get $axis]
    set l_axis_a [$ions get $axis_a]
    set l_axis_b [$ions get $axis_b]
#LIBERANDO MEMORIA
    unset ions
#Toma las coordenadas de cada ion de la seleccion
    foreach coor $l_axis coor_a $l_axis_a coor_b $l_axis_b {
#Calcula la distancia al eje de muestreo
        set distance_to_axis [ expr sqrt( pow($coor_a, 2) + pow($coor_b, 2) )
]
#Calcula la capa en la que se encuentra
        set layer [expr int(floor(($coor - $amin) / $thick_layer)) ]
#Pregunta si está; dentro de alguna capa
        if { $distance_to_axis <= $radius_layer } {

#Se incrementa el contador que corresponda
            incr n_ions_inside($layer) 1
        } else {
            incr n_ions_outside($layer) 1
        }
    }
}
#####
#PROCESANDO LOS VALORES DE CONTADORES
#####
#CALCULO DE CANTIDAD DE IONES ESPERADA EN CADA CAPA, densidad total por
el volumen de la capa = iones que deben haber en una capa
set n_ions_ref [expr $density * $v_layer]
for { set i 0 } { $i <= $n_layers } { incr i } {

```

```

#CALCULO DE LA CANTIDAD DE IONES PROMEDIO EN LA CAPA i
    set n_ions_inside($i) [expr 1.0 * $n_ions_inside($i) / $n_frames]
    set n_ions_outside($i) [expr 1.0 * $n_ions_outside($i) / $n_frames]
#CALCULO DE LA DENSIDAD DE IONES EN CADA CAPA, numero de iones promedio
que hay en una capa dividido por el volumen capa= densidad x #capa
    set DENSITY($i) [expr 1.0 * $n_ions_inside($i) / $v_layer]
#CALCULO DE LA RAZON ENTRE DENSIDAD LOCAL Y DENSIDAD TOTAL
    set G($i) [expr 1.0 * $n_ions_inside($i) / $n_ions_ref]

#no sera mejor calcular el numero de iones por capa
#NUMERO DE CARGAS TOTALES
# (numero cargas + en una capa /volumen capa) / (numero cargas + /volumen
total-lipidos) =denlocal /dentotal
    set RATIO($i) [expr 1.0 * (($n_ions_inside($i) / $v_layer ) /
$density )]

}
#####
#SALIDA DE RESULTADOS
#####
#PIDIENDO NOMBRE DE ARCHIVO DE SALIDA
puts "Ingrese un nombre de archivo para escribir los resultados: "
gets stdin filename
#OBTENIENDO TIPOS Y NOMBRES DE ARCHIVOS
set l_types [molinfo top get filetype]
set l_files [molinfo top get filename]
set f [open $filename w]
puts $f "Resultados Calculo Densidad Local / Densidad Total"
puts -nonewline $f "Tipos de archivo cargados: "
foreach type $l_types {
    puts $f "$type"
}
puts $f "Archivos cargados:\n"
foreach file $l_files {
    puts $f "$file"
}

```

```

}
puts $f "\nframes analizados           : $n_frames"
puts $f "Eje de muestreo                 : $axis"
puts $f "Espesor de capa                  : $thick_layer"
puts $f "Radio de capa                     : $radius_layer"
puts $f "Volumen de cada capa              : $v_layer Angstrom cÃ°bicos\n"
puts $f "VolÃ°men Total de la caja : $v_box Angstrom cÃ°bicos"
puts $f "Cantidad Total de iones           : $num_pot"
puts $f "Densidad Total en la caja : $density iones / A^3"
puts $f "Cantidad de iones esperada : $n_ions_ref"
puts $f ""
puts $f "capa desde hasta iones Densidad Local G"
puts $f ""
for { set i 0 } { $i < $n_layers } { incr i } {
    set desde [expr $i * $thick_layer + $min]
    set hasta [expr ($i + 1) * $thick_layer + $min]
    set j [expr $i + 1]
    puts $f "$j $desde $hasta $n_ions_inside($i) $DENSITY($i)
$RATIO($i)"
}
close $f

```