



Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática

---

# Induciendo eventos de disociación en complejos proteína-proteína

---

Francisca Salas Sepúlveda  
Profesores Guía: Dr. Horacio Poblete y Dr. David Naranjo.  
Profesora Informante: Dra. Janin Riedelsberger

Enero, 2023  
Proyecto de Memoria de Título  
Semestre 2-2022

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

# Índice

<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
<b>2. Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
4.1. Ensamble sistema Kv1.2/CTX	16
4.2. Protocolo y ejecución de simulaciones de dinámicas moleculares	17
4.2.1. Preparación del protocolo de constraints durante equilibrado del complejo Shaker/CTX	18
4.2.2. Variables colectivas para equilibrar el complejo Shaker/CTX	19
4.2.3. Campo eléctrico externo y dinámicas de producción	20
4.3. Análisis y evaluación de cálculos de simulación de dinámicas moleculares	21
4.3.1. Caracterización interacciones toxina-canal	21
4.3.2. Análisis estados de transición	22
4.3.3. Modelado de rutas de disociación	23
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>25</b>
5.1. Ensamble de los sistemas, equilibrado y aplicación de potencial eléctrico.	25
5.1.1. Evaluación estructural del ensamble del sistema	25
5.2. Análisis comparativo de los sistemas utilizando distintos voltajes	26
5.2.1. Dinámicas moleculares utilizando 0.5 y 1 V	26
5.2.2. Aplicación de voltajes cercanos a 2V	28
5.2.3. Despegue de caribdotoxina desde el poro del canal	30
5.2.3.1. Distancias entre pares críticos versus el voltaje	32
5.3. Transiciones, cálculos de energía e interacciones que determinan el bloqueo	33
5.3.1. Cálculo de energía para 0.5 y 1V	35
5.4. Eventos de permeación	37
5.5. Modelado ruta de disociación	41
<b>6. Conclusiones y proyecciones</b>	<b>45</b>
<b>Referencias</b>	<b>47</b>
<b>Anexos</b>	<b>53</b>

# Índice de figuras

Figura 1: Representación de la cantidad de artículos publicados entre los años 2008-2020 referentes a las búsquedas.	7
Figura 2: Tipos de inhibición toxina-canal.	8
Figura 3: (A) Estructura caribdotoxina (CTX).	10
Figura 4: (A) Vista frontal y (B) superior del complejo CTX/Kv1.2.	11
Figura 5: Bloqueo CTX/Shaker.	12
Figura 6: Residuos aminoácidos que forman parte de CTX e interactúan en la superficie del canal.	13
Figura 7: Sistema de estudio en membrana lipídica.	14
Figura 8: Esquema general de la metodología a utilizar para el desarrollo del proyecto.	16
Figura 9: Funciones y variables descritas para el cálculo de energía potencial utilizadas por modelos de campos de fuerza	17
Figura 10: Protocolo de minimización y equilibrado utilizado para el sistema Shaker/CTX.	19
Figura 11: Esquema contacto.	22
Figura 12: (A) Esquema para recopilar y transformar información siguiendo principios de cadenas de Markov. (B) Esquema que representa posibles rutas de disociación.	24
Figura 13: Sistema ensamblado.	25
Figura 14: Gráfico RMSD versus tiempo de equilibrado (~60 ns).	26
Figura 15: Análisis estructural de caribdotoxina aplicando 0, 0.5 y 1 volt.	28
Figura 16: Análisis estructural de caribdotoxina aplicando 1.2 y 1.3 V.	30
Figura 17: Comportamiento pares críticos en unión del complejo a voltajes: 0 (Control), 0.5, 1, 1.2 y 1.3 V.	31
Figura 18: Distancias entre residuos críticos en CTX y su respectivo par en Shaker en distintas condiciones de voltaje.	33
Figura 19: Heatmap de las transiciones entre contacto y desacople de pares.	34
Figura 20: Residuos críticos en caribdotoxina que podrían ser determinantes en el proceso de disociación.	36
Figura 21: Desocupación del sitio S1.	38
Figura 22: Eventos de permeación en distintas condiciones de voltaje.	39
Figura 23: Efecto de caribdotoxina sobre eventos de permeación por microsegundo.	40
Figura 24: Comparación de réplicas a 1 V con diferente concentración de KCl (normalizado por microsegundo).	41
Figura 25: Probabilidades para adoptar cada uno de los microestados a 0.5 V.	43
Figura 26: Probabilidades para adoptar cada uno de los microestados a 1 V.	44

# Índice de Tablas

Tabla 1: Distancias reportadas para cada par de aminoácidos (en código de una letra) que interactúan en la interfaz toxina-canal, extraídas desde el cristal PDB ID: 4JTA.	20
Tabla 2: Umbral calculado para cada par.	34
Tabla 3: Cálculo de energía para 0.5 y 1 V basado en probabilidades.	35
Tabla 4: Número de eventos de permeación por condición de voltaje con su respectiva duración de simulación y promedio.	39
Tabla 5: Microestados de las trayectorias a 0.5 y 1 V.	42
Tabla Anexo 1: Matriz de conteo de transiciones para 0.5 V.	53
Tabla Anexo 2: Matriz de conteo de transiciones para 1 V.	56

# Abstract

The association or binding events of protein-protein complexes have been extensively studied, which, in part, reflects the relevance of this type of events in vital processes and functions at the cellular level. Despite the above, research on the dissociation or unbinding events of protein-protein complexes, of as much biological relevance as their association, is limited. This is not due to a lack of interest in these events, but to the intrinsic difficulty of studying the dissociation of systems as large as protein-protein complexes; these are events that occur in the order of microseconds or even years.

The high computational cost of in silico analysis of protein-protein complexes has revealed the need to develop and/or use unconventional molecular dynamics methods for their study, for example, the use of smaller ligands such as drugs or toxins. In particular, charybdotoxin (CTX) corresponds to a toxin of peptide origin synthesized by *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, which has as its molecular target the potassium channels (of important role in the excitability of the nervous system) causing the occlusion of the pore of these channels. This property has been widely used to model and study voltage-dependent potassium channels. Rich in alkaline residues, CTX occludes the channel pore through attractive electrostatic interactions with residues located in the extracellular portion of the membrane protein. It has also been determined that its action is dependent on both voltage and internal and external K<sup>+</sup> concentration. In addition to the above, a "simple" interaction model has been proposed: Shaker/CTX, because their coupling does not lead to conformational changes or induced binding and, therefore, from the analysis of the interaction surfaces between the two it would be possible to model dissociation phenomena.

Consequently, it is proposed for this work to analyze the protein-protein dissociation events induced by the application of electric potential, in order to observe and quantify the transition states that precede the dissociation events and the energetic contribution of each of the interacting pairs at the interface of the toxin-channel complex, by means of the Shaker/CTX system.

## Resumen

Los eventos de asociación o *binding* de complejos proteína-proteína han sido y son ampliamente estudiados lo que, en parte, refleja la relevancia de este tipo de sucesos en procesos y funciones vitales a nivel celular. A pesar de lo anterior, las investigaciones sobre eventos de disociación o *unbinding* de complejos proteína-proteína, de tanta relevancia biológica como su asociación, son escasas. Esto no ocurre debido a la falta de interés que podría existir referente a estos eventos, más bien es consecuencia de la dificultad intrínseca de estudiar la disociación de sistemas tan grandes como los complejos proteína-proteína; son sucesos que ocurren en el orden de los microsegundos e incluso años.

El alto costo computacional que genera el análisis *in silico* de complejos proteína-proteína ha dejado al descubierto la necesidad de plantear y/o utilizar métodos no convencionales de dinámica molecular para su estudio como, por ejemplo, el uso de ligandos más pequeños como drogas o toxinas. En particular, caribdotoxina (CTX) corresponde a una toxina de origen peptídico sintetizada por *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, que tiene como blanco molecular canales de potasio (de importante rol en la excitabilidad del sistema nervioso) provocando la oclusión del poro de estos canales. A su vez, esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para modelar y estudiar canales de potasio dependientes de voltaje. Rica en residuos alcalinos, CTX ocluye el poro del canal mediante interacciones electrostáticas atractivas con residuos que se ubican en la porción extracelular de la proteína de membrana. Se ha determinado además, que su acción es dependiente tanto del voltaje como de la concentración interna y externa de K<sup>+</sup>. Sumado a lo anterior, se ha propuesto un modelo de interacción "simple": *Shaker/CTX*, considerado como tal, ya que, su acople no conduce a cambios conformacionales ni encaje inducido y, por ende, a partir del análisis de las superficies de interacción entre ambos sería posible modelar fenómenos de disociación.

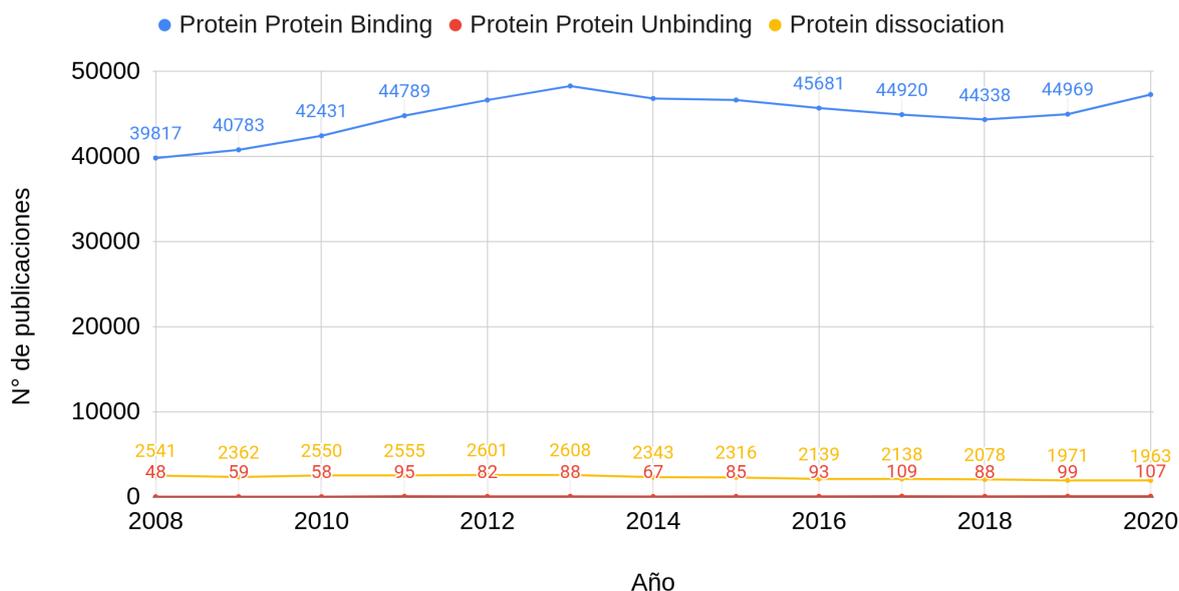
En consecuencia, se propone para este trabajo, realizar análisis de eventos de disociación proteína-proteína inducidos por la aplicación de potencial eléctrico, con tal de observar y cuantificar los estados de transición que anteceden a los eventos de disociación y la contribución energética de cada uno de los pares interactuantes en la interfaz del complejo toxina-canal, mediante el sistema *Shaker/CTX*.

# 1. Introducción

Parte de la funcionalidad de una proteína se materializa a través de interacciones con otras, mediante las denominadas interacciones proteína-proteína. Comúnmente son entendidas como contactos físicos entre estas maquinarias biológicas. Sin embargo, también debe ser una interacción funcional originada por una fuerza y/o evento biomolecular específico (De Las Rivas & Fontanillo, 2010). Las interacciones proteína-proteína están involucradas en una gran cantidad de procesos y funciones celulares como son: recepción de hormonas, inhibición de proteasas, complejos anticuerpos-antígenos, regulación de genes y también, en la formación de grandes complejos biomoleculares (Seychell, 2021). En algunos casos es tan importante el establecimiento de este tipo de interacciones, que la interrupción de eventos de formación o acople de complejos proteína-proteína podría significar pérdidas de tipo estructural y también, pérdidas funcionales. Considerando lo anterior, el estudio de las interacciones proteína-proteína señala Weisel (2003), es necesario para la comprensión de los procesos celulares ya mencionados y otras características y funciones fisiológicas vitales.

La mayor parte de las investigaciones (Figura 1) se ha situado en los eventos que preceden la formación de complejos proteína-proteína o en la predicción de las mejores conformaciones de una droga en un sitio de interés a partir de la afinidad de unión, como señalan Moldenhauer et al. (2019) y Tiwary et al. (2015), respectivamente. Esta situación, se contrapone a lo que ocurre con la disociación de los complejos proteína-proteína y tampoco refleja la relevancia de este tipo de eventos; en la biología estructural y biocatálisis, el estudio de la termodinámica y cinética de la unión y disociación puede ser muy importante para obtener un entendimiento más profundo de procesos biológicos de interés (Marques et al., 2019). Más aún, entender la cinética de desacople de sistemas proteína-ligando contribuiría, además, a mejorar el diseño de ligandos con deseada especificidad y seguridad (Zhou et al., 2019).

Ahora bien, las razones de la escasa información que se tiene respecto de los eventos de disociación de complejos proteína-proteína convergen en que los procesos que implican este tipo de eventos se extienden en períodos que superan los milisegundos, lo que computacionalmente hablando, es complejo de simular; aunque las dinámicas moleculares contribuyen en el entendimiento de diversos procesos biológicos, estas están limitadas por las escalas de tiempo (Cavalli et al., 2014). Por ello, como señalan Zhou et al. (2019) y también, Bianciotto et al. (2021), métodos convencionales de dinámicas moleculares no podrían representar este tipo de sucesos y, en consecuencia, se han utilizado métodos combinados, mediante metadinámicas o bien, dinámica molecular acelerada (SMD) en conjunto a análisis estadísticos para modelar el desacople, pero utilizando ligandos pequeños como drogas o toxinas peptídicas.



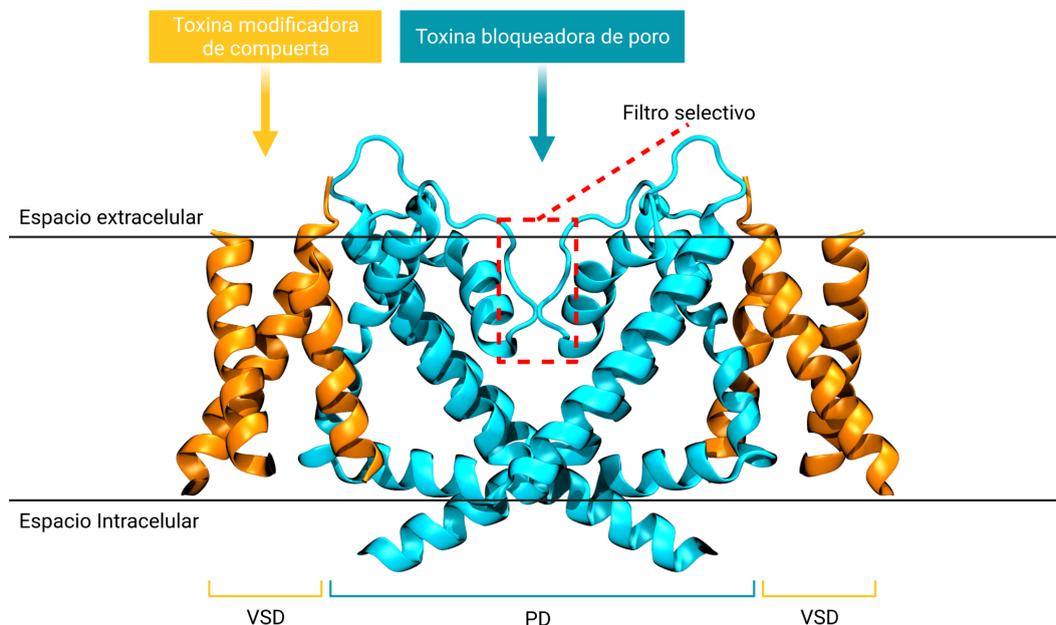
**Figura 1: Representación de la cantidad de artículos publicados entre los años 2008-2020 referentes a las búsquedas. “Protein binding” (en azul), “Protein unbinding” (en rojo), “Protein dissociation” (en amarillo) en PubMed.**

Dentro de este último grupo, las toxinas han simplificado el estudio de los mecanismos de modulación de proteínas tipo canales iónicos (Nicke et al., 2020) y, en este sentido, se han convertido en una herramienta eficaz para dilucidar la relación estructura-función de proteínas transportadoras de iones, principalmente como consecuencia de su tamaño y afinidad para con los canales iónicos. Por ejemplo, se han identificado más de 80 toxinas que modulan diferentes clases de canales de potasio (K<sup>+</sup>) a partir de venenos como caribdotoxina (escorpiones), dendrotoxinas (serpiente mamba verde), apamina y tertiapina-Q (abejas) (Triggle et al., 2006). En concreto han sido utilizadas en la determinación de la estructura de poro y la composición tetramérica de canales de potasio (Mackinnon et al., 1993; Hidalgo & MacKinnon, 1995; Ranganathan et al., 1996) pues, la afinidad entre canales de este tipo y las toxinas se encuentra entre las más fuertes de todos los complejos proteína-proteína conocidos (Zachariae et al., 2008).

La evolución ha dotado a los animales y a las plantas venenosas la capacidad de explotar la función excitadora de los canales iónicos produciendo toxinas que modifican la apertura o el cierre de estas proteínas (Kalia et al., 2015). En este sentido, la diversidad de canales de potasio dependientes de voltaje (K<sub>v</sub>) y su amplia distribución a lo largo del sistema nervioso central y periférico, además de su importante rol en la excitabilidad de los nervios y músculos, los convierten en un blanco estratégico para diferentes tipos de neurotoxinas sintetizadas por animales venenosos con el objetivo de prestar defensa ante enemigos naturales (Matsumura et al., 2021). El mecanismo de acción que siguen las toxinas es, en primera instancia, bloquear las corrientes mediadas por canales K<sub>v</sub>, paralizando la repolarización de la membrana y produciendo un aumento en la excitabilidad, consiguiendo así, la paralización del enemigo (Finol-Urdaneta et al., 2020).

Existe una gran variedad de orígenes para las pequeñas toxinas de origen peptídico que, a pesar de no estar relacionadas estructural ni filogenéticamente, comparten un motivo o mecanismo de inhibición dado por un residuo básico (usualmente lisina) en conjunto con un residuo aromático como la tirosina o fenilalanina (Matsumura et al., 2021). El primero de estos, encaja perfectamente en el filtro de selectividad de canales Kv, ocluyendo estéricamente el flujo de iones, mientras que el aminoácido hidrofóbico ayuda al acoplamiento y a la consolidación de la unión de la neurotoxina (Finol-Urdaneta et al., 2020).

Siguiendo el mecanismo antes descrito, las toxinas se unen a los canales Kv principalmente en dos puntos: cuando son de tipo bloqueadoras de poros se unen a la boca extracelular de los dominios de poros y, las toxinas modificadoras de la compuerta se unen a los dominios sensores de voltaje (Figura 2) (Banerjee et al., 2013). En ambos casos, provocan la inhibición de la corriente iónica pero, de manera física y directa en el primer caso y, en el segundo, de manera indirecta mediante cambios conformacionales inducidos.



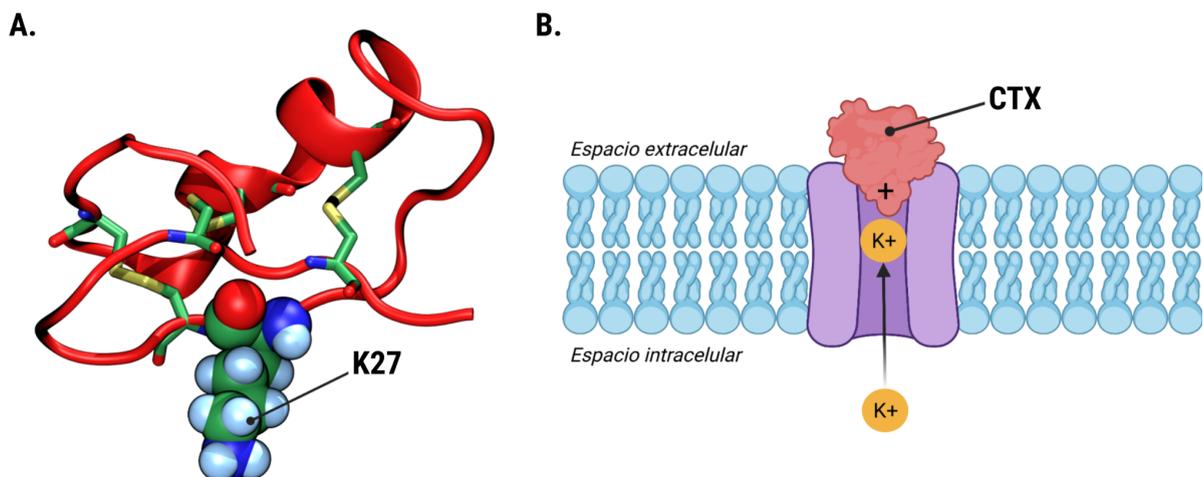
**Figura 2: Tipos de inhibición toxina-canal.** VSD: Dominio sensor de voltaje. PD: Dominio de poro. Las toxinas bloqueadoras de poro (en color cian) ocluyen el filtro selectivo de los canales iónicos de manera directa. En cambio, las modificadoras (en color amarillo) producen cambios conformacionales. En ambos casos, las toxinas cumplen su función extracelularmente.

Un ejemplo de toxinas bloqueadoras de poros son los venenos derivados de escorpiones, una compleja mezcla de distintas proteínas que han sido una fuente abundante de toxinas que bloquean canales de potasio. En específico, son péptidos pequeños compuestos por alrededor de 30-40 residuos de longitud, unidos por tres o cuatro enlaces disulfuro en una estructura rígida (Banerjee et al., 2013). Uno de ellos es caribdotoxina (CTX), péptido sintetizado por el escorpión *Leiurus quinquestriatus*, que constituye un inhibidor bastante estudiado de canales de potasio (Khabiri et al., 2011) y que, además, como señalan Anderson et al. (1988), se une en razón 1:1 con el canal y en donde las interacciones electrostáticas cumplen un rol importante en la afinidad de la toxina sobre la proteína. Caribdotoxina es un péptido compuesto por 37 residuos

aminoacídicos y una carga total de +5e, crítica para que las interacciones electrostáticas entre el canal y la toxina sean efectivas. Su estructura (Figura 3A) se compone por una alfa-hélice y una lámina beta bicatenaria, unida por tres enlaces disulfuro (Matsumura et al., 2021). Está constituida por residuos cargados positivamente (4 lisinas, 3 argininas y 1 histidina) además de dos grupos cargados negativamente (un glutamato y el grupo COOH en el extremo C-terminal). Su composición aminoacídica, altamente básica, contribuye a la fuerza electrostática de unión a la boca del canal de potasio, que se encuentra cargada negativamente (Park & Miller, 1992).

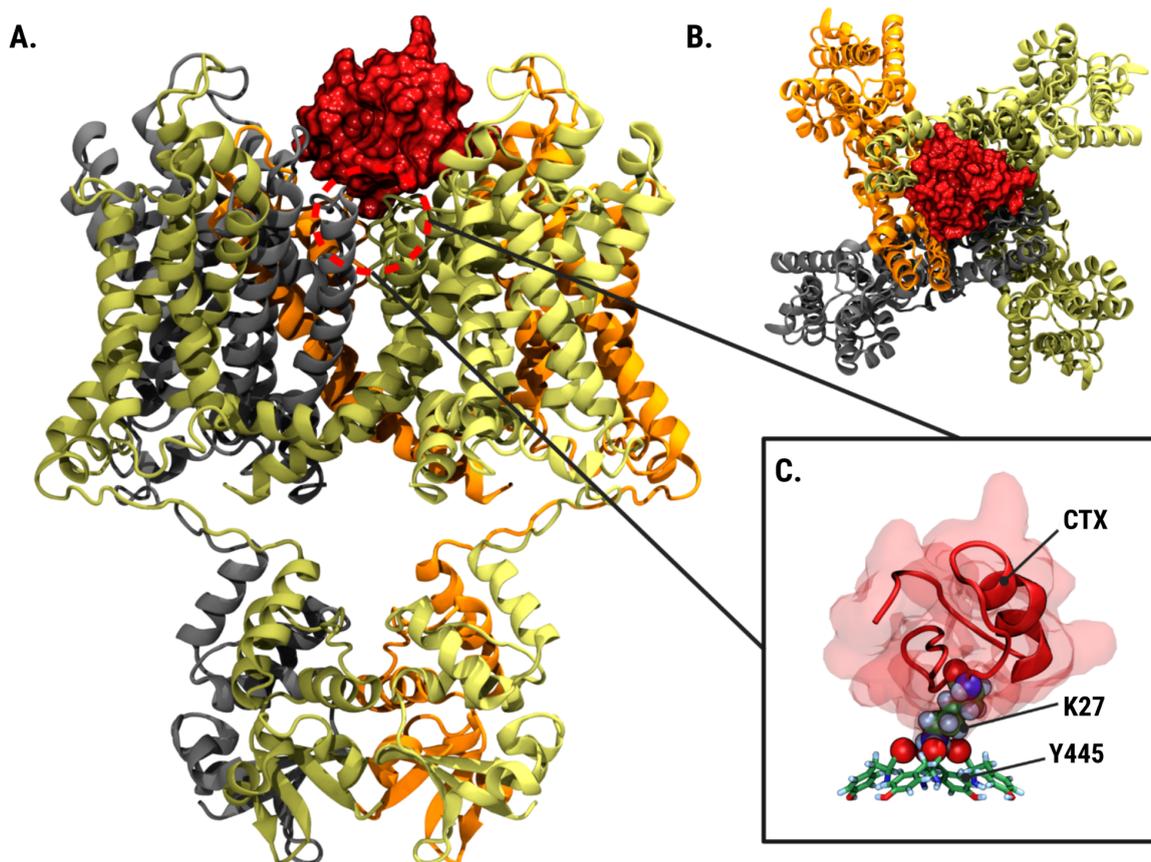
Además de lo anterior, Mackinnon & Miller (1988) descubrieron que la toxina se une al extremo externo del poro de los canales iónicos (Figura 3B) y, por tanto, corresponde a un bloqueador de poro. El mecanismo de unión que utiliza CTX fue investigado por Park & Miller (1992) mediante la mutagénesis de distintos residuos en la estructura del péptido, logrando establecer que los grupos cargados positivamente en la toxina promueven la interacción por influencias electrostáticas débiles y también, por el contacto directo e íntimo con el canal. En este sentido, se ha señalado especialmente el residuo K27 como un elemento central en el bloqueo del poro del canal, pues se une a través de la interacción de la carga positiva de la cadena lateral de la lisina y el sitio de unión a iones S1 en el filtro del canal. Así, la lisina mediaría la repulsión entre los iones de potasio en el poro y la toxina (Park & Miller, 1992; Miller, 1995) y, también, la dependencia de voltaje de esta última (Goldstein & Miller, 1993).

El fenómeno de dependencia de voltaje fue reportado por Mackinnon & Miller (1988), quienes experimentalmente analizaron la relación entre caribdotoxina y un canal de potasio activado por  $Ca^{2+}$ . Lograron establecer que la toxina puede acoplarse a conformaciones abiertas o cerradas del canal y que la tasa de disociación de CTX respecto del poro de la proteína aumenta con la despolarización de la membrana lipídica. Más aún, ambos investigadores, hallaron y modelaron la relación entre la concentración interna de iones potasio ( $K^+$ ) y la tasa de disociación de este complejo proteína-canal, señalando que existe una dependencia de voltaje en el mecanismo de disociación de esta toxina: cuando el interior del canal se torna positivo, producto del aumento de la concentración interna de  $K^+$  que, a su vez, es consecuencia de la oclusión del poro, el campo eléctrico empuja a los iones  $K^+$  que se encuentran en el filtro hacia el espacio extracelular, desestabilizando así a la toxina por repulsión electrostática en un proceso denominado "*trans-enhanced dissociation*" (Figura 3B). Más tarde, Goldstein & Miller (1993) en base a lo reportado por MacKinnon & Miller (1988), reportaron que estos resultados eran extrapolables a canales tipo *Shaker* y que, además, el bloqueo del poro del canal dependía de un residuo cargado positivamente en la posición 27.



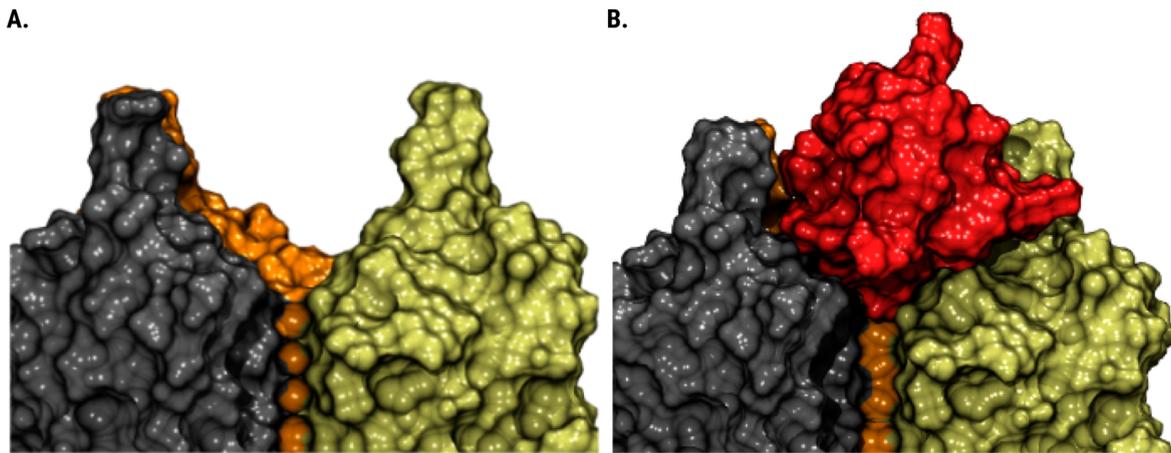
**Figura 3:** (A) **Estructura caribdotoxina (CTX).** La toxina se compone de una estructura alfa hélice, en conjunto a estructuras beta plegadas antiparalelas, además, de tres enlaces disulfuro (Representación licorice). En representación Van der Waals se muestra el aminoácido básico (K27) que hace contacto con el poro del canal. (B) Mecanismo de dependencia de voltaje (Adaptado de Mackinnon & Miller, 1988). En morado, se encuentra representado un canal iónico de potasio embebido en una membrana plasmática y, en rojo, sobre el poro de este, caribdotoxina, ocluyendo al canal.

Especialmente, la toxina (CTX) cubre alrededor de  $400 \text{ \AA}^2$  del vestíbulo externo de *Shaker* (Figuras 4A y 4B) y, una característica importante durante la unión de ambas estructuras, es la formación de una interacción entre un par de residuos en la boca externa de la proteína: K27 de CTX y Y445 del canal (Ranganathan et al., 1996). En específico, la lisina sólo entra en contacto con los oxígenos de los grupos carbonilo de la tirosina, en el punto más alejado del grupo hidroxilo, pero a distancia suficiente para que el grupo amino del residuo 27 en CTX (K27) se coordine mediante 4 puentes de hidrógeno con los oxígenos del grupo carbonilo de la tirosina (Y445) en cada una de las cadenas de *Shaker*, ocupando así el lugar de coordinación de un ion  $K^+$  (Figura 4C) (Banerjee et al., 2013). Otro aspecto importante en la unión del complejo *Shaker*/CTX es que la distribución de los iones en la parte superior filtro del canal iónico cambiará producto de la repulsión electrostática generada por el grupo amino de K27 cargado positivamente.



**Figura 4:** (A) Vista frontal y (B) superior del complejo CTX/Kv1.2. En representación New Cartoon y coloreada por cadena se muestra el canal iónico y, en rojo, coloreado por superficie, la toxina. (C) Contacto K27/Y445. En Van der Waals se encuentran representados los átomos de oxígeno pertenecientes a la cadena lateral de Y445 del canal que se coordinan con el grupo amino de K27 en CTX.

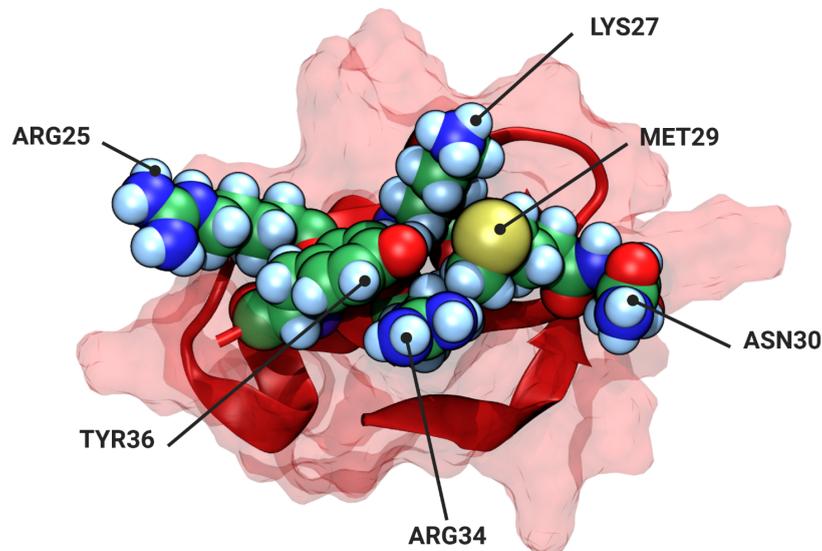
Ahora bien, durante la unión del complejo *Shaker*/CTX no existen cambios conformacionales significativos derivados del acople de ambas estructuras (Moldenhauer et al., 2019), lo que es consistente con la idea de que la toxina se une a la boca del canal siguiendo un modelo de mecanismo llave-cerradura (Figura 5) (Banerjee et al., 2013) y, más aún, es consistente con la idea de utilizar un sistema sencillo que permita describir eventos previos a la disociación proteína-proteína asociados al complejo *Shaker*/CTX considerando sólo el análisis de interacciones establecidas entre ambas estructuras. Este hecho es especialmente relevante pues, una de las dificultades de analizar tanto la formación como la disociación de complejos proteína-proteína es que se deben considerar también los cambios estructurales que son consecuencia de los eventos de *binding* o *unbinding*, aumentando el orden de magnitud de tiempo y recursos de análisis. El uso del complejo *Shaker*/CTX como objeto de estudio se justifica entonces en la “simpleza” de su acople y, también, de su desacople.



**Figura 5: Bloqueo CTX/Shaker.** Tanto en (A) como en (B) se encuentra representada la estructura del poro del canal Shaker, coloreado por cadena. Sin embargo, en (B) se muestra la estructura superficial de caribdotoxina sobre este, sin producir cambios conformacionales (Adaptado de Moldenhauer et al., 2019).

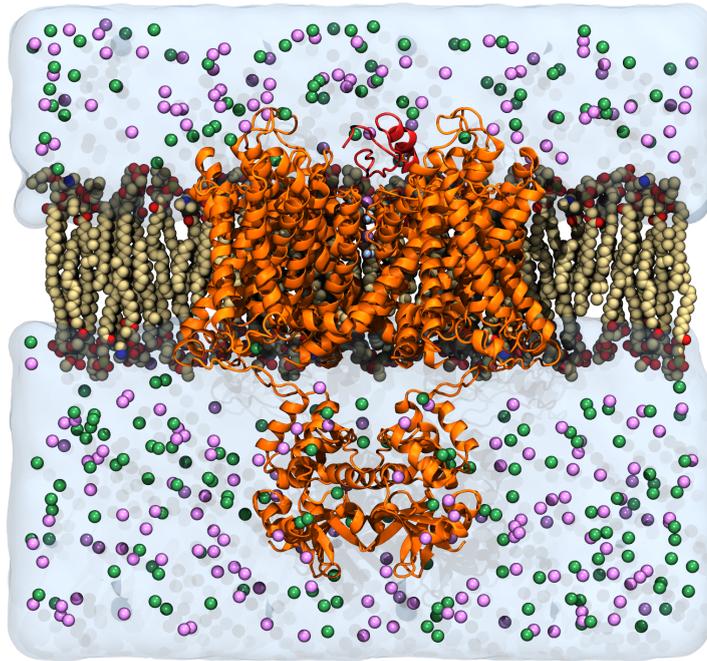
Adicionalmente, también en Moldenhauer et al. (2019), utilizando un cristal que contiene tanto el canal Kv1.2 como CTX en su superficie extracelular (PDB ID: 4JTA), se reportó una serie de entre 6 a 10 pares de residuos aminoacídicos (CTX-R25/Kv-D359, CTX-K27/Kv-S1 (Y445), CTX-M29/Kv-D375, CTX-N30/Kv-D375, CTX-R34/Kv-D375, y CTX-Y36/Kv-V377) que interactúan en la interfaz toxina-canal. De este grupo, cinco residuos de CTX son críticos en la unión del complejo utilizado: K27, R34, M29, Y36 y N30, principalmente por su naturaleza y posición en la toxina (Figura 6)(Goldstein, 1994). Respecto del movimiento e interacción entre cada par mencionado, se dice que si bien existe relación entre la unión y desunión de los pares, cada uno posee grados de autonomía respecto de los demás. La independencia de uno, respecto de los otros se observó en dinámicas moleculares con aplicación de potencial eléctrico; mientras algunos pares se mantenían muy cercanos, otros podían estar a más de 10 Å de distancia.

Sumado a lo anterior, es posible observar eventos de disociación en el complejo formado por caribdotoxina y canales de potasio a través de un proceso denominado *trans-enhanced dissociation* (MacKinnon & Miller, 1988), en donde la toxina podría ser desestabilizada producto del voltaje y la repulsión electrostática ejercida sobre esta. Considerando este fenómeno, Moldenhauer et al. (2019) reportaron que la tasa de disociación final de CTX es sensible tanto al voltaje como a la concentración de iones, lo que provoca inestabilidad (“wobbling” o bambolear) de la toxina sobre el canal y, con ello, estados de transición que se asemejan al canal sin toxina; el supuesto estado hermético del bloqueo de la proteína se rompe y el flujo de iones desde el medio intracelular hacia el extracelular es parcialmente restaurado. Además, al “tambalearse” la toxina sobre el canal, los contactos se mantienen sin importar que K27 se desacople (Moldenhauer et al., 2019), confirmando lo establecido por Hidalgo & Mackinnon (1995) respecto de la independencia entre cada uno de los contactos que interactúan en el complejo proteína-toxina.



**Figura 6: Residuos aminoacídicos que forman parte de CTX e interactúan en la superficie del canal.** En representación Van der Waals se encuentran los residuos reportados en Goldstein (1994) que forman parte de las interacciones con aminoácidos ubicados en la boca externa del canal y que son críticos para el bloqueo.

Anteriormente se han descrito eventos de asociación y disociación mediante herramientas de dinámica molecular como modelado por homología y docking, dinámicas Brownianas (BD), dinámicas moleculares largas y superficies de energía libre, también Umbrella sampling y potenciales de fuerza media (PMF) (Khabiri et al., 2011). Sin embargo, la mayor parte de los resultados se han limitado a describir interacciones proteína-proteína con una afinidad de unión débil (Su & Wu, 2019). Por ello, considerando la literatura previamente descrita respecto de canales iónicos y uso de toxinas, y la escasa información e investigación respecto de fenómenos de disociación de complejos proteína-proteína, en este trabajo se plantea visualizar y evaluar los eventos transitorios que preceden el desacople del complejo *Shaker*/CTX, con tal de determinar el aporte energético de cada contacto durante este proceso y modelar así posibles rutas de disociación. Esto a través de herramientas teórico-computacionales de simulación de dinámica molecular con aplicación de potencial eléctrico sobre el complejo *Shaker*/CTX (Figura 8) que induzcan el “wobbling” de la toxina sobre el canal iónico. Con lo anterior, se espera describir con mayor precisión los estados de transición propuestos en Moldenhauer et al. (2019) que son parte del proceso de disociación de complejos proteína-proteína y responder preguntas como: ¿Es posible, a través de dinámicas moleculares como las propuestas, establecer una red de interacciones durante el tambaleo de la toxina sobre el canal?, ¿Qué factores deben considerarse al analizar las interacciones que se establezcan durante la disociación? y, por último, ¿Cuáles son las interacciones con mayor peso estadístico y, por tanto, aquellas que modelan la disociación del complejo?



**Figura 7: Sistema de estudio en membrana lipídica.** Estructura cristalográfica PDB 4JTA, constituida por el canal Kv1.2 (Shaker) y caribdotoxina. Shaker se encuentra embebido en una membrana lipídica y caribdotoxina (en rojo) sobre el poro del canal. El sistema además, se encuentra neutralizado por iones potasio (en rosado) y cloro (en verde).

## 2. Hipótesis

La contribución energética de cada par que interactúa en la superficie toxina-canal es aditiva en el proceso de disociación del complejo proteína-proteína, evento que ocurrirá cuando todos los pares de aminoácidos que interactúan en la interfaz toxina-canal coincidan en el estado disociado.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo general

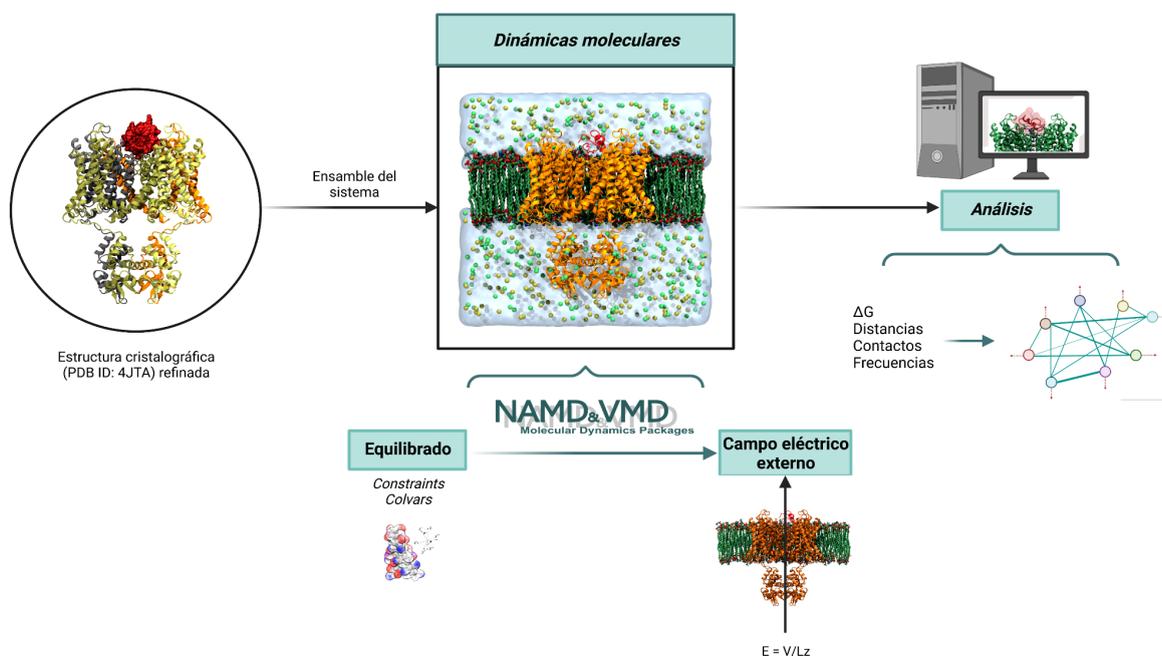
Analizar eventos de transición durante el proceso de disociación entre la toxina CTX (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*) y el canal iónico *Shaker* (*Rattus norvegicus*) bajo distintas condiciones de voltaje, determinando la contribución energética de los pares interactuantes en la interfaz toxina-canal que controlan la estabilidad del complejo proteína-péptido.

### 3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Simular el complejo *Shaker*/CTX bajo condiciones estándar de presión (1 atm), temperatura (300 K) aplicando campo eléctrico externo sobre el sistema.
- 3.2.2. Caracterizar las interacciones claves entre aminoácidos en la interfaz canal-toxina que estabilizan el complejo proteína-proteína.
- 3.2.3. Evaluar eventos de disociación de pares de aminoácidos bajo distintas condiciones de voltaje.
- 3.2.4. Analizar la contribución energética de cada par de aminoácidos disociados y evaluar su aditividad energética y con ello, determinar la autonomía de cada evento de asociación/disociación.
- 3.2.5. Construir las rutas más probables de disociación del complejo *Shaker*/CTX.

## 4. Materiales y Métodos

En esta sección son descritas las tareas (Figura 8) que permitieron responder la hipótesis planteada, mediante la inducción y modelado de eventos que preceden a la disociación del complejo *Shaker*/CTX.



**Figura 8: Esquema general de la metodología a utilizar para el desarrollo del proyecto.** Etapas principales para el ensamble del sistema a partir de una estructura cristalográfica ya refinada (PDB ID: 4JTA), la ejecución de dinámicas moleculares y, posteriormente, algunos de los análisis que se realizarán para completar los objetivos propuestos.

### 4.1. Ensamble sistema Kv1.2/CTX

Para la realización de este proyecto se utilizó la estructura cristalográfica de la proteína transmembrana perteneciente a la familia *Shaker* del canal Kv1.2 dependiente de voltaje asociado a caribdotoxina (PDB ID: 4JTA). Su estructura fue refinada previamente en Moldenhauer et al. (2019), en donde participaron tanto el Dr. Horacio Poblete como el Dr. David Naranjo. En concreto, para el ensamble del sistema *Shaker*/CTX se utilizaron herramientas disponibles como plugin en VMD v1.9.4 (Humphrey et al., 1996) y también, scripts en lenguaje TCL que son descritos en las subsecciones siguientes.

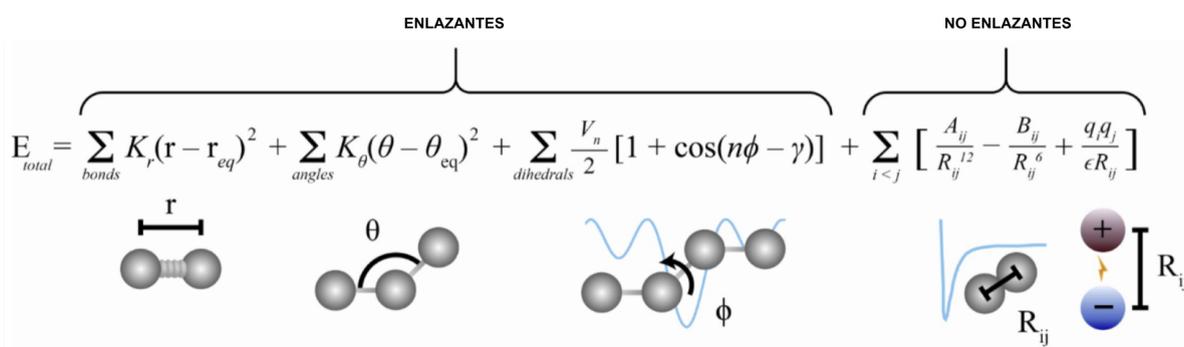
En primer lugar, el canal, que en su filtro contiene dos moléculas de agua intercalados con un ion potasio ( $K^+$ ), fue embebido en una membrana lipídica tipo POPC (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina) de dimensiones  $150\text{\AA} \times 150\text{\AA}$  que, a su vez, fue construida utilizando el plugin *Membrane Builder* en VMD, procurando que la toxina se encontrara en la parte “externa” de la membrana. Posteriormente se “combinó” tanto el complejo proteína-proteína como la bicapa lipídica mediante scripts en lenguaje TCL.

Luego, el sistema fue solvatado con moléculas de agua del tipo TIP3P implementadas en el campo de fuerza CHARMM (Jorgensen et al., 1983) en una caja periódica de dimensiones aproximadas de 150Å x 150Å x 140Å y neutralizado utilizando contraiones de potasio y cloro en concentración de 0.15 M mediante el plugin *autoionize* en VMD, con el objetivo de garantizar la neutralidad eléctrica del sistema. El resultado generado en esta etapa se muestra en la Figura 8.

## 4.2. Protocolo y ejecución de simulaciones de dinámicas moleculares

Tras ensamblar el sistema, se ejecutaron simulaciones de dinámica molecular clásica (DM) para: (1) equilibrar el sistema y (2) generar eventos de disociación proteína-proteína. Dadas las posiciones de todos los átomos de un sistema biomolecular la dinámica molecular calcula la fuerza ejercida por todos los átomos del sistema sobre cada uno de los átomos que lo componen y, mediante las leyes de movimiento de Newton, predice la posición espacial de cada uno de ellos en función del tiempo (Hollingsworth & Dror, 2018). De aquello resulta una trayectoria de un sistema atómico que, a pesar de ser una aproximación, proporciona información detallada sobre el curso temporal de los movimientos atómicos, a los que es imposible acceder experimentalmente (Roux, 2021).

Las fuerzas que actúan sobre cada uno de los átomos del sistema se estiman a partir de ecuaciones que forman parte de un modelo denominado Campo de Fuerza de Mecánica Molecular (Figura 9) que permite determinar la energía potencial del sistema en estudio ajustándose a resultados de los cálculos de mecánica cuántica e, incluso, a determinadas mediciones experimentales (Hollingsworth & Dror, 2018). Los modelos de campo de fuerza comprenden un conjunto de funciones que describen tanto las fuerzas que surgen de interacciones enlazantes como de aquellas no enlazantes. El primer caso considera: enlaces químicos, ángulos atómicos (ambos modelados como “resortes”) y ángulos diedros descritos mediante funciones sinusoidales. En el segundo caso, para interacciones no enlazantes considera aquellas de naturaleza electrostática y también, interacciones de *van der Waals*, modeladas mediante la ley de *Coulomb* y el potencial de *Lennard-Jones*, respectivamente (Durrant & McCammon, 2011).



**Figura 9: Funciones y variables descritas para el cálculo de energía potencial utilizadas por modelos de campos de fuerza (Modificada a partir de: Durrant & McCammon, 2011).**

Considerando lo anterior, se tiene entonces que el modelo escogido como campo de fuerza describe la energía potencial asociada a la dinámica molecular del sistema y, además, la fuerza generada por los átomos, que provocará movimiento sobre los mismos, será modelada mediante las leyes de movimiento de Newton tomando en cuenta tanto la masa como la aceleración de cada una de las partículas.

Los campos de fuerza son de naturaleza amplia y, por ende, también pueden describir sistemas biológicos. Cada uno posee fortalezas y debilidades propias que se asocian con la especificidad del campo de fuerza, que deriva de las funciones y variables que describen. Se utilizó en el presente trabajo, CHARMM36 (MacKerell et al., 1998; Best et al., 2012), que ha sido validado y optimizado para proteínas y lípidos (Hollingsworth & Dror, 2018).

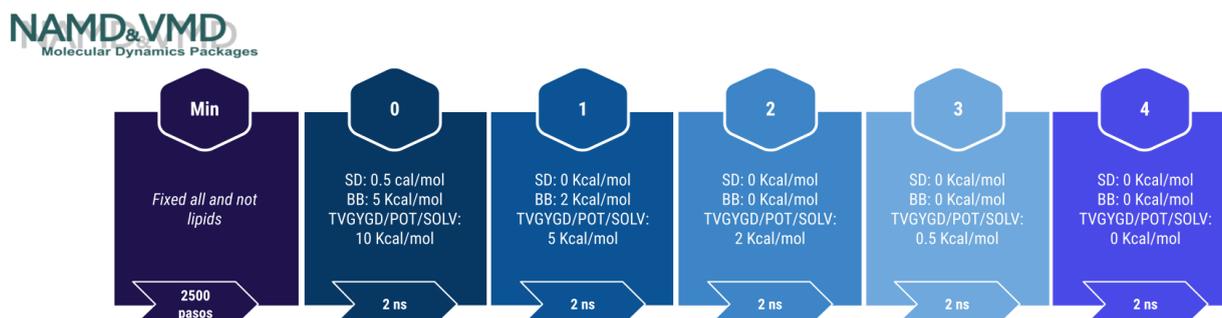
Junto a lo anterior, se utilizaron métodos que tienen como objetivo recrear condiciones experimentales para que los datos generados al simular el complejo *Shaker/CTX* se aproximen con baja probabilidad de error a lo que ocurre fisiológicamente. En consecuencia, para las simulaciones se utilizó el método de pistón y termostato de Langevin (Feller et al., 1995) a temperatura y presión constante de 300 K y 101.325 kPa (1 atm), respectivamente, en un ensamble tipo isobárico-isotérmico (NPT). Con el objetivo de disminuir la frecuencia de colisión debido a los gradientes de presión y temperatura. Además, las interacciones no enlazantes fueron calculadas utilizando el algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME) (Darden et al., 1993) con un espaciado menor a 1.2 Å, junto a un *cutoff* de 0.8-0.9 nm para las interacciones de tipo *van der Waals*. Por último, se aplicó un protocolo de repartición de masas definido por Hopkins et al. (2015), en el que la masa de los átomos de hidrógeno que no constituyen parte de las moléculas de agua se multiplica por un factor de 3, transfiriendo masa al hidrógeno desde el átomo más pesado al que estén unidos. Como consecuencia, fue posible integrar la ecuación de movimiento a un paso de 4 fs, sin tener pérdidas apreciables de precisión.

Por último, se tiene que el sistema solvatado y neutralizado, comprende alrededor de 300.000 átomos, por tanto, las simulaciones de dinámica molecular fueron costosas computacionalmente. Por ello, el software que se utilizó para este fin es NAMD (*NANoscale Molecular Dynamics*) (Phillips et al., 2020) está diseñado para simulaciones de alto rendimiento a gran escala y en procesos paralelos. Más aún, en su versión 3.0, NAMD ofrece un rendimiento que duplica el rendimiento de sus versiones pasadas al utilizar casi íntegramente tarjetas de vídeo de última generación. (*NAMD 3.0 Alpha, Gpu-Resident Single-Node-per-Replicate Test Builds*, n.d.).

#### 4.2.1. Preparación del protocolo de *constraints* durante equilibrado del complejo *Shaker/CTX*

Tras la preparación del sistema, el sistema fue sometido a procesos de minimización y equilibrado energético para estabilizar la estructura del modelo. Este proceso es esencial para determinar la disposición molecular adecuada de los componentes del sistema en el espacio, buscando que las moléculas que forman parte de este, adopten conformaciones energéticamente favorables. En este trabajo, el sistema de estudio fue sometido a una minimización de 2500 pasos y, posteriormente, a un protocolo de equilibrado (Figura 10) donde primero se fijó todo aquello que no correspondía a lípidos, con el propósito de lograr que la membrana se ubicara

especialmente alrededor de la proteína. Luego fueron restringidas, mediante *constraints* posicionales, aquellas regiones que correspondían a: *backbone*, cadenas laterales y el filtro del canal junto con su contenido. La herramienta *constraints* es utilizada para aplicar fuerza sobre la región seleccionada, restringiendo así el movimiento de la misma y, en particular, en este trabajo será utilizada para suavizar la liberación del sistema. Para ello, durante el proceso de equilibrado la fuerza aplicada disminuyó de manera paulatina sobre cada una de las regiones escogidas tras un tiempo de simulación aproximado de 2 ns, hasta que la fuerza sobre cada una de las regiones alcanzó el valor 0.



**Figura 10: Protocolo de minimización y equilibrado utilizado para el sistema Shaker/CTX.** En el primer cuadro, correspondiente a la etapa de minimización, se fijó todo aquello que no correspondiera a lípidos. Luego, los cuadros restantes, representan cada una de las etapas a las que fue sometido el complejo proteína-péptido y el tiempo de cada una de ellas. Dentro de cada cuadro se detalla: la selección (SD: sidechain; BB: backbone; TVGYGD: secuencia del filtro del canal; POT/SOLV: ion potasio y moléculas de agua que se encuentran dentro del filtro) y también la fuerza en Kcal/mol a la cual cada uno fue sometido en 4 etapas.

#### 4.2.2. Variables colectivas para equilibrar el complejo Shaker/CTX

Tras aplicar restricciones posicionales y equilibrar el sistema, se implementó la aplicación del módulo *Colvars* (Fiorin et al., 2013) o bien, de variables colectivas en NAMD. Esta metodología reduce los grados de libertad de un sistema mediante el uso de parámetros que alteran la dinámica del sistema de forma controlada y, en este caso, sin provocar sesgos energéticos, pues se plantea sólo con el objetivo de lograr equilibrar por completo el sistema. Para el trabajo fueron descritos y caracterizados una serie de contactos entre pares de aminoácidos en la interfaz toxina-canal, por ello es importante lograr que el sistema y, en particular, CTX, pueda establecer interacciones con su par proteico; el uso de *Colvars* de distancia contribuye con este objetivo mediante la variable *distance* que, en concreto, corresponde a una restricción armónica que define una componente de distancia entre dos grupos de átomos considerando el centro de masa de cada uno de ellos. Por tanto, y, considerando las distancias que han sido reportadas entre cada par de aminoácidos (Banerjee et al., 2013)(Tabla 1), se utilizó este módulo para que el sistema lograra reproducirlas en cada uno de los pares, mediante simulación molecular de 50 ns de duración aproximadamente.

**Tabla 1: Distancias reportadas para cada par de aminoácidos (en código de una letra) que interactúan en la interfaz toxina-canal, extraídas desde el cristal PDB ID: 4JTA.**

Residuo toxina	T8	T9	R25	R25	M29	N30	R34	R34	Y36	Y36	K27
Residuo canal	Q353	Q353	Q353	D359	D375	D375	Q353	D375	D357	V377	Y445
Distancia (Å)	5.7	5.9	4.8	8.5	5.7	5.1	8.7	8.0	4.5	6.5	1.8

### 4.2.3. Campo eléctrico externo y dinámicas de producción

Utilizando como punto de partida el sistema previamente equilibrado mediante dinámicas moleculares, se aplicó potencial eléctrico sobre este con tal de simular las condiciones que permiten observar el denominado “*wobbling*” de la toxina sobre el canal, utilizando el software NAMD3.

El enfoque utilizado, como señalan Gumbart et al. (2012), consiste en la introducción de un campo eléctrico uniforme  $E$  en toda la celda periódica a simular que contiene el sistema de membrana, dando lugar a una fuerza ( $F$ ) (Ecuación 1) que se aplica a todas las cargas ( $q_i$ ) en la simulación.

(Ecuación 1) 
$$F = q_i \cdot E$$

En este sentido, el campo eléctrico (Ecuación 2) fue dirigido perpendicularmente al plano de la membrana (eje Z) con una magnitud ( $E$ ) igual a la razón entre cada voltaje transmembrana ( $V$ ) que se aplicó y la longitud de la caja periódica del sistema en la coordenada Z ( $L_z$ ).

(Ecuación 2) 
$$E = \frac{V}{L_z}$$

Ahora bien, a pesar de que el campo eléctrico aplicado es uniforme, el potencial electrostático total resultante alrededor de la proteína no es uniforme, cumpliendo con las propiedades dieléctricas locales de la proteína y la membrana (Aksimentiev and Schulten, 2005). Más aún, la reorganización de las moléculas y, particularmente, del dipolo del agua inducirá una diferencia de voltaje a través de la bicapa lipídica (Delemotte et al., 2012).

Expuesto lo anterior, para el sistema *Shaker*/CTX se aplicó campo eléctrico externo utilizando NAMD3 siguiendo una parte del protocolo propuesto en Moldenhauer et al. (2019), que consiste en utilizar potenciales de membrana perpendiculares a la membrana, como fue descrito anteriormente, pero esta vez en el rango de 1 a 2 V durante 500 ns aproximadamente.

Para poder aplicar un campo eléctrico externo constante en dinámicas moleculares, NAMD (Phillips et al., 2020) posee el módulo denominado *External Electric Field*, determinado por un parámetro que lo “enciende” (*eFieldOn*) y otro que determina la dirección y magnitud de este

(*eField*) en unidades de kcal/(mol Å e) que debe ser añadido a los parámetros de entrada (*input*) del software NAMD3. En este sentido, para poder ejecutar simulaciones con los voltajes deseados (1V, 0.5V, 1.2V y 1.3V) se realizó la conversión que considera tanto la dimensión del eje Z del sistema como el potencial eléctrico, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\chi = \frac{\frac{\text{voltaje deseado}}{L_z}}{0,0434} \left[ \frac{\text{Kcal}}{\text{mol } \text{Å } e} \right]$$

En donde  $L_z$  corresponde a la longitud de la celda periódica en el eje Z y 0,0434 a la constante que permite convertir  $[\frac{V}{\text{Å}}]$  en las unidades de fuerza que utiliza NAMD ( $\frac{\text{Kcal}}{\text{mol } \text{Å } e}$ ). Debido al objetivo central de este proyecto, se utilizó campo eléctrico de magnitud positiva que, en consecuencia, “empuja” a los iones desde el espacio intracelular hacia el extracelular.

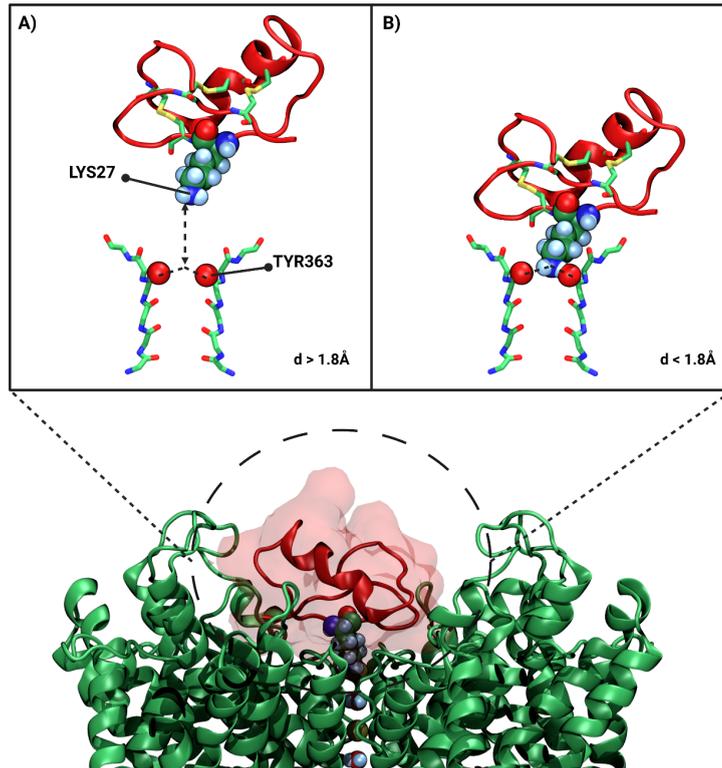
La definición de parámetros permitió generar un campo eléctrico constante de distintas magnitudes que, debido a las condiciones periódicas de los sistemas, no altera las concentraciones iónicas entre los espacios intra y extracelular delimitados por la membrana plasmática y, por tanto, mantiene las concentraciones iónicas iniciales.

### 4.3. Análisis y evaluación de cálculos de simulación de dinámicas moleculares

A continuación, se describen los métodos que fueron empleados para analizar los datos incluidos en las trayectorias de dinámica molecular del sistema *Shaker*/CTX tras aplicar el protocolo descrito previamente.

#### 4.3.1. Caracterización interacciones toxina-canal

Con la finalidad de caracterizar cada uno de los pares de aminoácidos que interactúan en la interfaz proteína-toxina, se definieron cuatro criterios a evaluar: (1) distancias, (2) frecuencias de interacción, (3) contribución energética individual (por par) y (4) duración (tiempo) de los contactos. Para este fin se desarrollaron scripts en lenguaje de programación *TCL/Tk* compatibles con el software de visualización *VMD*, que permiten obtener los valores asociados a los criterios escogidos. En este sentido, se almacenaron las distancias entre cada uno de los aminoácidos que interactúan en la interfaz toxina canal, lo mismo con la contribución energética de cada par y el estado de cada uno de los contactos a lo largo del proceso de aplicación de potencial eléctrico al sistema. Además, para estimar la frecuencia de interacción durante toda la trayectoria se definirá un criterio de contacto según las distancias descritas en la Tabla 1 y las que describen el complejo toxina-canal en condiciones control ( $V=0$ ). En consecuencia, cuando la longitud de separación fue menor al umbral establecido, se consideró un contacto efectivo que será almacenado como un valor “verdadero” o 1 y si, por el contrario, la distancia era mayor se consideró un evento de desacople para ese par, que fue almacenado como “falso” o 0 (Figura 11).



**Figura 11: Esquema contacto.** En representación Licorice, el backbone de la secuencia TVGYGD (filtro del canal) y en Van der Waals, los oxígenos que participan en la interacción con K27 (también en Van der Waals). El par K27-Y363 (numeración del cristal 4JTA en PDB) en A) separados por una distancia mayor a la reportada y, en B), separados por una menor a esta. En consecuencia, sólo el segundo caso será considerado un contacto para el par. A su vez, durante el análisis se revisará lo que ocurra con los demás residuos que interactúan a lo largo de toda la trayectoria.

#### 4.3.2. Análisis estados de transición

Tras la caracterización de cada una de las interacciones, el siguiente objetivo fue analizar y determinar estadísticamente cuán probable es que se establezcan contactos o no y, con ello, modelar posibles rutas de disociación.

En este sentido, mediante simulaciones de dinámica molecular se puede, teóricamente, reconstruir todo el paisaje de energía libre de un sistema a lo largo de su evolución temporal. Más aún, la probabilidad relativa de que el sistema se encuentre en un determinado estado A ( $P_A$ ) y en un estado B ( $P_B$ ) está relacionado con la diferencia de energía libre ( $\Delta G_{AB}$ ) a través de la relación de Boltzmann (Ecuación 3)(Harpole & Delemotte, 2018).

(Ecuación 3)

$$\Delta G_{AB} = -k_B T \log \frac{P_B}{P_A}$$

En donde,  $k_B$  corresponde a la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura del sistema. La relación se cumplirá cuando la simulación muestre el equilibrio entre los estados A y B o, lo que es lo mismo, cuando la dinámica sea lo suficientemente extensa (en tiempo) como para que se hayan observado muchas transiciones entre ambos estados (Noé et al., 2009).

Considerando lo propuesto, se utilizaron tres réplicas de cada sistema para este cálculo, obteniendo un tiempo de simulación aproximado de 2 microsegundos para 0.5 V y 4 microsegundos para 1 V, con el objetivo de aumentar el muestreo de estados.

### 4.3.3. Modelado de rutas de disociación

A partir de los datos recopilados en secciones anteriores, se plantea el modelado de rutas de disociación mediante *scripting* y técnicas que permitan hacer más eficiente el análisis de los eventos previos a la disociación del complejo péptido-proteína. Para ello se utilizaron metodologías que involucran estadística y datos generados a partir de dinámicas moleculares. En este sentido, en base a la probabilidad de transicionar a un microestado se asignó un “peso estadístico” a cada una de las interacciones entre aminoácidos de la toxina con los de la superficie del canal considerando a su vez, la energía que aporta cada una de ellas durante el evento de disociación.

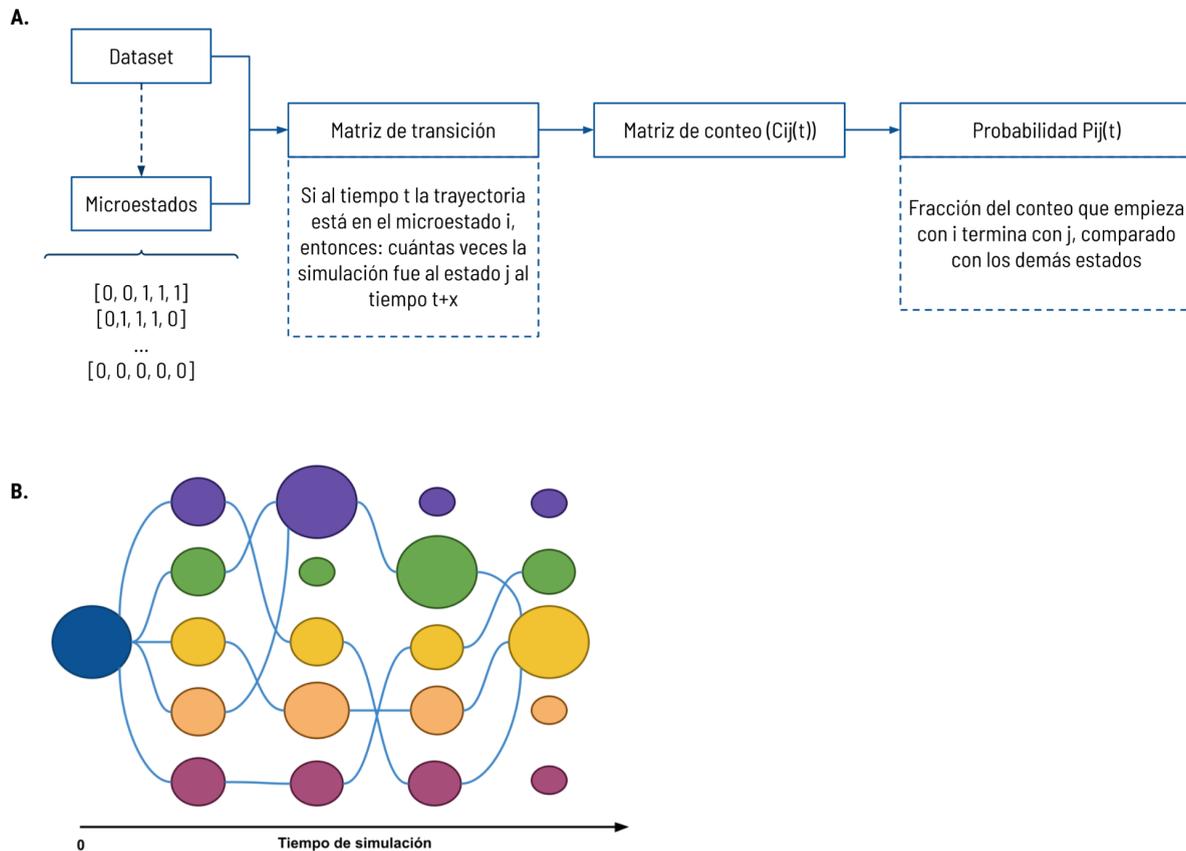
Considerando la información recopilada se desarrolló un script con el objetivo de modelar los cambios de estado que existen a lo largo de las trayectorias generadas en las simulaciones con aplicación de voltaje. Para ello, tomando la hipótesis propuesta y los planteamientos en Moldenhauer et al. (2019) respecto de la independencia de cada uno de los pares que interactúan en la interfaz toxina-canal, es que se propuso seguir un supuesto similar a las cadenas de Markov, en donde el estado futuro depende sólo del estado presente y no hay una probabilidad *a priori*. En esta línea, a partir de la distancia entre los pares en estudio a lo largo de las distintas trayectorias se determinó un umbral bajo la condición control ( $V=0$ ) que determina el estado de contacto o no para cada interacción, generando así una matriz con 1 o 0 dependiendo del estado de la interacción y, en base a ello, se proponen los siguientes principios (Figura 12A):

- Un macroestado corresponde a que la toxina esté pegada al canal o bien, disociada de este.
- Un microestado corresponde a una configuración o serie de conjuntos de pares (en este caso, 6) que podrían estar en contacto o no.
- El cambio entre microestados corresponde a una transición.

Aunque simples, los supuestos propuestos permiten modelar o más bien, determinar una sucesión de transiciones entre microestados o configuraciones de pares a partir de las simulaciones del complejo CTX/*Shaker* que a su vez, permiten asignar probabilidades a adoptar cada uno de los microestados observados.

Finalmente, si se considera que los eventos que ocurren durante el *wobbling* de la toxina sobre el canal como eventos autónomos entre sí (Moldenhauer et al., 2019) y también que no existe una probabilidad *a priori* que considere todo el “camino” del desacople para cada una de las

interacciones, entonces el peso estadístico o probabilidad de cada contacto y/o desacople va a cambiar dependiendo del orden en que cada una de las interacciones suceda. Finalmente, el modelado de las posibles rutas de disociación del complejo (Figura 12B) debe contemplar que existirán “caminos” con mayor probabilidad de ocurrir que otros.

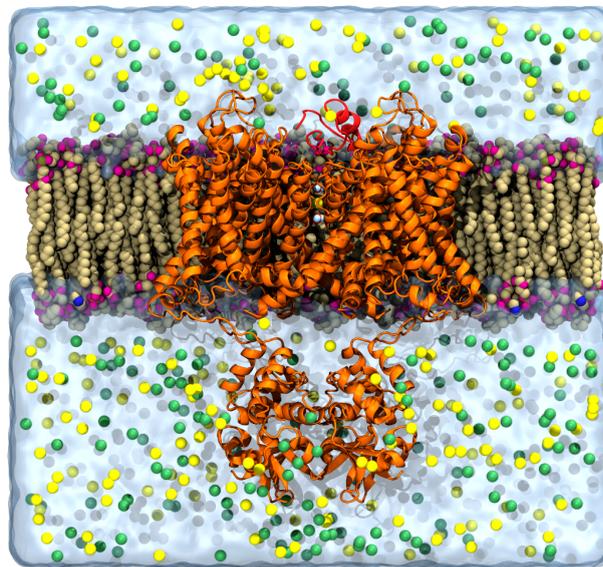


**Figura 12: (A) Esquema para recopilar y transformar información siguiendo principios de cadenas de Markov. (B) Esquema que representa posibles rutas de disociación. Cada una de las esferas representa un par de aminoácidos que interactúan en la interfaz toxina-canal y la probabilidad (directamente proporcional al tamaño de la esfera) de que este sea el siguiente par que se desacople. Adicionalmente, aquellas con mayor probabilidad de ocurrencia se encuentran conectadas configurando una posible “ruta” de disociación.**

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Ensamble de los sistemas, equilibrado y aplicación de potencial eléctrico.

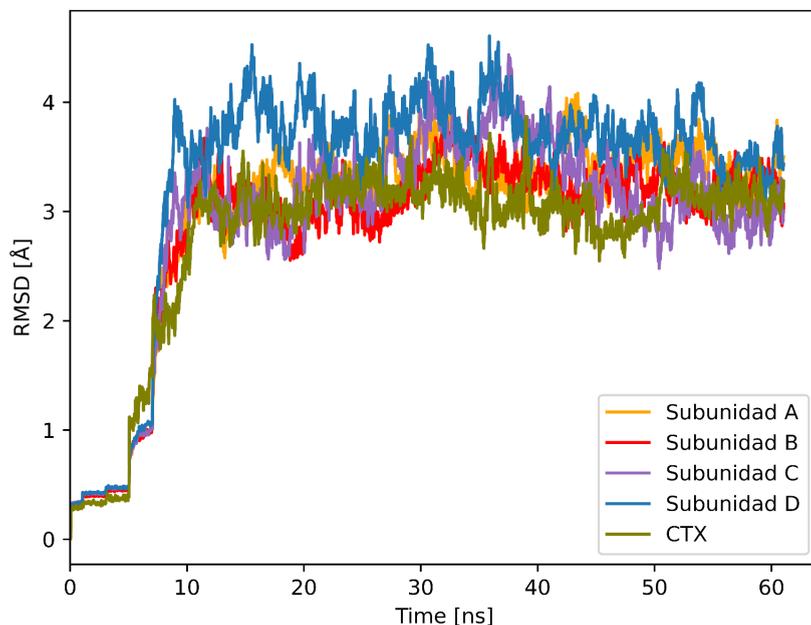
Para analizar eventos de disociación en el complejo *CTX/Shaker* fue necesario ensamblar un sistema acorde con el protocolo descrito anteriormente mediante una serie de scripts que fueron modificados según las necesidades del proyecto, además de herramientas disponibles en VMD (Humphrey et al., 1996), dando como resultado un complejo proteína-membrana solvatado y neutralizado (Figura 13).



**Figura 13: Sistema ensamblado.** *Shaker* (en naranja) embebido en una membrana lipídica y caribdotoxina (en rojo) sobre el poro del canal. El sistema además, se encuentra neutralizado por iones potasio (en amarillo) y cloro (en verde).

#### 5.1.1. Evaluación estructural del ensamble del sistema

Tras ensamblar el sistema y someterlo al protocolo de minimización y equilibrado propuesto (Figura 10) fue evaluada la estabilidad estructural mediante un script que calcula el RMSD de, en este caso, el canal iónico *Shaker* y caribdotoxina, considerando los carbonos alfa (CA) del backbone de todo lo que corresponde a proteína.



**Figura 14: Gráfico RMSD versus tiempo de equilibrado (~60 ns).**

El sistema fue sometido a una serie de restricciones posicionales durante los primeros 8 ns de simulación, las que paulatinamente fueron liberadas otorgándole mayor grado de libertad (Figura 14) y luego, fueron establecidas una serie de restricciones armónicas (*colvars*) con el objetivo de reproducir el bloqueo de caribdotoxina sobre el canal durante ~50 ns. Finalmente, tras liberar el sistema por completo se observa que después de ~60 ns el sistema alcanza un plató en los valores de RMSD, pues desde el promedio de RMSD en esa sección de tiempo, solo existen variaciones en el rango de 1 Å, lo cual asegura que la estructura de la proteína alcanzó un equilibrio conformacional, lo que asegura una estructura suficientemente estable para iniciar estudios de aplicación de voltaje.

## 5.2. Análisis comparativo de los sistemas utilizando distintos voltajes

### 5.2.1. Dinámicas moleculares utilizando 0.5 y 1 V

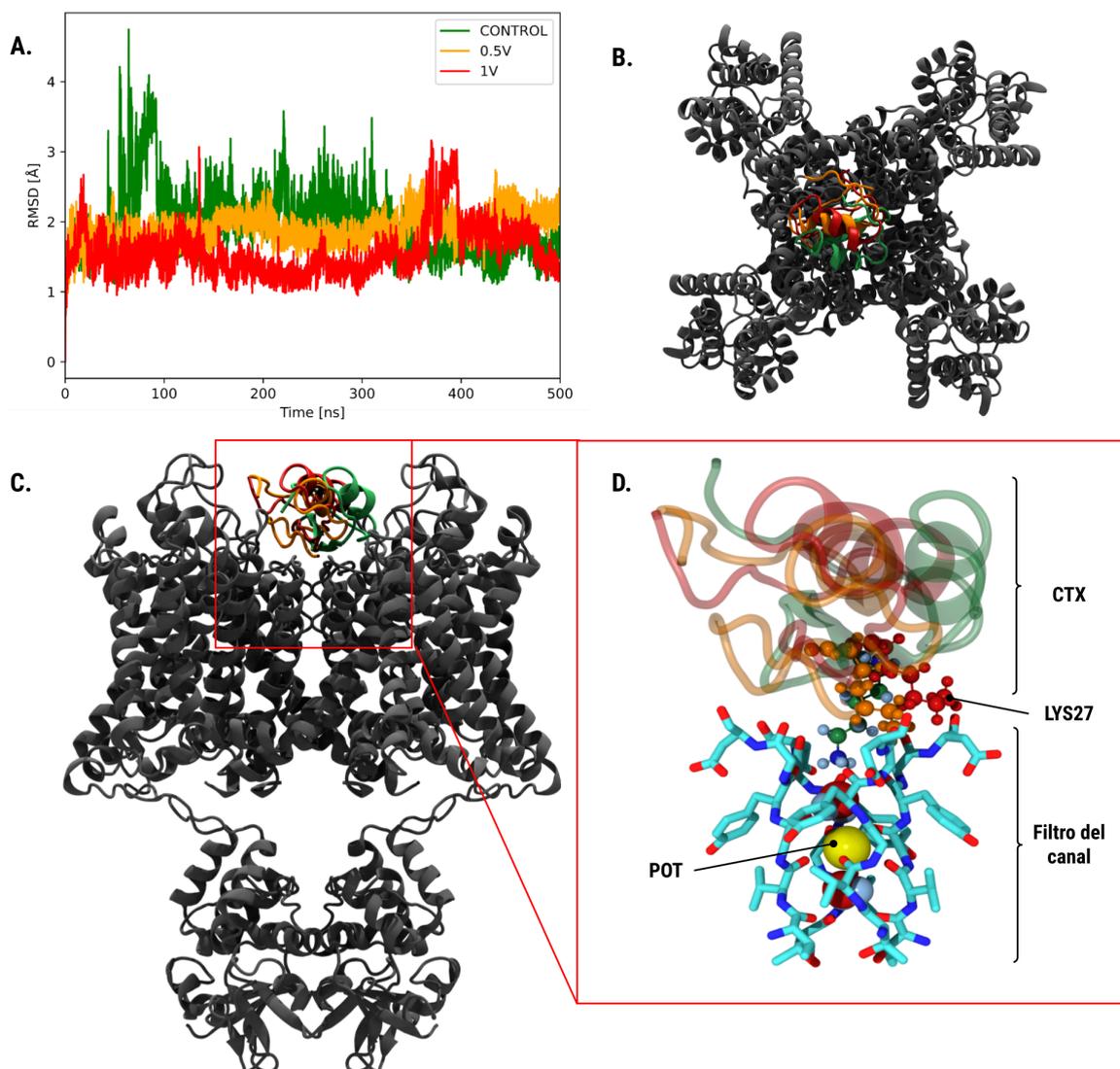
Tras aplicar voltaje de 0.5 V por un periodo de 500 ns fue posible observar que la toxina no sufría mayores perturbaciones estructurales, lo cual no se diferenciaba del mismo sistema sometido a 1 V. Posteriormente, se realizaron análisis de RMSD (Figura 15A) con el objetivo de comparar cambios estructurales en el *backbone* de caribdotoxina en función del tiempo y, por lo tanto, generados por la aplicación de voltaje. La desviación estándar de la variación de RMSD a lo largo de 500 ns para el sistema con 0.5 V fue de ~0.179 Å y para 1 V de 0.40 Å aproximadamente, lo cual sugiere un grado de perturbación levemente superior sobre la estructura del canal cuando el voltaje aplicado es mayor. Sin embargo, la diferencia no es

suficiente para ser considerada una alteración estructural importante. Es más, al comparar ambos casos con el sistema control ( $V = 0$ ), pareciera que la liberación de las restricciones armónicas tiene mayor influencia sobre el sistema que la aplicación de voltaje, pues tanto la desviación estándar ( $0.416 \text{ \AA}$ ) como el promedio de la variación de RMSD a  $0 \text{ V}$  es superior a los obtenidos a  $0.5$  y  $1 \text{ V}$  (Figura 15 A) al menos durante los primeros  $300 \text{ ns}$  de simulación luego de liberar por completo al sistema.

Sumado a lo anterior, si se observan las Figuras 15B y 15C, es posible apreciar que en ambos casos la posición que adopta caribdotoxina (en rojo) respecto de la conformación inicial (en verde) es distinta y varía dependiendo del voltaje utilizado: ambas estructuras rotan y se elevan desde el punto de partida, pero es a  $1 \text{ V}$  en donde la estructura presenta mayor variación respecto de la posición inicial, presumiblemente porque la fuerza que ejerce el campo eléctrico externo sobre el sistema es mayor, lo cual replica lo observado por Moldenhauer et. al el 2019 a  $100$  y  $500 \text{ mV}$ .

En particular, el residuo K27 en caribdotoxina, crítico en el bloqueo del canal, luego de  $500 \text{ ns}$  de dinámica molecular a  $1 \text{ V}$ , abandonó por completo su posición inicial en el sitio S1 de unión a iones e interactúa con D375, a una distancia de  $\sim 8 \text{ \AA}$  desde el punto inicial de la K27. Por otro lado, en  $0.5 \text{ V}$ , K27 aún no abandona por completo el filtro del canal luego de  $\sim 20 \text{ ns}$ , pero sí deja de ocluir (Figura 15D).

En consecuencia a la estabilidad y sobre todo, la baja tasa de cambio estructural y posicional de caribdotoxina en el sistema sometido a  $0.5 \text{ V}$  se determinó que, si bien, existen eventos de “*wobbling*”, estos no parecen ajustarse al objetivo de acelerar eventos de disociación del complejo CTX/*Shaker*. Es por ello que, para aprovechar recursos computacionales se determinó sólo la extensión del sistema sometido a  $1 \text{ V}$ , sin antes implementar 3 réplicas para ambos voltajes con el objetivo de obtener mayor muestreo de eventos de contacto de los pares críticos en la unión del sistema CTX/*Shaker* en ambos voltajes y, en paralelo estudiar la incidencia de aplicar voltajes cercanos a  $2 \text{ V}$ .



**Figura 15: Análisis estructural de caribdotoxina aplicando 0, 0.5 y 1 volt.** (A) Gráfico de la variación de RMSD del backbone del péptido a lo largo de 500ns. (B) Vista superior y (C) frontal del complejo proteico: en verde, el primer frame después del periodo de equilibrado; en rojo, el sistema sometido a 1V y, en naranja, a 0.5V. (D) Filtro del canal representado en licorice junto a un ion de potasio y dos moléculas de agua (configuración inicial), además de K27 en representación CPK coloreadas según el voltaje utilizado.

### 5.2.2. Aplicación de voltajes cercanos a 2V

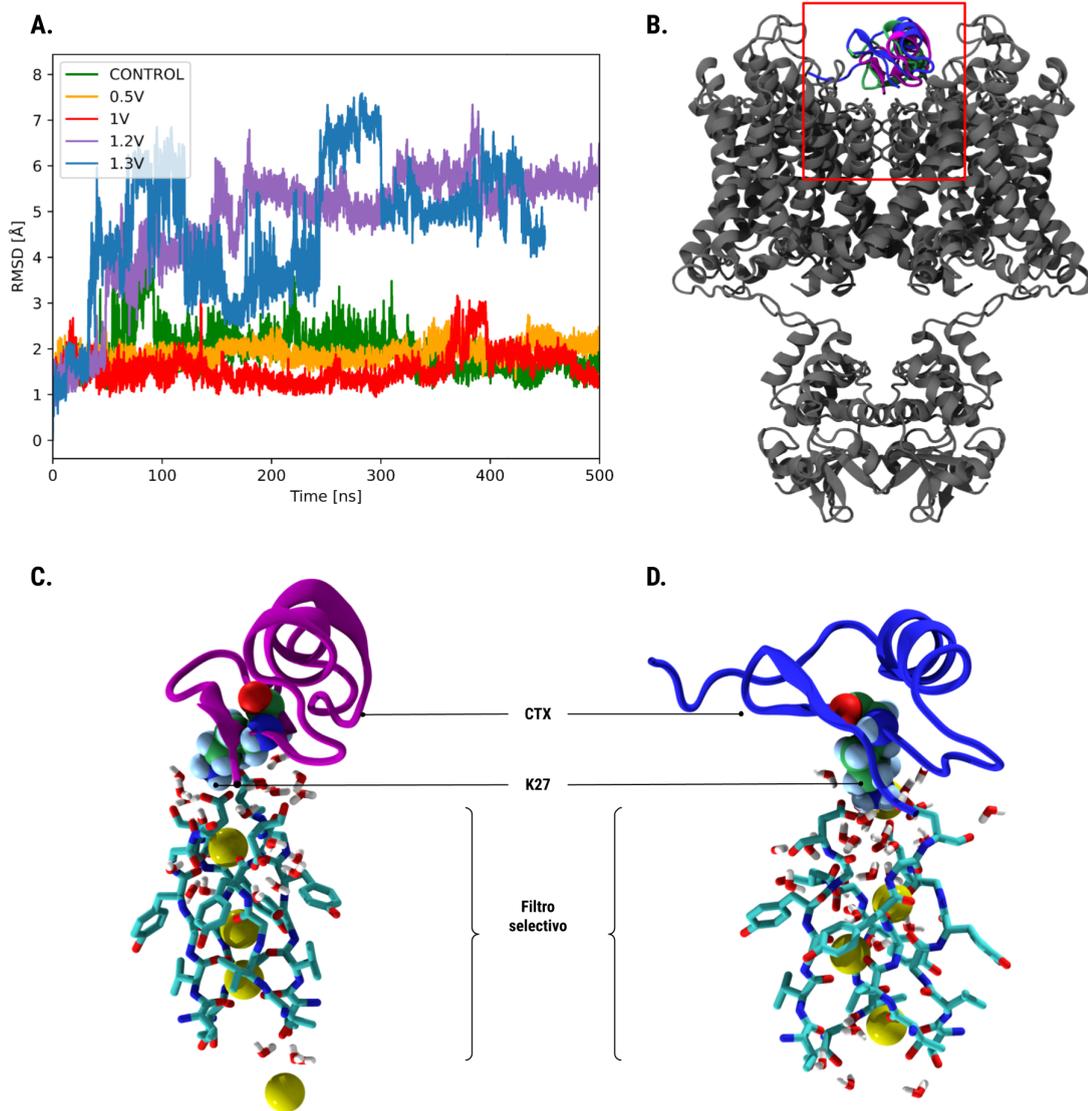
Con el objetivo de acelerar la inducción de eventos de disociación del complejo CTX/Shaker, se implementó un sistema sometido a 2 V; un voltaje significativamente superior a los utilizados *in vivo* o *in vitro* y, además, completamente inalcanzables para ensayos experimentales. Sin embargo, las dinámicas generadas no permiten realizar análisis alguno pues, siguiendo las configuraciones descritas en el protocolo propuesto, el sistema colapsó estructuralmente tras aproximadamente 50 ns. En este sentido, algunos de los elementos más relevantes al utilizar

voltajes dentro del rango de 1.4 a 2 V son: (1) la membrana lipídica se deforma y pierde secciones de lípidos, (2) el filtro del canal pierde su estructura por el ingreso de aguas desde el espacio extracelular, inactivando el canal y (3) si bien, cuando el voltaje es menor el tiempo de simulación podría extenderse, las dinámicas no contribuyen a la obtención de datos de eventos de disociación para los análisis deseados.

Considerando las condiciones antes propuestas para voltajes extremadamente altos, fue posible implementar un sistema con voltaje de magnitud 1.2 que pudo extenderse alrededor de 700 ns y también otro de 1.3 V con dinámicas de menor duración (350 ns). Esto con el objetivo de ilustrar cómo afecta el cambio de magnitud del campo eléctrico al sistema y, sobre todo, en las interacciones entre caribdotoxina y la superficie extracelular de *Shaker*.

Al igual que con los voltajes descritos en la subsección anterior, la variación de RMSD fue analizada para caracterizar los cambios estructurales en el *backbone* de caribdotoxina tras 500 ns de aplicación de voltaje (excepto para el sistema de 1.3V, en donde se analizó lo que ocurría luego de 350 ns), utilizando como referencia la toxina tras el término del equilibrado. De ello fue posible extraer que, en contraste con la variación estructural observada en la Figura 15A, el cambio promedio en RMSD para voltaje superiores a 1 V fue cinco veces mayor a las simulaciones a 0.5 y 1 V, alcanzando una media de  $\sim 5.39$  Å en 1.2 V y  $\sim 5.09$  Å en 1.3 (Figura 16A). Sumado a esto, en el gráfico (Figura 16A) se puede observar un cambio abrupto en la estructura de caribdotoxina cerca de los 50 ns de simulación, en donde el RMSD pasa de un valor aproximado de 2 Å a un peak de 4-5 Å (Figura 16C y 16D).

Ahora, también es posible apreciar que con voltajes altos y, considerando el protocolo de simulación propuesto, el *backbone* de caribdotoxina no logra estabilizarse por completo. Es más, a 1.3 V presenta variaciones de  $\pm 2$  Å a lo largo de toda la trayectoria, lo que podría sugerir que, debido al voltaje y el escape de iones de potasio (elemento que será mencionado en secciones posteriores) la toxina no logra estabilizarse sobre la superficie extracelular del canal y, por ende, es muy probable que el complejo proteína-proteína se disocie con mayor seguridad que con 0.5 y 1 V en tiempos de simulación más cortos pero, con el costo antes mencionado. Además, el análisis estructural reveló que a 1.2 y 1.3 V caribdotoxina se eleva desde el filtro selectivo en *Shaker* (Figura 16B) y rota respecto de la conformación inicial. En particular, a 1.3 V en la estructura de la toxina (Figura 16D) parecen romperse interacciones intramoleculares y por ello, residuos ubicados en los extremos de caribdotoxina logran explorar zonas que no estaban dentro de la superficie inicial de interacción con *Shaker*. Junto a esto, se observa que la estructura del filtro selectivo de la proteína transmembrana es especialmente afectado por la magnitud de campo eléctrico y el ingreso de moléculas de agua detrás del filtro (Figuras 16C y 16D), como consecuencia la estructura del filtro colapsa y se inactiva (Xu & McDermott, 2019; Mironenko et al., 2021).



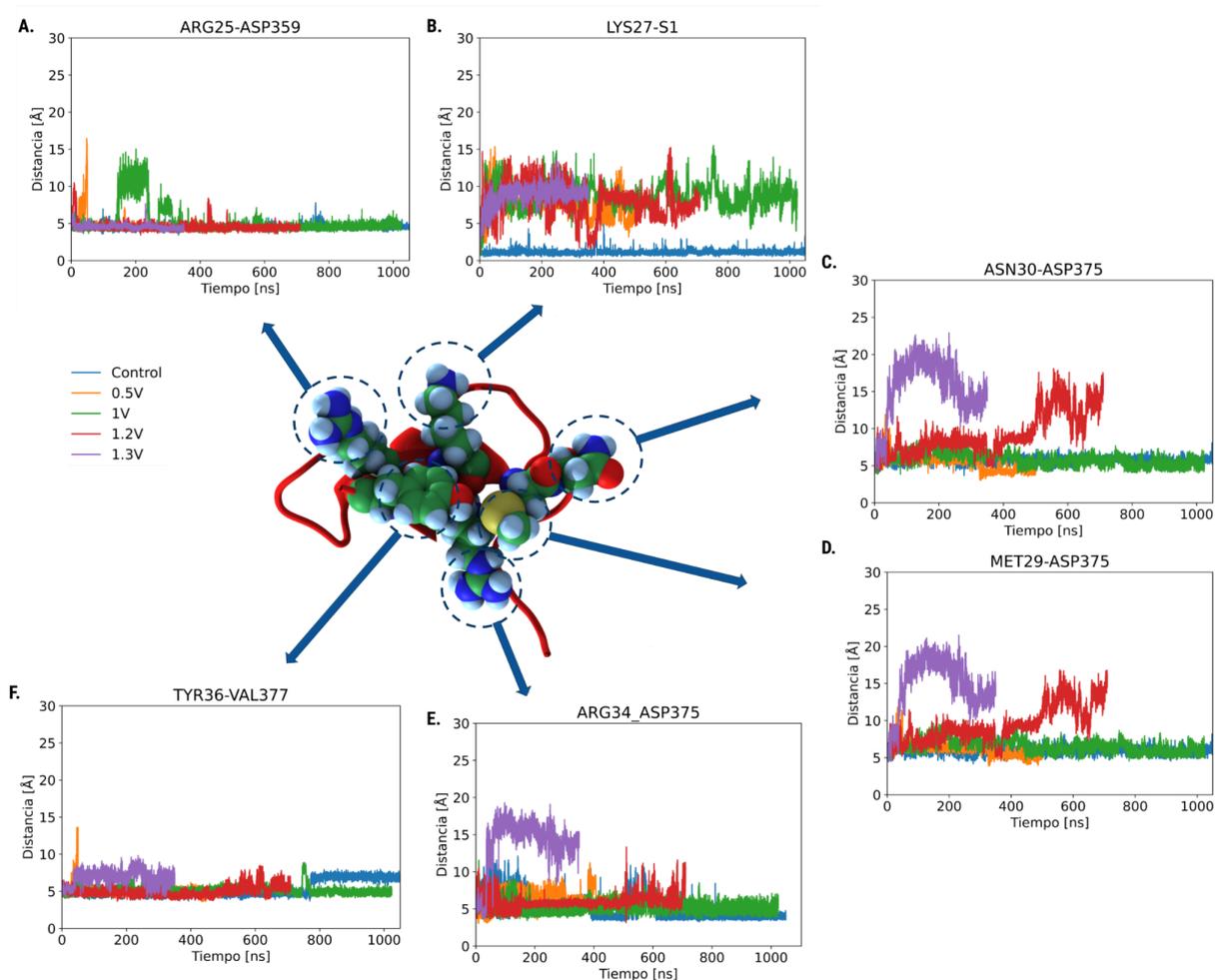
**Figura 16: Análisis estructural de caribdotoxina aplicando 1.2 y 1.3 V.** (A) Gráfico de la variación de RMSD del backbone del péptido a lo largo de ~500ns. (B) Vista frontal del complejo proteico: en verde, el primer frame después del periodo de equilibrado; en morado, el sistema sometido a 1.2 V y, en azul, a 1.3 V. (C) y (D) Filtro del canal a 1.2 y 1.3 V, respectivamente, representado en licorice junto a iones de potasio, además de K27 en representación Van der Waals.

### 5.2.3. Despegue de caribdotoxina desde el poro del canal

Goldstein (1994) definió una serie de 5 residuos que son considerados críticos en el acople de caribdotoxina y el canal *Shaker*: K27, R34, M29, Y36 y N30. Esto, principalmente, porque establecen contacto directo con el canal. En consecuencia, en el presente proyecto son estos residuos a los que se les dió especial importancia en los análisis relacionados con eventos de disociación, ubicándolos como principal objeto de estudio.

En este sentido, posterior al análisis estructural de caribdotoxina, fue estudiado el comportamiento de los residuos críticos a distintos voltajes con respecto a su contraparte en *Shaker*, según lo descrito por Banerjee et al. (2013) (Tabla 1), se reconocieron 3 grupos:

- **K27-S1** que, independiente del voltaje utilizado, se disocia casi inmediatamente con la aplicación de potencial eléctrico y, si bien, hay puntos en los que parece acercarse a su posición inicial, no logra conseguirlo. Presumiblemente porque la fuerza y energía de interacción es menor que aquella que mueve a los iones de potasio por el filtro del canal.
- **M29-D375, N30-D375 y R34-D375** que, con 0.5 y 1 V no parecen disociarse aún después de 700 ns, pero sí lo hacen cuando se implementan voltajes de mayor magnitud. En particular, R34-D375 se separó sólo con 1.3V.
- **Y36-V377**, este par no se disocia de manera definitiva con los voltajes utilizados, más bien presenta un comportamiento que oscila acercándose y alejándose de su contraparte.



**Figura 17: Comportamiento pares críticos en unión del complejo a voltajes: 0 (Control - azul), 0.5 (naranja), 1 (verde), 1.2 (rojo) y 1.3 (morado) V.** Gráficos de distancia versus tiempo de los pares críticos en la interacción CTX-Shaker.

Si bien fueron descritos 5 residuos críticos en la unión del complejo, en las simulaciones realizadas en este proyecto se incluyó en el análisis el residuo R25 en caribdotoxina, el cual mostró características interesantes a lo largo de la simulación molecular con aplicación de voltaje (Figura 17A). R25 se mantuvo cercano a su par en *Shaker* (D359) independiente del voltaje utilizado, lo que podría indicar que, a pesar de que un aminoácido podría ser considerado crítico en la unión del complejo toxina-canal, cuando se aplica potencial eléctrico en este tipo de sistemas, la clasificación de su “relevancia” podría cambiar.

Considerando lo anterior, también está el caso de K27, un residuo que en múltiples investigaciones ha sido señalado como clave para el bloqueo que establece caribdotoxina sobre canales de potasio dependientes de voltaje y que, en situaciones que no impliquen la presencia de campo eléctrico, continuará ocluyendo el canal (Figura 17B - Control). Sin embargo, apenas inicia la aplicación de voltaje, se disocia provocando el quiebre del estado hermético del bloqueo permitiendo la salida de iones de potasio desde el canal hacia el espacio extracelular.

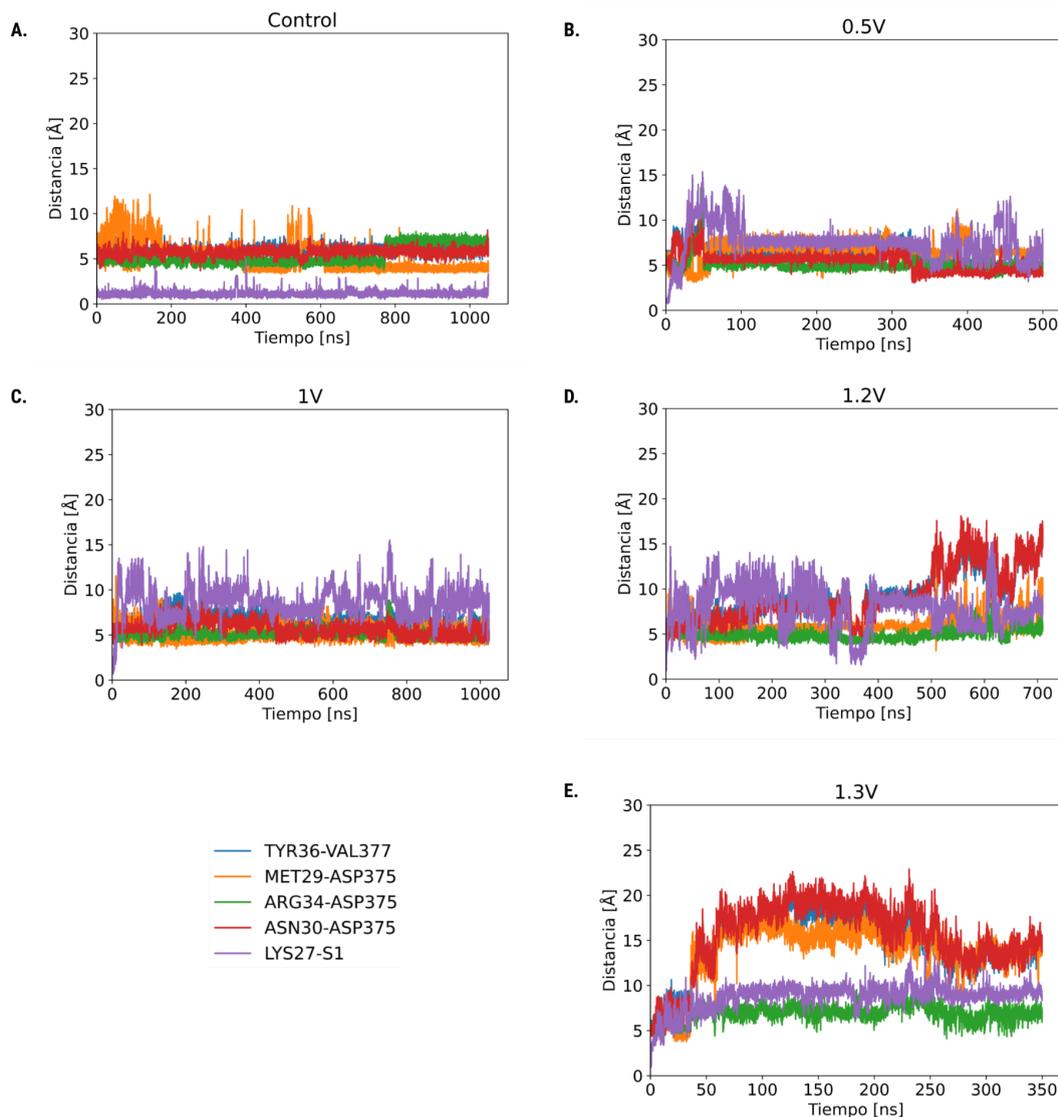
### 5.2.3.1. Distancias entre pares críticos versus el voltaje

Pese a analizar la situación por par según el voltaje aplicado, la comparativa de los cinco residuos críticos y su respectivo par contra los voltajes utilizados permite obtener un panorama general sobre cómo se comportan en conjunto, para posteriormente establecer posibles rutas de disociación.

Considerando la Figura 18 es posible establecer que en las dinámicas con 0.5 y 1 V el comportamiento de los pares es oscilatorio además, al confirmar visualmente, no pareciera que la toxina se desprenda del canal. Al menos no por completo pues, a voltajes bajos es sólo K27 el residuo que se separa de su contraparte en la proteína transmembrana (Figura 18B y 18C). Sólo con la información que entregan estas simulaciones es difícil establecer una ruta clara de disociación puesto que aún aplicando un campo eléctrico externo los residuos conservan el comportamiento del sistema control ( $V = 0$ ) (Figura 18A).

Ahora bien, el panorama es distinto en las simulaciones con 1.2 y 1.3 V en donde es claro que una parte de caribdotoxina se disocia alrededor de los 50 ns, quedando sólo el contacto de algunos pares como: R34-D375 y Y36-V377 en 1.2 V y sólo, R34-D375 en 1.3 V. Este análisis da luces de pares que podrían ser relevantes en el proceso de disociación de caribdotoxina pues independiente del voltaje utilizado se mantienen en contacto.

En general, en todas las condiciones de voltaje analizadas se puede apreciar el *wobbling* de la toxina sobre el canal según lo planteado por Moldenhauer et al. (2019), sin embargo, dependiendo del voltaje, la velocidad en la que ocurre la disociación cambia: es mucho más rápida al utilizar voltajes superiores a 1V y, por otro lado, es más factible observar el tambaleo a voltajes inferiores. Además, voltajes excesivamente altos podrían mostrar artefactos durante el proceso de disociación al afectar estructuralmente a ambas proteínas (Figura 16C y 16D) como a otros elementos en el sistema, tal como la pérdida de segmentos de la membrana lipídica.



**Figura 18: Distancias entre residuos críticos en CTX y su respectivo par en Shaker en distintas condiciones de voltaje.** Gráfico de distancia versus tiempo utilizando voltaje como referencia para evaluar el comportamiento de los pares críticos en conjunto.

### 5.3. Transiciones, cálculos de energía e interacciones que determinan el bloqueo

Si bien, con 1.2 y 1.3 V fue posible observar que la toxina se “eleva” desde su posición inicial y deja de ocluir el filtro del canal alrededor de los 50 ns, la cinética que sigue este proceso no permite cuantificar representativamente los eventos previos de pegado y despegado de los pares estudiados y, en consecuencia, el cálculo de la probabilidad de estar en un estado u otro no permite estimar la energía basada en la distribución de Boltzmann. Lo anterior sin considerar también el costo estructural de utilizar voltajes extremadamente altos. Es por ello, que para los cálculos posteriores fueron utilizadas las dinámicas a 0.5 y 1 V y no se realizaron análisis adicionales en las simulaciones de 1.2 y 1.3V.

En primer lugar, fue calculado el umbral que permite determinar si existe el contacto efectivo o no (estados 1 o 0, respectivamente) entre los pares críticos, en base al promedio de las distancias de la simulación del complejo control ( $V=0$ ) más una desviación estándar, excepto para K27-S1, en donde se consideró sólo el promedio de la distancia de este par a 0 V (Tabla 2).

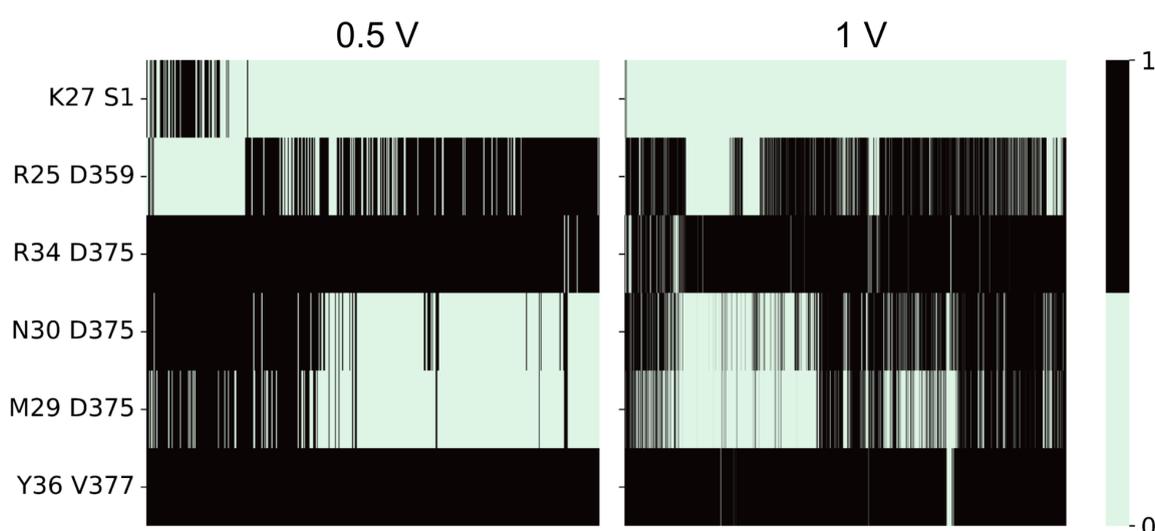
**Tabla 2: Umbral calculado para cada par.** Las distancias representan el límite para considerar que cada par se encuentra en un estado de contacto (estado 1) o disociado (estado 0).

Par	Y36-V377	M29-D375	N30-D375	R34-D375	R25-D359	K27-S1
Umbral [Å]	6.338	6.310	6.053	6.733	4.772	1.115

Utilizando el límite de contacto para cada par se desarrolló un script que permite calcular la probabilidad de encontrarse en cada estado a cada paso de simulación. Así, fue posible obtener un historial de transiciones (Figura 19) que permite a su vez, determinar la probabilidad de encontrar un par despegado o pegado.

El análisis de transición permitió también, establecer la frecuencia y tiempo de interacción, determinando que los pares que mayoritariamente se mantienen dentro del umbral de contacto son R34 y Y36 por sobre R25, M29 y N30. Confirmando la suposición de que R34-D375 junto a Y36-V377 podrían ser claves para la disociación de caribdotoxina ya que, de los residuos críticos, son los que menor número de transiciones entre estados realizan y se mantienen unidos a su contraparte en *Shaker*, independiente del voltaje utilizado.

Por otro lado, de acuerdo con la Figura 19, es posible plantear que a 1 V, uno de los primeros sucesos en el *wobbling* es la disociación de K27 y luego, los demás residuos comienzan a transicionar entre estados de despegue y pegado. Sin embargo, la tasa de error para proponer este supuesto es alta si se considera que para efectos del proyecto se utilizaron sólo 3 réplicas por condición de voltaje.



**Figura 19: Heatmap de las transiciones entre contacto y desacople de pares.** En negro, contacto o estado 1 y verde, despegue o estado 0. El eje X corresponde al tiempo de simulación.

En conjunto, esta información (Figura 19) permite complementar y confirmar que, al implementar simulaciones con 0.5 y 1 V no se observa la disociación de la toxina en ninguno de los casos pero, al lograr inducir el *wobbling* estas condiciones sí consiguen aumentar el muestreo de eventos de transición (retratado en las múltiples transiciones entre estados 0 y 1, en la Figura 19) previos a la disociación de caribdotoxina y con ello, efectuar el cálculo de probabilidades y energías con mayor precisión.

### 5.3.1. Cálculo de energía para 0.5 y 1V

Tras recopilar las transiciones para cada par, se calculó la diferencia de energía entre estados utilizando la relación de Boltzmann que, para los efectos de este proyecto, permite obtener el cambio energético de la transición de contacto entre los residuos que interactúan en la interfaz toxina-canal y así, el valor de  $\Delta G$  obtenido para cada par representa la afinidad por el contacto analizados a una magnitud de voltaje específica (en este caso 0.5 y 1 V).

$$\Delta G_{AB} = -k_B T \log \frac{P_{Binding}}{P_{Unbinding}}$$

**Tabla 3: Cálculo de energía para 0.5 y 1 V basado en probabilidades.** El cálculo considera tres réplicas para cada condición de voltaje.

Pares	0.5V (~600 ns)		1V (~1000 ns)	
	$P_{binding}/P_{unbinding}$	$\Delta G$ [kcal/mol]	$P_{binding}/P_{unbinding}$	$\Delta G$ [kcal/mol]
Y36-V377	65.3596	-2.5497	2.3736	-0.5272
M29-D375	1.0183	-0.0111	0.1532	1.1444
N30-D375	1.2798	-0.1505	0.2327	0.8892
R34-D375	10.9699	-1,4610	1.9193	-0.3977
R25-D359	4.6290	-0.9347	1.5623	-0.2722
K27-S1	0.0359	2.0290	0.0015	3.9647

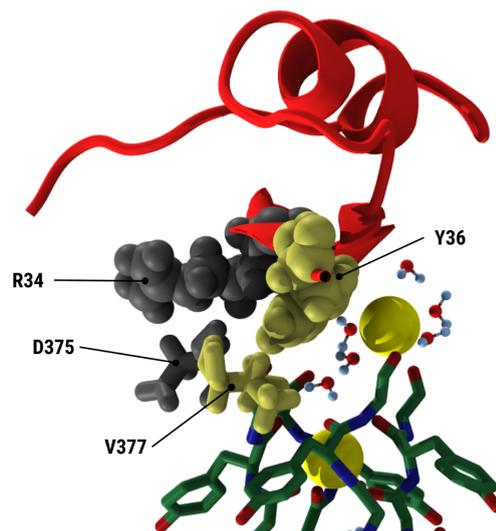
Los valores de  $\Delta G$  en Tabla 3 son consecuentes con los datos obtenidos a lo largo del desarrollo del proyecto; aquellos pares que presentan mayor afinidad energética son Y36-V377 y R34-D375 en 0.5 y 1 V. Ambos son residuos que, como ya ha sido mencionado, se mantienen unidos independiente del voltaje utilizado.

Ha sido reportado ampliamente que K27-S1 es un par que en principio interactúa mediante la coordinación de 4 puentes de hidrógeno entre el grupo amino en K27 y los oxígenos de los grupos carbonilo en Y445 de cada una de las cadenas de *Shaker* ocupando así, un lugar de coordinación a iones de  $K^+$  (S1) (Banerjee et al., 2013); de esta forma el filtro del canal es

ocluido estérica y electrostáticamente. Ahora bien, la situación cambia al aplicar campo eléctrico externo sobre el sistema: en todas las condiciones de voltaje analizadas K27 se distancia del sitio S1 debido a la ocupación por parte de iones  $K^+$ . De ahí que la variación de energía presente valores de 2.03 y 3.96 kcal/mol; existe una baja probabilidad de encontrar a este par en contacto a 0.5 y aún más a 1 V.

En relación a este punto, la naturaleza electrostática de las superficies proteicas que interactúan en la interfaz toxina-canal contribuye a la unión del complejo caribdotoxina/*Shaker* (Park & Miller, 1992). Sin embargo, las interacciones que establecen los residuos críticos en caribdotoxina frente a distintas condiciones de voltaje parece cambiar esta afinidad y por ejemplo, el comportamiento de los residuos que podrían establecer interacciones electrostáticas (K27-S1, R34-D375, R25-D359) no es uniforme: K27 es el primer y único residuo que se distancia de su contraparte en todas las condiciones de voltaje analizadas, pero R34 mantiene su interacción con D375 en *Shaker* independiente de la condición utilizada, lo que podría ser consecuencia de la una posible competitividad entre K27 y los iones de  $K^+$  que son empujados por el campo eléctrico por la ocupación del sitio S1, pues R34 Y R25 no se enfrentan a esta situación.

Por otra parte, Y36, un residuo hidrófobo, también descrito como un elemento importante en el acople de caribdotoxina a canales de potasio dependientes de voltaje, a pesar de interactuar con otro residuo hidrófobo (V377), parece ser un elemento importante en la mantención del bloqueo de caribdotoxina frente a la implementación de campo eléctrico pues a distintos voltajes, la interacción mostró más fuerza que incluso aquellas que se dan entre residuos cargados.



**Figura 20: Residuos críticos en caribdotoxina que podrían ser determinantes en el proceso de disociación.** En gris R34-D375 y en ocre, Y36-V377.

En esta línea, es posible sugerir que las interacciones con mayor influencia en el bloqueo son Y36-V377 y R34-D375 y, si se asume que al romper todas las interacciones que involucran los cinco residuos críticos descritos por Goldstein (1994) la toxina se disociará, podría suceder que al impedir la interacción hidrofóbica entre Y36 y V377 (Figura 20) o bien, la interacción

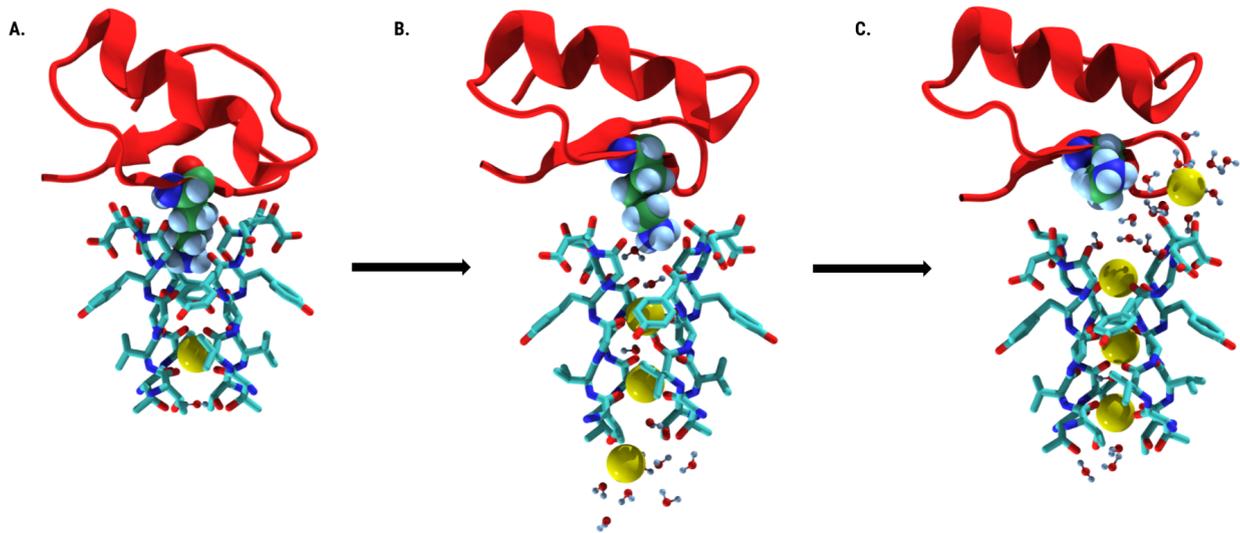
electrostática entre R34 y D375 (Figura 20), forzándolas a la separación, caribdotoxina podría despegar de la superficie extracelular del canal si se implementa un campo eléctrico como los utilizados en el proyecto. Por supuesto, este planeamiento es simplista pues se debe reiterar que podrían existir otros residuos en CTX, como R25 (Figura 17A), que impidan el desacople y, además, el número de réplicas utilizadas tampoco permite afirmar de manera tajante estos supuestos.

Por último, mencionar que, si bien los valores energéticos obtenidos son consecuentes con la cinética de la toxina en todas las condiciones analizadas aún queda una interrogante: ¿qué tan precisos son estos cálculos? Determinar el error de las estimaciones realizadas es un factor crucial para darle veracidad al cambio de energía entre los residuos estudiados. Además, el planteamiento de los cálculos energéticos basados en la relación de Boltzmann asume la independencia entre los eventos, sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede afirmar de manera absoluta que esto sea así. En esta línea, se propone aumentar el número de réplicas con el objetivo de que los cálculos energéticos logren convergencia pues, en principio, tres por sistema y el tiempo de simulación ejecutado no parecen ser suficiente y también, analizar la posible correlación entre pares de residuos que interactúan en la interfaz toxina-canal.

#### 5.4. Eventos de permeación

Conforme se realizó el análisis de la dinámica de disociación del complejo CTX/*Shaker* a 0.5, 1, 1.2 y 1.3 V se observaron eventos de permeación de iones de  $K^+$  aun cuando caribdotoxina mantenía contacto con *Shaker*. Este suceso no ha sido reportado como tal, al contrario, las toxinas han sido utilizadas para bloquear corrientes o bien, caracterizar estados cerrados en canales iónicos (Soler-Llavina et al., 2003). Por lo que cuantificar y describir la permeación de iones de  $K^+$  en un estado “semi-bloqueado” de *Shaker* podría contribuir a un nuevo entendimiento respecto del uso de voltajes altos y toxinas para estudiar canales iónicos.

En todas las condiciones de voltaje analizadas, el suceso que gatilla el primer evento de permeación de iones de  $K^+$  hacia el espacio extracelular es la desocupación del sitio S1 como consecuencia del inicio del *wobbling* de caribdotoxina (Figura 21): el campo eléctrico empuja los iones de  $K^+$  que se encuentran inicialmente en el filtro del canal y desestabiliza por repulsión electrostática a caribdotoxina, tal y como fue descrito por Mackinnon & Miller (1988). De esta manera, se rompen los enlaces de hidrógeno que coordinan la interacción entre K27 con Y445 y el sitio S1 puede ser ocupado por iones de  $K^+$  que, posteriormente, producto del mismo campo eléctrico, serán empujados hacia el espacio extracelular. Todo lo anterior, independiente de lo que sucede con el resto de los residuos críticos descritos por Goldstein (1994) en CTX; los pares que interactúan en la superficie toxina-canal mantienen su dinámica de pegado-despegado a pesar de la disociación de K27.



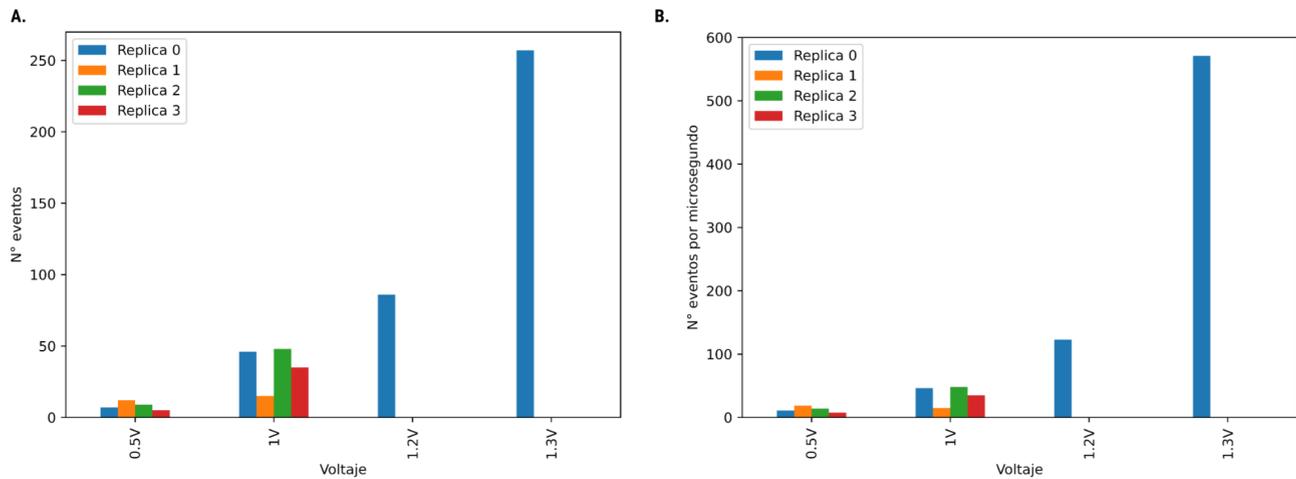
**Figura 21: Desocupación del sitio S1.** (A) K27 interactúa con el sitio S1 y bloquea el paso de iones sin aplicación de campo eléctrico externo. (B) Al implementar potencial eléctrico K27 comienza a abandonar el lugar de coordinación de iones e inmediatamente se aproxima un ion de potasio desde el espacio intracelular hacia el filtro selectivo. (C) Cuando K27 deja el sitio S1, el campo eléctrico empuja a las moléculas que se encuentran en el filtro del canal y, en consecuencia, hay eventos de permeación de iones.

Con el objetivo de comprender el efecto de diferentes magnitudes de campo eléctrico sobre los eventos de permeación, se realizó un conteo del número de iones que salía desde el filtro del canal independiente de la duración de las simulaciones. Como es posible observar en la Figura 22A y Tabla 4, a medida que aumenta el voltaje, también aumenta la velocidad en la que ocurren los eventos de permeación y por ende, también el número de iones que pasa por el filtro selectivo hacia el espacio extracelular.

La simulación a 1.3 V tuvo una duración aproximada de 350 ns y, a pesar de ello, la velocidad con la que ocurre la permeación de iones es un poco más de 734 ion/ $\mu$ s, más de 7 veces la tasa de transporte de iones en canales de potasio, ya que, en condiciones fisiológicas, son de aproximadamente 100 iones cada 1  $\mu$ s (Mironenko et al., 2021). A 1.2 V el número de eventos es similar a un canal abierto, la diferencia se aproxima a 20 iones. Tanto 1.3 como 1.2 V podrían no sólo tener impacto estructural, si no también durante el proceso de difusión de iones, pues superan las tasas de difusión de canales desbloqueados, aún cuando caribdotoxina sigue siendo parte del complejo proteína-proteína. A pesar de lo anterior, no se descarta que parte de los eventos de permeación observados a 1.2 y 1.3 V sean artefactos producto del daño estructural o del colapso del filtro selectivo del canal, causado por la aplicación de voltajes tan altos, por ello, no se pueden postular supuestos a partir de los resultados que implican estas condiciones.

Ahora bien, a 0.5 V son 8 iones de  $K^+$  en promedio los que son empujados por el campo eléctrico para abandonar *Shaker* tras  $\sim$ 650 ns de simulación. Este valor difiere de lo que sucede a 1 V en donde, al normalizar con respecto al tiempo (Figura 23B), el número de eventos de permeación aumenta aproximadamente 3 veces con respecto a 0.5 V. La tasa de difusión para estos casos es  $\sim$ 12 y  $\sim$ 36 iones/ $\mu$ s para 0.5 y 1 V, respectivamente. Por tanto, a pesar de que ocurren eventos

de permeación, la velocidad con la que suceden no se acerca a la de un canal abierto, por lo que caribdotoxina o bien, el voltaje, podrían influir en la dinámica que rige la permeación de iones de  $K^+$  aún cuando el sitio S1 se encuentra desocupado por K27.



**Figura 22: Eventos de permeación en distintas condiciones de voltaje. (A) Conteo de los eventos en dinámicas con diferente duración (sin normalizar). (B) Gráfico normalizado a eventos por microsegundo.**

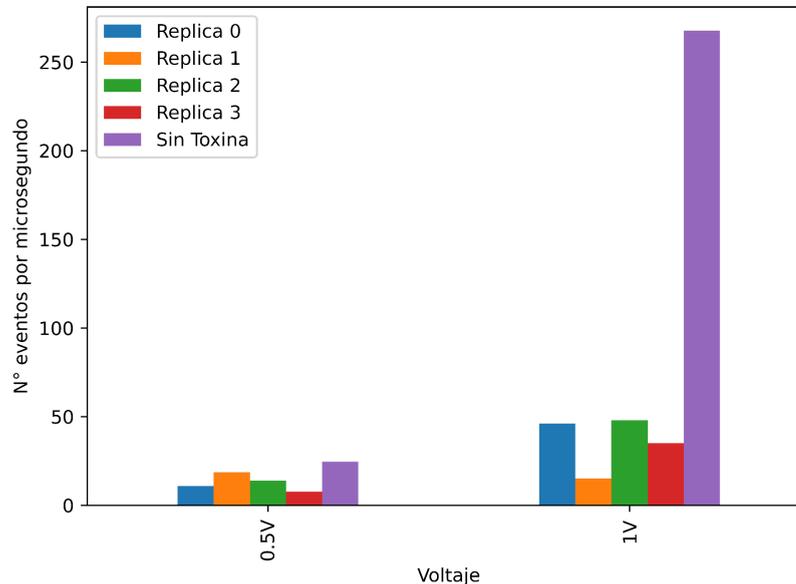
**Tabla 4: Número de eventos de permeación por condición de voltaje con su respectiva duración de simulación y promedio.**

		Tiempo de simulación [ns]	Réplica 0	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
Voltaje [V]	0.5	650	7	12	9	5	8
	1	1000	46	15	48	35	36
	1.2	700	86	-	-	-	86
	1.3	350	257	-	-	-	257

Sumado a los análisis a distinta concentración de sales, para determinar y confirmar si efectivamente existe un “desbloqueo” del canal sin consecuencias sobre la permeación de iones en las condiciones de voltaje propuestas para el proyecto, se implementaron dos sistemas más, ahora sin toxina, a 0.5 y a 1 V, ambos con concentración de 0.15 M de KCl en un tiempo aproximado de 650 ns. Al realizar el conteo de eventos de permeación se obtuvo que una diferencia de más de 10 veces entre los voltajes: a 0.5 V el número de iones que permearon hacia el espacio extracelular en 650 ns fue de sólo 16, por otro lado, a 1 V se obtuvo un total de 174 eventos en el mismo tiempo.

A pesar de que anteriormente fue mencionado que las tasas de difusión del canal “semi-bloqueado”, tanto a 0.5 como a 1 V, no se acercaban a las tasas fisiológicas, cuando se utilizan los voltajes propuestos sobre *Shaker* sin toxina, la diferencia es aún más clara (Figura 23). El canal bloqueado a 1 V, en promedio, difunde 36 iones por microsegundo, en cambio sin

toxina logra permear 267 iones en la misma cantidad de tiempo. Por tanto, aunque el filtro del canal se encuentra desbloqueado, existe una disminución importante en la tasa de difusión de potasio que podría ser atribuible a las interacciones que mantiene caribdotoxina con *Shaker* o bien, al daño estructural que podría causar someter al sistema 1 V durante 1 microsegundo.

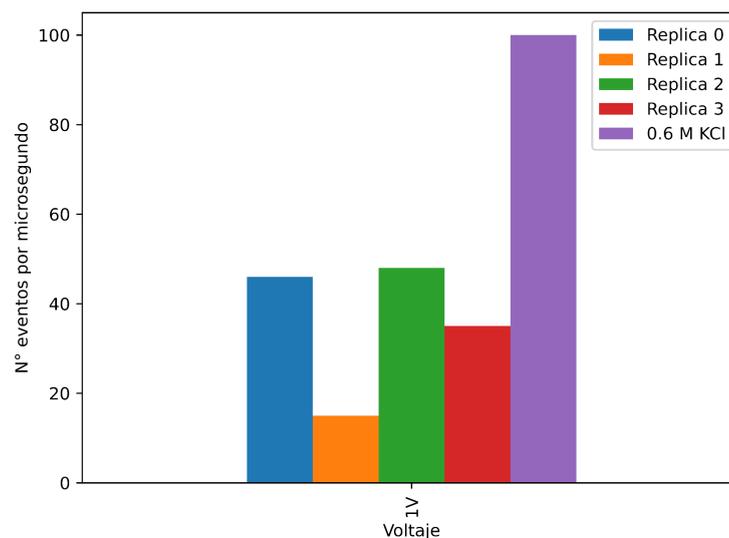


**Figura 23: Efecto de caribdotoxina sobre eventos de permeación por microsegundo.**

Ante el hallazgo de la existencia de eventos de permeación, se implementó una réplica a 1 V pero ahora con 0.6 M de KCl (siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.1.) para verificar el efecto de la concentración de iones de potasio sobre el *wobbling* y también, observar posibles cambios en el número de eventos de permeación respecto de la réplica con 0.15 M de sales (Figura 24).

Los resultados obtenidos indican que, independiente del tiempo de simulación, podría existir una relación directa entre el número de eventos de permeación y la concentración de potasio utilizada, esta nueva condición supera la difusión de todas las réplicas con 0.15 M de KCl. Al aumentar la concentración de sales a 0.6 M en una simulación de ~600 ns, el número de eventos de permeación fue de 60, por tanto, la tasa de difusión a 0.6 M es ~100 ion/ $\mu$ s, bastante superior a los 36 ion/ $\mu$ s a 0.15 M de KCl.

Ahora bien, a pesar de que las condiciones de voltaje planteadas para este proyecto no son viables de utilizar *in vivo* o *in vitro*, sí lo son en metodologías *in silico* con el objetivo de acelerar ciertos sucesos. Aunque en principio se aplicó voltaje para obtener un muestreo mayor de los eventos que involucran al *wobbling* y la posible disociación del complejo CTX/*Shaker*, también ocurre un aumento en el número y velocidad de eventos de permeación de iones de  $K^+$  a medida que aumenta el voltaje y la concentración de KCl, aún cuando caribdotoxina está en contacto con el canal.



**Figura 24: Comparación de réplicas a 1 V con diferente concentración de KCl (normalizado por microsegundo).** En azul, naranja, verde y rojo la concentración de KCl utilizada fue de 0.15 M y en morado, de 0.6 M.

Considerando la información recopilada, se plantea que el efecto del potasio sobre el proceso de disociación tiene relación con impedir el “re-pegado” de K27 al sitio S1 y, por tanto, el bloqueo de caribdotoxina. Además, según lo observado los iones de  $K^+$  y K27 “compiten” por ocupar el mismo sitio pues, siempre que no haya campo eléctrico sobre la membrana, caribdotoxina interactúa con Y445, pero tras algunos nanosegundos el potasio logra romper las interacciones que sujetan a K27 y desplazarla.

## 5.5. Modelado ruta de disociación

Como se ha reportado, los eventos de despegue suceden con muy baja probabilidad por lo que es difícil observarlos y analizarlos. En particular, siguiendo las condiciones estudiadas en este proyecto sólo se logró inducir el *wobbling* de caribdotoxina sobre *Shaker* y estudiarlo con mayor profundidad, más no provocar la disociación del complejo toxina-canal. Sin embargo, aún con estos resultados, es posible estudiar las transiciones que podrían llevar a una posible disociación. Es entonces que a partir de la información recopilada a 0.5 y 1 V se identificaron 24 posibles microestados (Tabla 5) seleccionando 6 pares que interactúan en la interfaz del complejo CTX/*Shaker*: Y36-V377, M29-D375, N30-D375, R34-D375, R25-D359 y K27-S1.

**Tabla 5: Microestados de las trayectorias a 0.5 y 1 V. El número 0 indica que el par no está en contacto y el número 1 que sí lo están.**

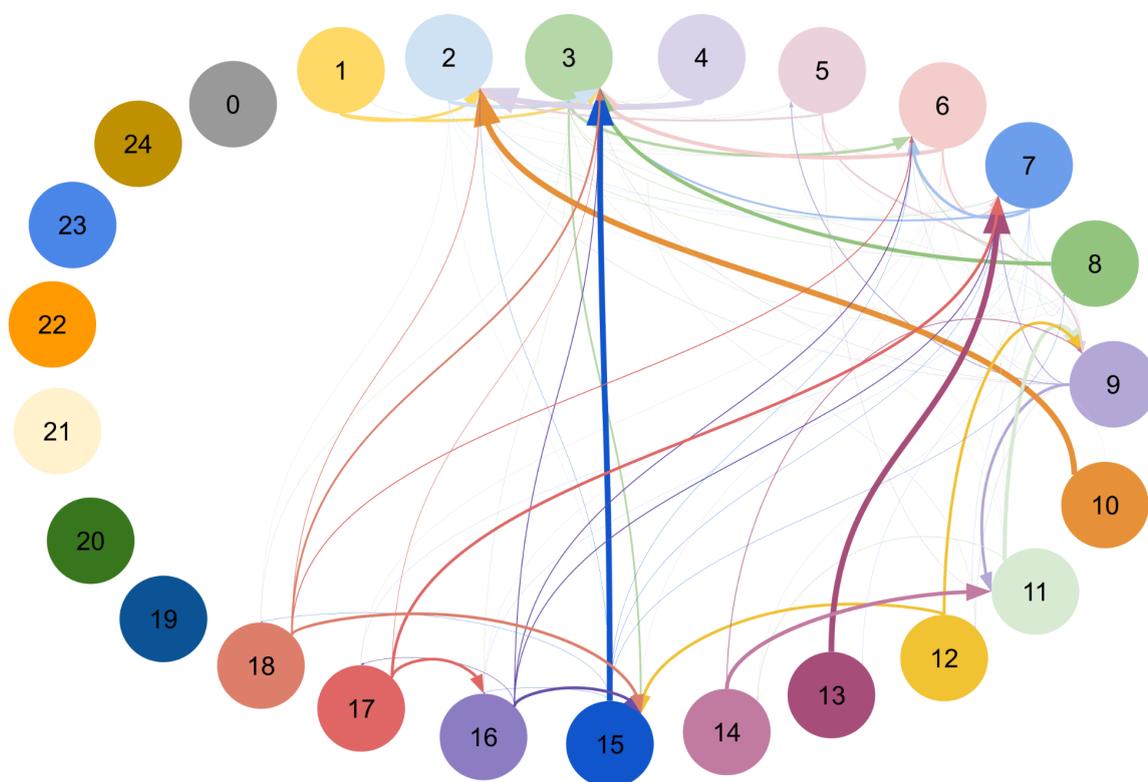
Microestado	Y36-V377	M29-D375	N30-D375	R34-D375	R25-D359	K27-S1
0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0
3	1	1	1	1	1	0
4	1	1	1	1	0	1
5	1	0	1	1	0	0
6	1	0	1	1	1	0
7	1	0	0	1	1	0
8	1	1	0	1	1	0
9	1	0	0	1	0	0
10	1	1	0	1	0	0
11	0	0	0	1	0	0
12	1	0	0	0	0	0
13	0	0	0	1	1	0
14	0	0	1	1	0	0
15	1	1	1	0	1	0
16	1	0	1	0	1	0
17	1	0	0	0	1	0
18	1	1	1	0	0	0
19	1	1	1	0	1	1
20	1	1	0	0	1	0
21	0	0	1	1	1	0
22	0	1	1	1	1	0
23	0	0	1	0	1	0
24	0	0	0	0	1	0

Luego, a partir de cada microestado se determinó la probabilidad de transición a las demás configuraciones, para resumir esta información en grafos (Figura 25 y 26) y visualizar qué tan probable es la transición entre microestados.

En ambos grafos la primera configuración, que corresponde a todos los pares en contacto (Tabla 5), tiende a transicionar con mayor probabilidad a la configuración en donde K27 es el único residuo que no interactúa con su contraparte (microestado 3) o bien, al que tiene a R25 y K27 desacoplados (microestado 2). Esto último se contrapone con la idea de que R25 mantiene su interacción con D359 independiente del voltaje utilizado, pero sí concuerda con la Figura 19, en donde se observa que el par R25-D359 constantemente transiciona entre el acople y el desacople de su interacción.

Otra tendencia entre los microestados es que si Y36 no está en contacto con V377 siempre hay al menos una arginina que sí lo está. Lo mismo ocurre cuando R25 y/o R34 no están en contacto con su par; siempre que pase Y36 sí lo estará. Estas son las interacciones que más se mantienen

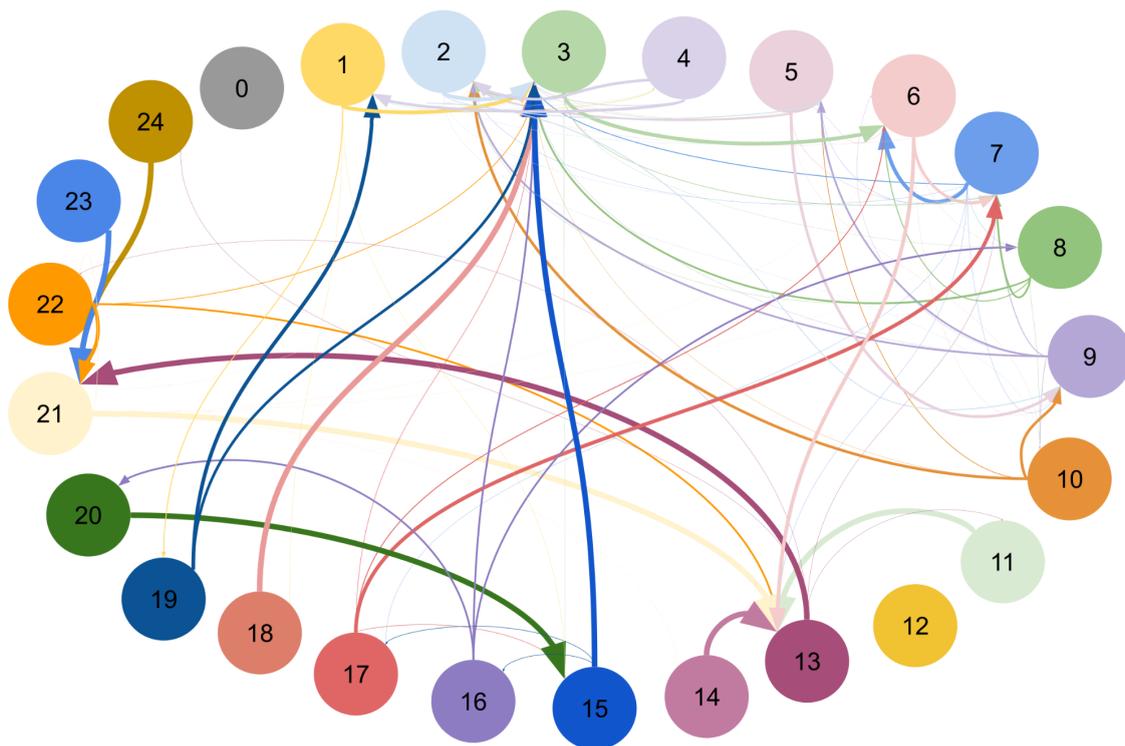
a lo largo de las trayectorias analizadas y, por tanto, podrían ser clave al momento de impedir la disociación del complejo toxina-canal.



**Figura 25: Probabilidades para adoptar cada uno de los microestados a 0.5 V.** Cada nodo representa una configuración de la Tabla 5 y el grosor de las aristas representa, de manera aproximada, la probabilidad de transicionar (flecha) al siguiente nodo.

Respecto de las posibles rutas de disociación, a 0.5 V se observaron alrededor de 2000 transiciones y a 1 V, aproximadamente 6000, dejando en claro la existencia del *wobbling* de la toxina sobre el canal y también, de la existencia de una red de contactos que parecen ser independientes entre sí. Si bien, el tiempo de simulación es diferente, si se extrapolan los datos, el número de transiciones y también de configuraciones probablemente seguiría siendo superior en 1 V como consecuencia de la magnitud del campo eléctrico utilizado y, por tanto, de la mayor inestabilidad provocada sobre el complejo.

En concreto, así como a 0.5 V hay configuraciones que no son adoptadas por los pares analizados, a 1 V nunca se estableció un microestado en donde sólo Y36 fuese el único aminoácido en contacto con su par. Este elemento llama la atención debido a que a 1 V debería existir una mayor probabilidad de desacople que a 0.5 V y, por tanto, el sistema debería adoptar más configuraciones que induzcan a ello y tengan sólo un par en contacto, por ejemplo.



**Figura 26: Probabilidades para adoptar cada uno de los microestados a 1 V.** Cada nodo representa una configuración de la Tabla 5 y el grosor de las aristas representa, de manera aproximada, la probabilidad de transicionar (flecha) al siguiente nodo.

Considerando la información recopilada, se puede afirmar que la disociación K27-S1 es el primer evento del *wobbling* y, por tanto, el primer paso en la ruta de desacople del complejo toxina-canal en estudio. El siguiente paso podría corresponder a M29 o a N30, independiente del voltaje utilizado pero es complejo determinar cuál de los aminoácidos restantes continúa en la ruta: Y36, R34 y R25 tienden más bien a mantener su interacción con el canal y no a la disociación bajo las condiciones analizadas. A pesar de ello, es claro que a distintos voltajes las configuraciones que prefiere caribdotoxina difieren, entonces, el potencial eléctrico utilizado podría favorecer ciertas rutas de disociación y también, un mayor número de microestados a medida que el voltaje aumenta. Este planteamiento es consistente con lo propuesto durante el proyecto pues, cuanto mayor es el voltaje utilizado menor es el equilibrio o afinidad que los pares tienen por mantener interacción con su contraparte y, por tanto, tenderán con mayor probabilidad a transicionar entre el acople y desacople.

## 6. Conclusiones y proyecciones

El costo computacional asociado a la investigación de la disociación de complejos proteína-proteína es elevado y aún siguiendo el protocolo propuesto, para un complejo proteína-proteína que consideraba un péptido un canal transmembrana, no fue posible observar eventos de disociación. Sin embargo, esta investigación da pie a nuevo conocimiento respecto de la disociación de toxinas con alta afinidad por canales iónicos y también, respecto del quiebre del bloqueo en el filtro de selectividad.

Los cálculos de energía permitieron obtener una idea de la tendencia de asociación y disociación de los pares analizados y, en conjunto con los análisis de trayectoria, es posible establecer que no existe dependencia entre el estado de un par y otro. Sin embargo, las simulaciones realizadas en este proyecto no bastan para dar certezas sobre la afinidad que existe entre los residuos que interactúan en la interfaz del complejo CTX/*Shaker*. Por ello, se propone aumentar el número de réplicas con tal de lograr convergencia en los cálculos de energía y confirmar entonces, si se mantiene la tendencia observada a lo largo de este proyecto al aumentar la estadística de muestreo.

Si bien, las dinámicas ejecutadas no permitieron determinar de manera absoluta la disociación de caribdotoxina desde el canal, sí fue posible estimar rutas que podrían llevar o no a ese estado. A la vez, es difícil establecer la secuencia específica de residuos que sigue caribdotoxina en el proceso de disociación, pues la toxina, aún a voltajes superiores a 1 V no abandona el contacto con la superficie de *Shaker* y transiciona entre distintas configuraciones que evitan el desacople. Lo observado es consistente con la idea de que es necesario que todos los pares que interactúan en la interfaz se disocien para que caribdotoxina abandone por completo la superficie extracelular de *Shaker*. Entonces, el enfoque propuesto, aunque simple, podría ser una herramienta útil en la predicción de eventos de disociación en otro tipo de complejos proteína-proteína pero sí debe considerar mayor volumen de datos.

Sumado a la información anterior, el protocolo propuesto permitió observar eventos de permeación de iones de  $K^+$  en un estado de “pseudo-bloqueo” o “semi-bloqueo”, es decir, aún cuando hay interacciones entre pares en la interfaz toxina-canal. Esta información también plantea una nueva arista para el proyecto macro del proceso de disociación de caribdotoxina respecto de caracterizar eventos de permeación en canales bloqueados e incluso, replantear el bloqueo absoluto de toxinas como control negativo de corrientes iónicas.

Datos experimentales y datos teóricos generados durante este proyecto, son consistentes con la dependencia de voltaje durante la disociación de la toxina. A medida que el voltaje aumenta, con mayor velocidad los pares críticos en la unión CTX/*Shaker* se disocian y, en esta línea, es la permeación de iones  $K^+$  el evento que no permite que la toxina vuelva a unirse al canal y bloquear el intercambio iónico. En esta línea, la aplicación de voltaje es la que da pie al *wobbling*, disociando K27 del sitio S1 y la permeación de iones de  $K^+$  es la que, en principio, impide el “re-bloqueo” de *Shaker*. Entonces, surge la interrogante sobre qué es lo que sucede tras dejar de someter al sistema a un campo eléctrico y, por ello, se plantean dos líneas a seguir: (1) dejar de aplicar campo eléctrico externo en distintos puntos de la simulación con el objetivo de

comprobar si existe daño estructural tras tiempos extendidos de aplicación de voltaje y también, para verificar si K27 vuelve a interactuar con el sitio S1. (2) Para comprender la influencia de potasio sobre el proceso de disociación, aumentar las réplicas del sistema con 0.6 M de KCl y también, ensamblar un sistema a concentración de  $K^+$  mucho más baja.

El protocolo propuesto y cómo se llevó a cabo, permite sentar evidencia de cómo ocurre la disociación de CTX y *Shaker*. Es más, permitió identificar interacciones que podrían ser críticas en la disociación total de caribdotoxina como es el caso de Y36-V377 y R34-D359 e incluso, replantear el rol de K27 pues, su función durante la disociación se contrapone con ser un elemento central en el bloqueo; K27 se disocia de manera casi inmediata al aplicar potencial eléctrico sobre el sistema. Sin embargo, debido a la extensión de este proyecto fue complejo abordar por completo la caracterización del proceso de disociación y, por ende, no fue posible determinar tajantemente una ruta de disociación y mucho menos la independencia entre los eventos de pegue y despegue de los residuos estudiados. En consecuencia, no se puede afirmar que la hipótesis planteada para el proyecto es por completo correcta, para ello es necesario analizar más experimentos y condiciones con el objetivo de determinar, a distintos voltajes, qué rutas prefiere el complejo CTX/*Shaker* para desacoplarse y si existe alguna relación entre los pares que interactúan en la interfaz toxina-canal.

## Referencias

- Aksimentiev, A., & Schulten, K. (2005). Imaging  $\alpha$ -Hemolysin with Molecular Dynamics: Ionic Conductance, Osmotic Permeability, and the Electrostatic Potential Map. *Biophysical Journal*, *88*(6), 3745–3761. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058727>
- Anderson, C. S., MacKinnon, R., Smith, C., & Miller, C. (1988). Charybdotoxin block of single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *Journal of General Physiology*, *91*(3), 317–333. <https://doi.org/10.1085/jgp.91.3.317>
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., & MacKinnon, R. (2013). Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channel. *ELife*, *2*. <https://doi.org/10.7554/elife.00594>
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., & MacKerell, A. D., Jr. (2012). Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *8*(9), 3257–3273. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
- Bianciotto, M., Gkeka, P., Kokh, D. B., Wade, R., & Hervé, M. (2021). *Contact map fingerprints of protein-ligand unbinding trajectories reveal mechanisms determining residence times computed from scaled molecular dynamics*. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.14547567>
- Cavalli, A., Spitaleri, A., Saladino, G., & Gervasio, F. L. (2014). Investigating drug–target association and dissociation mechanisms using metadynamics-based algorithms. *Accounts of Chemical Research*, *48*(2), 277–285. <https://doi.org/10.1021/ar500356n>
- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, *98*(12), 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- De Las Rivas, J., & Fontanillo, C. (2010). Protein–Protein interactions essentials: Key concepts to

- building and analyzing interactome networks. *PLoS Computational Biology*, 6(6), e1000807. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000807>
- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>
- Feller, S. E., Zhang, Y., Pastor, R. W., & Brooks, B. R. (1995). Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11), 4613–4621. <https://doi.org/10.1063/1.470648>
- Finol-Urdaneta, R. K., Belovanovic, A., Micic-Vicovac, M., Kinsella, G. K., McArthur, J. R., & Al-Sabi, A. (2020). Marine toxins targeting kv1 channels: Pharmacological tools and therapeutic scaffolds. *Marine Drugs*, 18(3), 173. <https://doi.org/10.3390/md18030173>
- Fiorin, G., Klein, M. L., & Héning, J. (2013). Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Molecular Physics*, 111(22–23), 3345–3362. <https://doi.org/10.1080/00268976.2013.813594>
- Goldstein, S. (1994). The charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: Peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron*, 12(6), 1377–1388. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90452-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90452-9)
- Goldstein, S. A., & Miller, C. (1993). Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Biophysical Journal*, 65(4), 1613–1619. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(93\)81200-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(93)81200-1)
- Gumbart, J., Khalili-Araghi, F., Sotomayor, M., & Roux, B. (2012). Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(2), 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.030>
- Harpole, T. J., & Delemotte, L. (2018). Conformational landscapes of membrane proteins delineated by enhanced sampling molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(4), 909–926. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.033>

- Hidalgo, P., & MacKinnon, R. (1995). Revealing the architecture of a K<sup>+</sup> channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science*, *268*(5208), 307–310.  
<https://doi.org/10.1126/science.7716527>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, *99*(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C., & Roitberg, A. E. (2015). Long-Time-Step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(4), 1864–1874. <https://doi.org/10.1021/ct5010406>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kalia, J., Milescu, M., Salvatierra, J., Wagner, J., Klint, J. K., King, G. F., Olivera, B. M., & Bosmans, F. (2015). From foe to friend: Using animal toxins to investigate ion channel function. *Journal of Molecular Biology*, *427*(1), 158–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.027>
- Khabiri, M., Nikouee, A., Cwiklik, L., Grissmer, S., & Ettrich, R. (2011). Charybdotoxin Unbinding from the mKv1.3 Potassium Channel: A Combined Computational and Experimental Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(39), 11490–11500.  
<https://doi.org/10.1021/jp2061909>
- MacKerell, A. D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Jr., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., ... Karplus, M. (1998). All-Atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *102*(18), 3586–3616.  
<https://doi.org/10.1021/jp973084f>

- MacKinnon, R., & Miller, C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *Journal of General Physiology*, 91(3), 335–349.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.91.3.335>
- Marques, S. M., Bednar, D., & Damborsky, J. (2019). Computational study of protein-ligand unbinding for enzyme engineering. *Frontiers in Chemistry*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00650>
- Matsumura, K., Yokowaga, M., & Osaka, M. (2021). Peptide Toxins Targeting Kv Channels. In *Pharmacology of Potassium Channels*. Springer Nature.
- Miller, C. (1995). The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides. *Neuron*, 15(1), 5–10. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90057-8)
- Mironenko, A., Zachariae, U., de Groot, B. L., & Kopec, W. (2021). The persistent question of potassium channel permeation mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 433(17), 167002. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167002>
- Moldenhauer, H., Díaz-Franulic, I., Poblete, H., & Naranjo, D. (2019). Trans-toxin ion-sensitivity of charybdotoxin-blocked potassium-channels reveals unbinding transitional states. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/elife.46170>
- NAMD 3.0 Alpha, gpu-resident single-node-per-replicate test builds. (n.d.). Retrieved May 7, 2022, from <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/alpha/3.0alpha/#usage>
- Nicke, A., Ulens, C., Rolland, J.-F., & Tsetlin, V. I. (2020). Editorial: From peptide and protein toxins to ion channel structure/function and drug design. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.548366>
- Noé, F., Schütte, C., Vanden-Eijnden, E., Reich, L., & Weikl, T. R. (2009). Constructing the equilibrium ensemble of folding pathways from short off-equilibrium simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19011–19016.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905466106>
- Park, C. S., & Miller, C. (1992). Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 9(2), 307–313.

[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90169-e](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90169-e)

Park, C. S., & Miller, C. (1992). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: Electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry*, 31(34), 7749–7755.

<https://doi.org/10.1021/bi00149a002>

Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020).

Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, 153(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>

Ranganathan, R., Lewis, J. H., & MacKinnon, R. (1996). Spatial localization of the K<sup>+</sup> channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron*, 16(1), 131–139.

[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80030-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80030-6)

Roux, B. (2021). Representation of molecular systems. In *Computational modeling and simulations of biomolecular systems* (pp. 1–14). World Scientific.

Seychell, B. C., & Beck, T. (2021). Molecular basis for protein–protein interactions. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 17, 1–10. <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.1>

Soler-Llavina, G. J., Holmgren, M., & Swartz, K. J. (2003). Defining the conductance of the closed state in a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 38(1), 61–67.

[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00157-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00157-0)

Su, Z., & Wu, Y. (2019). Computational studies of protein–protein dissociation by statistical potential and coarse-grained simulations: A case study on interactions between colicin E9 endonuclease and immunity proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(5), 2463–2471. <https://doi.org/10.1039/c8cp05644g>

Tiwary, P., Limongelli, V., Salvalaglio, M., & Parrinello, M. (2015). Kinetics of protein–ligand unbinding: Predicting pathways, rates, and rate-limiting steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1424461112>

Triggle, D. J., Gopalakrishnan, M., Rampe, D., & Zheng, W. (2006). *Voltage-Gated ion channels as*

*drug targets*. John Wiley & Sons.

Weisel, J. (2003). Protein–protein unbinding induced by force: Single-molecule studies. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(2), 227–235.

[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(03\)00039-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(03)00039-3)

Xu, Y., & McDermott, A. E. (2019). Inactivation in the potassium channel KcsA. *Journal of Structural Biology: X*, 3, 100009. doi:10.1016/j.yjsbx.2019.100009

Zachariae, U., Schneider, R., Velisetty, P., Lange, A., Seeliger, D., Wacker, S. J., Karimi-Nejad, Y.,

Vriend, G., Becker, S., Pongs, O., Baldus, M., & de Groot, B. L. (2008). The molecular mechanism of toxin-induced conformational changes in a potassium channel: Relation to c-type inactivation. *Structure*, 16(5), 747–754.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2008.01.018>

Zhou, Y., Zou, R., Kuang, G., Långström, B., Halldin, C., Ågren, H., & Tu, Y. (2019). Enhanced sampling simulations of ligand unbinding kinetics controlled by protein conformational changes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(9), 3910–3918.

<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00523>

# Anexos

**Tabla Anexo 1: Matriz de conteo de transiciones para 0.5 V.**

La primera columna representa el estado actual y, las siguientes, la configuración que, desde el estado presente, podrían ser adoptadas (Estado futuro). Los datos representados muestran el número de transiciones entre el microestado actual hacia cada una de las posibles configuraciones que podría adoptar.

Estado actual	Estado futuro																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	133	15	18	5	2	0	3	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	1	125	0	3	7	288	70	13	1	0	0	1	0	0	175	4	0	4	1	0	0	0	0	0
4	0	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	17	4	0	0	6	2	0	14	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	7	291	0	6	0	136	3	2	0	0	0	0	0	1	1	7	0	0	0	0	0	0	0
7	0	3	65	0	0	142	0	2	19	0	1	0	1	0	0	3	8	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	13	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	4	2	0	14	1	19	0	0	0	36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	0	4	0	1	0	36	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	4	172	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	8	0	3	0	0	0	0	0
16	0	0	4	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	8	0	2	0	0	0	0	0	0
17	0	0	2	0	0	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
18	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla Anexo 2: Matriz de conteo de transiciones para 1 V.**

La primera columna representa el estado actual y, las siguientes, la configuración que, desde el estado presente, podrían ser adoptadas (Estado futuro). Los datos representados muestran el número de transiciones entre el microestado actual hacia cada una de las posibles configuraciones que podría adoptar.

Estado actual	Estado futuro																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0	0	0	0	0
2	1	0	511	2	152	38	9	0	141	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	15	519	0	2	25	953	229	37	3	0	0	1	0	0	13	0	1	0	1	0	0	0	0	0
4	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	146	28	0	0	40	16	0	220	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	31	951	0	41	0	687	11	22	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	1	0	0
7	0	13	231	0	14	676	0	28	55	0	0	0	3	0	0	1	10	0	0	0	2	1	0	0
8	0	1	35	0	0	13	27	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	138	6	0	216	25	52	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	41	1	0	10	0	0	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

