



UNIVERSIDAD  
**SAN SEBASTIAN**  
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL  
SEDE SANTIAGO**

**MECANISMO DE GATING DEL HEMICANAL  
FORMADO POR CONEXINA 26 HUMANA MEDIADO  
POR EL CAMBIO CONFORMACIONAL DEL DOMINIO  
N-TERMINAL**

Tesis para optar al Grado de Doctor en Biología Computacional

Profesor Tutor: Dr. Tomas Pérez-Acle  
Profesor Co-tutor: Dr. Felipe Villanelo

**Estudiante: Joaquín Eduardo Jensen Flores**

©Joaquín Jensen Flores

Se autoriza la reproducción total o parcial de esta obra con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Santiago, Chile

2025

## Hoja de Calificación

En Santiago, **2 de octubre de 2025** los abajo firmantes dejan constancia que el estudiante **Joaquín Jensen Flores** del programa de Doctorado en Biología Computacional ha aprobado la tesis titulada ***“MECANISMO DE GATING DEL HEMICANAL FORMADO POR CONEXINA 26 HUMANA MEDIADO POR EL CAMBIO CONFORMACIONAL DEL DOMINIO N-TERMINAL”*** para optar al grado académico de Doctor en Biología Computacional con nota de **7,0**

Dr. Alberto Martin  
Profesor Evaluador  
Universidad San Sebastián

Dr. José Antonio Gárate  
Profesor Evaluador  
Universidad San Sebastián

Dr. Agustín Martínez  
Profesor Evaluador  
Universidad de Valparaíso

Dr. Tomás Pérez-Acle  
Tutor de Tesis  
Universidad San Sebastián

Dr. Felipe Villanelo  
Co-tutor de Tesis  
Universidad San Sebastián

## **Dedicatoria**

Es mi deseo dedicar el agradecimiento a mi madre, Vilma; a mi tía Verónica; a mi hermano Nicolás; y al resto de mi familia por el apoyo incondicional que han sido durante estos años. Además, agradezco a mis compañeros Jorge, Pablo y Soraya por la ayuda que me han dado y a mis amigos, en particular, a Turry y Javier por su apoyo. Por último, pero no menos importante agradecer la compañía de Aang mi compañero felino, que ha sido importante en los años de pandemia y posteriores.

Finalmente, dedico esta tesis a todos aquellos estuvieron antes de mí, y a los que vendrán después...



## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Doctorados de la Universidad San Sebastián por el financiamiento a través de la Beca de Doctorado y proyecto USS-FIN-24-PASD-01 para la pasantía de investigación en *the Queen's University of Belfast*, Reino Unido. También agradecer el financiamiento parcial por parte del Proyecto FONDECYT Regular N° 1211045 del Dr. Tomás Pérez-Acle y al Centro Ciencia & Vida a través del Financiamiento Basal para Centros Científicos y Tecnológicos de Excelencia de ANID (FB210008). Además, se agradece la Infraestructura de supercomputo del NLHPC (CCSS210001).

Por último, quiero agradecer al Dr. Felipe Villanelo por la guía constante en el transcurso de mi tesis y también por su apoyo al Dr. Tomás Pérez-Acle. También, agradezo al Dr. Gareth Tribello por sus enseñanzas y apoyo durante mi pasantía de investigación en *the Queen's University of Belfast*.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Conexinas	1
1.2	Estructura del GJC formado por conexina 26 humana	1
1.3	Regulación de la función de canales formados por conexinas	3
1.3.1	Voltaje o Potencial electroquímico	3
1.3.2	Concentración extracelular de $\text{Ca}^{2+}$	3
1.3.3	El rol del pH	4
1.4	Buscando el estado cerrado del Hemicanal	4
1.4.1	Rol de la parahélice (PH) en el <i>slow gating</i>	4
1.4.2	Rol de la hélice N-terminal (NTH) en el <i>fast gating</i>	4
1.4.3	Nueva evidencia estructural	5
1.5	Preguntas abiertas	7
<b>2</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>Diseño Experimental</b>	<b>10</b>
5.1	Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50	10
5.2	Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados	10
<b>6</b>	<b>Métodos</b>	<b>12</b>
6.1	Modelamiento	12
6.2	Simulaciones	13
6.3	Análisis estructural	15
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	<b>17</b>
7.1	Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50	17
7.1.1	La NTH mantiene la conformación presente en sCx50, en el modelo del HC de hCx26 NTH-TM1 <sup>6MHY</sup> PH-CT <sup>2ZW3</sup>	17
7.1.2	El cambio de orientación de la NTH cambia el movimiento de la estructura del HC	17
7.1.3	Caracterización del desplazamiento de la NTH	18
7.1.4	En el modelo hCx26 NTH-TM1 <sup>6MHY</sup> PH-CT <sup>2ZW3</sup> se mantiene la estructura secundaria de la NTH en la simulación	22
7.1.5	Caracterización termodinámica de las conformaciones de la NTH en el estado abierto	22

7.2	Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados . . . . .	26
7.2.1	Transición entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26 . . . . .	26
7.2.2	Transición entre los estados semicerrado y cerrado del HC de hCx26 . . . . .	29
7.2.3	Simulación al equilibrio del estado cerrado del HC de hCx26 . . . . .	29
7.2.4	Simulación al equilibrio del modelo "bola-cadena" HC de hCx26 . . . . .	31
<b>8</b>	<b>Discusión</b>	<b>35</b>
8.1	Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50. . . . .	35
8.2	Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados. . . . .	41
8.3	Discusiones Generales . . . . .	43
<b>9</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>10</b>	<b>Anexo 1: Métodos avanzados de muestreo en simulaciones de MD</b>	<b>46</b>
10.1	Energía libre y definición de coordenadas de reacción . . . . .	46
10.2	Umbrella Sampling . . . . .	48
10.3	Métodos de desesgado usados para muestreos tipo umbrella sampling . . . . .	49
10.3.1	<i>Weighted Histogram Analysis</i> (WHAM) . . . . .	49
10.3.2	Multiple Bennett Acceptance Ratio mBAR . . . . .	50
10.4	<i>Well Tempered Metadynamics</i> (WT-MetaD) . . . . .	51
<b>11</b>	<b>Anexo 2: Publicaciones</b>	<b>53</b>
<b>12</b>	<b>Referencias</b>	<b>54</b>

## Índice de figuras

1	Canales formados por Cxs. . . . .	1
2	Diferencias estructurales de la NTH en modelos de hCx26 y sCx46/Cx50. . . . .	2
3	Conformaciones de la NTH en el estado abierto y cerrado (hipótéticas) . . . . .	6
4	Diseño experimental del Objetivo 1 . . . . .	11
5	Diseño experimental del Objetivo 2 . . . . .	12
6	Orientación de los residuos de la NTH. . . . .	19
7	Evaluación del movimiento del HC de hCx26 en la simulación de MD: RMSD. . . . .	19
8	Evaluación del movimiento del HC de hCx26 en la simulación de MD: RMSF. . . . .	20
9	Desplazamiento de la NTH. . . . .	21
10	Porcentaje de $\alpha$ -helice de la NTH. . . . .	23
11	Histograma de ángulo de rotación $\theta$ . . . . .	24
12	PMF en función del ángulo de rotación. . . . .	25
13	Autocorrelación del vector de rotación en simulaciones al equilibrio. . . . .	27

14	Parametrización de los <i>paths</i> de la transición entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26. . . . .	27
15	Transiciones entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26 en simulaciones de WT-MetaD. . . . .	28
16	Curvas de PMF de la transición entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26. . . . .	30
17	Simulación de <i>pulling</i> llevando al HC de hCx26 del estado semicerrado al estado cerrado . . . . .	32
18	Simulación de <i>pulling</i> llevando al HC de hCx26 del estado cerrado al estado semicerrado . . . . .	33
19	Estructura del modelo hCx26 NTH-TM1 <sup>6L3T</sup> PH-CT <sup>7QER*</sup> de HC al liberar las restricciones de posición en una simulación al “equilibrio” . . . . .	33
20	Evaluación del movimiento del modelo hCx26 NTH-TM1 <sup>6L3T</sup> PH-CT <sup>7QER*</sup> de HC en una simulación al “equilibrio” y sin restricciones . . . . .	34
21	Estructura del modelo hCx26 <sup>6UVT</sup> de HC (modelo “bola-cadena”). . . . .	35
22	Ejemplos de interacciones observadas en el modelo hCx26 <sup>6UVT</sup> 1 . . . . .	36
23	Ejemplos de interacciones observadas en el modelo hCx26 <sup>6UVT</sup> 2 . . . . .	37
24	Evaluación del movimiento del modelo hCx26 <sup>6UVT</sup> de HC . . . . .	38
25	Radio del poro del HC de hCx26. . . . .	39
26	Estimación del diámetro del poro del HC de hCx26. . . . .	40

## Índice de tablas

1	Resumen de publicaciones. . . . .	53
---	-----------------------------------	----

## Abreviaturas

**Cx** *conexina*

**GJC** *gap junction channel*

**HC** *hemicanal*

**Cx26** *conexina 26*

**Cx46** *conexina 46*

**Cx50** *conexina 50*

**M** *helice transmembrana*

**ATP** *adenosin tri-fosfato*

**hCx26** *conexina 26 humana*

**NTH**  *$\alpha$ -hélice en el dominio N-terminal*

**TM** *hélice transmembrana*

**E** *loop extracelular*

**CL** *loop citoplasmático*

**CT** *dominio C-terminal*

**PH** *parahélice*

**GMC/BD** *método *grand cannonical* Monte Carlo acoplado a Dinámica Browniana*

**V<sub>m</sub>** *potencial de membrana*

**PTM** modificaciones post transduccionales

**MD** dinámica molecular

**AFM** microscopía de fuerza atómica

**RMSD** *root mean square deviation*

**Cx43** conexina 43

**hCx43** conexina 43 humana

**sCx46** conexina 46 de oveja (*sheep*)

**sCx50** conexina 50 de oveja (*sheep*)

**cryo-EM** crio-microscopía electrónica

**hCx31.3** conexina 31.3 humana

**RMSF** *root mean square fluctuation*

**WHAM** *Weighted Histogram Analysis*

**mBAR** *multiple Bennett Acceptance Ratio*

**hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 con moldes: modelo de sCx50 para los dominios NTH-TM1 y el modelo de hCx26 resuelto por Maeda y cols para los dominios PH-CT.

**hCx26<sup>2ZW3</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 resuelto por Maeda y cols. con los dominios faltantes completados por modelamiento comparativo.

**WT-MetaD** *Well Tempered Metadynamics*

**CV** Variable Colectiva



**hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 con moldes: hCx31.3 para los dominios NTH-TM1 y el modelo hCx26 resuelto por Brotherton y cols para los dominios PH-CT.

**hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 confeccionado como el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>, pero con una restricción de distancia entre NTHs opuestas.

**hCx26<sup>7QER</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 resuelto por Brotherton y cols. con los dominios faltantes completados por modelamiento comparativo.

**hCx26<sup>6UVT</sup>** modelo de hemicanal de hCx26 resuelto por Khan y cols. con los dominios faltantes completados por modelamiento comparativo.

**POPC** *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glicero-3-phosphocholine*

**CHARMM** *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*

**GROMACS** *Groningen Machine for Chemical Simulations*

**NVT** ensamble canónico de número de partículas, volumen y temperatura constantes

**NPT** ensamble de número de partículas, presión y temperatura constantes

**aNPT** ensamble NPT anisotrópico

**LINCS** *Linear Constraint Solver for Molecular Simulations*

**PME** Particle Mesh Ewald method

**U.A.** Unidades Arbitrarias

**PMF** *Potential Mean Force*

$k_B$  Constante de Boltzmann

**DSSP** *Define Secondary Structure of Proteins*

**SASA** *Solvent Accessible Surface Area*

**Cx36** *conexina 36*

**hCx36** *conexina 36 humana*

**A** *energía libre de Helmholtz*

**G** *energía libre de Gibbs*

**FEP** *free energy perturbation*

**BAR** *Bennett Acceptance Ratio*

**H-REMD** *Hamiltonian Replica Exchange*

$\mu$ **VT** *ensamble grand canónico de potencial químico ( $\mu$ ), volumen y temperatura constante*

## Resumen

Las conexas (**Cxs**) son proteínas de membrana que forman hemicanales (**HCs**) y *gap junction channels* (**GJCs**), esenciales en procesos como la contracción cardíaca, la sinapsis eléctrica y la comunicación celular. Estos canales se regulan mediante un mecanismo de apertura y cierre (*gating*) sensible al voltaje, al pH y al  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Un elemento clave en este proceso es la hélice N-terminal (**NTH**), localizada en el poro, cuya conformación en el estado abierto continúa siendo motivo de debate. La estructura cristalográfica de **hCx26** (2009) y los modelos posteriores de cryo-EM de **sCx46/Cx50** y **hCx26** (2018, 2020) muestran orientaciones diferentes de la **NTH**, lo que mantiene abierta la discusión sobre cuál de estas conformaciones corresponde al estado abierto.

Para abordar esta cuestión, se construyó un modelo híbrido del **HC** de **hCx26** con la orientación de la **NTH** observada en **sCx50** y se comparó con el modelo cristalográfico de 2009 mediante simulaciones de dinámica molecular (**MD**) y muestreos tipo *umbrella sampling* para luego calcular el **PMF** que describa la transición entre ambas conformaciones. El modelo híbrido mostró mayor estabilidad en equilibrio, aunque el perfil de energía libre (**PMF**) indicó que ambas conformaciones son igualmente probables, con barreras menores al ruido térmico. Estos resultados sugieren que la **NTH** puede adoptar más de una conformación en el estado abierto.

Mientras en 2020, las nuevas estructuras resueltas por cryo-EM del **GJC** de **hCx26** a pH ácido y del **HC** de **hCx31.3**, donde las **NTHs** podrían cerrar el canal siguiendo modelos de *gating* de “bola-cadena” y de “compuerta” respectivamente. Entonces, se exploraron los cambios conformacionales en el mecanismos de *gating* de “compuerta”. Donde se evaluó la estabilidad termodinámica de los estados abierto, semicerrado y cerrado mediante modelamiento comparativo, usando como molde la estructura del **HC** de **hCx31.3** y aplicando restricciones de distancia, y simulaciones de metadinámica. Aunque se observaron diferencias energéticas que favorecen el estado abierto con respecto al estado semicerrado, las transiciones hacia el estado cerrado no pudieron caracterizarse de manera concluyente y el modelo del estado cerrado tendió a reabrirse en equilibrio, lo que indica la necesidad de modificaciones al modelo de “compuerta” incorporando evidencia estructural más reciente, como la obtenida del **GJC Cx43**. En contraste, se evaluó el modelo de “bola-cadena” mediante una simulación al equilibrio que mostró estabilidad dinámica y un estrechamiento del poro hasta  $\sim 5$  Å, constituyéndose como un candidato plausible para describir el cierre completo del **HC**, aunque requiere mayor validación experimental *in silico*.

En conclusión, los resultados apoyan que: (i) la **NTH** en el estado abierto puede adoptar tanto la conformación observada en el modelo cristalográfico del **HC** de **hCx26** como la descrita en **sCx46/Cx50** y en **hCx26** resueltas por cryo-EM; (ii) el modelo de “compuerta” necesita ser refinado incorporando nueva evidencia estructural para representar adecuadamente el cierre; (iii) el modelo de “bola-cadena” es consistente con un estado cerrado estable, pero aún debe ser respaldado con estudios adicionales. Finalmente, esta tesis doctoral contribuye en la comprensión de la dinámica estructural de los canales formados por de conexas.

## Abstract

Connexins (Cxs) are membrane proteins that form hemichannels (HCs) and gap junction channels (GJs), which are essential for processes such as cardiac contraction, electrical synapses, and cell–cell communication. These channels are regulated by a gating mechanism that is sensitive to voltage, pH, and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . A key element in this process is the N-terminal helix (NTH), located in the pore, whose conformation in the open state remains a subject of debate. The crystallographic structure of hCx26 (2009) and subsequent cryo-EM models of sCx46/Cx50 and hCx26 (2018, 2020) show different NTH orientations, keeping the discussion open about which of these conformations corresponds to the open state.

To address this question, a hybrid model of the hCx26 HC was constructed with the NTH orientation observed in sCx50 and compared with the 2009 crystallographic model using molecular dynamics (MD) simulations and umbrella sampling to then calculate the potential of mean force (PMF) describing the transition between both conformations. The hybrid model showed greater equilibrium stability, although the free energy profile (PMF) indicated that both conformations are equally probable, with barriers smaller than thermal noise. These results suggest that the NTH can adopt more than one conformation in the open state.

In 2020, newly resolved cryo-EM structures of the hCx26 GJC at acidic pH and the hCx31.3 HC suggested that NTHs could close the channel following “ball-and-chain” and “gate” gating models, respectively. Consequently, conformational changes in the “gate” mechanism were explored, where the thermodynamic stability of the open, semi-closed, and closed states was evaluated using comparative modeling based on the hCx31.3 HC structure as a template, applying distance restraints, and performing metadynamics simulations. Although energetic differences favoring the open state over the semi-closed state were observed, the transitions to the closed state could not be conclusively characterized, and the closed-state model tended to reopen at equilibrium, indicating the need to refine the “gate” model by incorporating more recent structural evidence, such as that obtained from the Cx43 GJC. In contrast, the “ball-and-chain” model was evaluated through an equilibrium simulation, which showed dynamic stability and pore narrowing down to  $\sim 5$  Å, making it a plausible candidate for describing full HC closure, although it requires further experimental and in silico validation.

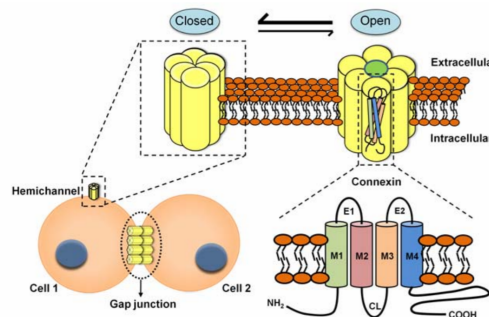
In conclusion, the results support that: (i) the NTH in the open state can adopt either the conformation observed in the hCx26 HC crystallographic model or that described in sCx46/Cx50 and hCx26 resolved by cryo-EM; (ii) the “gate” model needs refinement by incorporating new structural evidence to adequately represent closure; and (iii) the “ball-and-chain” model is consistent with a stable closed state but still requires additional supporting studies. Altogether, this doctoral thesis contributes to the understanding of the structural dynamics of connexin-formed channels.

# 1 Introducción

## 1.1 Conexinas

Las Cxs son una familia de proteínas presente en vertebrados que forman canales de unión de hendidura o en inglés GJCs [1]. Los GJCs conectan los citoplasmas de células adyacentes mediante el contacto de dos HCs, los que, a su vez, son hexámeros formados por Cxs que se encuentran en la membrana plasmática de cada célula (Figura 1). De esta forma, los GJCs permiten la difusión pasiva entre células de iones y pequeñas moléculas como gases, péptidos, metabolitos y ligandos de hasta 2 kDa [2]. Los HCs también pueden funcionar por sí solos transportando iones, gases y otras moléculas desde o hacia el espacio extracelular [3]. La función de GJCs y HCs es regulada por diversos factores fisiológicos, siendo los más relevantes los cambios en el potencial electroquímico, el pH y concentración extracelular de ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [3, 4].

Existen alrededor de 21 isoformas de Cxs en diferentes especies y tejidos [2] agrupadas en 5 subfamilias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  [5]. Los HCs pueden ser homoméricos o heteroméricos dependiendo de la identidad de los monómeros que lo conforman [2]. Los GJCs pueden ser también clasificados como homotípicos o heterotípicos, si los HCs homoméricos que se unen están formados por la misma isoforma o por isoformas distintas, respectivamente (por ejemplo los GJCs de Cx26 y de Cx46/Cx50) [3]. Por lo tanto, las posibles combinaciones de HCs y GJCs dan lugar a una gran variedad de especializaciones estructurales y funcionales [2].



**Figura 1: Canales formados por Cxs.** Hemicanales formados por un hexámero de conexinas en sus formas abierta y cerrada, insertos en la membrana plasmática (arriba). Localización del hemicanal en la superficie de la célula formando GJC y cuando se encuentran sin hacer contacto (del inglés *docking*) con otro hemicanal (abajo, izquierda). Representación de la topología de un monómero de conexina formado por 4 hélices transmembrana (M1-M4), dos loops extracelulares (E1, E2), un loop intracelular (CL) y los extremos N-terminal y C-terminal (abajo, derecha) (Tomado de [6]).

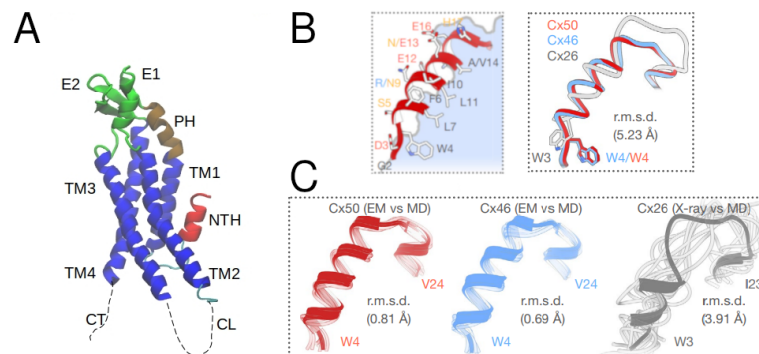
Tanto los GJCs como los HCs tienen un rol en el desarrollo y fisiología de distintos tipos celulares del organismo participando en diversos procesos biológicos como la sinapsis eléctrica en el sistema nervioso central, la contracción muscular cardíaca [3], la comunicación paracrina y autocrina celular mediante la liberación de ATP [7], entre otros. Se sabe también, que al menos 13 patologías en humanos son causadas por una o varias mutaciones localizadas en alguno de los genes que codifican por Cxs [8, 9].

De este modo, debido a la gran variedad de procesos biológicos en que los canales formados por Cxs participan, es importante comprender a cabalidad su funcionamiento y regulación.

## 1.2 Estructura del GJC formado por conexina 26 humana

En 2009 se obtuvo la primera estructura de rayos X de un GJC: el GJC formado por conexina 26 humana (hCx26) (perteneciente a la subfamilia  $\beta$ -Cxs) a una resolución de 3,5 Å [10]. La estructura de cada monómero fue resuelta casi por completo, faltando los residuos: 1, 110 al 124 y 218 al 226, más algunas cadenas laterales

específicas. Como se puede ver en las Figuras 1 y 2A, la estructura de cada monómero comprende una  $\alpha$ -hélice en el dominio N-terminal (NTH), 4 hélices transmembrana (TM1-TM4), dos *loops* extracelulares (E1,E2), un *loop* citoplasmático (CL) y el dominio C-terminal (CT). En esta estructura, las secciones que no se resolvieron completamente fueron el CL y el CT. Las TMs atraviesan la membrana plasmática de forma antiparalela. Las hélices TM1 y TM2 delinean el poro del HC, mientras que las hélices TM3 y TM4 están orientadas hacia la región hidrofóbica de la membrana plasmática. El CL y el CT están orientados hacia el espacio intracelular. Una observación muy relevante es la hélice llamada NTH, que se encuentra en el medio del poro del HC, a la altura de la membrana, sin atravesar por completo la membrana. Otra región interesante es la continuación de la TM1, que mantiene una conformación helicoidal hacia la región extracelular; sin embargo, esta hélice es imperfecta y se asemeja más a una hélice  $3_{10}$ . Por esta razón esta hélice también es denominada parahélice (PH). En E1 y E2 se encuentran dos cortas hojas  $\beta$  con orientación antiparalela. Ambas hojas  $\beta$  se acercan formando un muro que se cierra al espacio extracelular. Entre E1 y E2 hay 3 puentes disulfuro entre 6 residuos de cisteína (3 en cada *loop*). E1 y E2 son las regiones que hacen contacto o *docking* con el HC vecino formando el GJC.



**Figura 2: Diferencias estructurales de la NTH en modelos de hCx26 y sCx46/Cx50.** **A)** Estructura de un monómero de hCx26 resuelto por cristalografía de rayos X (PDBid:2ZW3). Se representan las diferentes regiones descritas (ver texto) según colores: en rojo la NTH, en azul las TMs, en verde E1 y E2 y por último en marrón la PH. En línea punteada negra las regiones faltantes CL y CT. **B)** (Izquierda) Estructura de la NTH en el GJC heterotípico sCx46/Cx50. Se muestra el detalle de las cadenas de laterales de los residuos polares orientados hacia el poro del canal y de los residuos apolares orientados el centro de la proteína. (Derecha) Superposición de la NTH de los HCs de sCx50 (rojo), de sCx46 (azul claro) y de hCx26 (blanco) (Modificado de [11]). **C)** Superposición de la estructura del dominio NTH de cada monómero a lo largo de simulaciones MD (en representación de tubo transparente) con respecto a la estructura inicial (en *cartoon*): sCx50 (rojo), sCx46 (azul claro) y hCx26 (gris) (Modificado de [11]).

Si bien la estructura cristalográfica del GJC de hCx26 entregó la primera mirada detallada de los canales formados por Cxs, esta corresponde solo a un cuadro estático del canal, quedando aún múltiples preguntas por responder. Entre otras, si este modelo estructural representa un canal abierto o un canal cerrado, o si es una estructura representativa para todos los tipos de Cxs. Para abordar la pregunta si este modelo corresponde a un representante del estado abierto o cerrado del canal es necesario remontarse a estudios estructurales previos. Unos años antes, usando mapas de densidad electrónica [12], se obtuvo la estructura de baja resolución del GJC de hCx26 que posee la mutación M34A. En esta estructura, al centro del poro (a la altura de la NTH) se observó una oclusión del canal que llevó a los autores a proponer que el canal se encontraba en el estado cerrado. Como en el modelo cristalográfico posterior de 2009 no se observó una oclusión equivalente, se asumió que esta nueva estructura se encontraba en un estado abierto [10]. No obstante, otros autores quisieron ahondar más en el hipotético estado abierto de esta estructura. Usando modelamiento comparativo se completaron las regiones que no fueron resueltas por la cristalografía de 2009 y se analizó el flujo de iones mediante el método *grand canonical* Monte Carlo acoplado a Dinámica Browniana (GMC/BD) [13]. De esta forma se observó que el poro del canal es demasiado



estrecho y que, bajo la acción de un potencial de membrana ( $V_m$ ) simulado no era posible reproducir los datos experimentales. Esto es debido a la presencia de cadenas laterales de residuos faltantes como M1 hacen que el poro se estreche resultando un diámetro promedio de 10 Å. Luego, a esta estructura se le incorporaron modificaciones post transduccionales (PTM) descritas experimentalmente (acetilaciones en el dominio N-terminal y en residuos de lisinas en las posiciones K15, K102, K105, K108, K112 y K116 neutralizando la carga de estos [14]) y se sometió a simulaciones de MD para permitir al canal alcanzar una estructura estable (a.k.a. relajación). De este modo, el poro del canal -con todos sus residuos de aminoácidos- aumentó de manera significativa, logrando una mayor coincidencia con datos experimentales obtenidos de estudios de canales únicos [15]. De este modo, los autores mostraron que la incorporación de estas modificaciones en la estructura eran esenciales para reproducir los datos experimentales de conductividad y selectividad catiónica [13].

A partir de estos estudios, la comunidad del área aceptó que la estructura de 2009, con algunos ajustes, podía ser considerada como una versión abierta del canal. Sin embargo, como veremos más adelante, a la luz de la nueva evidencia disponible, esta representatividad está nuevamente en cuestión, manteniendo esta pregunta abierta.

### 1.3 Regulación de la función de canales formados por conexinas

#### 1.3.1 Voltaje o Potencial electroquímico

Los canales formados por Cxs presentan dos mecanismos de regulación de su función que son dependientes de voltaje: (i) Rectificación de corrientes iónicas a través de canales completamente abiertos y (ii) apertura condicional o *gating* dependiente del voltaje. Este último corresponde a la probabilidad de apertura dependiente del voltaje en donde se producen cambios conformacionales en el canal que modulan el flujo iónico [3].

Dentro del mecanismo de regulación de la probabilidad de apertura o *gating* encontramos dos formas específicas y bien definidas. Por un lado, *fast-gating* o  $V_j$ -*gating*, corresponde a una serie de cambios rápidos del estado abierto hacia tres o más sub-estados que conducen menos de lo esperado para un canal abierto (i.e. estado de subconductancia) [16]. Por otro, el *slow-gating* o *loop-gating*, corresponde a una serie de cambios entre diversos estados intermediarios los que, en conjunto, permiten al canal alcanzar un estado completamente cerrado [16, 17]. Ambos mecanismos ocurren tanto en HCs como en GJC. Es importante señalar que mientras el *slow-gating* ocurre en todos los canales formados por Cxs hacia potenciales negativos (hiperpolarización), la polaridad del *fast-gating* es específica a cada isoforma de Cx.

#### 1.3.2 Concentración extracelular de $Ca^{2+}$

La concentración extracelular del ion  $Ca^{2+}$  es otro factor importante en la regulación de la función de los HCs formados por Cxs [4]. Los canales formados por Cxs son inhibidos a concentraciones milimolares (fisiológicas) de  $Ca^{2+}$  extracelular [4]. La apertura de los HCs a concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  extracelular ha llevado a pensar que los HCs pueden participar tanto de un mecanismo de señalización celular como de protección frente al mal funcionamiento celular [18]. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto regulador del  $Ca^{2+}$  es un estrechamiento del poro del HC, especialmente en la altura de la PH. Esto ha sido confirmado usando diferentes técnicas experimentales, como microscopía de fuerza atómica (AFM) [19-22]. Sin embargo, en 2016 se obtuvieron dos estructuras cristalográficas de GJCs de hCx26, uno en presencia de  $Ca^{2+}$  y otro sin el ion [23]. En estas estructuras se observaron 6 átomos de  $Ca^{2+}$  interactuando con los dominios PHs, pero las estructuras no muestran un cambio conformacional significativo entre ellas (presentan una desviación cuadrática media, RMSD o *root mean square deviation* en inglés, de aproximadamente 1 Å entre ellas). La explicación de los autores a esta observación es que habría un bloqueo electrostático de los iones  $Ca^{2+}$ , sin necesidad de cambios conformacionales.

Lamentablemente, en ninguna de estas estructuras fue posible resolver la estructura de la NTH, por lo que no fue posible incluir esta región en las posibles explicaciones.

Aun así, distintos autores han cuestionado esta explicación, dado que no aporta a esclarecer el mecanismo de acción del calcio. Incluso, esta hipótesis ha sido rebatida por estudios experimentales y de MD [24, 25]. De hecho, mediante modelos cinéticos y termodinámicos se ha propuesto en que el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , en realidad, se une y estabiliza el estado cerrado de los HCs, lo que no sería compatible con las estructuras antes explicadas [21, 26].

### 1.3.3 El rol del pH

El pH también tiene un efecto en la actividad de canales formados por Cxs. Se ha observado una inhibición de GJCs de conexina 43 humana (hCx43) a pH ácido [27], inhibición que estaría dada por la interacción entre los dominios CT y CL [27, 28]. También se ha observado inhibición de GJCs de Cx43 a pH alcalino [29]. En 2018, mediante estudios de electrofisiología, Garciarena y cols. [30] propusieron un mecanismo molecular de *gating* a pH alcalino, en donde, el dominio CT estaría formando una “compuerta”. Este mecanismo sería diferente al *gating* a pH ácido [30].

## 1.4 Buscando el estado cerrado del Hemicanal

A pesar de toda la evidencia existente, tanto para GJCs como para HCs, aún no está claro cuál es la estructura de canal cerrado. Esta controversia se remonta a 1980, año en que se propuso un primer modelo en donde los monómeros del HC se desplazan cerrando el canal como el iris de una cámara [31]; sin embargo, evidencia posterior llevaría a descartar definitivamente este modelo [3].

### 1.4.1 Rol de la parahélice (PH) en el slow gating

Para estudiar el efecto del voltaje, como factor importante en el *gating*, se ha recurrido a simulaciones de MD para explorar las diversas conformaciones del HC. Particularmente, se ha buscado definir de manera más detallada el rol de la PH durante el *slow gating*, evaluando si la PH podría ser parte de la barrera de permeabilidad, tal como lo sugieren estudios de electrofisiología y entrecruzamiento [32-34]. A partir de varios estudios de MD que utilizan la estructura resuelta en 2009, se ha descrito una correlación del movimiento de monómeros adyacentes, sugiriendo un efecto cooperativo, que sería posible gracias a una red de interacciones intermoleculares que estabilizan la PH. Esto llevó a los autores a concluir que bajo el efecto del voltaje, las PHs bloquearían el poro del canal, producto de la alteración en esta red. Notablemente, esta red de interacciones en torno a las PHs ha sido observada en simulaciones de MD realizadas posteriormente, como las del GJC heterotípico de Cx46/Cx50 de oveja (sCx46/Cx50). Estas interacciones inter- e intramonoméricas, son además estabilizadas por interacciones de puente de hidrógeno formadas con moléculas de agua, las cuales han sido observadas en modelos cristalográficos posteriores [11, 35].

### 1.4.2 Rol de la hélice N-terminal (NTH) en el fast gating

A diferencia del *slow gating*, el *fast gating* ocurre a diferentes voltajes, dependiendo del tipo de Cx involucrada [3]. En estudios estructurales y funcionales, Bargiello y cols. han determinado que la modificación de la carga en ciertas posiciones en la NTH, modifica la polaridad del *fast gating*. A partir de estos estudios, se ha propuesto a la NTH como el sensor de voltaje del *fast gating*. En la comunidad especialista en Cx se acepta esta premisa, dada la amplia evidencia experimental, aunque aun no se ha logrado obtener una estructura de donde se observe claramente a la NTH actuando como barrera de permeabilidad en el *gating* [3, 17, 36-39].

Un residuo importante para el *gating* mediado por voltaje es el que ocupa la posición 12, pues los efectos de mutar de este residuo dependen de la isoforma de Cx [3, 36]. Por ejemplo, en la mutación G12R en HCs de hCx26 (asociada a sordera sindrómica) se pierden tanto el *fast* como el *slow gating*. En simulaciones de MD se ha observado que la NTH se desplaza hacia el citoplasma en donde el residuo mutado interactúa con el CL. La disrupción de esta interacción recupera ambos tipos de *gating*, lo que sugiere la existencia de un acople entre estos, fenómeno que estaría mediado por la NTH [40].

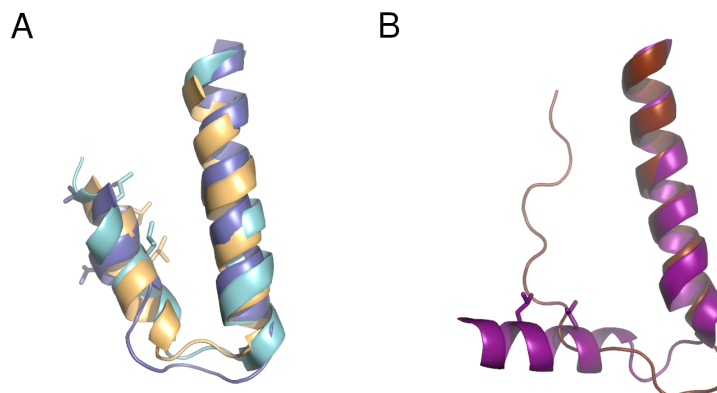
Así como se han caracterizado las redes de interacciones que podrían vincular la PH con el *slow gating* se ha intentado hacer lo mismo con la NTH y el *fast gating* mediante simulaciones de MD. Sin embargo, no se han podido detectar interacciones intermoleculares que persistan a lo largo del tiempo de simulación y que involucren a la NTH con otras regiones del canal [3]. Esto puede deberse a varias razones. Por un lado, la NTH es una estructura altamente flexible en solución y, por lo tanto, difícil de resolver por cristalografía de rayos X, explicando así la alta variabilidad de esta región en estudios de MD. Por otro lado, la NTH en la estructura de 2009 [10] presenta una característica inusual: los residuos apolares están orientados hacia el poro hidrofílico del canal, el que aparece lleno de agua, en tanto los residuos polares están orientados hacia la TM1: justo al revés de lo que se esperaría para una hélice  $\alpha$ . Dado que muchos de los estudios de MD publicados a la fecha usan esta estructura como inicial, las simulaciones fallan en representar la estructura del dominio en condiciones fisiológicas. Estos antecedentes han llevado a varios autores a concluir que este modelo *no sería* una representación adecuada de la estructura en condiciones fisiológicas [3].

### 1.4.3 Nueva evidencia estructural

A la fecha de la redacción de esta tesis, a 45 años de las primeras estructuras de GJC obtenidas (1980) y a 16 años de la primera cristalografía de rayos X de un GJC (2009), aún no conocemos, a ciencia cierta, la estructura de un canal cerrado. La estructura representativa del canal abierto, considerada como el estándar durante más de una década, hoy está en entredicho. No obstante, nuevas estructuras con resolución atómica de GJC y HC resueltas en los últimos años, podrían dar luces sobre la naturaleza de estos canales y sus mecanismos de regulación.

En 2018, Myers y cols. [11] resolvieron mediante crio-microscopía electrónica (*cryo-EM*) la estructura de un GJC heterotípico de sCx46/Cx50 (de la subfamilia  $\alpha$ -Cxs). De acuerdo a lo descrito por los autores, la estructura obtenida correspondería a un canal abierto, estabilizado de forma similar al GJC de hCx26 de 2009. Sin embargo, una diferencia clave con esta última estructura es que la NTH en sCx46/Cx50 presenta los residuos polares orientados hacia el lumen del poro del HC, y los residuos apolares orientados hacia el núcleo hidrofóbico de la proteína; justo al contrario de lo observado en el modelo resuelto del GJC de hCx26 en 2009 (véase Figura 2B y Figura 3A) [10]. Es más, al superponer las estructuras puede observarse que en hCx26 la hélice está rotada con respecto a la hélice en sCx46/Cx50 (véase Figura 2B y Figura 3A). Además, en simulaciones de MD, se ha visto que la NTH en sCx46/Cx50 es mucho más estable que en hCx26 (Figura 2C). Entonces, quedaría por resolver si estas diferencias estructurales se explican por las diferentes subfamilias analizadas (Cx26 es de la subfamilia  $\beta$  y Cx46/Cx50 es  $\alpha$ ) o son el resultado de las distintas condiciones experimentales usadas. Posteriormente, en 2022 se resolvieron mediante *cryo-EM*, tres nuevos modelos de GJC de hCx26 a diferentes presiones parciales de CO<sub>2</sub> [41], en donde se observa (Figura 3A) que la NTH presenta una orientación similar a la del canal heterotípico de sCx46/Cx50, inclinando la balanza hacia los últimos modelos [11, 35].

En 2020, Khan y cols. resolvieron por *cryo-EM* estructuras del GJC de hCx26 a pH 7,5 y a pH 6,5 [42]. Ambas estructuras presentan características similares a las resueltas por cristalografía tanto en 2009 como en 2016 [10, 23], con resoluciones de 4 Å y 4,2 Å, respectivamente. Lamentablemente, la NTH no logró ser resuelta en ninguna de estas estructuras. Sin embargo, se obtuvo una estructura de GJC a la que se le consideró como un



**Figura 3: Conformaciones de la NTH en el estado abierto y cerrado (hipótéticas).** **A)** Comparación estructural de la NTH en el modelo cristalográfico del GJC de hCx26 (PDBid:2ZW3) [10] en magenta y en los modelos resueltos por cryo-EM: del HC de sCx50 (PDBid:6MHY) [11] en anaranjado claro y del GJC de hCx26 (PDBid:7QER) [41] en cian, que son representativos del estado abierto de canales de Cxs. **B)** Comparación estructural de los modelos resueltos por cryo-EM: del GJC de hCx26 cerrado por pH (PDBid:6UVT) [42] en marrón y del HC de hCx31.3 (PDBid:6L3T) [43] en púrpura, ambas conformaciones son propuestas como modelos de *gating* de canales de Cxs. En donde se aprecian la NTH y la TM1 con su estructura secundaria representada en *cartoon* y las cadenas laterales de dos residuos de leucina en la NTH detallados como *sticks*.

canal cerrado, porque los mapas de densidad obtenidos, pese a la baja resolución (7,5 Å), muestran una oclusión central formada probablemente por las 6 NTHs, presentes en ambos HCs. A estas regiones no les fue asignada estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice (Figura 3B) ya que para formar dicha oclusión la cadena polipeptídica se tendría que desenrollar hacia el centro del poro, bloqueándolo. De manera notoria, este bloqueo seguiría el modelo de “bola-cadena” que ha sido propuesto anteriormente por otros autores para canales formados por Cxs [10] y otros canales iónicos [44].

También en 2020, se resolvió la estructura del HC de conexina 31.3 humana (hCx31.3), perteneciente a la subfamilia de  $\gamma$ -Cxs, por cryo-EM a una resolución de 2,3 Å [43]. En general, la estructura del HC es similar a las estructuras previamente resueltas. Sin embargo, las NTHs en el HC de hCx31.3 se localizan próximas al vestíbulo citoplasmático del HC, completamente perpendiculares al eje del poro (véase Figura 3B). La conformación de la NTH en el HC de hCx31.3 es estabilizada por las interacciones intracatenarias entre la NTH y la TM2 por los residuos F5 y L9 en la primera, y por los residuos T95, L96, V99, I100 y W103, en la última. De estos últimos, cinco residuos hidrofóbicos son altamente conservados en las subfamilias  $\alpha$  y  $\gamma$ -Cxs, incluyendo a Cx43 y Cx46, antecedentes que llevaron a los autores a proponer que esta conformación podría estar presente en canales formados por otras isoformas. El HC de hCx31.3 presenta un diámetro en el vestíbulo citoplasmático de 8 Å mientras que en los GJC de hCx26 y sCx46/Cx50 es de 10 Å y 11 Å, respectivamente. El HC de hCx31.3 es estructuralmente estable en simulación de MD en donde el RMSD converge en 3,5 Å, cifra cercana a la resolución del cristal. Adicionalmente, al calcular la fluctuación cuadrática media o RMSF (*root mean square fluctuation*) se observa que todos los residuos, exceptuando por los que forman los CLs, fluctúan alrededor de 1 Å, destacando la estabilidad estructural.

Si bien el HC de hCx31.3 no estaría en un estado completamente cerrado, según los estudios tanto *in silico* como experimentales presentados en esta publicación, las NTHs en esa posición podrían aproximarse, cerrando el canal al formar una estructura tipo “compuerta”, similar al modelo de *gating* mediado por pH propuesto por Garciarena y cols. [30].

## 1.5 Preguntas abiertas

Considerando los antecedentes discutidos en las secciones anteriores, quedan abiertas una serie de preguntas de investigación que serán abordadas en el transcurso de esta tesis: (i) Dada la dificultad para resolver la estructura de la **NTH** en canales formados por **hCx26** mediante cristalografía de rayos X y; la variabilidad presentada por el dominio **NTH** en simulaciones de **MD** que usan el modelo de Maeda y cols. [10] como inicial. Cabe preguntarse **¿En el estado abierto, la **NTH** tiene la conformación observada en el modelo original de Maeda y cols.[10] o la conformación presente en las nuevas estructuras resueltas[11, 35, 41]?** Por otro lado, (ii) dada la estructura del **HC** de **hCx31.3** **¿podría la **NTH** seguir el modelo de “compuerta” como mecanismo de gating en el **HC** de **hCx26**?** Donde la **NTHs**, en el estado abierto, tienen una posición próxima a la interfaz proteica del **HC**, se desplazarían al vestíbulo citoplasmático en el lumen del poro -como en **hCx31.3**- transitando por un estado semicerrado, para luego, las **NTHs** en monómeros opuestos se aproximarían cerrando el canal.

## 2 Hipótesis

Con el fin de dar respuesta a las preguntas enunciadas en la sección anterior, se propone la siguiente hipótesis:

*Si la **NTH** en el estado abierto del hemicanal de **hCx26** adopta la conformación observada en el canal heterotípico de **sCx46/Cx50** entonces, durante el gating la **NTH** se desplazaría hacia lumen del **HC** llevándolo al estado cerrado siguiendo el modelo de “compuerta”.*



### 3 Objetivo General

De acuerdo a la hipótesis planteada para el presente proyecto, se propone el siguiente objetivo general:

**Caracterizar la estructura y dinámica de la NTH en el estado abierto del HC de hCx26 y proponer un mecanismo por el cual la NTH cierra el HC al seguir el modelo de compuerta.**

### 4 Objetivos Específicos

1. Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50.
2. Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados.

## 5 Diseño Experimental

### 5.1 Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50

Para lograr este objetivo primero fue necesario generar un modelo del HC de hCx26 híbrido en donde la NTH tiene la conformación del canal heterotípico de sCx46/Cx50 [11]. Mediante el uso de modelamiento comparativo [45] se generó este modelo usando como moldes: la estructura de la NTH y TM1 de sCx50 (PDBid: 6MHY) y la estructura del resto del monómero del modelo de Maeda y cols [10] (PDBid: 2ZW3) (véase Figura 4A).

Como se ve en la Figura 4A una vez generado el modelo híbrido, este fue insertado en una membrana lipídica, la que a su vez se incorporó a una caja con moléculas de agua y iones. Este sistema fue sometido a simulación de MD y se caracterizó el comportamiento del HC y del dominio NTH.

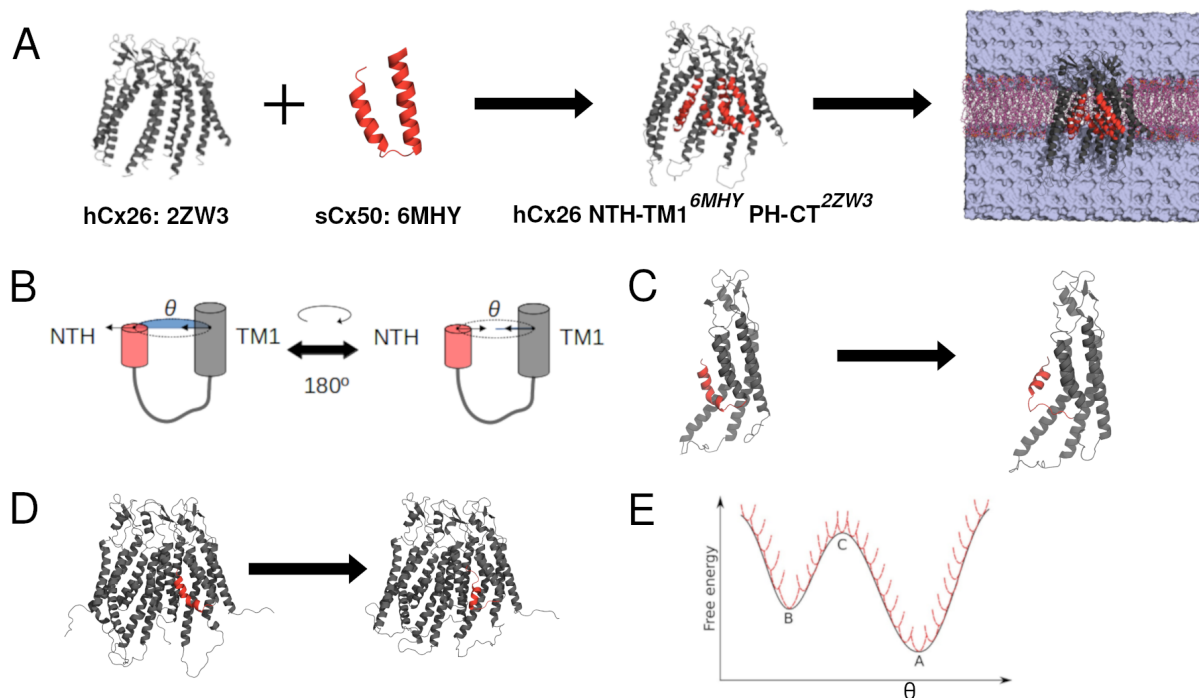
Por otro lado, se hizo una descripción termodinámica entre las conformaciones de la NTH en el modelo híbrido y el modelo de Maeda y cols [10]. Primero se realizó esta descripción solo para un monómero, utilizando una simulación de MD en donde se fuerza la rotación de la NTH convirtiendo el modelo híbrido en el modelo de Maeda. Para conseguir esta rotación se definió como coordenada de reacción, que corresponde al ángulo  $\theta$ , entre las orientaciones de los vectores normales a las rectas que pasan por el centro de las hélices NTH y TM1, respectivamente (véase Figura 4B-C). Con la trayectoria generada se realizó un muestreo tipo *umbrella sampling* [46] y mediante el uso de algoritmos de desesgado como WHAM [47-49] y *multiple Bennett Acceptance Ratio* (mBAR) [50-52] se obtuvo una curva que describe la superficie de energía libre entre ambas conformaciones en función del ángulo de rotación de la NTH,  $\theta$  (véase Figura 4E). Luego se realizó el mismo procedimiento con 1 monómero en el HC completo (véase Figura 4D-E).

### 5.2 Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados

Con el fin de identificar los cambios conformacionales de la NTH que permiten el cierre del HC de hCx26 mediante el modelo de “compuerta”. En este modelo, la NTH en el estado abierto se encuentra próxima a la TM1 y se desplaza al vestíbulo citoplasmático del HC, para luego cerrar el canal aproximándose a la NTH del monómero opuesto. Para ello, se separó el mecanismo de cierre en dos partes:

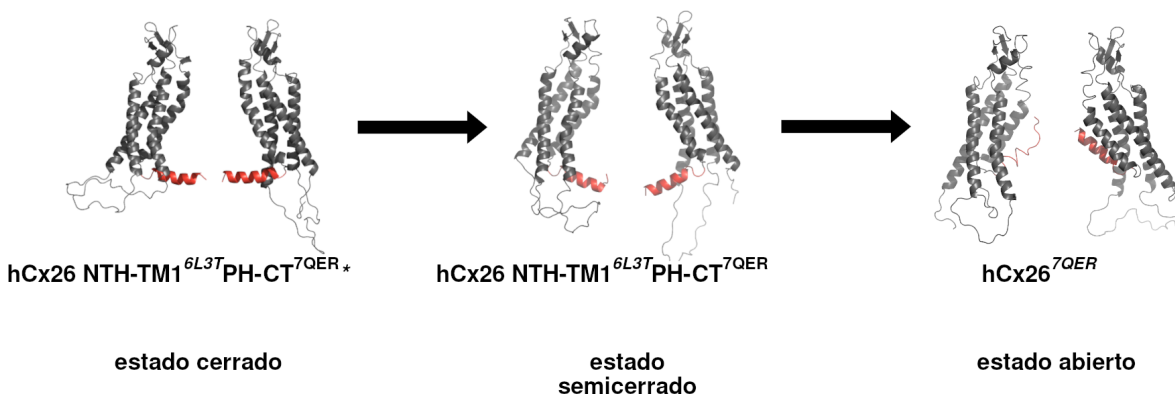
1. El tránsito de la NTH próxima a la TM1 (en el estado abierto) hacia el vestíbulo citoplasmático (estado semicerrado).
2. El cierre del canal mediante la aproximación de las NTHs de monómeros opuestos.

Para hacer el muestreo de los cambios conformacionales en ambas partes del mecanismo de cierre, se utilizó el método de WT-MetaD (*Well Tempered Metadynamics* en inglés) [54, 55] el cual permite realizar el muestreo en función de una determinada coordenada de reacción y calcular la energía libre asociada al proceso. En este caso se usó el paquete especializado en técnicas avanzadas de simulación PLUMED2 [56]. La coordenada de reacción escogida es la Variable Colectiva (CV) disponible en PLUMED2, PATH [57] la cual permite explorar el cambio conformacional de una molécula de un estado A, a un estado B. En este caso, el estado A en la primera parte del mecanismo de cierre es el estado semicerrado del HC y el estado B es el estado abierto. Mientras que en la segunda parte los estados A y B son el estado cerrado y semicerrado del HC respectivamente. Los modelos



**Figura 4: Diseño experimental del Objetivo 1.** **A)** Confección del modelo del HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> (híbrido), mediante modelamiento comparativo usando como moldes sCx50 (PDBid: 6MHY) para los dominios NTH y TM1 y hCx26 (PDBid: 2ZW3) para el resto de proteínas. Este modelo fue inserto en una bicapa de POPC que a su vez fue embebido en una caja llena de moléculas de agua y iones, que luego fue sometido a simulación de MD en un ensamble termodinámico NPT anisotrópico (aNPT). **B-E)** Paralelamente se hicieron simulaciones de MD forzando una rotación de 180° en la NTH (a través del ángulo  $\theta$ ), interconvirtiendo los modelos de HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> y hCx26<sup>2ZW3</sup> (control). Las simulaciones de rotación fueron primero, con un solo monómero y luego con un solo monómero en el HC completo. De las trayectorias generadas se hicieron muestreos tipo *umbrella sampling* obteniendo curvas de PMF en función del ángulo de rotación  $\theta$  como variable colectiva. Panel E modificado de [53].

del HC en los estados abierto, semicerrado y cerrado fueron generados mediante modelamiento comparativo [45]. Para los estados semicerrado y cerrado se usó como molde de la NTH y TM1 la estructura del HC de hCx31.3 (PDBid: 6L3T) [43] y para el resto del monómero se usó el modelo hCx26 resuelto por Brotherton y cols (PDBid: 7QER) [41], en el caso del modelo del estado cerrado se aplicó una restricción de distancia a las NTHs durante el modelado para que las NTHs opuestas estuvieran a una distancia de 4 Å entre sí. En cambio, para el estado abierto del HC se usó el modelo de hCx26 resuelto por Brotherton y cols. [41] donde las partes faltantes fueron completadas con modelamiento comparativo [45] y aplicando restricciones de distancia entre los átomos de los residuos faltantes en la NTH completando la hélice- $\alpha$ .



**Figura 5: Diseño Experimental de Objetivo 2.** Esquematización del mecanismo de *gating* siguiendo el modelo “de compuerta”, donde la *NTH* cambia su posición entre los estados cerrado (izquierda), semicerrado (centro) y abierto (derecha) representados por los modelos de *HC* hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>, hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> y hCx26<sup>7QER</sup> respectivamente. Los dos primeros modelos se generaron mediante modelamiento comparativo usando como molde para la *NTH* y *TM1* la estructura del *HC* de hCx31.3 (PDBid: 6L3T) y la estructura del *HC* de hCx26 resuelto por Brotherton y cols. (PDBid: 7QER), pero el modelo del estado cerrado fue generado aplicando una restricción de distancia de 4 Å entre las *NTH*s. El modelo del estado abierto (hCx26<sup>7QER</sup>) es el modelo resuelto por Brotherton y cols. al que se le completaron los dominios no resueltos mediante modelamiento comparativo y aplicando una restricción de distancia entre los átomos faltantes de las *NTH*s.

## 6 Métodos

### 6.1 Modelamiento

Para generar los modelos comparativos se utilizó el software MODELLER 10.3 [45]. Como se mencionó previamente, para el modelo de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> o “híbrido”, se utilizaron los modelos de Maeda y cols. (PDB id: 2ZW3) [10] y el *HC* de sCx50 (PDB id: 6MHY) [11] como moldes, donde ambas estructuras fueron alineadas. Luego, se seleccionaron los residuos de la *NTH* y la *TM1* (residuos del 2 al 40) de cada monómero del *HC* de sCx50 y del *HC* de hCx26 se tomaron el resto de los residuos para generar el modelo del *HC* de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>.

Por otro lado, también se completaron las regiones faltantes de la estructura de Maeda y cols. [10] utilizando el mismo programa MODELLER 10.3 [45]. Este modelo (hCx26<sup>2ZW3</sup>) fue utilizado como control.

Para generar los modelos del *HC* de hCx26 en los estados abierto, semicerrado y cerrado que se utilizaron para generar los “caminos” o “*paths*” entre los diferentes estados del *HC*, para luego ser usados en las simulaciones *WT-MetaD* respectivas (véase 5.2) también se usó MODELLER 10.3. Al igual que para el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>, para los modelos de los estados semicerrado y cerrado (modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> respectivamente), se usó el modelo del *HC* de hCx31.3 (PDBid: 6L3T) [43] como molde para los dominios *NTH* y *TM1*, pero esta vez usando como molde para el resto de residuos de cada monómero el modelo de hCx26 resuelto por Brotherton y cols. (PDBid: 7QER) [41] y usando restricciones de distancia entre los átomos de las *NTH* opuestas durante el modelado para el caso del modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> (estado cerrado) y que estas se encuentren entre sí a una distancia de 4 Å. Además, de la misma forma que con el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>, se completaron las regiones faltantes del modelo de Brotherton y cols. [41] usando MODELLER 10.3 [45] para usarlo como modelo del estado abierto del *HC* (hCx26<sup>7QER</sup>). Pero para este último modelo, hCx26<sup>7QER</sup>, se aplicaron restricciones de distancia en los átomos de los residuos 1-3 para que formen la porción faltante de hélice- $\alpha$  en la *NTH* durante el modelado. También se

completaron las partes faltantes al modelo resuelto por Khan y cols. (modelo hCx26<sup>6UVT</sup>) [42] para usarlo como estructura representativa del estado cerrado del modelo “bola-cadena”.

Para cada modelo comparativo se generaron 500 modelos y se seleccionaron los mejores modelos usando el software MAIDEN [58] que utiliza potenciales estadísticos para evaluar modelos de proteínas de membrana.

## 6.2 Simulaciones

Para preparar los sistemas para las simulaciones se utilizó un protocolo desarrollado en el laboratorio basado en el protocolo usado por el programa CHARMM-GUI [59]. Los HC fueron insertados en una membrana lipídica de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glicerol-3-phosphocholine* en inglés) y embebido en una caja de 150 × 150 × 120 Å<sup>3</sup>, lleno con el modelo de moléculas de agua TIP3P [60] y 150 mM KCl. La distancia mínima del límite de la celda de simulación fue de 15 y 35 Å para el eje *z* y los ejes *x* e *y* respectivamente, respetando el criterio de imagen mínima. Se usó el campo de fuerza CHARMM-36 para proteínas y lípidos [61, 62].

**Simulaciones al equilibrio:** La mayoría de las simulaciones fueron hechas con el paquete GROMACS 2020 [63]. A los sistemas generados con los HC de hCx26, se sometieron a 5.000 pasos de minimizado de energía utilizando en algoritmo *steepest descent*. Después, se realizó una sucesión de simulaciones de equilibrado, primero usando solo un termostato de Berendsen [64] en un ensamble NVT (*n*<sup>º</sup> de átomos, volumen y temperatura constante) y luego agregando un barostato de Berendsen [64] en un ensamble NPT (*n*<sup>º</sup> de átomos, presión y temperatura constante) anisotrópico o aNPT, por 25 ps cada etapa, con un paso de tiempo de 0,001 ps. Luego, como tercera etapa de equilibrado se realizó 150 ps de simulación en las mismas condiciones, pero con un paso de tiempo de 0,002 ps y después una cuarta etapa de 1 ns repitiendo las condiciones, pero usando el termostato Noose-Hoover [65, 66] y el barostato de Parinello-Rahman [67]. Estas 4 etapas de equilibrado se realizaron aplicando restricciones de movimiento en los átomos “pesados” de la proteína y la membrana lipídica. Finalmente, se realizaron 50 ns (hCx26<sup>7QER</sup>, hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>, hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> y hCx26<sup>6UVT</sup>) y 100 ns (para los modelos hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>) de equilibrado con las mismas condiciones del paso anterior, pero sin restricciones de movimiento, en un ensamble aNPT con 1 atm y 310,15 K. Luego para los modelos hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> a partir de la estructura final de la simulación de equilibrado se realizaron 3 réplicas de 100 ns cada una. En todas las simulaciones fue usado el algoritmo LINCS [68] sobre los átomos de hidrógeno y PME [69] para el cálculo de los potenciales electrostáticos.

**Rotación forzada y umbrella sampling:** Para generar la trayectoria en que la NTH rota interconvirtiendo el modelo de HC hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> al modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>, se utilizó el módulo de *rotación forzada* de GROMACS 2020 [63, 70]. Primero se realizó la rotación con solo un monómero aislado en una caja con agua y iones en un ensamble aNPT y aplicando restricción de movimiento en las TMs. La rotación fue llevada a cabo con una constante de fuerza de 200 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> y una tasa de cambio del ángulo de 0,021 ° s<sup>-1</sup>. Después, para el HC completo se realizó la simulación donde se rotó la NTH de un solo monómero usando los mismos parámetros ya mencionados y aplicando también restricciones de movimiento en las TMs. Luego, de las trayectorias de rotación forzada se obtuvieron instantáneas o “snapshots” cada 5° para la simulación con el monómero de hCx26 aislado y cada 2,5° para la simulación con el HC completo. Y se realizaron muestreos tipo *umbrella sampling* (véase Anexo 10.2) [46] aplicando restricciones armónicas con constantes de fuerza de 500 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> en las simulaciones con el monómero aislado y de entre 200 y 500 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> para simulaciones con el HC completo. Finalmente, se calculó el potencial de fuerza media o *Potential Mean Force* (PMF) utilizando los algoritmos WHAM [47-49] y mBAR [50-52] (véanse los Anexos 10.3.1 y 10.3.2).

**Simulaciones de pulling y WT-MetaD:** Para el muestreo entre los estados abierto, semicerrado y cerrado del HC de hCx26, primero se generaron los *paths* o “caminos” entre estos estados, para ello se usó el módulo *pathtools* de PLUMED2 (versión 2.10-dev) [56]. Los *paths* se generaron a partir de las estructuras (al final de las simulaciones de “equilibrado” respectivas) de los modelos hCx26<sup>7QER</sup>, hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>, usando solo los átomos de la cadena principal y cada *path* tiene 12 “frames” equidistantes entre sí. Los *paths* fueron generados de forma tal que se mida el cambio de posición solo del dominio NTH, mediante las columnas OCCUPANCY y B-FACTOR de los archivos PDB, donde, para el dominio NTH, las columnas OCCUPANCY y B-FACTOR se les asignó los valores de 0.00 y 1.00, mientras que para el resto de dominios estas columnas tienen los valores de 1.00 y 0.00. Cabe destacar que para la transición del estado semicerrado al abierto se generaron dos *paths* o “caminos”, cada uno usando un solo 1 monómero del HC y que son opuestos entre sí. Mientras que, para la transición entre los estados cerrado y semicerrado, se generó un solo *path* usando los dos monómeros en que las NTHs son opuestas entre sí.

Luego, se realizaron una serie de simulaciones fuera del equilibrio, usando GROMACS 2023.5 [63] parchado con PLUMED2 (versión 2.10-dev) [56] y la CV PATH [57]. Esta Variable Colectiva comprende dos medidas: *S path* y *Z path*, donde *S path* representa el “camino” que sigue la molécula, mientras que *Z path* representa la distancia en que la molécula se aleja o se desvía de este “camino” ideal, ambas medidas están definidas por las siguientes ecuaciones:

$$s = \frac{\sum_{i=1}^N i \exp(-\lambda R[X - X_i])}{\sum_{i=1}^N \exp(-\lambda R[X - X_i])} \quad (1)$$

$$z = -\frac{1}{\lambda} \ln \left[ \sum_{i=1}^N \exp(-\lambda R[X - X_i]) \right] \quad (2)$$

Donde  $N$ , representa el número total de “frames” contenidos en el *path*,  $X$  representa la posición de los átomos de la molécula, en este caso de la cadena principal de la proteína y  $X_i$  la posición de los átomos de cada “frame” del “camino” y  $R[X - X_i]$  corresponde a la distancia entre la molécula y cada “frame” dada por el RMSD. Mientras que el parámetro  $\lambda$  corresponde al “espacio” que cada “frame” ocupa en el camino, entre más alto el valor de éste, menor espacio ocupa cada “frame” y viceversa. De esta forma, *S path*, que es adimensional, indica en que parte del “camino” se encuentra la proteína y *Z path* indica a qué distancia, en nanómetros, la proteína se aleja del “camino”. Para todas las simulaciones fuera del equilibrio se usó un valor de  $\lambda$  de 20.

Las simulaciones fuera del equilibrio realizadas fueron en primera instancia simulaciones de *pulling* de entre 10 y 50 ns donde se usó *S path* como coordenada de reacción y aplicando una constante de fuerza 50 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>, de forma tal que la o las NTH cambien sus posiciones entre los estados varias veces. Luego, con las trayectorias obtenidas se reparametrizaron los *paths* usando el módulo de PLUMED2 [56] *driver*.

Una vez los *paths* fueron reparametrizados se realizaron simulaciones WT-MetaD [54, 55] (véase Anexo 10.4) usando como coordenadas de reacción el *S path* y *Z path* y como ancho y alto de *gaussiana* 0,2 (U.A. o nm) y 1,2 kJ mol<sup>-1</sup> respectivamente. Las *gaussianas* fueron depositadas cada 1.000 pasos y se usó un *biasfactor* de 30. También se usó una grilla de 300 *bins*, usando como valor mínimo y máximo para *S path* de -1 y 13 U.A. y para *Z path* de -0,5 y 2 nm respectivamente. Para cada *path* se hicieron 4 réplicas de simulaciones independientes de 100 ns.

En las simulaciones de *pulling* y WT-MetaD se usaron restricciones de movimiento sobre el resto de las NTHs del HC y la constante de fuerza usada para la restricciones fue de 1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>. Además, en las simulaciones de WT-MetaD se aplicaron *upper walls* para valores de *Z path* mayores a 0.6 nm usando una constante de fuerza

de 1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>.

Luego, usando el módulo *driver* de PLUMED2 [56] se calculó la probabilidad en función *S path* quitando el sesgo aplicado durante la simulación de WT-MetaD para cada réplica, para después calcular el promedio de probabilidad y la desviación estándar:

$$\bar{h} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N h_i \quad (3)$$

$$\sigma(h) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N h_i^2 - \bar{h}^2 \right]} \quad (4)$$

Donde  $h$ ,  $\bar{h}$ ,  $\sigma(h)$  y  $N$  son la probabilidad, probabilidad promedio, la desviación estándar y el número de réplicas respectivamente. A partir de la probabilidad promedio y la desviación estándar se calcularon el PMF promedio y el error:

$$\overline{PMF} = -k_B T \ln[\bar{h}] \quad (5)$$

$$\sigma(PMF) = \frac{\sigma(h)}{\bar{h}} k_B T \quad (6)$$

Donde  $\overline{PMF}$ ,  $\sigma(PMF)$ ,  $k_B$  y  $T$  son el PMF promedio, el error, la constante de Boltzmann y la temperatura de 310,15 K respectivamente.

### 6.3 Análisis estructural

Para analizar la exposición a solvente de los residuos del dominio NTH se usó el módulo SASA disponible en GROMACS [63].

Además, el módulo de Python especializado en estructura y dinámica de biomoléculas, MDAnalysis [71, 72], fue usado tanto para medir, posiciones, distancias y ángulos entre grupos de átomos como para medir el RMSD y RMSF, siguiendo las siguientes fórmulas:

$$\rho(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i(t) - x_i^{ref})^2} \quad (7)$$

$$\rho_i = \sqrt{\langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle} \quad (8)$$

Donde, en 7 el  $\rho(t)$  es el RMSD en función del tiempo  $t$ ,  $N$  es el número de átomos,  $x_i(t)$  la posición del átomo  $i$  en el tiempo  $t$  y  $x_i^{ref}$  es la posición del átomo  $i$  en la estructura usada como referencia. Mientras, que en 8  $\rho_i$  es el RMSF del átomo  $i$ ,  $x_i$ , es el átomo  $i$  y  $\langle x_i \rangle$  es la posición promedio del átomo  $i$  en la trayectoria. Para ambas métricas se consideró, para el cálculo, solo la posición de los átomos de carbono  $\alpha$  del HC. Además, para el dato de RMSD de se hizo un suavizado empleando el método *lowess* [73]. Este método consiste en una regresión polinómica ponderada, en que cada punto del conjunto de datos se ajusta una regresión polinómica de grado bajo, donde el ajuste de los datos al polinomio se efectúa con una ponderación de mínimos cuadrados, obteniendo una curva suavizada de los datos.

Para la caracterización del movimiento de la NTH durante las simulaciones al equilibrio, usando MDAnalysis [71, 72], por un lado, se midió la distancia entre el centro de masa del grupo de átomos que conforman la NTH y

el centro geométrico del HC. Esta distancia fue descompuesta en dos componentes: en el eje  $z$  y en el plano  $xy$  o radial. Al mismo tiempo, se midió el ángulo ( $\phi$ ) entre el vector de desplazamiento formado por los átomos de la NTH y la recta normal del HC, que es perpendicular a la membrana.

Para medir el radio del poro se usó la implementación del software HOLE disponible en MDAnalysis [74-76] y como segunda aproximación se midió la distancia entre los extremos de las cadenas laterales de los residuos D2, W3 y G11 de la NTH y los residuos K41, E42 y E47 de la PH ubicados en monómeros opuestos.

Por último, para calcular el porcentaje de tiempo de simulación en que cada residuo de la NTH mantiene la  $\alpha$ -helicidad, se midió cuanto tiempo se mantienen interacciones de puente de hidrógeno en la cadena principal cada 4 residuos. Para ello, se calculó la energía del puente de hidrógeno usando el algoritmo DSSP [77, 78], que fue implementado usando MDAnalysis [71, 72] y siguiendo la siguiente ecuación:

$$E = 0.084[e^2]\left(\frac{1}{r_{ON}} + \frac{1}{r_{CH}} - \frac{1}{r_{OH}} - \frac{1}{r_{CN}}\right) \cdot 332[\text{kcal mol}^{-1} \text{e}^{-2} \text{\AA}^{-1}] \quad (9)$$

Donde,  $E$  es la energía en  $\text{kcal mol}^{-1}$  y los términos  $r_{AB}$  es la distancia de los átomos A y B que corresponden a los átomos de carbono (C) y oxígeno (O) de los grupos carboxilo (C=O) y los átomos de nitrógeno (N) e hidrógeno (H) de los grupos amino (N-H) presentes en los enlaces peptídicos. Si la energía es menor a  $-0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$  se considera que el residuo está formando un puente de hidrógeno.

Además, se calculó la autocorrelación de orden 1 del vector del vector de rotación de la NTH en las simulaciones al equilibrio, según la siguiente ecuación:

$$C(t) = \langle u(t) \cdot u(t_0) \rangle_{t_0} \quad (10)$$

Donde,  $C(t)$  es la autocorrelación de orden 1 en función del tiempo  $t$ ,  $u(t)$  y  $u(t_0)$  son los vectores de rotación en el tiempo  $t$  y el tiempo de origen respectivamente. Los paréntesis triangulares ( $\langle \rangle_{t_0}$ ) representa el promedio del producto punto de los vectores  $u(t)$  y  $u(t_0)$  con respecto a múltiples orígenes a lo largo de la trayectoria de la simulación.

Todos los análisis descritos fueron realizados usando las trayectorias de las 3 réplicas de 100 ns para los modelos hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>, y se calculó el promedio y desviación estándar.



## 7 Resultados

### 7.1 Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del HC de hCx26 cuando la NTH adopta la conformación presente en el canal heterotípico de sCx46/Cx50

Como se mencionó anteriormente, para realizar el Objetivo 1 se generó un modelo híbrido del HC de hCx26 (hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>) y se completó el modelo de Maeda y cols para utilizarlo como control (hCx26<sup>2ZW3</sup>). Ambos modelos fueron insertos en una bicapa de POPC, embebidos en una caja de agua y iones y sometidos a 100 ns de simulación de MD en un ensamble aNPT a 1 atm de presión y 310,15 K. Luego, a partir de las estructuras finales de cada simulación se hicieron 3 réplicas independientes de 100 ns cada una.

#### 7.1.1 La NTH mantiene la conformación presente en sCx50, en el modelo del HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>

Como se observó en la publicación de Myers y cols [11] que la NTH en el modelo del canal heterotípico de sCx46/Cx50 presenta una orientación diferente a la observada en el modelo de hCx26 resuelto por Maeda y cols [10] (Figura 6A), donde los residuos de aminoácido polares se orientan hacia el poro del canal (Figura 6B) y que esta orientación se mantiene cuando la estructura es sometida a simulaciones de MD. Debido a esto, se evaluó si la NTH en el modelo híbrido (hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>) mantiene dicha orientación (Figura 6C). Para responder esto, se usó la exposición de cada residuo al solvente como aproximación de la orientación de los residuos, donde aquellos con mayor exposición estarían orientados hacia el poro. Para medir la exposición al solvente se usó el módulo de análisis de GROMACS, SASA. En la Figura 6D se observa la exposición al solvente de los residuos: W3/4, T8/N9, V13/14 y K15/E16 en la estructura cristalográfica (2ZW3) del HC hCx26, la estructura del HC de sCx50 (6MHY) obtenida por cryo-EM y el promedio de la exposición al solvente en el modelo del HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>, calculado de los 6 monómeros y las 3 réplicas. Donde los residuos apolares están orientados hacia el centro hidrofóbico de la proteína y los polares orientados al poro, en el modelo híbrido del HC de hCx26 y la estructura del HC de sCx50. Mientras, en el modelo cristalográfico del HC de hCx26 tiene los residuos apolares con mayor exposición al solvente y los residuos polares con menor exposición, demostrando una orientación invertida con respecto a las otras dos estructuras.

Por lo tanto, el modelo del HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> mantiene la conformación sCx50 durante la simulación.

#### 7.1.2 El cambio de orientación de la NTH cambia el movimiento de la estructura del HC

Para estudiar la estabilidad de la estructura del HC en simulación se midió el parámetro RMSD. El RMSD da cuenta de cuanto varía la posición de los átomos en la estructura del HC durante la simulación con respecto a una estructura de referencia.

En este caso, para calcular el RMSD para los HC de los modelos hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> en las réplicas, se usaron como referencia las estructuras iniciales para cada sistema y se calculó el RMSD para los átomos de carbono  $\alpha$  de los 6 monómeros del HC. El RMSD, para el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> tiende a aumentar de 2,5 a  $\sim$ 3.5 Å aproximadamente, desde los 20 ns en adelante, mientras que, en el mismo periodo de tiempo, en el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>, el RMSD tiende a aumentar de 3,5 a 4,5 Å aproximadamente (Figura 7). Sin embargo, se calculó el RMSD de los átomos de carbono  $\alpha$  de la NTH, donde, como se observa en el recuadro interior de la Figura 7, el RMSD fluctúa entre 2,0 y 3,0 Å para ambos modelos a lo largo de la simulación. También, se suavizaron los datos del RMSD tanto el calculado para el HC completo como el calculado para la NTH

usando el método *lowess* [73]. El **RMSD** suavizado para el **HC** en los modelos **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** y **hCx26<sup>2ZW3</sup>** resultaron respectivamente 3,8 y 4,2 Å aproximadamente después de 100 ns, mientras que para la **NTH** en los modelos **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** y **hCx26<sup>2ZW3</sup>** resultaron alrededor de 2,9 y 2,6 Å al final de la simulación (Figura 7).

Ahora bien, para determinar qué partes de la proteína son más móviles que otras, se midió el **RMSF**. El **RMSF** entrega la información de cuáles átomos de la estructura de la proteína varían más o menos en su posición con respecto a la estructura promedio de la simulación.

Para este caso se calculó el **RMSF** de los carbonos  $\alpha$  de cada monómero de los modelos de **HCs** de **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** y **hCx26<sup>2ZW3</sup>**. En el modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>**, el **RMSF** fluctuó entre 2 y 16 Å aproximadamente (Figura 8A), mostrando peaks máximos correspondientes a los *loops* y los dominios **NTH** y **CT**, lo cual era esperable ya que son las regiones con mayor movilidad de la proteína. Sin embargo, en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** el **RMSF** varía entre 0,6 y 10 Å aproximadamente (Figura 8B), lo cual muestra que la estructura proteica presenta mayor estabilidad que en el control, excepto el **CL** donde se presenta mayor movilidad.

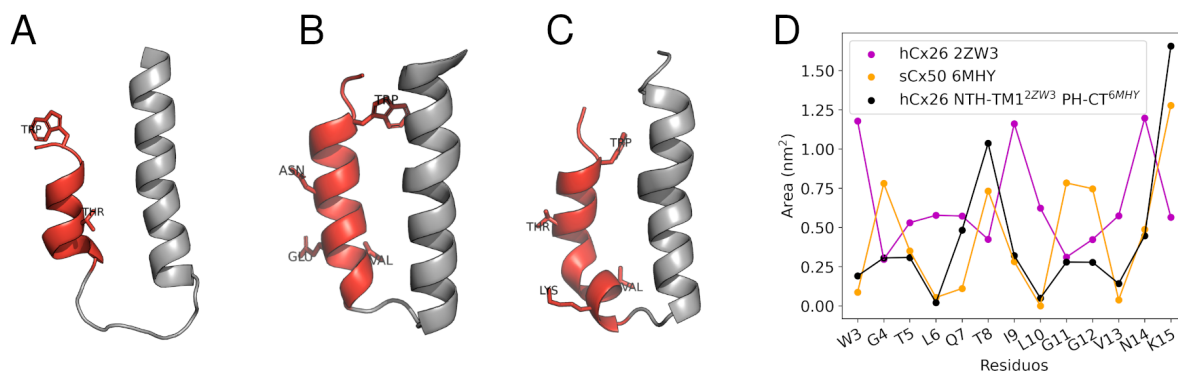
**En resumen, el **RMSD** y **RMSF** nos da indicios que el cambio de la orientación de la **NTH** está causando un cambio en la dinámica del **HC**, favoreciendo una mayor estabilidad.**

### 7.1.3 Caracterización del desplazamiento de la **NTH**

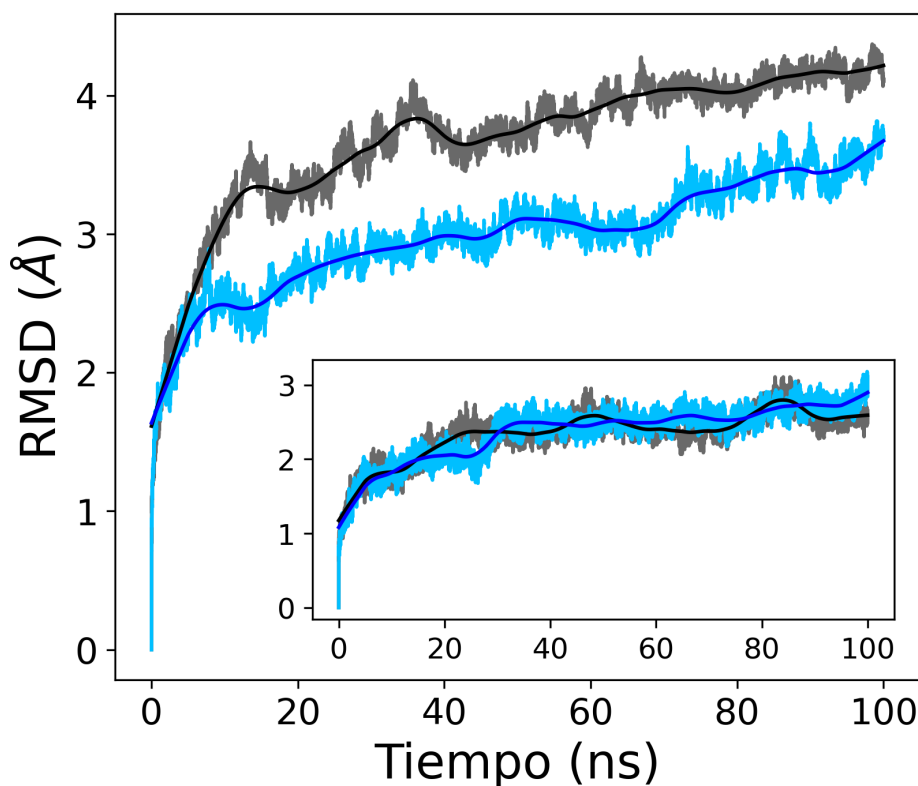
Luego se midió el desplazamiento de la **NTH**, respecto al resto de la proteína, al cambiar su orientación. La **NTH**, al estar en el medio del poro, puede tener un movimiento de bisagra en donde se puede acercar al centro del poro. Para medir este desplazamiento de la **NTH**, se mide el ángulo ( $\phi$ ), ver Figura 9C que forma el vector del desplazamiento de la **NTH** respecto a la recta normal del canal (perpendicular a la membrana). Otra forma es descomponer el vector de desplazamiento en (i) el movimiento de la **NTH** en el eje  $z$  (Figura 9A) y (ii) el movimiento radial de la **NTH** (Figura 9B). Se midió la distancia de entre la **NTH** y el centro de masa del **HC** en el eje  $z$  para dar cuenta de la primera componente del desplazamiento de la **NTH**. Se observa que la distancia varía entre monómeros en ambos sistemas. En el modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>**, la distancia es mayor que en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>**, fluctuando en los 6 monómeros entre 0,2 y 4,3 Å (Figura 9D). Mientras que en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** fluctúa entre 0 y 2,8 Å (Figura 9D). Para observar cómo fue afectada la otra componente del desplazamiento de la **NTH** se midió la distancia radial de la **NTH** respecto del centro de masa del **HC**. Se observa que la distancia radial de los 6 monómeros en ambos modelos es similar entre ambos modelos, teniendo mayores diferencias entre ellos los monómeros C, D y E. En los monómeros C y E la distancia es mayor en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>** con valores promedios de 25,8 y 25,7 Å respectivamente, mientras que en el modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>** las distancias promedio en los monómeros C y E es de 23,5 y 21,4 respectivamente (Figura 9E). En el monómero D, en cambio, la distancia es mayor en el modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>** con una distancia promedio de 28,9 Å, mientras que en el modelo híbrido tiene una distancia promedio de 23,9 Å (Figura 9E).

La otra aproximación para observar el desplazamiento de la **NTH** es medir el ángulo ( $\phi$ ), ver Figura 9C, que se forma entre el vector de desplazamiento de esta con la recta normal. En este caso, como se puede ver en la Figura 9F no hay diferencia del valor del ángulo medido entre los dos sistemas, teniendo una alta variación del valor del ángulo  $\phi$ .

Se esperaría observar que la medición del ángulo  $\phi$  coincidiera con las mediciones de la distancia radial y la distancia en el eje  $z$ , es decir, que al observar un mayor ángulo debería observarse mayores distancias radial y en el eje  $z$ . Lo cual no se observa en ninguno de los dos modelos (Figura 9F). La alta variación del ángulo entre el

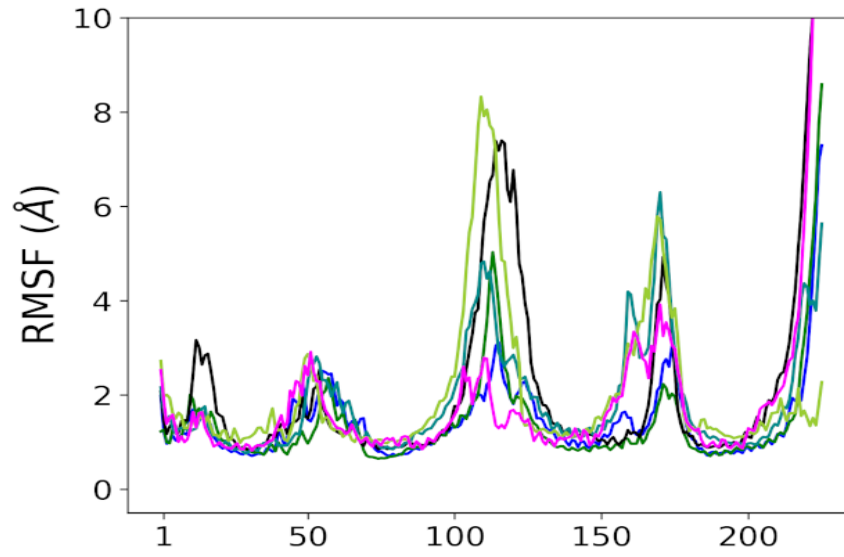


**Figura 6: Orientación de los residuos de la NTH.** A-C) Dominios NTH y TM1 de los modelos: hCx26 resuelto por Maeda y cols [10] (A), sCx50 resuelto por Myers y cols [11] (B) y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> después de someterse a una simulación al equilibrio (C). La cadena principal está representada en *cartoon* y las cadenas laterales de los residuos resaltados en *sticks*, el dominio NTH está coloreado en rojo y el dominio TM1 en gris. D) Exposición al solvente en nm<sup>2</sup> de los residuos del dominio NTH de las posiciones del 1 al 15 con respecto a la secuencia de hCx26. Fue calculada la mediana de la exposición al solvente de los residuos de los 6 monómeros en los modelos de hCx26 resuelto por Maeda y cols (PDBid: 2ZW3) en magenta y de sCx50 resuelto por Myers y cols (PDBid:6MHY) en anaranjado y para el modelo de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> (en negro) se calculó la mediana de los 6 monómeros y a lo largo de la simulación.



**Figura 7: Evaluación del movimiento del HC de hCx26 en la simulación de MD: RMSD.** RMSD (dato original y curva suavizada) de los átomos de carbono  $\alpha$  de los modelos de HC hCx26<sup>2ZW3</sup> (gris y negro, respectivamente) y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> (azul claro y azul, respectivamente) versus el tiempo en nanosegundos (ns). En el recuadro interior se observa el RMSD, calculado exclusivamente de los átomos de carbono  $\alpha$  de la NTH versus el tiempo.

A



B

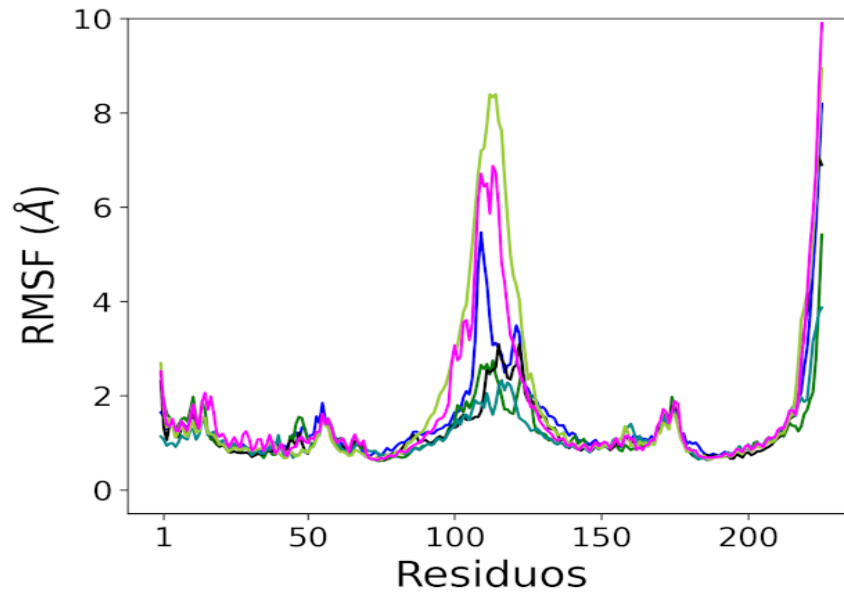
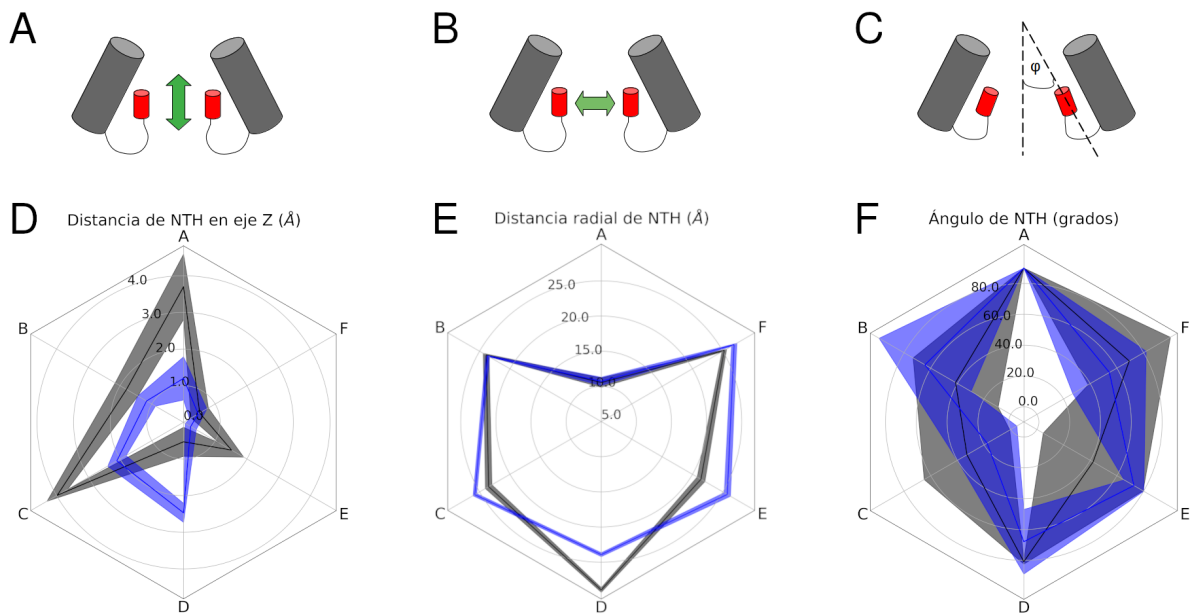


Figura 8: Evaluación del movimiento del HC de hCx26 en la simulación de MD: RMSF. A-B) RMSF de los residuos de los modelos de HC hCx26<sup>2ZW3</sup> (A) y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> (B). Cada curva representa el RMSF de cada monómero de Cx desde la A hasta la F en los colores azul, verde, negro, cian oscuro, amarillo verdoso y magenta respectivamente.



**Figura 9: Desplazamiento de la NTH.** A-C) Esquematzación del desplazamiento de la NTH según: El desplazamiento en el eje  $Z$  (A), desplazamiento radial o en el plano  $xy$  (B) y el ángulo ( $\phi$ ) entre el vector de desplazamiento de la NTH y la recta normal (perpendicular a la membrana) (C). D,E) Distancia entre centro de masa de la NTH y el centro geométrico del HC medido en el eje  $Z$  (D) y en el plano  $xy$  (E). F) Medición del ángulo entre el vector que forman el desplazamiento de los átomos de carbono  $\alpha$  de la NTH y la recta normal. Los vértices de los gráficos hexagonales representan los monómeros del HC y los círculos concéntricos la distancia en Å o unidades angulares (en grados). Las líneas y áreas sombreadas representan el promedios y la desviación estándar de 3 réplicas de 20 ns en color negro y azul para los modelos de HC hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> respectivamente.

vector de desplazamiento de la NTH con respecto la recta normal en ambos modelos podría estar dándose por alteraciones en la estructura secundaria de la NTH, ya que el vector de desplazamiento depende de la posición de los átomos de carbono- $\alpha$  que componen la hélice.

**Por lo tanto, en el eje  $z$  la NTH en el modelo híbrido presenta una mayor estabilidad del movimiento que en el modelo control, pero en ambos modelos podría haber alteraciones en la estructura secundaria de la NTH.** Por lo que es importante caracterizar la estructura secundaria de la NTH en ambos modelos.

#### 7.1.4 En el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> se mantiene la estructura secundaria de la NTH en la simulación

En el trabajo de Myers y cols. [11] observaron que la NTH en el canal heterotípico sCx46/Cx50 mantenía la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice en las simulaciones de MD; mientras que el modelo cristalográfico del GJC de hCx26 de Maeda y cols., se perdía la estructura de secundaria en simulaciones. Por esto, se midió cómo el cambio de la orientación afecta la estructura secundaria de la NTH. Para esto se calculó el porcentaje en el tiempo de simulación en que la NTH mantiene la “ $\alpha$ -helicidad”.

En el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup> se observó que la longitud de las hélices varía entre monómeros siendo la menor longitud de 3 residuos y la mayor del 7. En los monómeros A, C y E presentan las hélices mayor longitud y mayor un porcentaje de “ $\alpha$ -helicidad” entre 78 y 99 %, mientras que los monómeros D y F las hélices tienen menor longitud y entre 33 y 88 % de  $\alpha$ -hélice y el monómero B no forma una hélice (Figura 10A). Mientras que en modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> las hélices tienen una longitud uniforme en los 6 monómeros y presenta un porcentaje de  $\alpha$ -helicidad entre 95 y 100 % en los residuos de las posiciones del 3 al 6 y entre 40 y 100 % en las posiciones del 10 al 13. Sin embargo, la hélice se quiebra en los residuos Q7 e I9, donde el porcentaje de  $\alpha$ -hélice se reduce considerablemente.

**Por lo tanto, al igual que lo que pasa con la NTH en canal heterotípico sCx46/Cx50, el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> también mantiene la estructura secundaria de la NTH.**

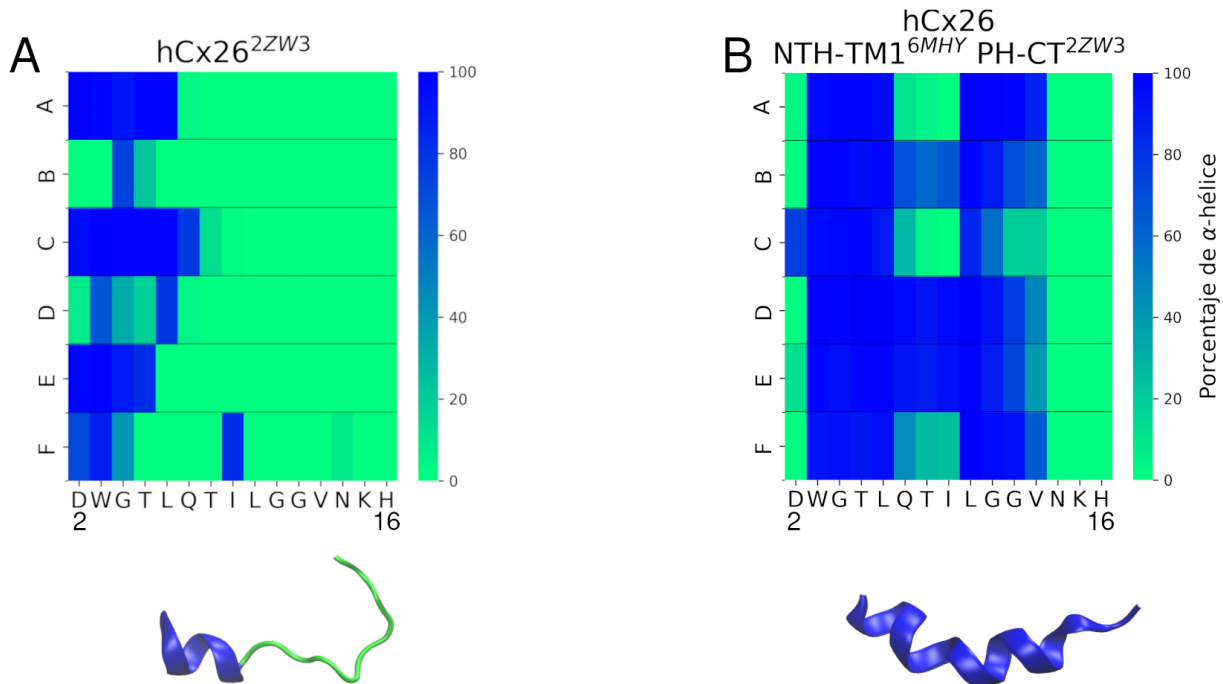
#### 7.1.5 Caracterización termodinámica de las conformaciones de la NTH en el estado abierto

Una vez caracterizada las propiedades dinámicas del modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> se prosiguió con la caracterización termodinámica de entre ambas conformaciones del HC hCx26 en el estado abierto, representadas en los modelos hCx26<sup>2ZW3</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>.

Como primera aproximación, se hizo una simulación en que se rota la NTH en 180° de un solo monómero del modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>, para esto de la estructura del HC equilibrada se extrajo uno de los monómeros y embebió en una caja de agua y iones de las mismas características del sistema original. Luego, de esta trayectoria de rotación se obtuvieron *snapshots* cada 5° y con ellas se hizo un muestreo tipo *umbrella sampling*.

En la Figura 11A, se pueden observar los histogramas en función del ángulo de rotación  $\theta$  de cada “ventana” de simulación del *umbrella sampling*, pero los “hombros” de estos histogramas no se solapan como para considerarse como un muestreo adecuado para el cálculo de PMF. Sin embargo, se calculó el PMF para poder tener una vista preliminar de la curva de energía de libre en función del ángulo  $\theta$  (Figura 12A-B), tanto usando los métodos de desesgado WHAM y mBAR, en la cual se observa que la diferencia de PMF entre ambas conformaciones es menor al ruido térmico ( $\sim 2.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

Después, se procedió con realizar la rotación de la NTH de un solo monómero, pero en el HC completo, en este caso la NTH se rotó hasta los 210°. A partir de la trayectoria de rotación se obtuvieron *snapshots* cada 2,5° y se realizó un muestro tipo *umbrella sampling*. De los histogramas del ángulo de rotación obtenidos (Figura 11B) se

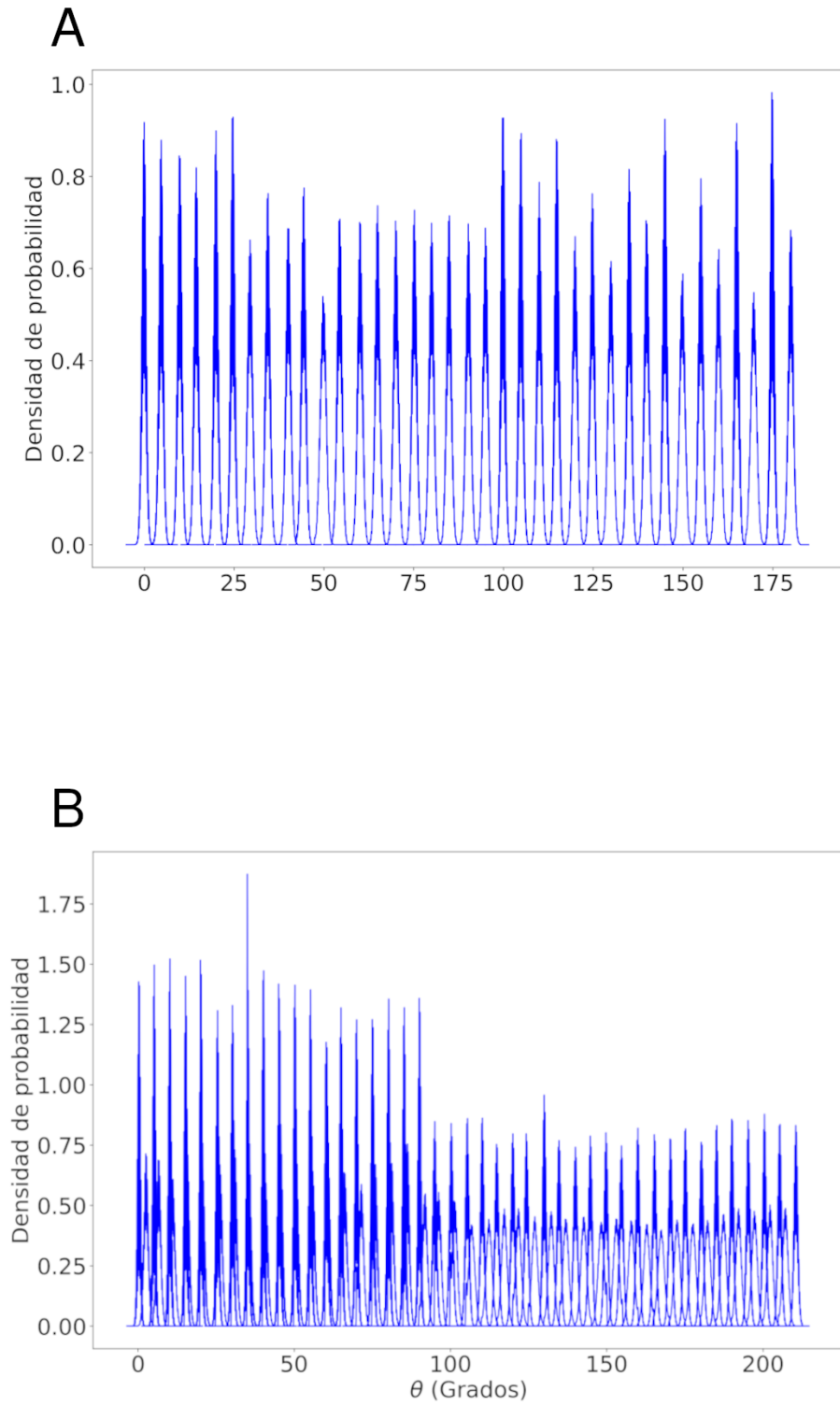


**Figura 10: Porcentaje de  $\alpha$ -hélice de la NTH.** A-B) Porcentaje del tiempo de simulación en que cada residuo de la NTH estabiliza la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice (ver texto). Porcentaje de  $\alpha$ -hélice de cada residuo de la NTH (eje x) por cada monómero (eje y). El porcentaje de  $\alpha$ -hélice se representa en el espectro de color, donde el 100 % de  $\alpha$ -hélice y el 0 % son el color azul y verde respectivamente. Debajo se muestra una representación de la cadena principal del dominio NTH en *cartoon* de ambos modelos.

puede observar que sus “hombros” se solapan entre sí. Y al utilizar WHAM y mBAR, de la curva de PMF (Figura 12C-D) también se observa que ambas conformaciones presentan una diferencia de PMF menor a  $1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  y, por lo tanto, menor al ruido térmico.

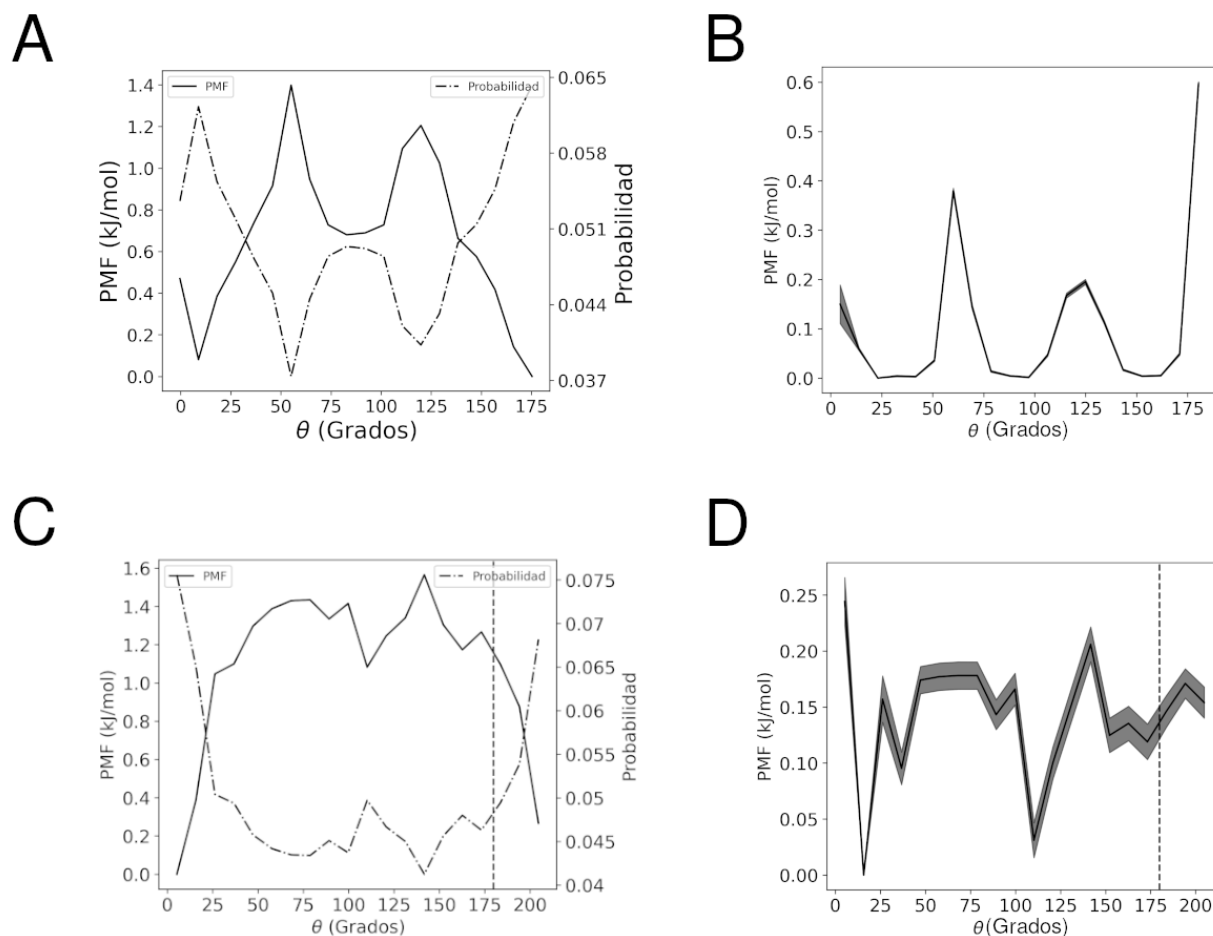
Dadas las curvas de PMF obtenidas de ambos muestreos y calculados usando dos métodos distintos de desesgado, se podría concluir que ambas conformaciones son energéticamente favorables e igualmente probables. Pero, este cambio conformacional no se observa en las simulaciones de MD al equilibrio, por lo que la escala de tiempo en que se da este cambio conformacional podría ser de uno o varios órdenes de magnitud superior al tiempo de simulación. Es por esto, que se midió la autocorrelación ( $C(t)$ ) del vector de rotación ( $u$ ) de la NTH en función del tiempo en simulaciones al equilibrio, para estimar el tiempo en que este proceso espontáneo podría ocurrir. De este cálculo, que se observa en la Figura 13, se puede decir que el decaimiento de la orientación del vector de rotación de la NTH es muy lento en simulaciones al equilibrio debido a que es asintótico a cero.

Entonces, de los resultados obtenidos del cálculo del PMF y de la autocorrelación del vector de rotación de la NTH en simulaciones al equilibrio, se puede inferir que el cambio conformacional entre los modelos del HC de hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> y hCx26<sup>2ZW3</sup> es espontáneo, pero tan lento que no es observable en los tiempos utilizados en la simulaciones al equilibrio realizadas en esta tesis.



**Figura 11: Histograma de ángulo de rotación  $\theta$ . A-B)** Histogramas donde se muestra la densidad de probabilidad del ángulo de rotación  $\theta$  en cada ventana de simulación de muestreos tipo *umbrella sampling* tanto para el monómero aislado de **hCx26** (**A**) como para un monómero en el **hC** completo (**B**).





**Figura 12: PMF en función del ángulo de rotación  $\theta$ .** A,C) Curvas de PMF en función del ángulo de rotación  $\theta$  calculado a partir de los muestreos tipo *umbrella sampling* en un monómero aislado (A) y en un monómero en el hC completo (C) usando el algoritmo WHAM. El eje izquierdo y la línea continua representa el PMF en  $\text{kJ mol}^{-1}$ , y el eje derecho y la línea discontinua y punteada representan la probabilidad. B,D) Curvas de PMF en función del ángulo de rotación  $\theta$  calculado a partir de los muestreos tipo *umbrella sampling* en un monómero aislado (B) y en un monómero en el hC completo (D) usando el algoritmo mBAR. La línea continua representa el PMF en  $\text{kJ mol}^{-1}$  y la zona sombreada el error calculado a partir de *bootstrapping* (número de *bootstraps*: 200 y número máximo de iteraciones: 1000 y usando una semilla aleatoria). Las líneas discontinuas en C y D representan los  $180^\circ$  de rotación que representan al modelo en la conformación presente en el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>.

## 7.2 Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados

Para la identificación de los cambios conformacionales entre los estados abierto y cerrado siguiendo el modelo de *gating* “de compuerta” se ha separado el proceso en dos cambios conformacionales:

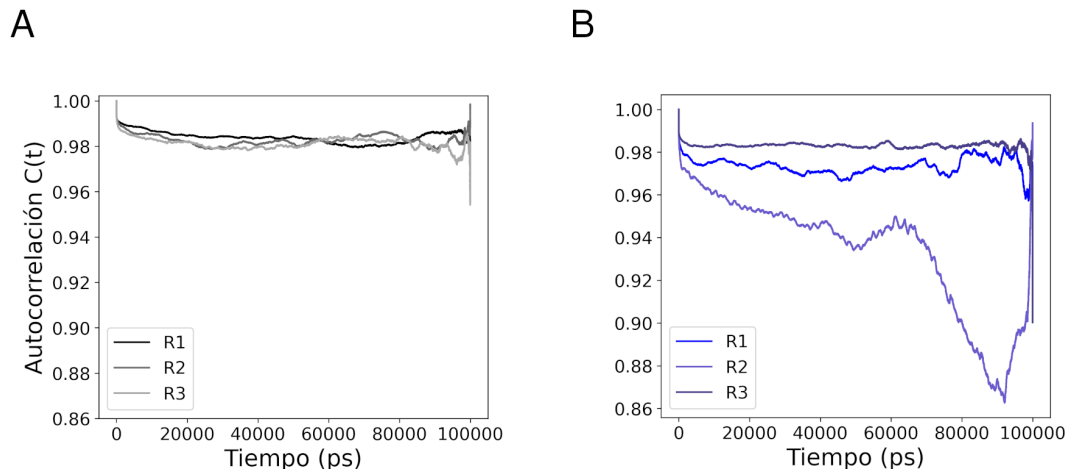
1. El desplazamiento de la NTHs, en donde en el estado abierto se encuentra cercana al lumen del poro HC (cercana a la TM1), hacia el vestíbulo citoplasmático del canal (estado semicerrado).
2. La aproximación de los extremos N-terminal de las NTHs opuestas cerrando el HC.

### 7.2.1 Transición entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26

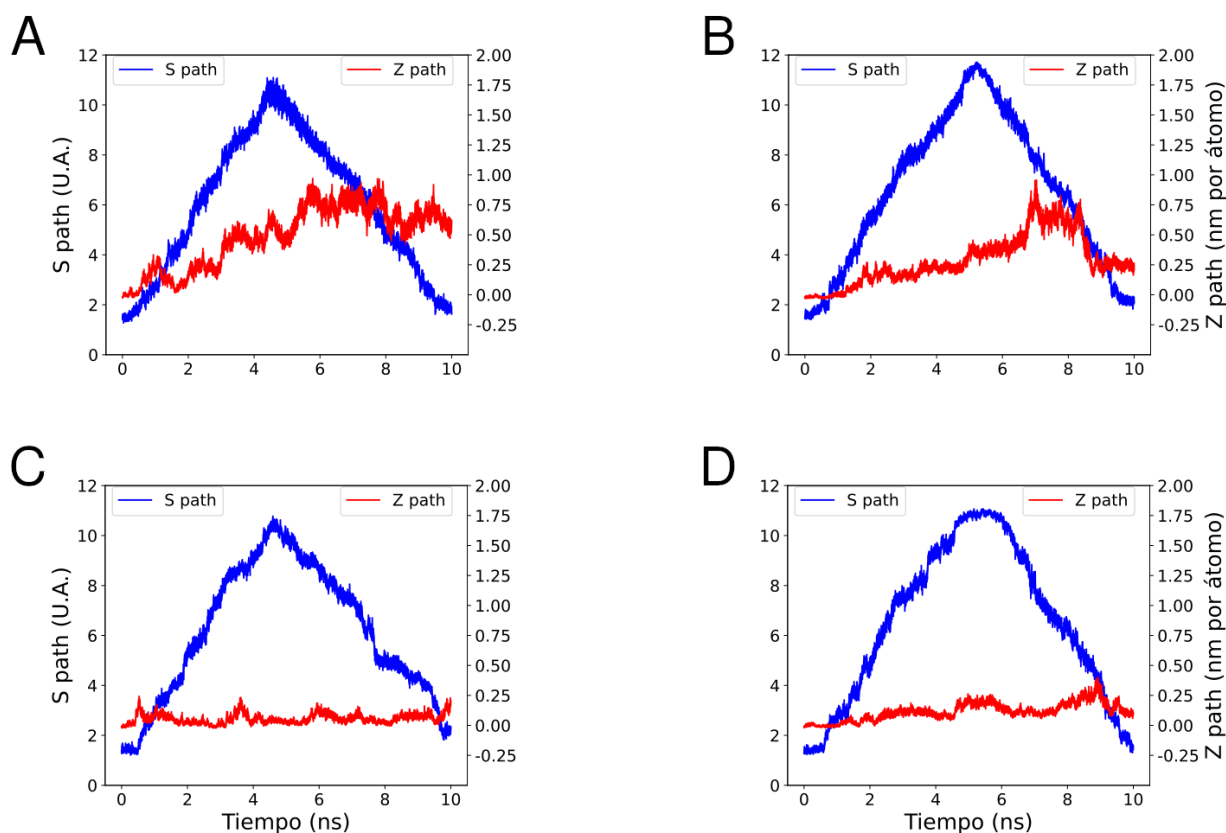
Para realizar la descripción del cambio conformacional entre los estados abierto y semicerrado del HC, primero se generaron mediante modelamiento comparativo los modelos hCx26<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> que representan los estados abierto y semicerrado respectivamente (ver Metodología para detalles de cada modelo). Luego ambas estructuras fueron insertas en una bicapa de POPC y embebida en una caja de agua e iones, cada una, y sometidas a 50 ns de simulación de MD al equilibrio (y en el caso del modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>, aplicando también una restricción de posición en los átomos de las NTHs). Posteriormente, con las estructuras finales para cada modelo se generaron *paths* o “caminos”, usando el módulo *pathtools* del software PLUMED2 [56], donde el inicio y final del *path* son los modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26<sup>7QER</sup> respectivamente. En cada *path* la NTH de un monómero se desplaza desde vestíbulo citoplasmático al lumen del poro del canal y se generaron 2 *paths* diferentes. Después, se realizaron una serie de simulaciones de “empuje” o *pulling* usando como referencia los *paths* generados y como coordenada de reacción la componente *S path* de la CV PATH [57] de PLUMED2 [56], en donde la NTH de un monómero del HC se mueve del estado semicerrado (valor de *S path* igual a 1 U.A.) al estado abierto (valor de *S path* igual a 12 U.A.). Se puede observar en la Figura 14 que las NTHs de 2 monómeros diferentes transitan entre los estados semicerrado y abierto, según la curva de *S path* en azul, pero el *Z path* (curva roja) obtenido de estas simulaciones se observa que alcanza valores de hasta 1 nm. Teniendo en cuenta que el *Z path* nos indica que tanto se aleja la molécula del “camino establecido”, entonces de las simulaciones de *pulling* realizadas se puede inferir que las NTHs no están siguiendo los “caminos definidos”. Por lo que usando las trayectorias de estas simulaciones se hicieron reparametrizaciones de los *paths*, para luego realizar nuevas simulaciones de *pulling* usando los *paths* reparametrizados como referencia. Al observar los resultados de la nuevas simulaciones de *pulling*, vemos que las NTHs en cada *path* transitan entre ambos estados y vemos que el *Z path* alcanza valores de hasta 0,25 nm, lo cual nos indica que cada monómero transita los estados semicerrado y abierto siguiendo los “caminos establecidos”.

Ahora que los *paths* que conectan los estados abierto y semicerrado fueron definidos y que el cambio conformacional se puede realizar mediante simulaciones de *pulling*. El siguiente paso fue explorar la transición entre ambos estados mediante simulaciones de WT-MetaDs en donde la coordenada de reacción son *S path* y *Z path*. Se definieron la altura y ancho de *gaussiana* de 1,2 kJ mol<sup>-1</sup> y 0,2 U.A. o nm y un *biasfactor* de 30. También se uso un *upper wall* para restringir el *Z path*. Para cada *path* se hicieron 4 simulaciones independientes de 100 ns cada una, de manera tal que el sistema transite entre ambos estados en varias ocasiones (Figura 15).

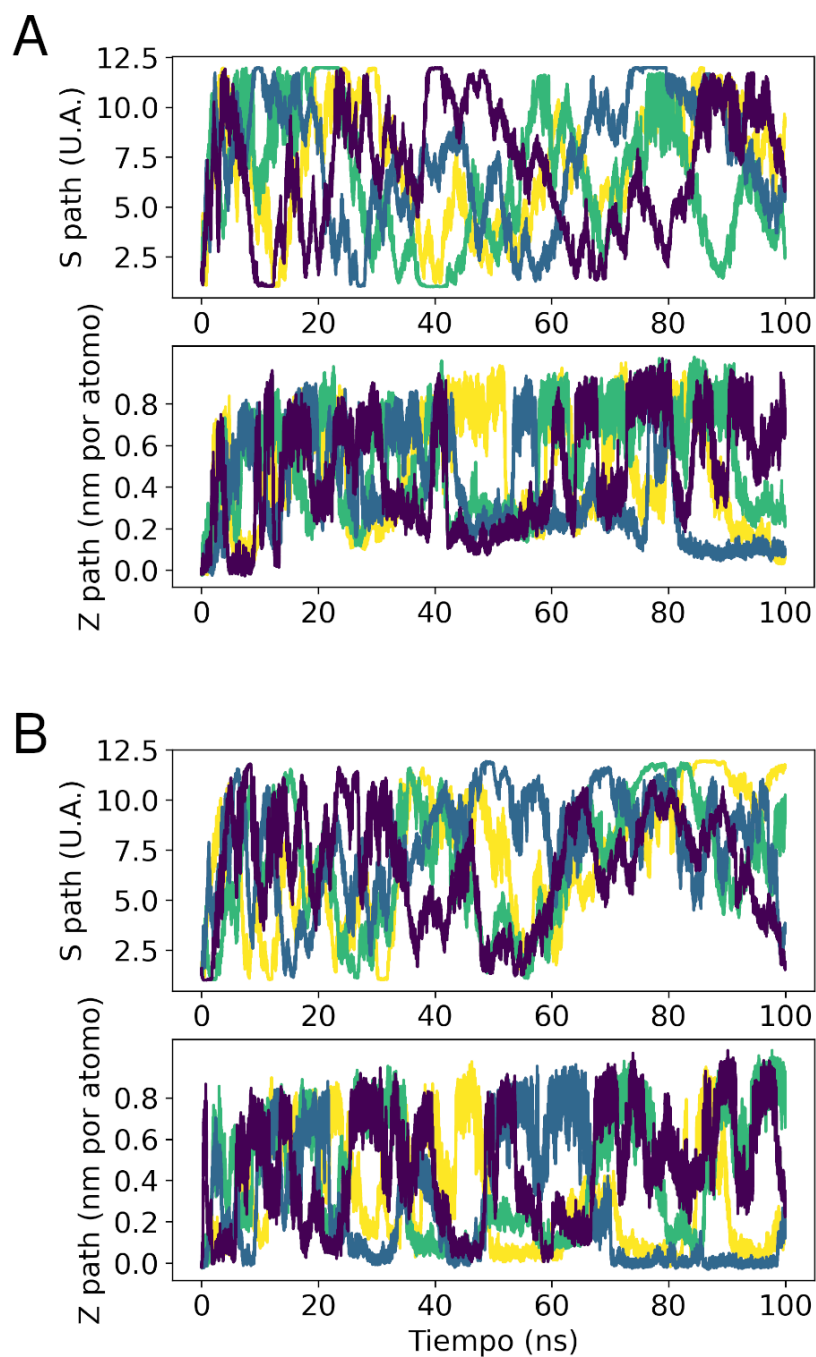
A partir de estas simulaciones se calculó el promedio del PMF y el error para cada *path*. En el caso del *path* en donde se mueve la NTH del monómero etiquetado como D (Figura 16), se observa que una diferencia del PMF de 20 kJ mol<sup>-1</sup> entre los estados semicerrado y abierto, siendo el estado abierto más favorable energéticamente,



**Figura 13: Autocorrelación del vector de rotación en simulaciones al equilibrio.** Autocorrelación ( $C(t)$ ) en función del tiempo picosegundos, calculo a partir de la medición del vector de rotación  $u$  (véase ecuación 10 en la sección de Análisis Estructural 6.3) en simulaciones al equilibrio usando los modelos de **HC hCx26<sup>22W3</sup>** (A) y **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>22W3</sup>** (B) en escala de grises y azules respectivamente. Cada línea continua representa réplica independiente.



**Figura 14: Parametrización de los paths de la transición entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26.** A-B) Progresión del *S path* y *Z path* en simulaciones de *pulling* usando como coordenada de reacción el *S path* y usando como referencia los *paths* generados mediante el módulo *pathtools* de PLUMED2 [56], en donde las *NTHs* de los monómeros etiquetados como D (A) y A (B) se mueven. C-D) Progresión del *S path* y *Z path* en simulaciones de *pulling* usando como coordenada de reacción el *S path* usando como referencia los *paths* reparametrizados a partir de simulaciones de *pulling* anteriores y en donde la *NTH* de los monómeros D (C) y A (D) se mueven. La curva azul y el eje izquierdo de los gráficos representan el *S path* en Unidades Arbitrarias (U.A.), y la curva roja y el eje derecho representan *Z path* en nm por átomo.



**Figura 15: Transiciones entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26 en simulaciones de WT-MetaD. A-B)** Transiciones entre los estados semicerrado y abierto del HC de hCx26 evidenciado mediante la medición de las CVs *S path* y *Z path* versus el tiempo en simulaciones de WT-MetaD usando como coordenadas de reacción ambas CVs y con referencia a los *paths* reparametrizados en que las NTHs de los monómeros D (A) y A (B) se mueven. En cada panel (A y B) los gráficos superior e inferior muestran la progresión de las CVs *S path* en Unidades Arbitrarias (U.A.) y *Z path* en nm por átomo respectivamente en 4 simulaciones de WT-MetaD independientes. Las curvas en púrpura oscuro, azul, verde y amarillo representan cada simulación de WT-MetaD independiente.

sin embargo el estado semicerrado se encuentra en un pozo energético. Además, en la transición entre ambos estados se observan al menos 4 “hombros” en los “frames” 4, 6, 8 y 10 con valores entre 5 y 20  $\text{kJ mol}^{-1}$  de PMF. Mientras que con el *path* en que la NTH del monómero A se mueve (Figura 16), la diferencia del PMF entre los estados semicerrado y abierto de 80  $\text{kJ mol}^{-1}$ , pero en este caso el estado semicerrado no se encuentra en un pozo energético y es más un “hombro” en la curva. Además, se observan otros “hombros” en los “frames” 2, 4, 6 y 8 con valores entre 15 y 60  $\text{kJ mol}^{-1}$  de PMF. Cabe destacar que en el “frame” 10 hay un pozo energético separado por una barrera de energía de  $\sim 20 \text{ kJ mol}^{-1}$  del estado abierto (“frame” 12).

### 7.2.2 Transición entre los estados semicerrado y cerrado del HC de hCx26

Para la descripción del cambio conformacional entre los estados semicerrado y cerrado del HC de hCx26 se usaron los modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>, donde el último modelo presenta las NTHs en el vestíbulo citoplasmático, pero se encuentra más cercanas a las NTHs opuestas. Para ello, al generar este modelo, una restricción de distancia fue aplicada a los átomos del dominio NTH y luego el HC fue inserto en una bicapa de POPC y embebido en una caja de agua e iones, para posteriormente ser sometido a una simulación de MD de 50 ns al equilibrio y aplicando una restricción de posición en los átomos de las NTHs. Posteriormente, a partir de la estructura ya “equilibradas” de los modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> se generó un *path* que representa la transición entre los estados semicerrado y cerrado.

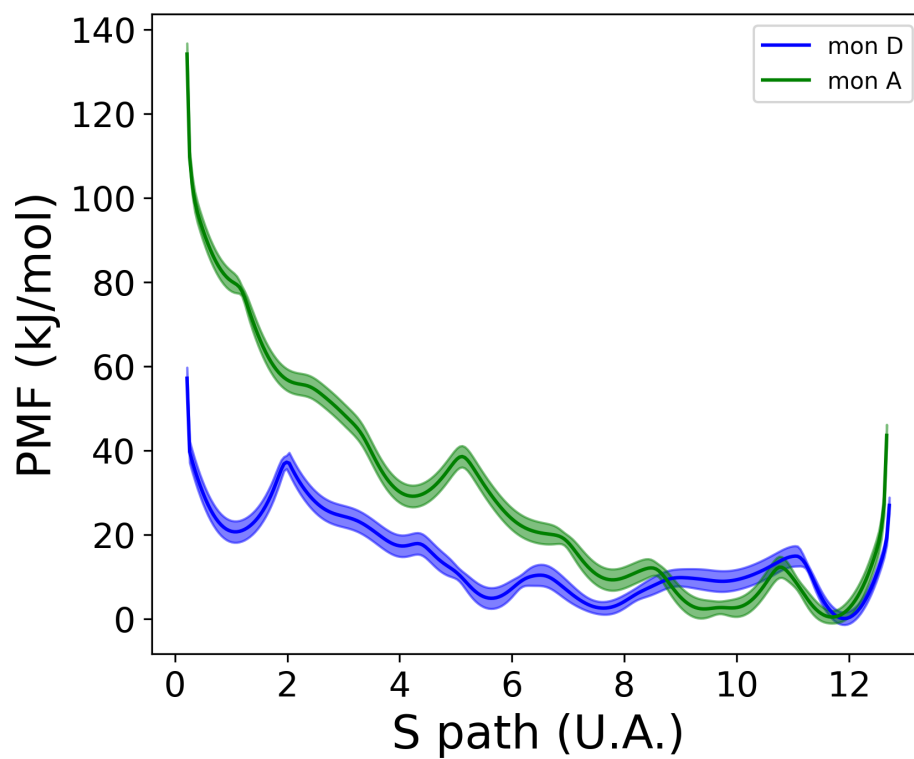
Una vez el *path* fue definido, se hicieron simulaciones de *pulling* usando como coordenada de reacción la componente *S path* de la CV PATH y usando como referencia *path* que conecta los estados semicerrado y cerrado, donde el valor de *S path* de 1 U.A. representa el estado semicerrado y el valor de 12 U.A. representa el estado cerrado.

Primero, se realizó una simulación de *pulling* a partir del estado semicerrado empujando las NTHs opuestas. En la Figura 17A se observa que la curva del *S path* inicia en un valor cercano a 4 U.A. y alrededor de la mitad de la simulación alcanza un valor cercano a 11 U.A., para luego volver a valores cercanos a 4 U.A. al final de la simulación. Además, al observar la curva del *Z path* se nota que alrededor de los 5 ns de simulación alcanza valores cercanos a 0,5 nm, mientras que alrededor del final de la simulación este alcanza valores cercanos a 1 nm. Al examinar visualmente la simulación (Figura 17B-D) se observa un efecto de aparente repulsión entre los extremos N-terminal de las NTHs y que una de las hélices es empujada hacia el vestíbulo citoplasmático del HC y la otra hélice se mueve hacia interior el poro del HC.

Luego, se hizo otra simulación de *pulling*, pero esta vez iniciando desde el estado cerrado y alejando las NTHs opuestas. En la Figura 18A se puede observar en la curva de *S path* que inicia con valores cercanos a 8 U.A. para decrecer hasta valores cercanos a 4 U.A. alrededor de los 5 ns y después este incrementa hasta volver a alcanzar valores cercanos a 8 U.A. nuevamente alrededor de los 10 ns. Mientras que al observar la curva del *Z path* se nota que inicialmente oscila en valores cercanos a 0 nm y luego incrementa a valores cercanos a 0,25 nm alrededor de la mitad de la simulación y vuelve a oscilar en valores cercanos a 0 nm al final de la simulación. Cabe destacar que al inicio y final de la simulación el *Z path* presenta incluso valores menores de 0 nm. Además, al examinar visualmente la simulación (Figura 18B-D) se observa que los extremos N-terminal de las NTHs no se alejan entre sí y una de las hélices pierde su estructura secundaria.

### 7.2.3 Simulación al equilibrio del estado cerrado del HC de hCx26

En vista de los resultados obtenidos que sugieren que se necesita una alta energía para poder explorar la transición entre los estados semicerrado y cerrado propuestos, se quiso evaluar que tan estable es la estructura del estado



**Figura 16:** Curvas de **PMFs** de la transición entre los estados semicerrado y abierto del **HC** de **hCx26**. Curvas de **PMF** (en  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) en función del *S path* en Unidades Arbitrarias (U.A.) calculadas a partir de simulaciones de **WT-MetaD** en donde las **NTHs** de los monómeros D (“mon D”) y A (“mon A”) se mueven. La curva azul presenta el **PMF** calculado usando el “*path D*”, mientras que la curva verde representa el **PMF** calculado usando el “*path A*”. Las líneas continuas representan el promedio y el área sombreada el error.

cerrado (modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>) al “equilibrio”. Para ello, se realizó una simulación al “equilibrio” soltando la restricción de posición de los átomos de las NTHs y se observa en la Figura 19 que el HC se abre, las hélices se desplazan hacia el interior del poro, algunas más que otras. Además algunas hélices (3) se mantienen interaccionando entre sí, mientras otras se alejan.

Al medir el RMSD de los átomos de carbono- $\alpha$  del HC durante la simulación (Figura 20) se observa que este parámetro aumenta constantemente, pasando de 3 Å en los 10 ns de simulación hasta los 10 Å al final de la simulación (50 ns).

#### 7.2.4 Simulación al equilibrio del modelo “bola-cadena” HC de hCx26

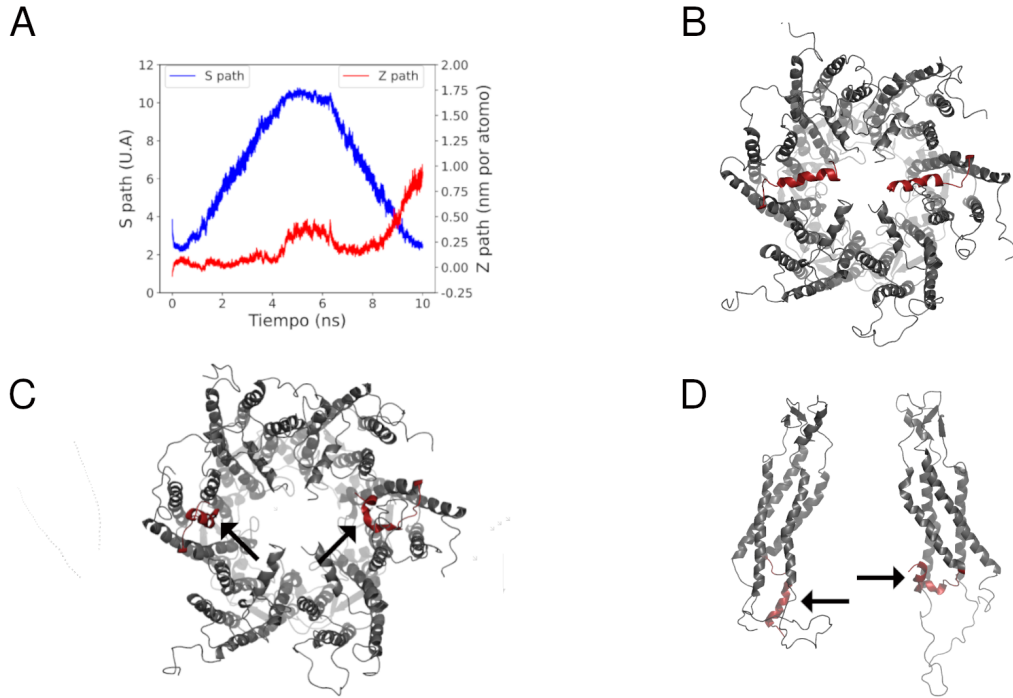
Como se menciona en la Introducción de esta tesis, a parte del modelo de *gating* “de compuerta” se ha propuesto por otros autores el modelo de “bola-cadena” cuyo más reciente representante es modelo de GJC de hCx26 resuelto por cryo-EM en condiciones de pH ácido [42], en donde las NTHs pierden su estructura secundaria y se extienden en dirección del espacio extracelular.

Para estudiar este modelo, se han completado las regiones faltantes de esta estructura del HC de hCx26 (hCx26<sup>6UVT</sup>) y posteriormente se insertó en una bicapa de POPC y embebido en una caja de agua e iones, y sometido a una simulación al “equilibrio” de 50 ns.

Al examinar visualmente la simulación al equilibrio del modelo de HC hCx26<sup>6UVT</sup> se observa la tendencia al cierre del HC a nivel de las NTHs (Figura 21A-C), pero a nivel de las PHs no se observa un estrechamiento del poro (Figura 21D-F). Entre los dominios NTHs resaltan las interacciones de las cadenas laterales de los residuos L232-W907 (Figura 22B,D) y M453-L1132 (Figura 22A,C) entre los monómeros B y E, y C y F respectivamente, estas interacciones se empiezan a observar alrededor de los 12,5 ns de simulación. También destacan interacciones entre los dominios NTH y PH en los monómeros A, B y D a lo largo de la simulación. Específicamente, entre las cadenas laterales de los residuos M679-K719 en el monómero D (Figura 23B,D,F) y las cadenas laterales de los residuos M1-K267 (Figura 23A) de los monómeros A y B respectivamente al comienzo de la simulación. Sin embargo, se observa que esta interacción es desplazada por la interacción de las cadenas laterales de los residuos M1-E268 (Figura 23C,E) durante el resto de la simulación.

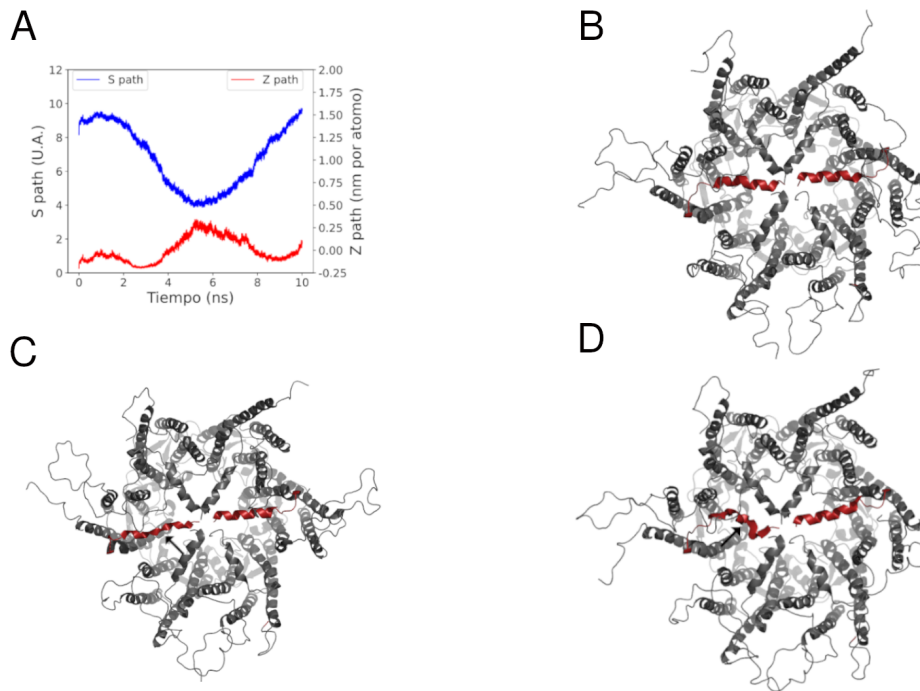
Luego, se midió el RMSD de los átomos de carbono- $\alpha$  del HC durante la simulación (Figura 24), donde se observó que el RMSD se estabiliza a partir de los 5 ns entre los 10 y 11 Å de desviación.

También se midió el radio del poro del HC en las simulaciones al “equilibrio” de los modelos hCx26<sup>6UVT</sup> y hCx26<sup>7QER</sup> (estados cerrado y abierto del HC), usando el software HOLE [75, 76, 79], especializado en la medición del radio del poro de canales proteicos. En el modelo hCx26<sup>6UVT</sup> se observa una significativa constricción del radio del poro promedio de alrededor de 2 Å en coordenadas cercanas al origen del eje Z. Mientras que en el modelo hCx26<sup>7QER</sup> en la misma zona del eje Z se observa un radio promedio de 4 Å. En vista de estos resultados, se midió la distancia entre las cadenas laterales de residuos presentes en la NTH y PH en monómeros opuestos como una segunda aproximación del diámetro del poros. Los residuos utilizados para estas mediciones son: D2, W3 y G11 en las NTHs y K41, E42 y E47 en las PHs. En el modelo hCx26<sup>6UVT</sup> se observa un diámetro menor entre los residuos D2 y W3 con respecto al modelo hCx26<sup>7QER</sup>, con una diferencia de 5 Å. Pero en los residuos G11, K41, E42 y E47 no se registran diferencias en el diámetro del canal entre ambos modelos.

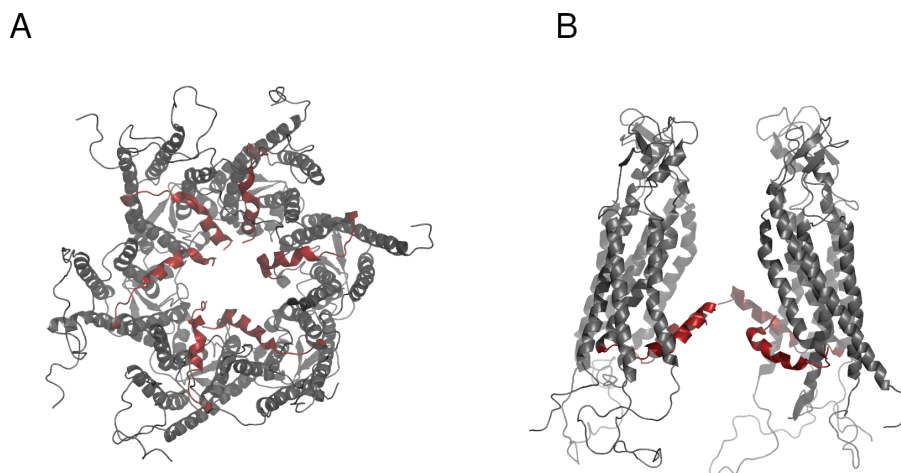


**Figura 17: Simulación de pulling llevando al HC de hCx26s del estado semicerrado al estado cerrado. A)** Progresión de las CVs *S path* *Z path* en función del tiempo de simulación, en una simulación de *pulling* usando como coordenada de reacción el *S path* y usando como referencia el *path* generado usando el módulo *pathtools* de PLUMED2 [56] que representa la transición entre los estados semicerrado y cerrado del HC de hCx26. La curva azul y el eje izquierdo representan el *S path* en Unidades Arbitrarias (U.A.) y la curva roja y el eje derecho el *Z path* en nm por átomo. **B-D)** Estructura del HC de hCx26 a lo largo de la simulación de *pulling*, se observa como dos NTHs (en rojo) que se repelen entre sí al ser empujadas para aproximarlas entre sí. En B-C se observa al HC visto desde el espacio intracelular al inicio de la simulación (B) y al final de la simulación (C), y en D se observan los monómeros A y D vistos desde la membrana, al final de la simulación. La cadena principal está representada en *cartoon* y en color gris, mientras que los dominios NTHs que son empujadas en color rojo y están indicadas con flechas de color negro.





**Figura 18:** Simulación de *pulling* llevando al HC de hCx26 del estado cerrado al estado semicerrado. **A)** Progresión de las CVs *S path* *Z path* en función del tiempo de simulación, en una simulación de *pulling* usando como coordenada de reacción el *S path* y usando como referencia el *path* generado usando el módulo *pathtools* de PLUMED2 [56] que representa la transición entre los estados semicerrado y cerrado del HC de hCx26. La curva azul y el eje izquierdo representan el *S path* en Unidades Arbitrarias (U.A.) y la curva roja y el eje derecho el *Z path* en nm por átomo. **B-D)** Estructura del HC de hCx26 a lo largo de la simulación de *pulling*, se observa como los extremos N-terminal de las NTHs se quedan interactuando entre sí, mientras que una de las hélices se estira y pierde su estructura secundaria. En B-D se observa al HC visto desde el espacio intracelular al inicio (B), a la mitad (C) y al final de la simulación (D). La cadena principal está representada en *cartoon* y en color gris, mientras que los dominios NTHs que son empujadas en color rojo y están indicadas con flechas de color negro.



**Figura 19:** Estructura del modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> de HC al liberar las restricciones de posición en una simulación al “equilibrio”. **A-B)** Estructura del HC en el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> al someterlo a una simulación de MD y sin restricción de movimiento en los átomos del dominio NTH. En A se observa el HC visto desde el espacio intracelular y en B se observan 4 monómeros del HC vistos desde la membrana. La cadena principal de la proteína está representada en *cartoon* y en color gris, mientras que las NTHs están coloreadas de rojo.

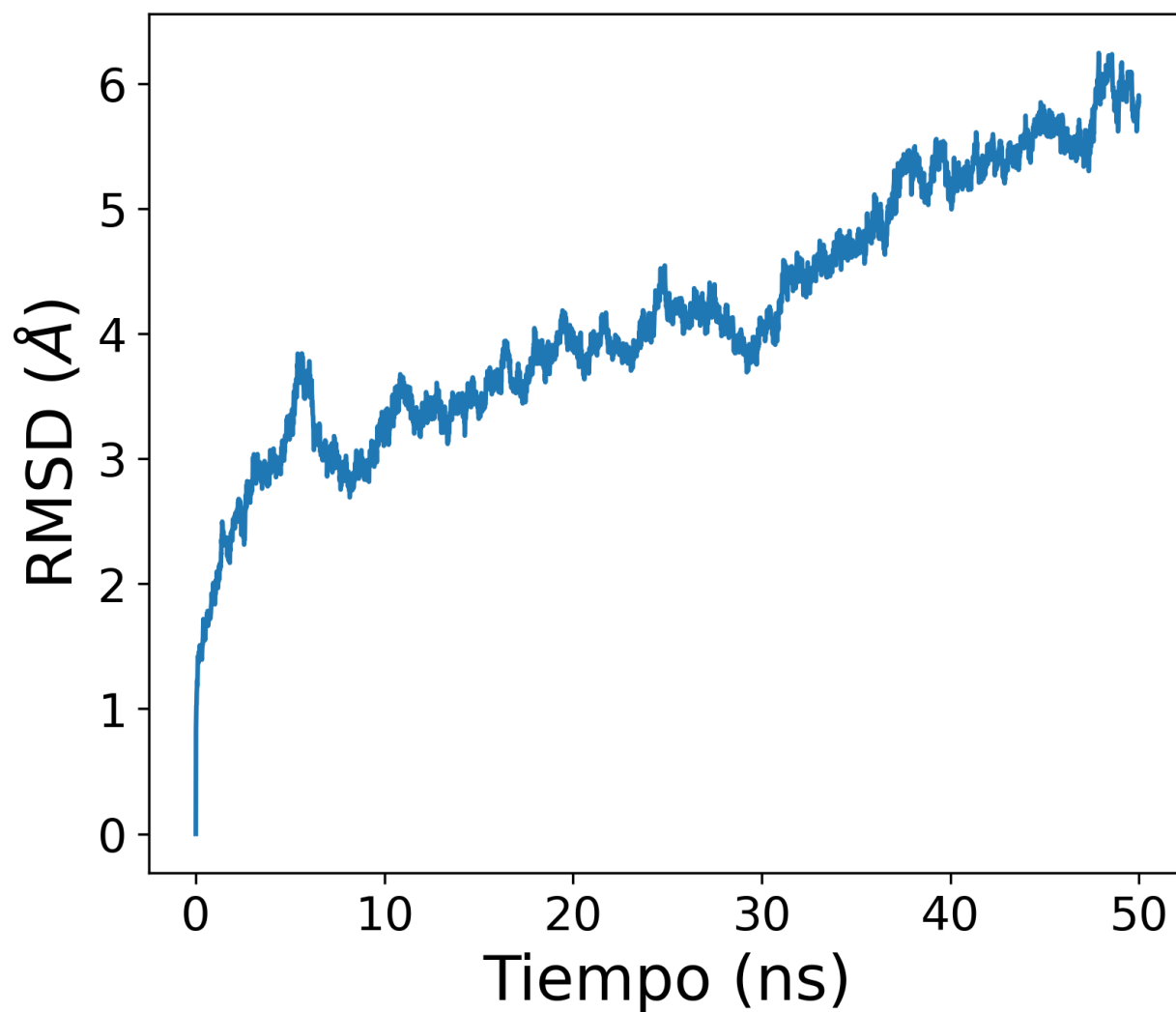
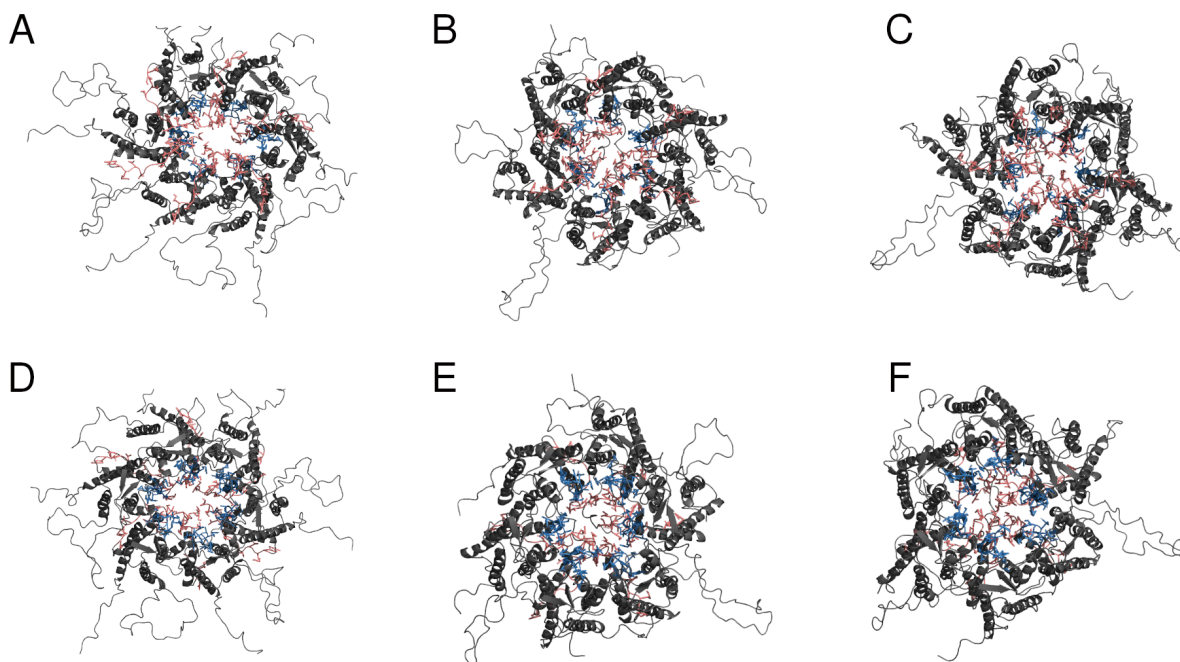


Figura 20: Evaluación del movimiento del modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>** de **HC** en una simulación al “equilibrio” y sin restricciones. Evaluación del movimiento del **HC** en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>** al someterlo a una simulación al “equilibrio” y sin restricción de posición en los átomos de las **NTHs**, mediante la medición del **RMSD** de los átomos de carbono- $\alpha$  del **HC** durante la simulación.



**Figura 21: Estructura del modelo hCx26<sup>6UVT</sup> de HC (modelo “bola-cadena”).** Estructura del HC en el modelo hCx26<sup>6UVT</sup> durante una simulación al “equilibrio” visto desde espacio intracelular (A-C) y desde el espacio extracelular (D-F). La cadena principal representada en *cartoon* y las cadenas laterales de los dominios **NTH** y **PH** representadas en *sticks*. Los dominios **NTH** y **PH** se muestran en color rojo y azul respectivamente, mientras que el resto del **HC** se muestra de color gris.

## 8 Discusión

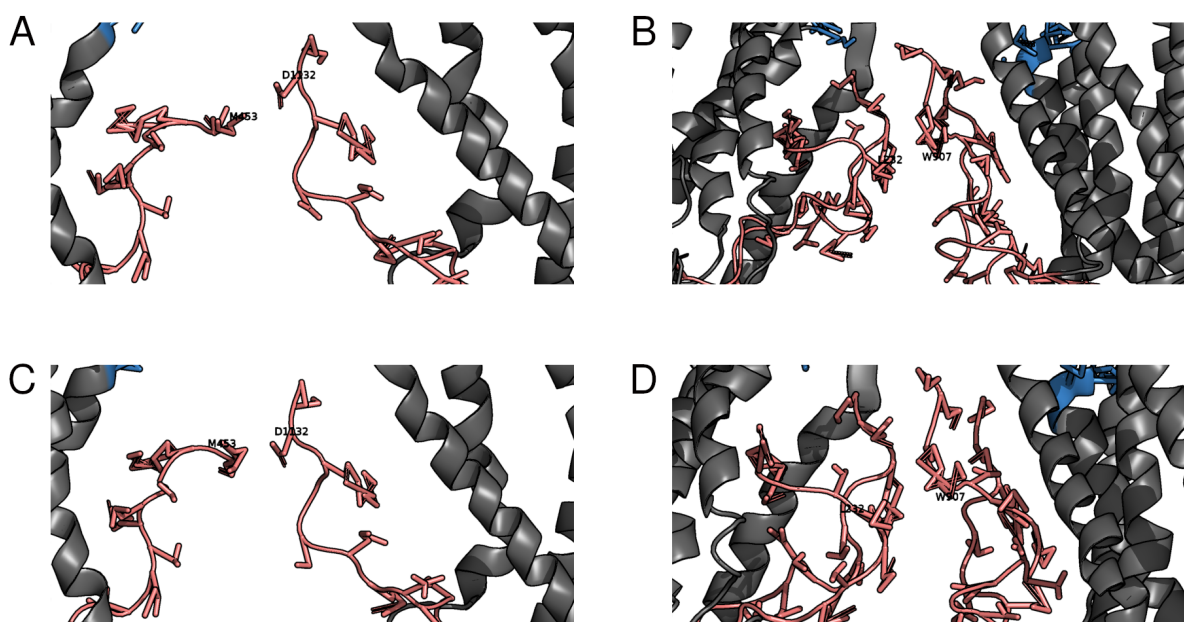
A continuación se realizará una discusión de los resultados a lo largo de esta tesis doctoral, primero de forma separada los resultados de los Objetivos Específicos 1 y 2, y luego se realizarán discusiones generales unificando conclusiones de ambos Objetivos.

### 8.1 Objetivo 1: Estudiar la estabilidad termodinámica del **HC** de **hCx26** cuando la **NTH** adopta la conformación presente en el canal heterotípico de **sCx46/Cx50**.

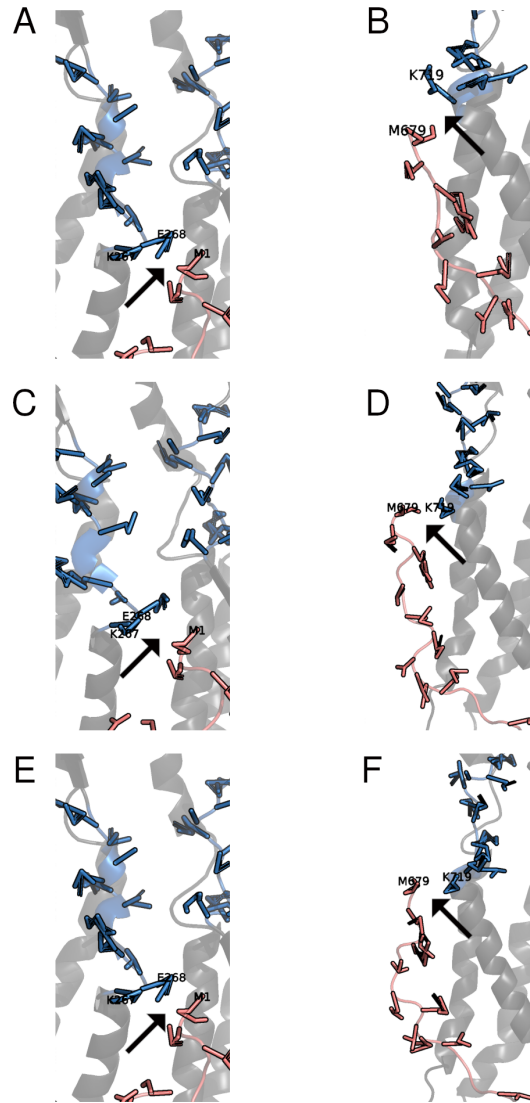
Durante el desarrollo del primer objetivo específico de la presente tesis, se estudió la conformación de la  $\alpha$ -hélice en el dominio N-terminal (**NTH**) en el estado abierto del **HC** de **hCx26**, con el fin de estudiar la estabilidad de la conformaciones que adopta la **NTH** en los modelos resueltos por Maeda y cols. [10] y en los modelos de Myer y cols [11] y Brotherton y cols [41].

Para evaluar si la **NTH** puede adoptar la conformación observada en los modelos de Myers y cols. [11] en el estado abierto del **HC** de **hCx26** se generó un modelo de éste, mediante modelamiento comparativo, usando como moldes los modelos de Myers y cols. y Maeda y cols. para los dominios **NTH-TM1** y **PH-CT** respectivamente (modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>**) y se hizo una evaluación de la dinámica del modelo durante simulaciones al “equilibrio” y se comparó con la dinámica del modelo de Maeda y cols. completado (modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>**).

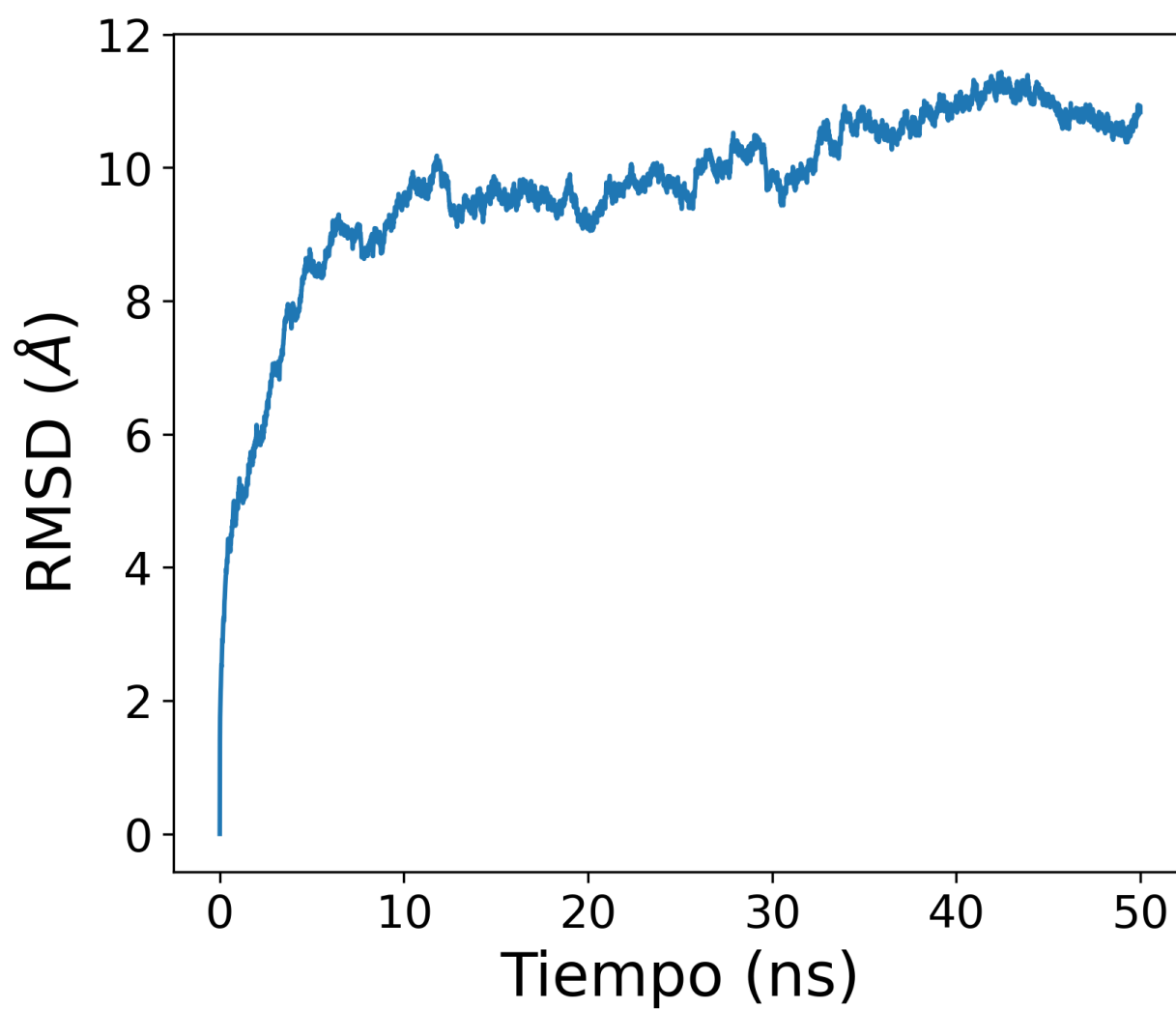
En la simulaciones se observó que en el modelo **hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup>**, la **NTH** no solo mantiene su conformación, según los resultados de exposición a solvente, sino que también presenta una mayor estabilidad en el dominio con respecto al modelo **hCx26<sup>2ZW3</sup>**, como lo demuestran: los resultados del movimiento de la **NTH** en el eje  $z$ , y el porcentaje de tiempo de simulación en que los residuos que componen a la **NTH** mantienen una



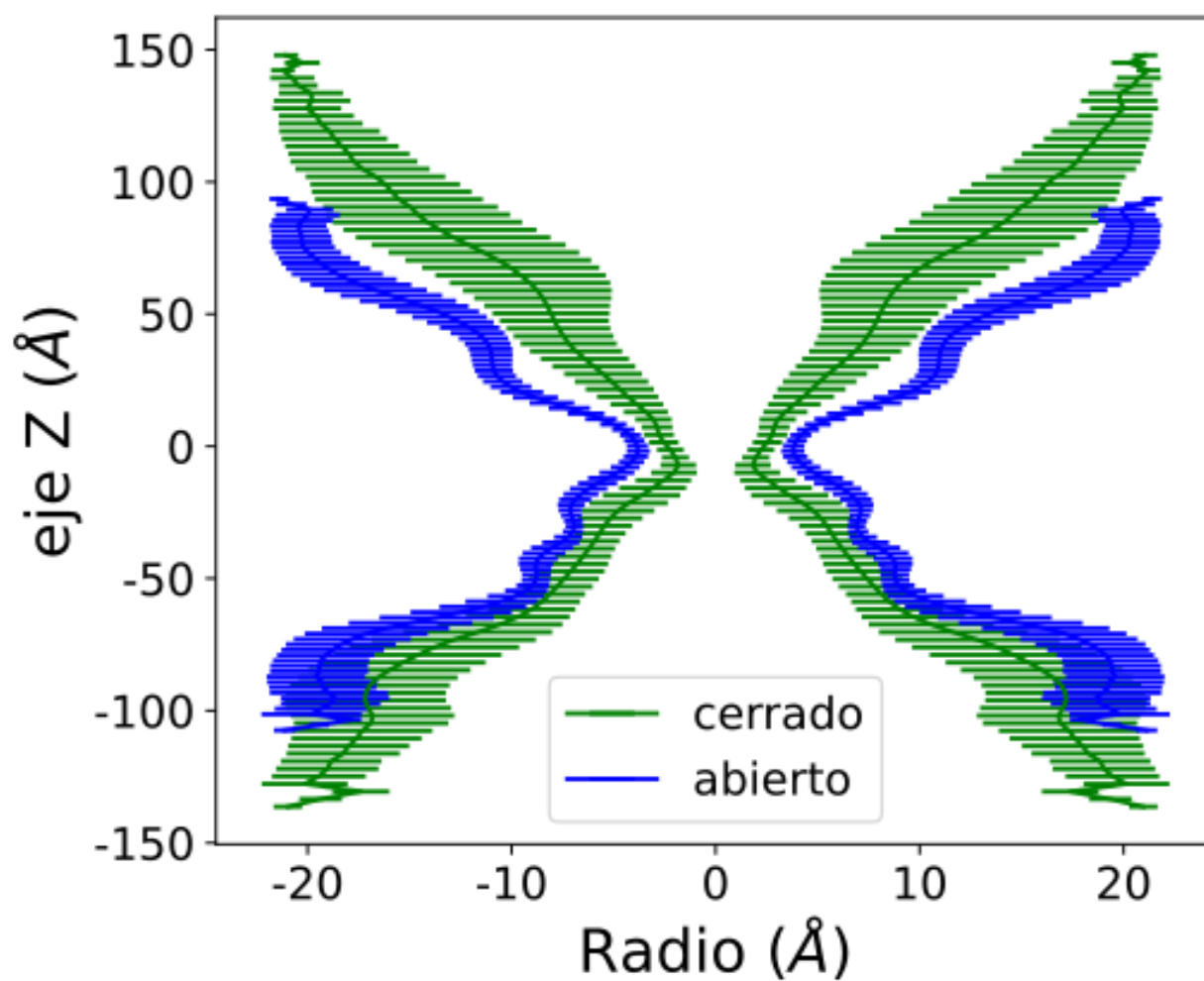
**Figura 22: Ejemplos de interacciones observadas en el modelo hCx26<sup>6UVT</sup> 1.** A,C) Interacción entre las cadenas laterales de los residuos M453-L1132 en las NTHs de los monómeros C y F, a la mitad de la simulación (A) y al final de la simulación (C). B,D) Interacción entre las cadenas laterales de los residuos L232-W907 en las NTHs de los monómeros B y E, a la mitad de la simulación (B) y al final de la simulación (D). La cadena principal está representada en *cartoon* y las cadenas laterales de los residuos en los dominios NTH y PH. Los dominios NTH y PH se muestran en color rojo y azul respectivamente y el resto del HC se muestra en color gris.



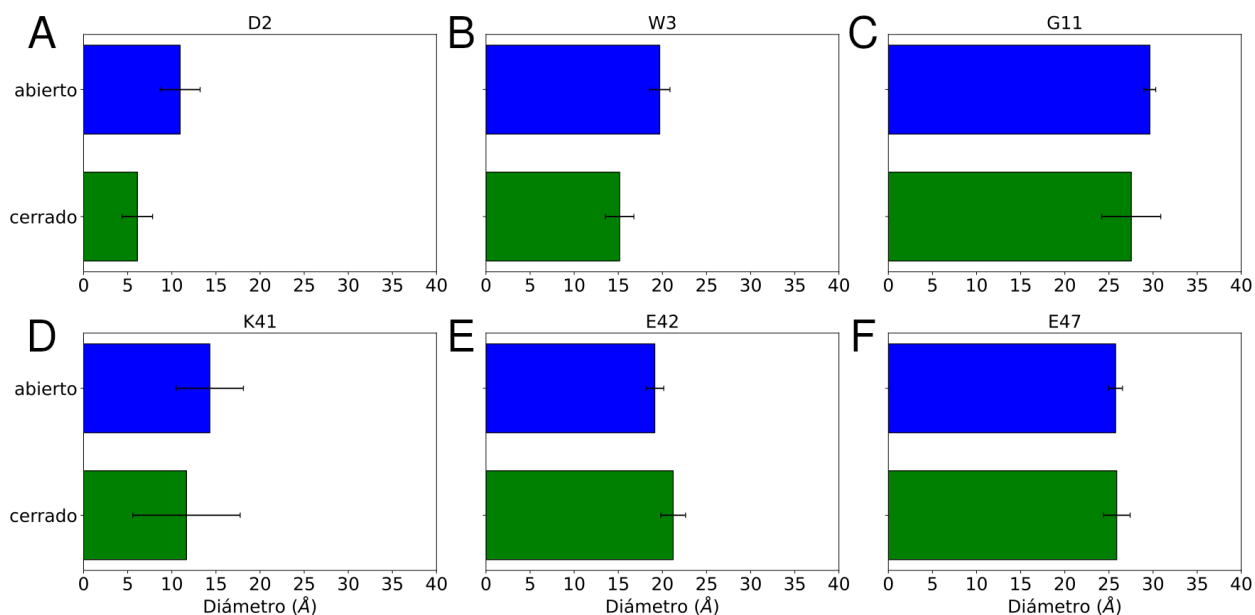
**Figura 23: Ejemplos de interacciones observadas en el modelo hCx26<sup>6UVT</sup> 2.** **A,C,E)** Interacciones entre las cadenas laterales de los residuos M1, K267 y E268 de los dominios **NTH** y **PH** de los monómeros A y B al inicio (A), a la mitad (C) y al final (E) de la simulación. **B,D,F)** Interacciones entre las cadenas laterales de los residuos M679 y K719 de los dominios **NTH** y **PH** en el monómeros D al inicio (B), a la mitad (D) y al final (F) de la simulación. La cadena principal está representada en *cartoon* y las cadenas laterales de los residuos en los dominios **NTH** y **PH**. Los dominios **NTH** y **PH** se muestran en color rojo y azul respectivamente y el resto del **HC** se muestra en color gris y Las flechas negras indican la ubicación de la interacciones.



**Figura 24: Evaluación del movimiento del modelo hCx26<sup>6</sup>UVT de HC.** Evaluación del movimiento del HC en el modelo hCx26<sup>6</sup>UVT en una simulación al “equilibrio”, mediante la medición del RMSD de los átomos de carbono- $\alpha$  del HC durante la simulación.



**Figura 25: Radio del poro del HC de hCx26.** Medición del radio promedio del poro del HC mediante el software *HOLE*. La líneas representa el promedio del radio del poro en la simulación de los modelos hCx26<sup>6UVT</sup> y hCx26<sup>7QER</sup> (verde y azul respectivamente) que representan los estados cerrado y abierto del HC. Las barras horizontales representan la desviación estándar del radio del poro.



**Figura 26: Estimación del diámetro del poro del HC de hCx26.** Estimación del diámetro del HC de hCx26 a nivel de la NTH, a partir de la medición de la distancia entre las cadenas laterales de los residuos D2, W3 y G11 (A-C) y a nivel de la PH al medir la distancia de las cadenas laterales de los residuos K41, E42 y E47 (D-F).

estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice. Por lo que el dominio NTH en el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> de HC de Cx26 tiene propiedades dinámicas similares a las observadas en modelo del canal heterotípico de sCx46/Cx50 [11].

Cabe destacar, que los 3 resultados de la caracterización del movimiento de la NTH tiene un correlato con los resultados del porcentaje de “ $\alpha$ -helicidad” de la NTH. Es decir, al observar una mayor variación del movimiento de la NTH en el eje  $z$  con respecto al movimiento radial en el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup> denota que algunas hélices se estiran perdiendo la estructura secundaria, lo que se condice con los resultados de porcentaje de  $\alpha$ -hélice. Además, la alta variación del ángulo entre el vector de desplazamiento de la NTH con respecto a la recta normal perpendicular a la membrana plasmática, en ambos modelos, da indicios a alteraciones de la estructura secundaria. Esto se explica porque el vector de desplazamiento depende de la posición de los átomos de carbono- $\alpha$  que forman las hélices; y como vemos en los resultados del porcentaje de  $\alpha$ -hélice en el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>, por ejemplo, donde hélice pierden su estructura secundaria o en el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> las hélices tiene un quiebre en la mitad de estas, lo cual puede afectar la determinación del vector de desplazamiento de la NTH y por ende también la medición del ángulo que forma el vector.

Por otro lado, el cambio de conformación de la NTH también produce una mayor estabilidad dinámica en el HC, según los resultados de RMSD y RMSF de los átomos de carbono- $\alpha$  del canal completo, que son más bajos que lo que se midió en el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>.

Si bien, en simulaciones al “equilibrio” el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> del HC de hCx26 se muestra más estable que el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>, queda evaluar si este modelo es más probable o en otras palabras si es más estable termodinámicamente. Para ello, se realizaron muestreos *umbrella* (*umbrella sampling*) a partir de *snapshots* de simulaciones de empuje en que la NTH es rotada con respecto de un eje de rotación que fue trazado por el centro de la hélice. El objetivo de esta simulación de rotación, es crear una transición suave, desde el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6MHY</sup> PH-CT<sup>2ZW3</sup> hasta el modelo hCx26<sup>2ZW3</sup>. Se hizo un muestreo solo con un monómero de Cx26 aislado y otro muestreo con el HC completo pero con una sola NTH rotando. A partir de ambos muestreos se



calculó el PMF a través de dos métodos de de-sesgado (WHAM y mBAR). De las curvas de PMF obtenidas (ambos muestreos y métodos de de-sesgado) se observa que ambas conformaciones son termodinámicamente estables y que la distancia energética entre estas, es menor al ruido térmico ( $<2,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

Este resultado fue inesperado dado que la NTH no transita espontáneamente entre ambas conformaciones en las simulaciones, partiendo desde una u otra. Una explicación de esta aparente discrepancia, es que el tiempo requerido para una transición espontánea entre ambas conformaciones es demasiado largo para poder explorarlo en este estudio. Dado el tamaño del canal ( $\sim 1.200$  residuos y 22344 átomos), el tiempo de simulación requerido podría estar en el orden de los microsegundos, muy por encima del tiempo de simulación empleado en este trabajo.

Para explorar esta posibilidad, calculamos la autocorrelación del vector de rotación de la NTH en ambos modelos, con el fin de estimar de manera aproximada el tiempo necesario para observar una conversión espontánea de conformación. En la Figura 13 se puede ver que la disminución del ángulo de rotación en las dinámicas en equilibrio es muy lenta y es asintótica a cero. Esto era esperable, ya que en nuestras simulaciones de dinámica molecular nunca observamos una rotación espontánea.

## 8.2 Objetivo 2: Identificar los cambios conformacionales de la NTH que permitan el tránsito del HC de hCx26 entre los estados abierto y cerrado y describir la superficie de energía libre entre ambos estados.

Como se menciona en la Introducción, el dominio NTH es crucial para la apertura o cierre del canal, como se ha demostrado extensamente en estudios experimentales [3, 17, 36-39]. En esta tesis se ha propuesto como modelo de cierre del HC de hCx26 el modelo “de compuerta”, en que las NTHs se desplazan desde su ubicación cercana a la interfaz proteica (TM1) hacia el vestíbulo citoplasmático (estado semicerrado) y luego las NTHs opuestas se aproximan entre sí.

Para obtener un modelo de HC de hCx26 en que las NTHs se encuentren en la misma conformación que en hCx31.3 se usó modelamiento comparativo, usando como moldes esta estructura y la estructura resuelta por Brotherton y cols. [41] para los dominios NTH-TM1 y PH-CT respectivamente (modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>). En tanto, para generar el modelo del HC cerrado se usó también modelamiento comparativo, usando las mismas estructuras moldes pero usando restricciones de distancia en los átomos que componen la NTH (modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup>). Finalmente, como estructura del estado abierto del HC de hCx26 se usó la estructura resuelta por Brotherton y cols. [41] completando las partes faltantes mediante modelamiento comparativo (modelo hCx26<sup>7QER</sup>). Cabe mencionar que Brotherton y cols. resolvieron 3 estructuras del GJC bajo diferentes presiones parciales de CO<sub>2</sub>, para efectos de esta tesis la estructura usada para los moldes de los modelos hCx26<sup>7QER</sup>, hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> es la estructura resuelta a 55 mm de Hg de CO<sub>2</sub> (PDBid: 7QER), ya que esa concentración es la más cercana a la fisiológica [80]. Se usó esta estructura como representativa del estado abierto porque la NTH tiene una conformación similar a la observada en la estructura del modelo heterotípico de sCx46/Cx50 [11].

Para evaluar si es posible que el HC de hCx26 siga el modelo de *gating* “de compuerta” se decidió realizar una descripción termodinámica de la transición, primero, entre los estados abierto y semicerrado, y luego, entre los estados semicerrado y cerrado. Para poder realizar estas descripciones se ha escogido el método muestreo de simulaciones MD metadinámica, específicamente *Well Tempered Metadynamics* (WT-MetaD) [54, 55]. Este método permite realizar un muestreo del espacio de configuraciones entorno a una coordenada de reacción y *a posteriori* calcular el PMF en función de dicha coordenada de reacción. Como coordenada de reacción se escogió la Variable Colectiva (CV) PATH [57] disponible en el software PLUMED2 [56]. Esta CV consiste en el “camino” generado

a partir de un estado inicial y final de una molécula, con un determinado número de estados intermedios entre ellos. En este caso, los estados iniciales y finales son los modelos hCx26<sup>7QER</sup>s y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y los modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>\* para las dos transiciones propuestas.

Para la transición entre los estados abierto y semicerrado del HC, se generaron dos *paths* o caminos distintos, donde las NTHs de los monómeros A y D se mueven. Luego de reparametrizar los *paths* generados y de determinar los parámetros de la simulación de WT-MetaD para que la NTH pueda transitar entre ambos estados más de una vez, se realizaron para cada *path* 4 simulaciones de WT-MetaD independientes de 100 ns. De esta manera se consiguió que los monómeros visitaran ambos estados varias veces, registrando las componentes de la CV *S path* y *Z path* (Figura 15). Más tarde, se calculó el PMF en función de la componente *S path* de ambos “caminos”. Las curvas de PMF (ver Figura 16) nos muestran dos perfiles diferentes para cada *path*, donde el perfil con mayor diferencia de PMF entre ambos estados es aquel en que la NTH del monómero D se mueve. El hecho de que las curvas de PMF sean distintas podría ser un indicio de que la transición entre ambos estados (abierto y semicerrado) tiene un efecto cooperativo, pero para corroborar esta posibilidad es necesario realizar una tercera o más simulaciones de WT-MetaD donde la NTH de otro monómero y calcular las curvas de PMF correspondientes. Cabe destacar, que a pesar de las diferencias, en ambos monómeros el estado abierto es el estado de menor energía con respecto al estado semicerrado, lo cual es esperable ya que el estado semicerrado es un estado intermedio de mayor energía entre los estados abierto y cerrado.

Para la transición de los estados semicerrados y cerrado del HC también se generó un *path* con el objetivo de luego realizar simulaciones de WT-MetaD, pero primero era necesario realizar simulaciones de empuje para mover las NTHs opuestas entre ambos estados, usado como coordenada de reacción la componente *S path* del “camino” generado y así con las trayectorias de estas simulaciones para reparametrizar el *path* generado. Sin embargo, cuando se hizo una simulación partiendo del estado semicerrado y empujando las hélices hacia el estado cerrado, las NTHs se desvían de la trayectoria esperada, es decir, una hélice se mueve con dirección al espacio extracelular y acercándose a la TM1, mientras que la otra hélice se mueve en dirección contraria, hacia el vestíbulo citoplasmático. Este desplazamiento observado en las NTHs podría explicarse por una aparente repulsión entre los extremos N-terminales de ambas hélices. Al realizar una nueva simulación, pero esta vez en el sentido inverso, es decir partiendo del estado cerrado, lo que se observa es que los extremos N-terminales no se alejan como deberían, además de que una de las hélices se estira y pierde su estructura secundaria.

Ante estos resultados, cabe la duda de la viabilidad del modelo de *gating* propuesto. Cabe destacar que al realizar las simulaciones al “equilibrio” de los modelos hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>\* se tuvieron que aplicar restricciones de movimiento a los átomos de las NTHs y en las simulaciones fuera de el equilibrio, la restricción solo fue aplicada a la hélices que no se mueven. Para analizar un posible efecto de estas restricciones, se quiso averiguar si el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>\* es estable en una simulación al equilibrio sin ninguna restricción. Al inspeccionar la simulación sin restricciones vemos que las NTHs se alejan, abriendo el canal y las hélices se desplazan hacia la interfaz proteica del canal. Al ver que al equilibrio el modelo de HC hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>\* no es estable, hace posible cuestionar la viabilidad del modelo de *gating* “de compuerta”. Sin embargo, en 2023 Qi, Acosta Gutierrez y cols. [81] resolvieron la estructura del GJC de hCx43 y que según los autores se encuentra en el estado cerrado. Las NTHs están dispuestas de forma similar a la estructura del HC de hCx31.3, pero se observa una mayor constricción del poro en vestíbulo citoplasmático y la TM2s están desplazadas hacia fuera del poro con respecto a la estructura hCx31.3. Por lo que es muy probable que el modelo escogido como representante del estado cerrado del HC de hCx26 (modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup>\*) no sea el adecuado y habría que estudiar la transición entre los estados

semicerrado y cerrado usando el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER</sup> y un modelo del HC de hCx26 con la conformación del modelo de hCx43 resuelto por Qi, Acosta Gutierrez y cols [81].

Como se mencionó previamente, en 2020 Khan y cols. [42] resolvieron por cryo-EM la estructura del GJC de hCx26 en condiciones de pH ácido, donde las NTHs se despliegan perdiendo su estructura secundaria y desplazándose en dirección del espacio extracelular. Los autores proponen que los dominios N-terminales desplegados estarían cerrando cada HC siguiendo un modelo “de bola-cadena” que anteriormente se ha propuesto para canales formados de Cxs [10] y otros canales iónicos [44]. Para analizar preliminarmente esta estructura, se completaron las partes faltantes del modelo mediante modelamiento comparativo (modelo hCx26<sup>6UVT</sup>) y se realizó una simulación al “equilibrio” de 50 ns. De la simulación, se observa que los dominios N-terminales se mantienen despejados, así como también se observa un estrechamiento del poro del canal a la altura de los dominios N-terminales, identificándose interacciones entre las cadenas laterales de residuos en los dominios N-terminales y las PHs, e interacciones entre las cadenas laterales de residuos entre los dominios N-terminales. Si bien, estos resultados son prometedores, hace falta hacer más simulaciones al “equilibrio” como réplicas independientes y ver si estos resultados son consistentes en las otras simulaciones. Además, sería interesante realizar una descripción termodinámica entre el estado abierto del HC de hCx26 y el este nuevo “candidato” de estado cerrado, pero para ello es necesario determinar una coordenada de reacción que describa adecuadamente la transición entre ambos estados. Lamentablemente, el estudio de este nuevo posible estado cerrado, escapa a los objetivos de esta tesis, pero se plantea como una interesante proyección futura.

### 8.3 Discusiones Generales

En el desarrollo de este trabajo se ha buscado por responder las preguntas de investigación hechas al principio de esta tesis doctoral:

1. Dada la dificultad para resolver la estructura de la NTH en canales formados por hCx26 mediante cristalografía de rayos X y; la variabilidad presentada por el dominio NTH en simulaciones de MD que usan el modelo de Maeda y cols. [10] como inicial. **¿En el estado abierto, la NTH tiene la conformación observada en el modelo original de Maeda y cols.[10] o la conformación presente en las nuevas estructuras resueltas (Myers y cols y Brotherton y cols. [11, 35, 41]?**
2. Dada la estructura del HC de hCx31.3 **¿podría la NTH seguir el modelo de “compuerta” como mecanismo de gating en el HC de hCx26?** Donde la NTHs, en el estado abierto, tienen una posición próxima a la interfaz proteica del HC, se desplazarían al vestíbulo citoplasmático en el lumen del poro -como en hCx31.3- transitando por un estado semicerrado, para luego, las NTHs en monómeros opuestos se aproximarían cerrando el canal.

Respondiendo la primera pregunta, según los resultados obtenidos se puede inferir que, en el estado abierto del HC de hCx26, la NTH estaría transitando distintas conformaciones incluyendo las conformaciones observadas en modelos reportados en el PDB como el modelo de Maeda y cols. [10], el modelo de Brotherton y cols. [41] y también la conformación que muestra el modelo híbrido. De esta manera el comportamiento dinámico de este dominio explica la dificultad de resolver su estructura mediante métodos como la cristalografía de rayos X y cryo-EM [23, 42].

Para responder la segunda pregunta es necesario primero revisar brevemente la evidencia acerca de los mecanismos de *gating* de canales formados por Cx. Específicamente, se han descrito dos mecanismos de *gating* mediado por voltaje: el *fast gating* y *slow gating*, donde la evidencia experimental previa propone que cambios conformacionales

en la NTH ocurren en el *fast gating*, mientras que en el *slow gating* ocurren cambios conformacionales en la PH [3, 17, 32-34, 36-39]. Pero, según los resultados del trabajo de García y cols. sobre la mutación G12R en el HC de hCx26 que desacopla tanto el *fast* como el *slow gating*, hay evidencia de que ambos procesos están relacionados [40].

Se ha reportado en diversos estudios experimentales que en los residuos polares con o sin carga que componen dominio NTH se encuentra el sensor del voltaje que media el *fast gating* de canales formados por Cxs [17, 36-39]. Además, posteriores estudios en las isoformas Cx36, Cx46 y Cx50 han demostrado que no solo los residuos polares sino también los apolares son importantes en determinar la conductividad de estos canales y que también estabilizan los estados abierto y cerrado [82-84]. Por lo que es verosímil proponer un mecanismo de *gating* que implique un cambio conformacional de la NTH.

El resultado obtenido de la transición entre los estados abierto y semicerrado en el modelo de *gating* de “compuerta”, específicamente que los perfiles de PMF medidos en distintos monómeros no sean tan similares, implicaría que la transición entre estos estados no sea movimiento concertado de las 6 NTHs sino un movimiento individual de cada monómero, quizá de carácter cooperativo. Lo cual, podría respaldar la evidencia experimental del *fast gating* mediado por voltaje que da indicios de efecto del movimiento individual del dominio NTH de cada monómero [17].

Sin embargo, el modelo de *gating* de “compuerta” no sería viable para poder explicar el *slow gating* mediado por voltaje donde el canal se cierra completamente o no como originalmente se ha propuesto. En dos trabajos independientes [81, 85] se han resuelto estructuras del GJC de hCx43 por cryo-EM y los autores las han propuesto como conformaciones del estado cerrado. Donde, las NTHs se encuentran cerca del vestíbulo citoplásmico de forma similar al modelo resuelto del HC de hCx31.3 y los modelos de los estados semicerrado y cerrados propuestos en esta tesis, pero cerrando el poro del canal y con las siguientes diferencias en las TMs: En el trabajo de Lee y cols. [85] la TM1 puede variar en su estructura secundaria entre una hélice  $\alpha$  o  $\pi$  en el estado cerrado. Mientras que en el trabajo Qi, Acosta-Gutierrez y cols. [81] las TM2 se desplazan hacia fuera del poro con respecto al modelo de hCx31.3, dejando un espacio entre la NTH y la TM2. Estos cambios conformacionales propuestos en las TMs podrían estar contribuyendo en una menor rigidez en el HC en el momento de cerrar el canal, a diferencia que lo que sucede en lo visto en las simulaciones de empuje entre los estados semicerrado y cerrado propuestos. Por lo que el modelo hCx26 NTH-TM1<sup>6L3T</sup> PH-CT<sup>7QER\*</sup> no es un modelo adecuado del estado cerrado del HC de hCx26 y sería interesante incluir la evidencia estructural de los modelos de HC de hCx43 en la validación del modelo de este modelo de *gating*. Además, en ambos trabajos proponen que la estabilización del estado cerrado está mediada también por la interacción con lípidos y también se propone lo mismo en el trabajo de Lee y cols. donde resuelven la estructura del GJC de hCx36 [86], y en las simulaciones usadas para evaluar este modelo de *gating* no se ha tomado en cuenta estas interacciones.

Por otro lado, el modelo de *gating* de “bola-cadena” también es prometedor para explicar el *slow gating* pero es necesario realizar más simulaciones y una descripción termodinámica del modelo de *gating* para poder respaldarlo. Además, cabe destacar que ambos modelos han sido probados en simulaciones en ausencia de un campo eléctrico y como estos mecanismos de *gating* son mediados por voltaje, es necesario realizar simulaciones donde se aplique un campo eléctrico que simule el potencial de membrana.

Por ultimo, en respuesta de la segunda pregunta de investigación, aún hace falta más simulaciones para aceptar o descartar el modelo de *gating* de “compuerta” y lo mismo se puede concluir del modelo de “bola-cadena”.

## 9 Conclusiones

Finalmente, según los resultados obtenidos se puede concluir que:

- En el estado abierto la **NTH** presenta tanto la conformación del modelo de Maeda y cols. [10] del HC de hCx26 como la presente en los modelos del canal heterotípico de sCx46/Cx50 [11] y el modelo de Brotherton y cols [41].
- El modelo de “compuerta”, específicamente la transición del estado abierto al semicerrado del canal y de forma individual en cada monómero, podría explicar el *fast gating* mediado por voltaje.
- El modelo de “compuerta”, específicamente, en la transición entre los estados semicerrado y cerrado no es viable como modelo de *gating*.
- El modelo de “bola-cadena” es un modelo de *gating* prometedor pero hace falta más investigación para validarlo.
- Por último, los resultados de esta tesis nos lleva a **aceptar** de forma **parcial** la hipótesis original, ya que en el estado abierto la **NTH** adopta tanto la conformación del canal heterotípico de sCx46/Cx50 como la conformación del modelo de Maeda y cols. en el estado abierto, pero aún hace falta más evidencia para **aceptar** o **descartar** el modelo de *gating* de “compuerta” en el HC de hCx26.

## 10 Anexo 1: Métodos avanzados de muestreo en simulaciones de MD

En el desarrollo de esta tesis se emplearon dos métodos avanzados de muestreo en simulaciones MD: *umbrella sampling* [46] y WT-MetaD [54, 55]. En este anexo se abordaran tanto las definiciones de conceptos de energía libre y coordenada de reacción como los fundamentos de los métodos de muestreo *umbrella sampling* y WT-MetaD, y los fundamentos de métodos de de-sesgado WT-MetaD [47, 48] y mBAR [50-52].

### 10.1 Energía libre y definición de coordenadas de reacción

La diferencia de energía libre es la cantidad de trabajo de un sistema termodinámico puede realizar [87]. La diferencia de la energía libre es fundamental para determinar la espontaneidad de procesos tales como reacciones químicas, catálisis química y enzimática, y otros procesos bioquímicos como el plegamiento de proteínas y los cambios conformacionales en estas últimas [88-91]. En química, la teoría del estado de transición se utiliza para calcular velocidades de reacción a partir de barreras de energía libre [92]. La energía libre contiene a la entropía, una medida del espacio disponible de configuraciones en un sistema y para muestrear este espacio en un sistema de gran cantidad de átomos, es necesario un proceso intensivo [93, 94].

Hay un salto acá. De donde aparece el  $Q$  y cómo se relaciona con lo que venías diciendo?

La función canónica de partición  $Q$  es la suma (o integral) de todas las posibles configuraciones en un sistema termodinámico y es un factor normalizador útil para obtener propiedades termodinámicas, como la energía libre [95]. La función de partición de un sistema puede ser calculado vía una integral sobre el espacio de fase completo, es decir, el espacio de configuraciones y el momento espacial. Si la energía potencial  $E$  es independiente del momento y la integral sobre esta es una constante multiplicativamente para  $Q$ , por lo que puede ser ignorada [88]. Entonces,  $Q$  es definido como:

$$Q = \int \exp[-\beta E(r)] d^N r \quad (11)$$

Donde,  $\beta = 1/k_B T$ , siendo  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura en escala absoluta,  $N$  el número de grados de libertad del sistema y  $E(r)$  es la energía potencial en función de las configuraciones microscópicas del sistema. La energía libre de *Helmholtz*,  $A$ , está relacionada con  $Q$ :

$$A = -\frac{1}{\beta} \ln Q \quad (12)$$

La función canónica de partición implica un número constante de partículas, temperatura y volumen constante, pero si es la presión la que se mantiene constante, se obtiene la energía libre de *Gibbs* ( $G$ ). Aparte del cambio del ensamble,  $A$  y  $G$  son equivalentes, además en sistemas difícilmente compresibles, como los sistemas de interés en esta tesis,  $\Delta A$  y  $\Delta G$  son numéricamente similares [88].

Generalmente, en el estudio de reacciones químicas, es de interés la diferencia de energía libre entre dos estados y si la diferencia entre ambos es geométrica (como sucede a menudo entre reactantes y productos de una reacción química). Entonces, la integración de la ecuación 11 se puede hacer sobre una parte del espacio de fase entre ambos estados [88].

Frecuentemente, puede ser definida una coordenada de reacción ( $\xi$ ), un parámetro continuo que provee una distinción entre dos estados termodinámicos. Cualquier parámetro de orden podría ser definido como coordenada de reacción y este puede tener una o más dimensiones [88]. Usualmente,  $\xi$  es definido en términos geométricos como la distancia, torsión entre átomos o la diferencia de RMSD entre dos estados de referencia [88]. Con  $\xi$  definido, la distribución de probabilidad de un sistema a lo largo de  $\xi$  puede ser calculado integrando todos los

grados de libertad con excepción de  $\xi$  [88]:

$$Q(\xi) = \frac{\int \delta[\xi(r) - \xi] \exp [(-\beta E)d^N r]}{\int \exp [(-\beta E)d^N r]} \quad (13)$$

Donde,  $\delta[\xi(r) - \xi]$  es la función de delta de Dirac que selecciona aquellas configuraciones de  $r$  que correspondan a un valor particular de  $\xi$ , actuando como “filtro” en la integral.

$Q(\xi)d\xi$  puede ser interpretado como la probabilidad de encontrar al sistema en un pequeño intervalo  $d\xi$  a lo largo de  $\xi$ . Por lo tanto, esto permite calcular la energía libre a lo largo de una coordenada de reacción, también llamado Potencial de Fuerza Media (*Potential Mean Force* en inglés) o PMF [88]:

$$PMF = -\frac{1}{\beta} \ln Q(\xi) \quad (14)$$

A diferencia de la energía libre de Helmholtz (A) o de Gibbs (G), que son una propiedad del global del sistema y son calculadas a partir de la función de partición  $Q$ , el PMF es la energía libre restringida una coordenada de reacción  $\xi$ .

En simulaciones computacionales, las integrales directas sobre el espacio de fases que aparecen en las ecuaciones 11 y 13 no pueden evaluarse analíticamente. No obstante, si el sistema cumple la condición de ergodicidad —es decir, si una simulación suficientemente extensa permite recorrer todas las configuraciones relevantes del sistema—, los promedios temporales se equiparan a los promedios de ensamble. En consecuencia,  $Q(\xi)$  puede estimarse como se muestra en [88]:

$$P(\xi) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t \rho[\xi(t')] dt' \quad (15)$$

Donde,  $t$  corresponde al tiempo y  $\rho$  es la frecuencia en que el sistema visita  $\xi$  en un intervalo de tiempo infinitesimal  $t'$ . Entonces, en principio se podría obtener el PMF a partir de simulaciones de MD mediante la medición de  $P(\xi)$ , la distribución del sistema a lo largo de una coordenada de reacción. Sin embargo, las simulaciones de MD solo tienen una duración finita, en que se puede hacer un buen muestreo del espacio de configuraciones alrededor de un mínimo de energía potencial. Para hacer el muestreo de regiones con barreras de energía significativamente mayores a  $k_B T$ , las simulaciones de MD estándar no son suficientes y por lo tanto, tampoco son suficientes para reconstruir el PMF.

Se han desarrollado técnicas que permiten el muestreo de las regiones del espacio de configuraciones donde se presentan estas barreras de energía, las cuales se pueden clasificar como: (i) métodos de muestreo en el equilibrio, (ii) métodos de muestreo fuera del equilibrio y (iii) métodos que introducen grados de libertad adicionales [88]. El primer grupo de técnicas se mantiene el equilibrio del sistema, ya que la energía libre es una propiedad del equilibrio en los sistemas termodinámicos. Un ejemplo de estos métodos es la integración termodinámica [96-101]. El segundo grupo de técnicas se basan en estimar la diferencia de energía libre a través de la reacción del sistema frente a una perturbación del equilibrio. Ejemplos de estas técnicas son la *relación de Jarzynski* [102], la *free energy perturbation* (FEP) [103], o el *umbrella sampling* [46], en la sección 10.2 se hará una revisión más extensa de esta última técnica. Por último, el tercer grupo de técnicas, como dice su nombre se adicionan grados de libertad al sistema para poder sobrepasar la barreras de energía libre. Ejemplos de estas técnicas son las metadinámicas y  $\lambda$ -dinámicas ( $\lambda$ -dynamics en inglés) [104-107]. Para efectos de esta tesis se hará una revisión más extensa de las metadinámicas [54] en la sección 10.4.

## 10.2 Umbrella Sampling

El método de muestreo *umbrella sampling* fue desarrollado por Torrie & Valleau [46]. Consiste en la adición de un sesgo, un termino energético, que es aplicado en el sistema para permitir el muestreo adecuado a lo largo de la coordenada de reacción. El sesgo puede ser aplicado en una simulación o en una serie de diferentes simulaciones usualmente denominadas “ventanas”, cuyas distribuciones se solapan entre sí. Frecuentemente, el sesgo aplicado tiene la forma de un potencial armónico:

$$\omega_i(\xi) = \frac{1}{2}K(\xi - \xi_i^{ref}) \quad (16)$$

Donde  $K$  es constante de fuerza y  $\xi_i^{ref}$  es el valor central de  $\xi$  para la “ventana”  $i$  y  $\omega_i(\xi)$  es el potencial armónico aplicado en la “ventana” de simulación que depende solo de la coordenada de reacción. De este modo, la energía potencial de cada simulación sesgada,  $E^b(r)$  se define como:

$$E^b(r) = E^u(r) + \omega_i(\xi) \quad (17)$$

En las siguientes ecuaciones los superíndices “b” y “u” corresponden a cantidades sesgadas y de-sesgadas respectivamente, cuando ninguno de estos superíndices sea usado la cantidad es de-sesgada.

Para obtener el PMF de-sesgado es necesaria la distribución de-sesgada, siguiendo la ecuación 13, la distribución de-sesgada de cada ventana se define como:

$$P_i^u(\xi) = \frac{\int \exp[-\beta E(r)] \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r}{\int \exp[-\beta E(r)] d^N r} \quad (18)$$

De las simulaciones de cada ventana se puede obtener la distribución sesgada al lo largo de la coordenada de reacción y asumiendo un sistema ergódico:

$$P_i^b(\xi) = \frac{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi'(r))]\} \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r}{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi'(r))]\} d^N r} \quad (19)$$

Debido a que el sesgo aplicado al sistema depende solo de  $\xi$  y que la integración en el numerador es sobre todos los grados de libertad a excepción de  $\xi$ :

$$P_i^b(\xi) = \exp[-\beta \omega_i(\xi)] \times \frac{\int \exp[E(r)] \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r}{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi'(r))]\} d^N r} \quad (20)$$

El numerador del segundo termino en 20 ( $\int \exp[E(r)] \delta[\xi'(r) - \xi] d^N r$ ) es igual al numerador de 18 entonces se puede reemplazar y despejar la probabilidad de-sesgada:



$$\begin{aligned}
P_i^b(\xi) &= \exp[-\beta\omega_i(\xi)] \times \frac{P_i^u(\xi) \int \exp[-\beta(E(r))] d^N r}{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi(r))]\} d^N r} \\
P_i^u(\xi) &= P_i^b(\xi) \times \frac{1}{\exp[-\beta\omega_i(\xi)]} \times \frac{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi(r))]\} d^N r}{\int \exp[-\beta E(r)] d^N r} \\
&= P_i^b(\xi) \exp[\beta\omega_i(\xi)] \times \frac{\int \exp\{-\beta[E(r) + \omega_i(\xi(r))]\} d^N r}{\int \exp[-\beta E(r)] d^N r} \\
&= P_i^b(\xi) \exp[\beta\omega_i(\xi)] \times \frac{\int \exp[-\beta E(r)] \exp\{-\beta[\omega_i(\xi(r))]\} d^N r}{\int \exp[-\beta E(r)] d^N r} \\
&= P_i^b(\xi) \exp[\beta\omega_i(\xi)] \int P(r) \exp[-\beta\omega_i(\xi)] d^N r \\
&= P_i^b(\xi) \exp[\beta\omega_i(\xi)] < \exp[-\beta\omega_i(\xi)] >
\end{aligned} \tag{21}$$

Como  $P(r) = \exp[-\beta E(r)] / \int \exp[-\beta E(r)] d^N r$  [87, 95], entonces se puede reemplazar en la relación  $Q/Q^b$  en 21 y a la vez  $Q/Q^b = \int P(r) \exp[-\beta\omega_i(\xi)]$  es el valor esperado de  $\exp[-\beta\omega_i(\xi)]$  en la distribución de-sesgada por lo que se puede expresar como el promedio ensamble de  $\exp[-\beta\omega_i(\xi)]$ .

Entonces, se puede obtener el **PMF** de cada ventana a partir de  $P_i^u(\xi)$ :

$$PMF_i = -\frac{1}{\beta} \ln P_i^b(\xi) + \omega_i(\xi) + F_i \tag{22}$$

Donde, como se mencionó,  $P_i^b(\xi)$  se puede medir en las simulaciones y se conoce el valor de  $\omega_i(\xi)$  *a priori*. Mientras que  $F_i$ , o factor de normalización, es igual a  $\ln < \exp[-\beta\omega_i(\xi)] >$ .

De esta forma, se puede obtener el **PMF** por cada ventana, sin embargo, para obtener el **PMF** global es necesario calcular el factor de normalización,  $F_i$  que está relacionado con el sesgo aplicado a cada ventana ( $\omega_i(\xi)$ ). Pero debido a que las distribuciones sesgadas obtenidas en cada ventana se solapan entre sí en sus valores extremos, se hace imposible diferenciar la contribución del sesgo entre ventanas vecinas. Es por esto que para calcular el **PMF** global a partir de muestreos tipo *umbrella sampling* es necesario el uso de métodos de de-sesgado.

### 10.3 Métodos de desesgado usados para muestreos tipo umbrella sampling

Como se mencionó en la sección anterior, para calcular el **PMF** a partir de *umbrella sampling* es necesario usar métodos de de-sesgado como **WHAM** (*Weighted Histogram Analysis Method*) y/o **mBAR** (*multiple Bennett Acceptance Ratio*).

#### 10.3.1 Weighted Histogram Analysis (**WHAM**)

El método de-sesgado **WHAM** (sigla que en inglés que significa *Weighted Histogram Analysis*) desarrollado originalmente por Kumar y cols [47, 48], consiste en el cálculo la distribución global promediando ponderadamente de las distribuciones de-sesgadas de cada ventana, con el objetivo de minimizar el error estadístico del factor de normalización,  $F_i$ :

$$P^u(\xi) = \sum_i^{\text{ventanas}} \rho_i(\xi) P_i^u(\xi) \quad (23)$$

Los pesos son escogidos para minimizar el error estadístico de  $P^u$ :

$$\frac{\partial \sigma^2(P^u)}{\partial \rho_i} = 0 \quad (24)$$

Y bajo la condición  $\sum \rho_i = 1$ , entonces:

$$\rho_i = \frac{a_i(\xi)}{\sum_j^{\text{ventanas}} a_j(\xi)} \quad (25)$$

$$a_i(\xi) = N_i \exp[-\beta \omega_i(\xi) + \beta F_i] \quad (26)$$

Donde en 25  $a_i(\xi)$  es la contribución que aporta la distribución de una ventana de simulación en el peso, y  $\sum_j^{\text{ventanas}} a_j(\xi)$  corresponde a la suma de las distribuciones de todas las ventanas. Mientras que en 26  $a_i(\xi)$  corresponde a la contribución de cada ventana a un valor específico de la coordenada reacción y  $N_i$  es el tamaño de la muestra de cada ventana. De esta forma la ecuación 26 es usada para calcular los valores de  $\rho_i$  en la ecuación 23.

Por otro lado,  $F_i$  es calculado con:

$$\exp(-\beta F_i) = \int P^u(\xi) \exp[-\beta \omega_i(\xi)] d\xi \quad (27)$$

Como se puede observar,  $P^u$  es usado en ecuación 27 y  $F_i$  entra en la ecuación 23, mediante la ecuación 26. Por lo que es necesario iterar ambas ecuaciones (23 y 27) hasta que los valores alcancen la convergencia.

### 10.3.2 Multiple Bennett Acceptance Ratio **mBAR**

El siguiente método de de-sesgado utilizado en el presente trabajo es **mBAR** (sigla de *multiple Bennett Acceptance Ratio* en inglés). Desarrollado por Shirts y cols [50-52] que es una extensión del método **BAR** (*Bennet Acceptance Ratio*) [108, 109] para múltiples estados termodinámicos. Este método, además de ser usado para *umbrella sampling*, también se usa en otros métodos de muestreo como perturbación de energía libre (FEP) [103] o **H-REMD** (*Hamiltonian Replica Exchange*) [110] entre otros. **mBAR** es un estimador “libre de *bins*” de diferencia de energía libre que puede ser derivado a partir de **WHAM** en la condición en que el tamaño del *bin* está en el límite tendiendo a cero [50, 111, 112].

La ideal central de **mBAR** es estimar la energía libre reducida de cada estado termodinámico o “ventana” de simulación del *umbrella sampling*, de un total de estados o “ventanas”,  $K$ :

$$f_k = -\ln \left[ \sum_{n=1}^{N_k} \frac{\exp[-u_k(r_n)]}{\sum_{l=1}^K N_l \exp[-f_l - u_l(r_n)]} \right] \quad (28)$$

Donde,  $f_k$  es la energía reducida de cada “ventana” o estado  $k$ , la energía libre de reducida está relacionada con el **PMF** de cada estado:  $f_k = \beta P M F_k$ .  $N_k$  y  $N_l$  son el número de muestras no correlacionadas de cada estado  $k$ , y  $u_n$  y  $u_l$  son los potenciales reducidos de cada estado o “ventana”  $k$ .

El potencial reducido de un sistema, en ensambles **NVT**, **NPT** y  $\mu$ **VT** se define como:

$$u_k(r) = \beta_k[E_k(r) + p_k V_k(r) + \mu_k^T n(r)] \quad (29)$$

Donde,  $E(r)$  es la energía potencial del sistema, la cual en el caso de *umbrella sampling* incluye el potencial hármonico ( $\omega_k(\xi)$ ) adicionado en cada “ventana” de simulación. En el caso del uso del ensamble **NPT**,  $p_k$  y  $V_k(r)$  son la presión aplicada en el sistema y el volumen de este en cada estado respectivamente. Por último, en el caso del uso de un ensamble *grand* canónico ( **$\mu$ VT**),  $\mu_k^T$  y  $n_k(r)$  son el vector del potencial químico y el número de moléculas de cada componente del sistema respectivamente.

Volviendo a la ecuación 28, en el denominador de cada elemento  $n$  de la sumatoria se incluye la energía libre reducida de cada estado, por lo tanto, para poder obtener estos valores es necesario resolver esta ecuación de forma iterativa partiendo por valores arbitrarios de  $f_k$  que usualmente son iguales a cero. Se calcula primero el denominador que es común para todos los estados y, luego, se calcula la energía libre reducida para cada estado. Luego, estos nuevos valores de energía libre reducidas son usados en la siguiente iteración, hasta que los valores converjan.

Una vez obtenidas las energías libres reducidas de cada estado se pueden obtener los pesos de cada ventana  $W_k$  en las muestras obtenidas:

$$W_k(r) = \frac{N_k \exp[-u_k(r_n) + f_k]}{\sum_{l=1}^K N_l \exp[u_l(r_n) + f_k]} \quad (30)$$

Luego, se usan los pesos obtenidos para calcular el **PMF** global usando diferentes métodos para reconstruir la curva, entre los cuales se pueden mencionar el cálculo de histogramas a partir de la distribución de  $\xi$  obtenida de las simulaciones o ajustando la curva mediante funciones de distribución de probabilidad como por ejemplo, gaussianas.

## 10.4 Well Tempered Metadynamics (**WT-MetaD**)

El método de muestreo de simulaciones de MD, metadinámica fue desarrollado originalmente por Laio & Parinello en 2002 [54], el cual a su vez está basado en el trabajo previo del grupo de van Gasteren [113]. Este método consiste en agregar un potencial externo que depende la trayectoria de la simulación,  $V(\xi(r), t)$ . Y a su vez este potencial está definido por la sumatoria de *gaussianas*, las cuales se van depositando sobre el espacio de configuraciones de la coordenada de reacción  $\xi$ , y  $V(\xi(r), t)$  esta definido como:

$$V(\xi(r), t) = \sum_{k\tau < t} W(k\tau) \exp\left[-\sum_{i=1}^d \frac{(\xi_i - \xi_i(r(k\tau)))^2}{2\sigma_i^2}\right] \quad (31)$$

Donde,  $\tau$  es el intervalo de tiempo en que las *gaussianas* son depositadas y  $k$  es el número de éstas que son depositadas.  $W(k\tau)$  es el alto de las *gaussianas* en función del tiempo,  $d$  es el número de dimensiones de la coordenada de reacción  $\xi$  y  $\sigma$  es el ancho de las *gaussianas*.

El adicionado de *gaussianas* en el espacio de configuraciones permite al sistema que se encuentra en un “pozo” de energía potencial, cruzar las barreras de alta energía y visitar otras regiones del espacio de configuraciones. De este modo, las *gaussianas* son como una “arena computacional” que permite al sistema explorar el espacio de configuraciones. En simulaciones suficientemente largas el potencial converge al negativo de la energía libre o **PMF**:

$$V(\xi, t \rightarrow \infty) = -PMF + C \quad (32)$$

Donde  $C$  es una constante, en una simulación de metadinámica estándar  $W(k\tau)$  es constante a lo largo de la simulación. Debido a esto, la estimación del [PMF](#) oscila entorno a los valores reales de [PMF](#), sin embargo, se corre el riesgo de explorar regiones del espacio de configuraciones que no tengan sentido físico. Para corregir el problema de convergencia, [WT-MetaD](#) [55] (*Well Tempered Metadynamics* en inglés) fue desarrollado, en donde el alto de *gaussiana*  $W(k\tau)$  varía a lo largo de la simulación y depende del potencial  $V(\xi(r), t)$ :

$$W(k\tau) = W_0 \exp\left[-\frac{V(\xi(r(k\tau)), k\tau)}{k_B \Delta T}\right] \quad (33)$$

Donde,  $W_0$  es la altura inicial de la *gaussiana*,  $k_B$  la constante de Boltzmann y  $\Delta T$  es un parámetro de “temperatura artificial” que controla el decaimiento de la altura de las *gaussianas* depositadas. De este modo, se asegura que la convergencia del potencial agregado sea más suave, pero sin afectar la estimación del [PMF](#):

$$V(\xi, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{T + \Delta T} PMF + C \quad (34)$$

Donde,  $T$  es la temperatura del sistema. Cuando  $\Delta T = 0$ , entonces la simulación es equivalente a una simulación de MD al equilibrio, mientras que cuando  $\Delta T = \infty$  la simulación es equivalente a una simulación de metadinámica estándar.

En la implementación de [WT-MetaD](#) del software PLUMED [56] se utiliza el parámetro *biasfactor* o  $\lambda$ :

$$\lambda = \frac{T + \Delta T}{\Delta T} \quad (35)$$

Este parámetro de entrada en las simulaciones de [WT-MetaD](#), controla la velocidad en que decae la altura de las *gaussianas* depositadas mediante la ecuación 33, específicamente a través del parámetro  $\Delta T$  y por extensión también controla la extensión de la exploración del espacio de configuraciones.

## 11 Anexo 2: Publicaciones

En el transcurso del doctorado he participado como co-autor en 3 trabajos de investigación de canales formados en conexinas (véase tabla 1). El primer trabajo, cuyo manuscrito titulado como *“Human Connexin 26 N-Terminal Helix orientation is in a dynamic equilibrium”*, contiene los resultados del primer objetivo de esta tesis y fue enviado a la revista *Biophysical Journal*. A la fecha de publicación de esta tesis, este manuscrito se encuentra aún en revisión. Mientras que, los demás trabajos que ya están publicados no están relacionadas directamente con el trabajo de tesis, pero tratan de otros factores que influyen en la formación y regulación de canales de conexinas. En la Tabla 1 se resume la información de los 3 trabajos.

Título	Autores	Revista, Año, Número	Estado
<i>“Human Connexin 26 N-Terminal Helix orientation is in a dynamic equilibrium.”</i>	<b>Jensen-Flores, J.</b> ; Barrera, Y.; Barría-Urenda, M.; Garate, J.A.; Villanelo, F.; Perez-Acle, T.	<i>Biophysical Journal</i>	En revisión
<i>“Connexins channels and hemichannels are modulated differently by charge reversal at residues forming the intracellular pocket.”</i>	Villanelo, F.; Minogue, P.J.; Maripillán, J.; Reyna-Jeldes, M.; <b>Jensen-Flores, J.</b> ; García, I.E.; Beyer, E.C.; Perez-Acle, T.; Berthoud, V.M.; Martínez, A.D.	<i>Biological Research</i> 2024, 31.	Publicado*
<i>“Simulations on Simple Models of Connexin Hemichannels Indicate That Ca<sup>2+</sup> Blocking Is Not a Pure Electrostatic Effect.”</i>	Villanelo, F.; Carrasco, J.; <b>Jensen-Flores, J.</b> ; Garate, J.A.; Perez-Acle, T.	<i>Membranes</i> 2021, 11.	Publicado**

**Tabla 1: Resumen de publicaciones.** Información de los trabajos publicados o en revisión durante el transcurso del doctorado. \*<https://doi.org/10.1186/s40659-024-00501-5>. \*\*<https://doi.org/10.3390/membranes11050372>.

## 12 Referencias

1. Cruciani, V. y Mikalsen, S.-O. The vertebrate connexin family. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **63**, 1125-1140 (2006).
2. Villanelo, F., Escalona, Y., Pareja-Barrueto, C., Garate, J. A., Skerrett, I. M. y Perez-Acle, T. Accessing gap-junction channel structure-function relationships through molecular modeling and simulations. *BMC Cell Biology* **18**, 5 (2017).
3. Bargiello, T. A., Oh, S., Tang, Q., Bargiello, N. K., Dowd, T. L. y Kwon, T. Gating of Connexin Channels by transjunctional-voltage: Conformations and models of open and closed states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1860**, 22-39 (2018).
4. Fasciani, I., Temperán, A., Pérez-Atencio, L. F., Escudero, A., Martínez-Montero, P., Molano, J., Gómez-Hernández, J. M., Paino, C. L., González-Nieto, D. y Barrio, L. C. Regulation of connexin hemichannel activity by membrane potential and the extracellular calcium in health and disease. *Neuropharmacology* **75**, 479-490 (2013).
5. Abascal, F. y Zardoya, R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 4-14 (2013).
6. Orellana, J., Giaume, C. y Sáez, J. en. Section: Role of Connexin Hemichannels in Neurodegeneration (2011). ISBN: 978-953-307-485-6.
7. Wang, N., Bock, M. D., Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A., Vinken, M., Rogiers, V., Bukauskas, F. F., Bultynck, G. y Leybaert, L. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 35-50 (2013).
8. Pfenniger, A., Wohlwend, A. y Kwak, B. R. Mutations in connexin genes and disease. *European Journal of Clinical Investigation* **41**, 103-116 (2011).
9. García, I. E., Prado, P., Pupo, A., Jara, O., Rojas-Gómez, D., Mujica, P., Flores-Muñoz, C., González-Casanova, J., Soto-Riveros, C., Pinto, B. I., Retamal, M. A., González, C. y Martínez, A. D. Connexinopathies: a structural and functional glimpse. *BMC Cell Biology* **17**, S17. ISSN: 1471-2121. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0092-x> (mayo de 2016).
10. Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. y Tsukihara, T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602 (2009).
11. Myers, J. B., Haddad, B. G., O'Neill, S. E., Chorev, D. S., Yoshioka, C. C., Robinson, C. V., Zuckerman, D. M. y Reichow, S. L. Structure of native lens connexin 46/50 intercellular channels by cryo-EM. *Nature* **564**, 372-377 (2018).
12. Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. y Sosinsky, G. E. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 10034-10039 (2007).
13. Kwon, T., Harris, A. L., Rossi, A. y Bargiello, T. A. Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: Evaluation of structural models with Brownian dynamics. *Journal of General Physiology* **138**, 475-493 (2011).
14. Locke, D., Bian, S., Li, H. y Harris, A. L. Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochemical Journal* **424**, 385-398 (2009).

15. Suchyna, T. M., Nitsche, J. M., Chilton, M., Harris, A. L., Veenstra, R. D. y Nicholson, B. J. Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophysical journal* **77**, 2968-2987 (1999).
16. Trexler, E. B., Bennett, M. V., Bargiello, T. A. y Verselis, V. K. Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**. Publisher: National Academy of Sciences, 5836-5841 (1996).
17. Oh, S., Abrams, C. K., Verselis, V. K. y Bargiello, T. A. Stoichiometry of Transjunctional Voltage-Gating Polarity Reversal by a Negative Charge Substitution in the Amino Terminus of a Connexin32 Chimera. *Journal of General Physiology* **116**, 13-32 (2000).
18. Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., Takano, T. y Nedergaard, M. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Science signaling* **5**, ra8-ra8 (2012).
19. Müller, D. J., Hand, G. M., Engel, A. y Sosinsky, G. E. Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions. *The EMBO journal* **21**. Publisher: Oxford University Press, 3598-3607 (2002).
20. Allen, M. J., Gemel, J., Beyer, E. C. y Lal, R. Atomic force microscopy of Connexin40 gap junction hemichannels reveals calcium-dependent three-dimensional molecular topography and open-closed conformations of both the extracellular and cytoplasmic faces. *The Journal of biological chemistry* **286**. Publisher: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 22139-22146 (2011).
21. Bargiello, T. A., Tang, Q., Oh, S. y Kwon, T. Voltage-dependent conformational changes in connexin channels. *Biochimica et biophysica acta* **1818**, 1807-1822 (2012).
22. Zonta, F., Buratto, D., Crispino, G., Carrer, A., Bruno, F., Yang, G., Mammano, F. y Pantano, S. Cues to Opening Mechanisms From in Silico Electric Field Excitation of Cx26 Hemichannel and in Vitro Mutagenesis Studies in HeLa Transfectans. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11** (2018).
23. Bennett, B. C., Purdy, M. D., Baker, K. A., Acharya, C., McIntire, W. E., Stevens, R. C., Zhang, Q., Harris, A. L., Abagyan, R. y Yeager, M. An electrostatic mechanism for  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated regulation of gap junction channels. *Nature Communications* **7**, 8770 (2016).
24. Lopez, W., Ramachandran, J., Alsamarah, A., Luo, Y., Harris, A. L. y Contreras, J. E. Mechanism of gating by calcium in connexin hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**. Publisher: National Academy of Sciences, E7986-E7995 (2016).
25. Villanelo, F., Carrasco, J., Jensen-Flores, J., Garate, J. A. y Perez-Acle, T. Simulations on Simple Models of Connexin Hemichannels Indicate That  $\text{Ca}^{2+}$  Blocking Is Not a Pure Electrostatic Effect. *Membranes* **11** (2021).
26. Pinto, B. I., Pupo, A., García, I. E., Mena-Ulecia, K., Martínez, A. D., Latorre, R. y Gonzalez, C. Calcium binding and voltage gating in Cx46 hemichannels. *Scientific Reports* **7**, 15851 (2017).
27. Ek-Vitorín, J. F., Calero, G., Morley, G. E., Coombs, W., Taffet, S. M. y Delmar, M. pH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys J* **71**, 1273-1284 (1996).
28. Duffy, H. S., Sorgen, P. L., Girvin, M. E., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S. M., Delmar, M. y Spray, D. C. pH-Dependent Intramolecular Binding and Structure Involving Cx43 Cytoplasmic Domains \*. *Journal of Biological Chemistry* **277**. Publisher: Elsevier, 36706-36714 (2002).

29. Swietach, P., Rossini, A., Spitzer, K. W. y Vaughan-Jones, R. D. H<sup>+</sup> Ion Activation and Inactivation of the Ventricular Gap Junction. *Circulation Research* **100**, 1045-1054 (2007).
30. Garcíarena, C. D., Malik, A., Swietach, P., Moreno, A. P. y Vaughan-Jones, R. D. Distinct moieties underlie biphasic H<sup>+</sup> gating of connexin43 channels, producing a pH optimum for intercellular communication. *The FASEB Journal* **32**, 1969-1981 (2018).
31. Unwin, P. N. y Zampighi, G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature* **283**, 545-549 (1980).
32. Tong, X., Aoyama, H., Tsukihara, T. y Bai, D. Charge at the 46th residue of connexin 50 is crucial for the gap-junctional unitary conductance and transjunctional voltage-dependent gating. *The Journal of Physiology* **592**, 5187-5202 (2014).
33. Verselis, V. K., Trelles, M. P., Rubinos, C., Bargiello, T. A. y Srinivas, M. Loop gating of connexin hemichannels involves movement of pore-lining residues in the first extracellular loop domain. *The Journal of biological chemistry* **284**. Publisher: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 4484-4493 (2009).
34. Tang, Q., Dowd, T. L., Verselis, V. K. y Bargiello, T. A. Conformational changes in a pore-forming region underlie voltage-dependent “loop gating” of an unapposed connexin hemichannel. *Journal of General Physiology* **133**, 555-570 (2009).
35. Flores, J. A., Haddad, B. G., Dolan, K. A., Myers, J. B., Yoshioka, C. C., Copperman, J., Zuckerman, D. M. y Reichow, S. L. Connexin-46/50 in a dynamic lipid environment resolved by CryoEM at 1.9 Å. *Nature Communications* **11**, 4331 (2020).
36. Oh, S., Rubin, J. B., Bennett, M. V., Verselis, V. K. y Bargiello, T. A. Molecular Determinants of Electrical Rectification of Single Channel Conductance in Gap Junctions Formed by Connexins 26 and 32. *Journal of General Physiology* **114**, 339-364 (1999).
37. Verselis, V. K., Ginter, C. S. y Bargiello, T. A. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* **368**, 348-351. ISSN: 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/368348a0> (mar. de 1994).
38. Oh, S., Rivkin, S., Tang, Q., Verselis, V. K. y Bargiello, T. A. Determinants of Gating Polarity of a Connexin 32 Hemichannel. *Biophysical Journal* **87**, 912-928. ISSN: 0006-3495. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349504735766> (2004).
39. Purnick, P. E., Oh, S., Abrams, C. K., Verselis, V. K. y Bargiello, T. A. Reversal of the Gating Polarity of Gap Junctions by Negative Charge Substitutions in the N-Terminus of Connexin 32. *Biophysical Journal* **79**, 2403-2415. ISSN: 0006-3495. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950076485X> (2000).
40. García, I. E., Villanelo, F., Contreras, G. F., Pupo, A., Pinto, B. I., Contreras, J. E., Pérez-Acle, T., Alvarez, O., Latorre, R., Martínez, A. D. y González, C. The syndromic deafness mutation G12R impairs fast and slow gating in Cx26 hemichannels. *Journal of General Physiology* **150**, 697-711 (2018).
41. Brotherton, D. H., Savva, C. G., Ragan, T. J., Dale, N. y Cameron, A. D. Conformational changes and CO<sub>2</sub>-induced channel gating in connexin26. *Structure* **30**. Publisher: Elsevier, 697-706.e4. ISSN: 0969-2126. <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.02.010> (2023) (5 de mayo de 2022).
42. Khan, A. K., Jagielnicki, M., McIntire, W. E., Purdy, M. D., Dharmarajan, V., Griffin, P. R. y Yeager, M. A Steric “Ball-and-Chain” Mechanism for pH-Mediated Regulation of Gap Junction Channels. *Cell Reports* **31**, 107482 (2020).



43. Lee, H.-J., Jeong, H., Hyun, J., Ryu, B., Park, K., Lim, H.-H., Yoo, J. y Woo, J.-S. Cryo-EM structure of human Cx31.3/GJC3 connexin hemichannel. *Science Advances* **6**, eaba4996 (2020).
44. Liebovitch, L. S., Selector, L. Y. y Kline, R. P. Statistical properties predicted by the ball and chain model of channel inactivation. *Biophys J* **63**, 1579-1585 (1992).
45. Webb, B. y Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* **54**, 5.6.1-5.6.37 (2016).
46. Torrie, G. y Valleau, J. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics* **23**, 187-199. ISSN: 0021-9991. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021999177901218> (1 de feb. de 1977).
47. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. y Kollman, P. A. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *Journal of Computational Chemistry* **13**. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd, 1011-1021. ISSN: 0192-8651. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130812> (2024) (1 de oct. de 1992).
48. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. y Kollman, P. A. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. *Journal of Computational Chemistry* **16**. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd, 1339-1350. ISSN: 0192-8651. <https://doi.org/10.1002/jcc.540161104> (2024) (1 de nov. de 1995).
49. Grossfield, A. "WHAM: the weighted histogram analysis method", version 2.0.11 [http://membrane.urmc.rochester.edu/wordpress/?page\\_id=126](http://membrane.urmc.rochester.edu/wordpress/?page_id=126).
50. Shirts, M. R. y Chodera, J. D. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *The Journal of Chemical Physics* **129**, 124105. ISSN: 0021-9606. <https://doi.org/10.1063/1.2978177> (2024) (23 de sep. de 2008).
51. Chodera, J. D. A Simple Method for Automated Equilibration Detection in Molecular Simulations. *Journal of chemical theory and computation* **12**. Place: United States, 1799-1805. ISSN: 1549-9626 1549-9618 (12 de abr. de 2016).
52. Shirts, M. R. y Ferguson, A. L. Statistically Optimal Continuous Free Energy Surfaces from Biased Simulations and Multistate Reweighting. *Journal of Chemical Theory and Computation* **16**, 4107-4125. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00077> (2020).
53. Liao, Q. en *Computational Approaches for Understanding Dynamical Systems: Protein Folding and Assembly* (eds. Strodel, B. y Barz, B.) ISSN: 1877-1173, 177-213 (Academic Press, 2020).
54. Laio, A. y Parrinello, M. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12562-12566. eprint: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.202427399>. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.202427399> (2002).
55. Barducci, A., Bussi, G. y Parrinello, M. Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 020603. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.100.020603> (2 ene. de 2008).
56. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C. y Bussi, G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Computer Physics Communications* **185**, 604-613 (2014).

57. Branduardi, D., Gervasio, F. L. y Parrinello, M. From A to B in free energy space. *The Journal of Chemical Physics* **126**, 054103. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/doi/10.1063/1.2432340/15394827/054103\\_1\\_1\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/doi/10.1063/1.2432340/15394827/054103_1_1_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.2432340> (feb. de 2007).
58. Postic, G., Ghouzam, Y. y Gelly, J.-C. An empirical energy function for structural assessment of protein transmembrane domains. *Biochimie* **115**, 155-161 (2015).
59. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. e Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry* **29**, 1859-1865 (2008).
60. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. y Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **79**, 926-935. ISSN: 0021-9606. <https://doi.org/10.1063/1.445869> (2024) (15 de jul. de 1983).
61. Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M. y MacKerell, A. D. 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**. Publisher: American Chemical Society, 3257-3273 (2012).
62. Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D. y Pastor, R. W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**. Publisher: American Chemical Society, 7830-7843 (2010).
63. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. y Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1701-1718 (2005).
64. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. y Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 3684-3690. ISSN: 0021-9606. <https://doi.org/10.1063/1.448118> (2024) (15 de oct. de 1984).
65. Nosé, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 511-519. ISSN: 0021-9606. <https://doi.org/10.1063/1.447334> (2024) (1 de jul. de 1984).
66. Hoover, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A* **31**. Publisher: American Physical Society, 1695-1697. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevA.31.1695> (1 de mar. de 1985).
67. Parrinello, M. y Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* **52**, 7182-7190. ISSN: 0021-8979. <https://doi.org/10.1063/1.328693> (2024) (1 de dic. de 1981).
68. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. y Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **18**. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd, 1463-1472. ISSN: 0192-8651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H) (2024) (1 de sep. de 1997).
69. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. y Pedersen, L. G. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* **103**, 8577-8593. ISSN: 0021-9606. <https://doi.org/10.1063/1.470117> (2024) (15 de nov. de 1995).

70. Kutzner, C., Czub, J. y Grubmüller, H. Keep It Flexible: Driving Macromolecular Rotary Motions in Atomistic Simulations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation* **7**. Publisher: American Chemical Society, 1381-1393. ISSN: 1549-9618. <https://doi.org/10.1021/ct100666v> (10 de mayo de 2011).
71. Michaud-Agrawal, N., Denning, E. J., Woolf, T. B. y Beckstein, O. MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry* **32**, 2319-2327 (2011).
72. Gowers, R. J., Linke, M., Barnoud, J., Reddy, T. J. E., Melo, M. N., Seyler, S. L., Domaski, J., Dotson, D. L., Buchoux, S., Kenney, I. M. y Beckstein, O. *MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations* en *Proceedings of the 15th Python in Science Conference* (eds. Benthall, S. y Rostrup, S.) (2016), 98-105.
73. Cleveland, W. S. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* **74**, 829-836 (1979).
74. Smart, O. S., Goodfellow, J. M. y Wallace, B. A. The pore dimensions of gramicidin A. en. *Biophys J* **65**, 2455-2460 (dic. de 1993).
75. Smart, O. S., Neduvellil, J. G., Wang, X., Wallace, B. y Sansom, M. S. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 354-360. ISSN: 0263-7855. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026378559700009X> (1996).
76. Stelzl, L. S., Fowler, P. W., Sansom, M. S. y Beckstein, O. Flexible Gates Generate Occluded Intermediates in the Transport Cycle of LacY. *Journal of Molecular Biology* **426**, 735-751. ISSN: 0022-2836. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283613006700> (2014).
77. Kabsch, W. y Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd, 2577-2637. ISSN: 0006-3525. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211> (2024) (1 de dic. de 1983).
78. Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T. A. H., Krieger, E., Joosten, R. P. y Vriend, G. A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Research* **43**, D364-D368. ISSN: 0305-1048. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1028> (2024) (D1 28 de ene. de 2015).
79. Smart, O., Goodfellow, J. y Wallace, B. The pore dimensions of gramicidin A. *Biophysical Journal* **65**, 2455-2460. ISSN: 0006-3495. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349593812931> (1993).
80. Umeda, A., Ishizaka, M., Ikeda, A., Miyagawa, K., Mochida, A., Takeda, H., Takeda, K., Fukushi, I., Okada, Y. y Gozal, D. Recent Insights into the Measurement of Carbon Dioxide Concentrations for Clinical Practice in Respiratory Medicine. *Sensors* **21**. ISSN: 1424-8220. <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/16/5636> (2021).
81. Qi, C., Acosta Gutierrez, S., Lavriha, P., Othman, A., Lopez-Pigozzi, D., Bayraktar, E., Schuster, D., Picotti, P., Zamboni, N., Bortolozzi, M., Gervasio, F. L. y Korkhov, V. M. Structure of the connexin-43 gap junction channel in a putative closed state. *eLife* **12** (eds. Drew, D. y Swartz, K. J.) RP87616. ISSN: 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.87616> (ago. de 2023).

82. Yue, B., Haddad, B. G., Khan, U., Chen, H., Atalla, M., Zhang, Z., Zuckerman, D. M., Reichow, S. L. y Bai, D. Connexin 46 and connexin 50 gap junction channel properties are shaped by structural and dynamic features of their N-terminal domains. *The Journal of Physiology* **599**, 3313-3335. eprint: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1113/JP281339>. <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/JP281339> (2021).
83. Jaradat, R., Li, X., Chen, H., Stathopoulos, P. B. y Bai, D. The Hydrophobic Residues in Amino Terminal Domains of Cx46 and Cx50 Are Important for Their Gap Junction Channel Ion Permeation and Gating. *International Journal of Molecular Sciences* **23**. ISSN: 1422-0067. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11605> (2022).
84. Gudaitis, L., Snipas, M., Kraujalis, T., Kraujaliene, L. y Verselis, V. The N-terminal domain and voltage dependence of connexin-36 gap junction channels. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **772**, 110556. ISSN: 0003-9861. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986125002693> (2025).
85. Lee, H.-J., Cha, H. J., Jeong, H., Lee, S.-N., Lee, C.-W., Kim, M., Yoo, J. y Woo, J.-S. Conformational changes in the human Cx43/GJA1 gap junction channel visualized using cryo-EM. *Nature Communications* **14**, 931. ISSN: 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36593-y> (feb. de 2023).
86. Lee, S.-N., Cho, H.-J., Jeong, H., Ryu, B., Lee, H.-J., Kim, M., Yoo, J., Woo, J.-S. y Lee, H. H. Cryo-EM structures of human Cx36/GJD2 neuronal gap junction channel. *Nature Communications* **14**, 1347. ISSN: 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37040-8> (mar. de 2023).
87. Callen, H. *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics* ISBN: 9780471610564. <https://books.google.cl/books?id=MFutGQAACAAJ> (Wiley, 1985).
88. Kästner, J. Umbrella Sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **1**, 932-942 (nov. de 2011).
89. Arrhenius, S. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **4U**, 226-248. <https://doi.org/10.1515/zpch-1889-0416> (1889).
90. Eyring, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics* **3**, 107-115. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/3/2/107/18788362/107\\_1\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/3/2/107/18788362/107_1_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.1749604> (feb. de 1935).
91. Evans, M. G. y Polanyi, M. Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution. *Trans. Faraday Soc.* **31**, 875-894. <http://dx.doi.org/10.1039/TF9353100875> (0 1935).
92. Chandler, D. Statistical mechanics of isomerization dynamics in liquids and the transition state approximation. *The Journal of Chemical Physics* **68**, 2959-2970. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/68/6/2959/18911299/2959\\_1\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/68/6/2959/18911299/2959_1_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.436049> (mar. de 1978).
93. Kollman, P. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews* **93**, 2395-2417. ISSN: 0009-2665. <https://doi.org/10.1021/cr00023a004> (nov. de 1993).
94. Beveridge, D. L. y DiCapua, F. M. Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems. *Annual Review of Biophysics* **18**, 431-492. ISSN: 1936-1238. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.bb.18.060189.002243> (1989).

95. McQuarrie, D. *Statistical Mechanics* ISBN: 9781891389153. <https://books.google.com.mx/books?id=itcpPnDnJM0C> (University Science Books, 2000).
96. Born, M. Volumen und Hydratationswärme der Ionen. *Zeitschrift für Physik* **1**, 45-48. ISSN: 0044-3328. <https://doi.org/10.1007/BF01881023> (feb. de 1920).
97. Kirkwood, J. G. Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *The Journal of Chemical Physics* **3**, 300-313. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/3/5/300/18788537/300\\\_1\\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/3/5/300/18788537/300\_1\_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.1749657> (mayo de 1935).
98. Carter, E., Ciccotti, G., Hynes, J. T. y Kapral, R. Constrained reaction coordinate dynamics for the simulation of rare events. *Chemical Physics Letters* **156**, 472-477. ISSN: 0009-2614. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261489873142> (1989).
99. Van Gunsteren, W. Methods for calculation of free energies and binding constants: successes and problems. *Computer simulation of biomolecular systems: theoretical and experimental applications*, 27-59 (1989).
100. Straatsma, T. P. y McCammon, J. A. Multiconfiguration thermodynamic integration. *The Journal of Chemical Physics* **95**, 1175-1188. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/95/2/1175/18992773/1175\\\_1\\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/95/2/1175/18992773/1175\_1\_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.461148> (jul. de 1991).
101. Sprik, M. y Ciccotti, G. Free energy from constrained molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics* **109**, 7737-7744. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/109/18/7737/19114804/7737\\\_1\\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/109/18/7737/19114804/7737\_1\_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.477419> (nov. de 1998).
102. Jarzynski, C. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2690-2693. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.78.2690> (14 abr. de 1997).
103. Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *The Journal of Chemical Physics* **22**, 1420-1426. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/22/8/1420/18805749/1420\\\_1\\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/22/8/1420/18805749/1420\_1\_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.1740409> (ago. de 1954).
104. Knight, J. L. y Brooks III, C. L.  $\lambda$ -Dynamics free energy simulation methods. *Journal of Computational Chemistry* **30**, 1692-1700. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcc.21295>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21295> (2009).
105. Kong, X. y Brooks Charles L., I.  $\lambda$ -dynamics: A new approach to free energy calculations. *The Journal of Chemical Physics* **105**, 2414-2423. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/105/6/2414/19030041/2414\\\_1\\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/105/6/2414/19030041/2414\_1\_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.472109> (ago. de 1996).
106. Giese, T. J., Ekesan, Ş., McCarthy, E., Tao, Y. y York, D. M. Surface-Accelerated String Method for Locating Minimum Free Energy Paths. *Journal of Chemical Theory and Computation* **20**, 2058-2073. ISSN: 1549-9618. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c01401> (mar. de 2024).
107. Tidor, B. Simulated annealing on free energy surfaces by a combined molecular dynamics and Monte Carlo approach. *The Journal of Physical Chemistry* **97**, 1069-1073. ISSN: 0022-3654. <https://doi.org/10.1021/j100107a015> (feb. de 1993).
108. Bennett, C. H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data. *Journal of Computational Physics* **22**, 245-268. ISSN: 0021-9991. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021999176900784> (1976).

109. Shirts, M. R., Bair, E., Hooker, G. y Pande, V. S. Equilibrium Free Energies from Nonequilibrium Measurements Using Maximum-Likelihood Methods. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 140601. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.91.140601> (14 oct. de 2003).
110. Meli, M. y Colombo, G. A Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (MD) Method for the Study of Folding, Based on the Analysis of the Stabilization Determinants of Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 12157-12169. ISSN: 1422-0067. <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/6/12157> (2013).
111. Tan, Z., Gallicchio, E., Lapelosa, M. y Levy, R. M. Theory of binless multi-state free energy estimation with applications to protein-ligand binding. *The Journal of Chemical Physics* **136**, 144102. ISSN: 0021-9606. eprint: [https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/doi/10.1063/1.3701175/15449520/144102\\_1\\_online.pdf](https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-pdf/doi/10.1063/1.3701175/15449520/144102_1_online.pdf). <https://doi.org/10.1063/1.3701175> (abr. de 2012).
112. Bartels, C. Analyzing biased Monte Carlo and molecular dynamics simulations. *Chemical Physics Letters* **331**, 446-454. ISSN: 0009-2614. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000926140001215X> (2000).
113. Huber, T., Torda, A. E. y van Gunsteren, W. F. Local elevation: A method for improving the searching properties of molecular dynamics simulation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **8**, 695-708. ISSN: 1573-4951. <https://doi.org/10.1007/BF00124016> (dic. de 1994).