



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
Laboratorio de Biofísica y Fisiología Cardíaca**

“La Relación Estructura Función entre la Subunidad  $\alpha$  y  $\beta 1$   
del Canal de Sodio”.

TESIS

Que para obtener el grado  
de Doctor en Ciencias  
Fisiológicas

Presenta:

**MRes. Ángel Adonai Islas Navarrete**

**Tutores:** D.C. Eduardo M. Salinas Stefanón  
D.C. Thomas F. Scior

Comisión Revisora:  
D.C Enrique Soto.  
D.C Elias Majarrez.  
D.C Jorge Arreola  
D.C Manuel Villanueva.

## RESUMEN

Los canales de sodio dependientes de voltaje son complejos proteicos heteroméricos, que inician los potenciales de acción en células excitables. La subunidad accesoria  $\beta 1$  del canal de sodio modula alostéricamente la subunidad  $\alpha$  formadora del poro, por medio de una asociación molecular no covalente. A la fecha, se desconocen los determinantes moleculares de dicha asociación. A partir de métodos bioinformáticos, de modelaje molecular y registros electrofisiológicos, se han identificado residuos, que desempeñan un papel crítico en la asociación funcional de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  del canal Nav1.4.

El mutante C43A de la subunidad  $\beta 1$  alteró la modulación de la dependencia de voltaje de activación y de inactivación de estado estable, retrasó la inactivación y la recuperación de la inactivación y aumentó la acumulación de la inactivación ante despolarizaciones repetidas, a una frecuencia de 1Hz del canal Nav1.4. El mutante R89A retrasó selectivamente la inactivación y recuperación de la inactivación del canal Nav1.4, sin modificar la modulación de la dependencia de voltaje o la dependencia de uso. Los mutantes Y32A y G33M selectivamente modificaron el voltaje medio de inactivación sin alterar la cinética. Estos resultados sugieren que la modulación de la corriente de sodio que la subunidad  $\beta 1$  ejerce sobre el canal Nav1.4, depende de dos enlaces intramoleculares en el dominio extracelular de  $\beta 1$  y que esta puede ser modificada selectivamente. Los modelos propuestos son consistentes con los datos anteriormente publicados, esbozan la interface funcional entre estas dos subunidades y podrían contribuir al entendimiento de algunas patologías asociadas con los canales de sodio.

## INDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Canales de sodio.

1.1.1 Origen y Evolución.

1.1.2 Estructura de las Subunidades.

1.1.3 Filtro de Selectividad.

1.1.4 Activación.

1.1.5 Inactivación.

1.1.6 Inactivación lenta.

1.1.7 Canalopatías.

1.1.8 Neuromodulación.

1.1.9 Características farmacológicas.

1.1.10 Subunidades  $\beta$ .

1.1.11 Modulación de la corriente de sodio por la Subunidad  $\beta 1$ .

1.1.12 Modulación Farmacológica de la Subunidad  $\beta 1$ .

1.1.13 Knock-outs de  $\beta 1$ .

1.2. Epilepsia Generalizada con Ataques Febriles (GEFS).

1.3 Otras patologías asociadas a las subunidades  $\beta$ .

1.4 Toxinas  $\alpha$  de escorpión.

1.5 Planteamiento del problema.

### 2. JUSTIFICACIÓN

### 3. HIPÓTESIS

### 4. OBJETIVO GENERAL

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

### 6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Predicción de Estructura Secundaria.

6.2 Análisis Bioinformático.

6.3 Modelaje por Homología.

6.4 Cálculo de Potenciales Electrostáticos.

6.5 Predicción de sitios de glicosilación.

6.6 Anclaje molecular de proteínas.

6.7 Electroforesis y mutagénesis puntual.

6.8 Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana.

6.9 Registro electrofisiológico.

6.10 Soluciones.

6.11 Protocolos experimentales y análisis de datos.

## 7. RESULTADOS

7.1 Extensión del modelo de la subunidad  $\alpha$ .

7.1.1 Inserción de dominios transmembrana: Identificación y modelaje de segmentos S5.

7.1.2 Identificación de los posibles sitios de unión en la subunidad  $\alpha$ .

7.1.3 Comparación del modelo de Nav1.4 con el canal bacteriano NavAb.

7.1.4 Modelaje de la subunidad  $\alpha$  a partir del canal NavAb.

7.2 Modelaje de la subunidad  $\beta 1$ .

7.2.1 Topología de la subunidad  $\beta 1$ .

7.2.2 Análisis Bioinformático para identificar residuos esenciales para la modulación del canal de sodio.

7.2.3 Identificación de puntos calientes (*hotspots*) potenciales.

7.2.4 Mapeo de restricción del gen SCN1B ( $r\beta 1$ ) y secuenciación.

7.3 Análisis electrofisiológico de los mutantes de  $\beta 1$ .

7.3.1 El mutante  $\beta 1$ -C43A perturba la modulación del voltaje de activación que la subunidad  $\beta 1$  ejerce sobre el canal Nav1.4.

7.3.2 Los mutantes de  $\beta 1$ -C43A,  $\beta 1$ -Y32A y  $\beta 1$ -G33M perturban la modulación del voltaje de inactivación que esta subunidad ejerce sobre el canal Nav1.4.

7.3.3 Los mutantes  $\beta 1$ -C43A y  $\beta 1$ -R89A enlentecen la inactivación de los canales Nav1.4.

7.3.4 Los mutantes  $\beta 1$ -C43A y  $\beta 1$ -R89A enlentecen la recuperación de la inactivación de los canales Nav1.4.

7.3.5 El mutante  $\beta 1$ -C43A induce una acumulación de inactivación.

7.4 Simulación de los efectos fisicoquímicos de los mutantes de la subunidad  $\beta 1$ .

7.5 Dimerización de la subunidad  $\beta 1$ .

## 8. DISCUSIÓN

8.1 Modelaje de la subunidad  $\beta 1$ .

8.2 Efectos de pérdida de función selectivos e independientes.

8.3 Modulación de  $\beta 1$  de acuerdo a la teoría de transición de estado.

8.4 Interpretación de la relación estructura-función de R89.

8.5 Interpretación de la relación estructura-función de C43.

8.6 Magnitud del efecto de los mutantes de  $\beta 1$ .

8.7 Glicosilación de la subunidad  $\beta 1$ .

8.8 Asociación de  $\beta 1$  a canales de potasio.

9. PERSPECTIVAS

10. CONCLUSIONES

11. PUBLICACIONES

12. APÉNDICES

12.1 Alineamientos de Secuencias Aminoacídicas.

12.2 Análisis de Hidropatía.

12.3 Predicción de Estructura Secundaria.

12.4 Distancias Génicas y construcción de fenogramas.

12.5 Modelaje Molecular.

12.5.1 Determinación Experimental de Estructuras Moleculares.

12.5.2 Mecánica Molecular.

12.5.3 Campos de Fuerza.

12.5.4 Métodos de minimización energética.

12.5.5 Análisis Conformacional Sistemático.

12.5.6 Evaluación de los Modelos

12.6 Activación del canal Nav1.4.

13. BIBLIOGRAFÍA

**1. Introducción.**

Para toda célula que conforma un tejido, es vital mantener una concentración desigual de sustancias en su interior y en el exterior. Esto origina una desigualdad de cargas eléctricas en la célula, permitiendo a ésta establecer un no equilibrio dinámico que oscila alrededor de un estado estable (potencial de reposo) el cual, mediante una sofisticada maquinaria molecular delicadamente acoplada, es capaz de reaccionar apropiadamente a una serie de variaciones para regresar a tal estado estable. Las variaciones a este potencial eléctrico por medio del intercambio de partículas inorgánicas con carga constituyen un comportamiento estereotípico, dinámico, regenerativo (conocido como potencial de acción). De esta forma la célula censa el ambiente, recibe y transmite información codificada.

Las responsables de originar y mantener este fenómeno son un número de proteínas presentes en la membrana celular que forman vías conductoras de iones llamadas canales iónicos (Hille, 2001). Estos canales son poros acuosos constituidos básicamente por los siguientes componentes funcionales: un filtro de selectividad, un sensor de voltaje, un vestíbulo externo, un vestíbulo interno y, en algunos casos una compuerta de inactivación. Dependiendo del tipo de mecanismo de compuerta los canales se pueden distinguir en: a) canales activados por voltaje, b) activados por ligando y c) activados por tensión o volumen. Existen también canales que no requieren de alguno de estos mecanismos de compuerta y son llamados canales de fondo (*background*), estos son activados constantemente y abren y cierran continuamente sin aparente modulación (Hille, 2001).

Los primeros estudios de los canales iónicos se remontan a la última cincuentena del siglo XX. Hodgkin y Huxley en 1952 desarrollaron el primer modelo para explicar la excitabilidad basada en dos propiedades elementales: la permeabilidad catiónica (flujo de cationes a través del canal) y el mecanismo de compuerta (cambios conformacionales dinámicos en respuesta a fluctuaciones en el potencial de membrana). El desarrollo de la técnica de registro de corrientes a través de la membrana de células excitables por fijación de voltaje en 1940 desarrollada por Cole, permitió a Hodgkin y Huxley sentar las bases iónicas del potencial de acción, por lo que se hicieron acreedores al premio nobel de fisiología en 1963. En la actualidad, esta técnica permite profundizar el estudio de las propiedades de estos canales: conducción, dependencia de voltaje, rectificación, selectividad iónica, activación, inactivación y la farmacología de los compuestos químicos que se sabe tienen efectos directos sobre el canal modificando sus características electrofisiológicas (Hille, 2001; Balser, 1999).

### **1.1 Canales de Sodio.**

En particular los canales de sodio dependientes de voltaje, son esenciales para la generación y propagación de potenciales de acción en neuronas, células musculares y neuroendócrinas (Catterall, 2000). El desarrollo de técnicas de análisis bioquímico como la solubilización por detergentes, purificación, ensayos de unión de alta afinidad con neurotoxinas etc., condujeron en 1980 al descubrimiento de la proteína del canal de sodio, purificada de cerebro de mamífero (Beneski and Catterall, 1980; Catterall, 2000). Posteriormente fueron descubiertas isoformas de esta proteína obtenidas de diferentes tejidos. La isoforma predominante en músculo esquelético de mamífero fue aislada y caracterizada en 1989 (Trimmer y cols., 1989).

En 1981, Hartshorne y Catterall purificaron por primera vez, el canal de sodio de cerebro, formado por un complejo que consta de una subunidad  $\alpha$  asociada covalentemente a una subunidad  $\beta 2$  por un puente de disulfuro y a una subunidad  $\beta 1$  asociada no covalentemente. Este complejo al ser insertado en vesículas y bicapas fosfolípicas fue suficiente para reconstituir la función y propiedades del canal de sodio sensible a voltaje (Catterall, 2013).

El canal de sodio es una proteína integral multiheteromérica compuesta por 2 tipos de subunidades. La subunidad  $\alpha$  (260kDa), que consta de cuatro dominios homólogos y forma el poro del canal constituyendo canales funcionales, en mamíferos existen 9 isoformas distintas (Nav1.1 a Nav1.9), codificadas en los genes SCN1A a SCN5A y SCN8A a SCN11. La subunidad  $\beta$  (30-40kDa) presenta 4 isoformas, codificados en los genes SCN1B a SCN4B (Catterall, 2000).

Las subunidades  $\beta$  median procesos de señalización regulando excitabilidad eléctrica, adhesión, migración, tránsito molecular y transcripción (Brackenbury e Isom, 2008). La subunidad  $\beta 1$  modifica la cinética del canal, sin embargo los efectos de esta subunidad accesoria varían de acuerdo al tipo celular (Isom, 2001). Una sólida línea de evidencia señala que la interacción entre estas subunidades ocurre extracelularmente (Makita y cols., 1996; Qu y cols., 1999; Chen y Cannon 1995; McCormick y cols., 1999) sin embargo aun no se ha descrito su sitio de unión (Brackenbury e Isom, 2008).

### **1.1.1 Origen y Evolución.**

Con el fin de dar una perspectiva al uso de estructuras de proteínas ancestrales en el modelaje por homología de canales de sodio, a continuación se presenta un breve repaso de su origen en el contexto evolutivo.

Las bacterias, al igual que los eucariotas, presentan en su interior celular una alta concentración de potasio y baja de calcio, sin embargo, algunas no requieren ni de cloro ni de sodio, por la mayoría de las bacterias carecen de canales de estos iones, mientras que claramente presentan canales de potasio. De esta forma se considera que la aparición de los canales de potasio y calcio, ocurre antes que la de los de sodio, ya que los organismos unicelulares presentan éstos dos primeros. Es posible que los canales de calcio hayan evolucionado de los canales de potasio primordiales por duplicación del gen ancestral de un solo dominio y los canales de sodio hayan evolucionado de manera análoga, o a su vez de mutaciones del canal de calcio, ya que los cuatro dominios que forman el canal de sodio guardan más similitud con los correspondientes cuatro dominios del canal de calcio que entre sí mismos (Marban y cols., 1998; Goldin y Alan 2002).

La levadura es el organismo más simple que presenta canales de calcio de cuatro dominios (Frank y cols., 2005). Se cree que el uso de sodio en lugar del calcio, hizo posible la conducción rápida y señalización de altas frecuencias eléctricas en los primeros organismos multicelulares sin los efectos adicionales intracelulares reguladores del calcio como segundo mensajero (Chopra y cols., 2007).

Los potenciales de acción dependientes de sodio empiezan a ser comunes en medusas (filo: cnidaria), éstos organismos poseen 2 formas de simetría radial (medusa nadadora y pólipos sensibles) dotados con una red de nervios descentralizada y receptores simples, su cuerpo consiste en dos epitelios separados por mesoglea (sustancia gelatinosa inerte), (Seipel y Schmid 2005). Existe evidencia molecular que sostiene la hipótesis de que las células nerviosas y musculares coevolucionaron de un precursor mioepitelial. El

surgimiento de locomoción rápida precisa del desarrollo de una relación estrecha entre el sistema de músculos y sistema nervioso (Seipel y Schmid 2005; Goldin y Alan 2002).

Por mucho tiempo se pensó que los canales de sodio eran exclusivos de organismos eucariotas, sin embargo se ha descubierto un canal de sodio procarionte en la bacteria de agua salada *Bacillus halodurans*, denominado NaChBac. Éste es dependiente de voltaje, posee un solo dominio que se ensambla como un homotetrámero y es selectivo a iones de sodio. Sin embargo, como es de suponer, tanto su selectividad (anillo EEEE similar al canal de Ca<sup>++</sup>), dependencia de voltaje (posee un loop S3-S4 corto) y su proceso de inactivación (mucho más lenta, tipo C) parece ser fundamentalmente distinta a la de canales heterotetrámeros eucariotas (Catterall, 2001).

Debido al hecho de que los mamíferos y los peces poseen diferente número de isoformas y de acuerdo a análisis filogenéticos entre especies, se cree que la duplicación de genes de canales de sodio ancestrales ocurrió por separado en teleóstos y tetrápodos, en los primeros, debido a una duplicación del genoma completo (Chopra y cols., 2007; Seipel y Schmid, 2005).

Por tanto los modelos evolutivos dominantes, proponen que las 10 isoformas de canal de sodio de mamíferos fueron originadas a partir de una duplicación por tándem de al menos 2 de los 4 genes ancestrales (presentes en peces) que a su vez provienen de poliploidización (duplicación que origina más de dos conjuntos pareados de cromosomas homólogos en un organismo) de 1 o 2 genes precursores Nav1 en cordados (Chopra y cols., 2007).

Bajo este contexto evolutivo, es importante mencionar que casi todo gen de canal iónico se expresa en cerebro, aunque éste pertenezca a otro tipo celular, por lo que la expansión y divergencia de los canales iónicos sensibles a voltaje debió ser central al incremento de complejidad del sistema nervioso central de los vertebrados (Seipel y Schmid, 2005).

Los invertebrados, a diferencia de los vertebrados poseen un número menor de genes que codifican para canal de sodio, por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, solo posee un gen de canal de sodio (*SCNA\_DROME*). Sin embargo estudios recientes evidencian que insectos como éste y la cucaracha alemana *Blattella germanica*, son capaces de producir una diversidad funcional de canales de sodio (hasta 60 variaciones), por medio de splicing alternativo y edición de RNA, al procesar el transcripto de un solo gen de canal de sodio (Du y cols., 2009).

Los canales de sodio dependientes de voltaje de invertebrado que se ha podido expresar *in vitro*, son los de insectos; y su expresión funcional robusta requiere de una subunidad accesoria llamada TipE, una proteína transmembrana accesoria (con dos supuestos segmentos transmembrana) (Du y cols., 2009). Al comparar los registros de corrientes en neuronas de *Drosophila*, se observa una tasa más lenta de recuperación, dependiente de repolarización, en las corrientes de sodio durante activaciones repetidas de neuronas mutantes (tipE<sup>-</sup>) con respecto al fenotipo nativo (Hodges y cols., 2002).

A pesar de la similitud funcional de tipE en la mosca de la fruta (y Vssc $\beta$  en la mosca doméstica) con la subunidad accesoria de vertebrados  $\beta$ 1, existe una muy baja similitud estructural a nivel de secuencia primaria de aminoácidos entre estas proteínas (Feng y cols., 1995). La secuencia de tipE posee un 11% de identidad y un 22% de similitud con respecto a  $\beta$ 1 de rata.

De este modo, las subunidades  $\beta$  no se encuentran en los genomas de invertebrados mientras que en peces teleostos, anfibios, aves y mamíferos todas las secuencias de

subunidades  $\beta$  son ortólogos, es decir tienen un ancestro común y pertenecen al mismo clado (ramificación de un árbol filogenético) (Chopra y cols., 2007). Los análisis filogenéticos sugieren la existencia de dos genes precursores para la variedad de subunidades  $\beta 1/\beta 3$  y  $\beta 2/\beta 4$  en los primeros vertebrados, sin embargo es probable que el ancestro común de teleóstos y tetrápodos hace más de 400 millones de años haya poseído 4 distintos genes ancestrales de la subunidad  $\beta$  (Chopra y cols., 2007).

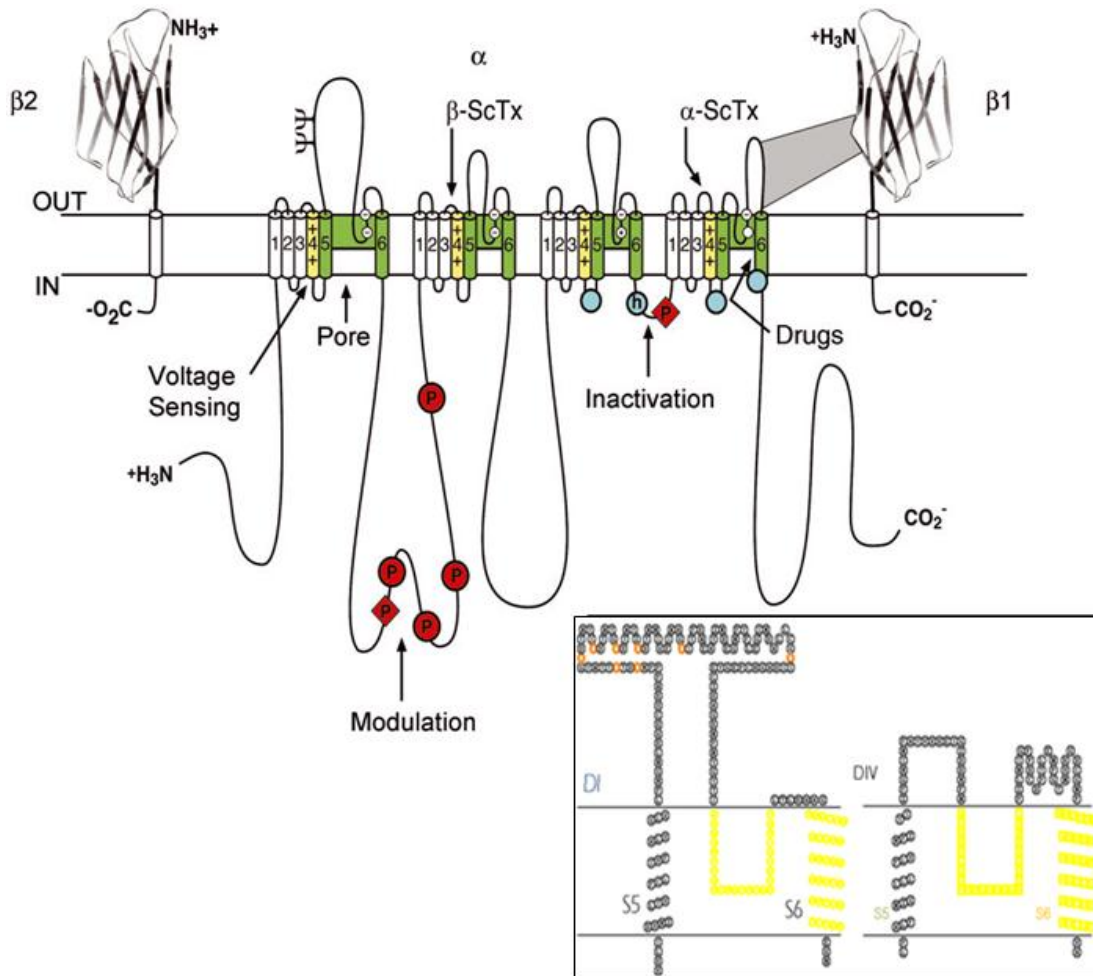
La similitud de las secuencias en vertebrados a una familia de proteínas inmunoglobulínicas más antigua, sugiere que los genes de las subunidades  $\beta$  pudieron haber surgido *de novo* a partir de genes que codifican para moléculas de adhesión celular, receptores de membrana o componentes innatos del sistema inmune. Por lo tanto se cree que esta familia de genes surgió en las primeras etapas de la evolución de los vertebrados, antes de la divergencia de teleóstos y tetrápodos y probablemente desempeñaron un papel en la diversificación y especialización de la señalización eléctrica de los primeros vertebrados, por lo que la formación del complejo macromolecular  $\alpha$ - $\beta$  constituye una innovación altamente conservada y funcionalmente importante de los vertebrados (Chopra y cols., 2007).

### 1.1.2 Estructura de las Subunidades.

El aislamiento de fragmentos de cDNA del canal de sodio de anguila eléctrica electroplax realizados por Noda y cols., en 1984, produjo el primer acercamiento al conocimiento de la estructura primaria del canal. Más tarde Guy y Seetharamulu en 1986, haciendo uso de modelado molecular, generaron con gran precisión el modelo de plegamiento de la subunidad  $\alpha$  de aproximadamente 2000 aminoácidos organizada en 4 dominios homólogos (I-IV), compuesto cada uno de 6 segmentos  $\alpha$ -hélices transmembrana (S1-S6).

Debido a la semejanza que los segmentos transmembranales de los canales de potasio guardan con los de sodio, resulta pertinente mencionar que, en 1998, MacKinnon y cols., publicaron la primera estructura cristalizada de un canal iónico, el KcsA, un canal de potasio bacteriano (especie: *Streptomyces lividans*). Más tarde en el 2002, el mismo grupo resuelve la estructura del canal MthK en estado abierto, un canal de la arqueobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum* activado por calcio. Debido a los detallados estudios estructurales y mecánicos de estas estructuras le es entregado a Roderick Mackinnon el premio Nobel de Química en el 2003 (Nobel Media AB 2013).

Los segmentos transmembranales de los canales de sodio están compuestos de 19 a 27 aminoácidos hidrofóbicos que forman  $\alpha$ -hélices de 28 a 40 Å de longitud (Catterall, 2000). Las terminales amino y carboxilo, las asas que unen a los dominios (I-IV) y las asas que conectan a los segmentos S2-S3 y S4-S5 se encuentran en la parte intracelular. Mientras que las asas que unen a los segmentos S1-S2, S3-S4, y S5-S6 son extracelulares (Catterall y cols., 2005). La figura 1 esquematiza la estructura primaria del canal de sodio de vertebrado típico, formado por dos subunidades  $\beta$  y una  $\alpha$ .

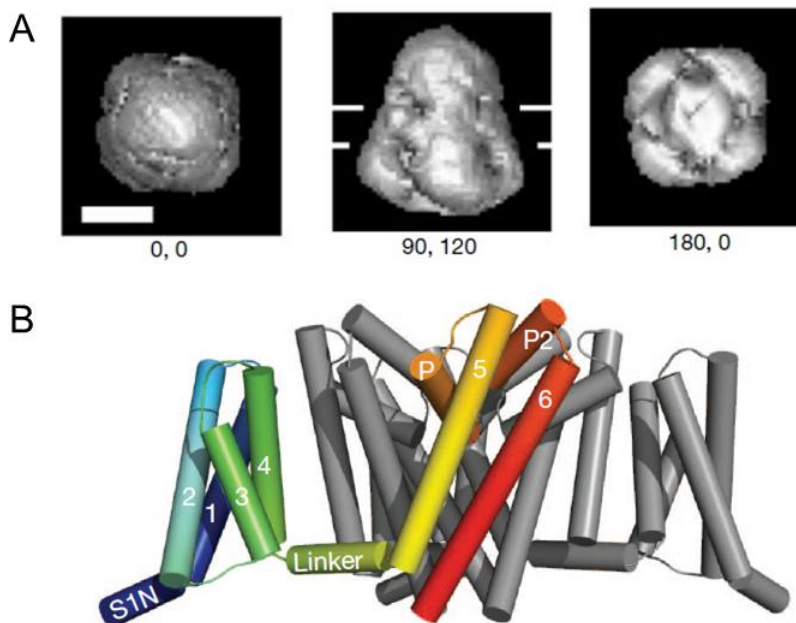


**Fig. 1 Esquema del canal de sodio activado por voltaje.** Los cilindros representan los segmentos  $\alpha$ -hélice, los verdes representan los segmentos formadores del poro. El dominio extracelular de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  se muestran como plegamientos Ig. Los círculos pequeños son los anillos externos (EEDD) e internos (DEKA) de los residuos que forman el filtro de selectividad. Los círculos rojos (P) representan sitios de fosforilación de PKA y en diamante, el sitio de fosforilación de PKC. Sitios de glicosilación, en la subunidad  $\alpha$  representada por  $\psi$ . Los cilindros amarillos representan el sensor de voltaje S4. La h en círculo azul representa la partícula de inactivación (IFM) en el asa de la compuerta de inactivación. Los círculos azules representan sitios implicados en la formación del receptor de la compuerta de inactivación. También se muestran los sitios de unión con las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  de escorpión. (tomado de Catterall 2012). El inserto muestra la distribución y longitud aproximada de los segmentos insertados en membrana S5 y S6 de los dominios DI y DIV del canal de sodio Nav1.4 y sus asas extracelulares (arriba) sitios de N-glicosilación en naranja. En amarillo el asa P re-entrante y S6 incluidos en el modelo de T. Scior (2009). Caricatura generada con el software TOPO2.

Sato y cols., en 2001 publicaron imágenes del arreglo tridimensional del canal de sodio sensible a voltaje de la anguila *Electrophorus electricus* a una resolución de  $19\text{\AA}$  resuelto por microscopía crio-electrónica enfriada por helio y análisis de imágenes de partícula única. Los autores ilustran que el canal consiste en una superficie exterior estrecha en forma de campana de  $65\text{\AA}$  de diámetro que corresponde al 24% del volumen total, la cual se ensancha en forma de cuadrado hacia la parte inferior, con  $135\text{\AA}$  de altura,  $100\text{\AA}$  de longitud a los lados (figura 2A). Su parte transmembrana corresponde al 29% y la parte baja más angosta corresponde al 47% del volumen total. Varias cavidades están conectadas

a 4 orificios pequeños y 8 orificios cerca de la superficie extracelular y de membrana citoplásmica. Lo que sugiere la existencia de fenestraciones en otros canales iónicos sensibles a voltaje (Sato y cols., 2001).

A la fecha, el más reciente progreso experimental en el esclarecimiento de la estructura del canal de sodio ha sido publicado por el grupo de Catterall en el 2011, quienes cristalizaron el canal de sodio dependiente de voltaje de *Arcobacter butzleri* (NavAb) en una conformación de poro cerrado a una resolución de 2.7 Å. La estructura contiene los 4 sensores de voltaje activados y favorecen el modelo de apertura del canal por el cual los segmentos S4 (alfa hélices tipo  $3_{10}$ ) se desplazan verticalmente en respuesta a la despolarización y los linkers S4-S5 dilatan el poro alrededor pivotando una bisagra alrededor de éste. La estructura también sugiere que el lumen ácido del poro promovería la deshidratación parcial de los iones de sodio y la posible penetración de moléculas hidrófobas (cadenas acilo de fosfolípidos y drogas) a través de 4 fenestraciones a los lados del poro de alrededor de ~8 a 10 Å (Payandeh y cols., 2011).



**Fig. 2. Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje.** (A) representación de la superficie del canal de *E. electricus* vista extracelular, transmembrana e intracelular de izquierda a derecha, obtenida por análisis de imagen de partícula única y por microscopía crió-electrónica, (tomado de Sato y cols., 2001). (B) Elementos estructurales del canal NavAb de *A. butzleri*, un monómero se encuentra coloreado, S1N es el amino terminal, segmentos transmembrana S1 a S6, P es el asa , adjacente al S5 y P2 el asa adjacente al S6, por claridad el dominio sensor de voltaje cercano ha sido removido (tomado de Payandeh y cols., 2011).

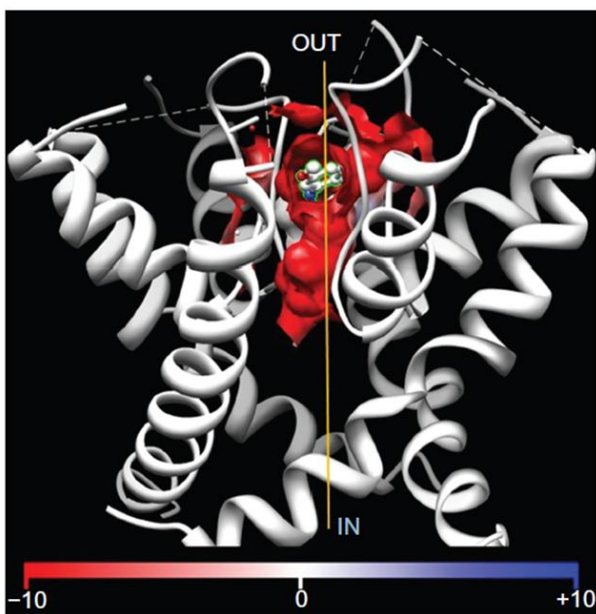
A partir de la estructura cristalizada del canal NavAb, O'Reilly y cols., generaron un modelo por homología del canal de sodio de humano Nav1.5 y utilizaron dinámicas moleculares dirigidas (*Steered Molecular Dynamics*) para simular el anclaje de una molécula de bisfenol (compuesto encontrado en contenedores plásticos de comida) al poro del canal a través de una de sus fenestraciones. Los autores encontraron que la fenestración entre el dominio III y IV constituye una vía accesible de entrada a este ligando (O'Reilly y cols., 2012).

Por otra parte, la organización estructural de las subunidades  $\beta$  comprende a) un dominio N-terminal extracelular inmunoglobulínico b) un dominio transmembrana y c) un dominio C-terminal intracelular más pequeño en comparación con el dominio extracelular. La familia de subunidades  $\beta$  de mamífero consiste de 4 miembros  $\beta 1$  a  $\beta 4$ , codificados en

los genes SCN1B a SCN4B. Se ha reportado *splicing* alternativo, especie-específico para el gen SCN1B que produce la variante  $\beta$ 1A de aproximadamente 45kDa (Isom 2001).

El dominio inmunoglobulínico (Ig) extracelular en los cinco isoformas de la subunidad  $\beta$  es estructuralmente homólogo al dominio de anticuerpos variable (V-set) de la superfamilia de inmunoglobulinas y a menudo se encuentra en las moléculas de adhesión celular (CAM), esta característica de las subunidades  $\beta$  del canal de sodio fue descubierta siguiendo el análisis de la secuencia de  $\beta$ 2, revelando que su dominio extracelular contenía un plegamiento Ig y una región extendida similar a la contactina, una CAM (Isom, 2001).

Se ha propuesto que la estructura plegada terciaria de la subunidad  $\beta$ 1 es similar a la proteína de mielina P0 y ésta ha servido de molde para la generación del primer modelo por homología publicado con el fin de detallar la asociación funcional que  $\beta$ 1 posee con algunos canales de potasio (McCormick y cols., 1998; Nguyen y cols., 2012).



**Fig 3. Modelo de poro del canal Nav1.4 unido a primaquina.** El modelo comprende los segmentos transmembrana S6 y las asas P formadoras del poro, en representación de listones. La molécula de primaquina (en palos y esferas) bloquea el canal desde el vestíbulo extracelular. Se ilustra la superficie electrostática (en un radio de 5Å) alrededor de la primaquina en escala de color coulombica. (tomado de Scior y cols., 2011).

dominio: I-Asp, II-Glu, III-Lys y IV-Ala, éstos forman un anillo interno estrecho conocido como el motivo DEKA, en la secuencia de la isoforma rNav1.4 éstos son D400, E755, K1237 y A1529. La determinación del filtro de selectividad así como la del vestíbulo externo del canal se debe en gran parte a la alta afinidad y especificidad que presentan los canales a las toxinas guanidínicas tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX), éstas bloquean anillo DEKA uniéndose a la boca externa del canal (Hille, 2001; Mantegazza y cols., 2010). Interesantemente el canal de sodio puede volverse selectivo a calcio intercambiando los aminoácidos en el anillo interno de la secuencia DEKA, en los cuatro dominios por su contraparte EEEE (ácidos glutámicos) en canales de calcio (Hille, 2001).

En el laboratorio de biofísica cardiaca del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla se han obtenido resultados experimentales sobre la unión de drogas (*i.e.* tolueno y primaquina) empleando el modelo 3D del canal de sodio, generado a partir del canal de potasio MthK en estado abierto (figura 3). El modelo contiene los segmentos que forman el poro del canal de la subunidad  $\alpha$  de la isoforma rNav1.4 la cual se encuentra prominentemente en músculo esquelético (Scior y cols., 2009; Salinas-Stefanon y cols., 2011; 2012).

### 1.1.3 Filtro de Selectividad.

El poro del canal está formado por 2  $\alpha$ -hélices transmembrana (segmentos S5 y S6), conectadas por una asa extracelular denominada asa P (re-entrante) de cada dominio. La selectividad de los canales de sodio por este ión está determinada por 4 aminoácidos bien conservados en cada

Existen también un par de residuos de aminoácidos cargados negativamente en posiciones análogas en todos los dominios I-IV, éstos forman el anillo externo (EEMD) del canal que sirven como el sitio receptor para TTX y STX y también desempeñan un papel importante en la selectividad en el poro externo de los canales de sodio. Los estudios de Payandeh y cols., sobre el canal NavAb sugieren que el vestíbulo extracelular del canal de sodio (de aproximadamente  $4.6 \text{ \AA}^2$ ), puede acomodar un ión de sodio con dos moléculas planares de agua (Catterall, 2012). Esta deshidratación parcial es una de las diferencias más significativas con respecto a la ruta de permeación que siguen los cationes en canales de potasio y coincide con el modelo de 4 barreras y 3 sitios propuesto inicialmente por Hille (Hille 2001).

Dentro de las isoformas del canal, es una tirosina o una fenilalanina situada en el dominio DI a dos posiciones anteriores al ácido glutámico del filtro DEKA la responsable de conferir sensibilidad a TTX. La isoforma cardiaca del canal de sodio es relativamente insensible (posee 200 veces menos afinidad) a TTX debido a que posee una cisteína en esta posición, otros canales de sistema nervioso periférico al presentar una serina, poseen incluso menor afinidad por ésta toxina (Hille, 2001).

La estructura del poro del canal es considerada estática en comparación con la de las asas, cuya organización es asimétrica y cuya dinámica en el mecanismo de compuerta posee una escala de tiempo del orden de milisegundos. De acuerdo a estudios de mutagénesis, se cree que el asa del poro del dominio II se encuentra más superficial, el dominio I y III en un lugar intermedio y el dominio IV más interno. Esto se ha determinado haciendo uso de la propiedad del cadmio, dependiente de voltaje, que al unirse a un residuo mutado en cierta posición de cisteína bloquea el canal, aportando información sobre el grado de exposición de tal posición en cada dominio (Catterall, 2000).

#### **1.1.4 Activación.**

En el segmento S4 de cada dominio, se encuentran aminoácidos cargados positivamente (argininas y lisinas), cada tres posiciones, los cuales son responsables de la iniciación de la activación del canal al desplazar sus cargas a través de la membrana hacia el espacio extracelular, en respuesta a cambios en el campo eléctrico de la membrana (despolarización). Hirschberg y cols., (1995) sugieren que aproximadamente 12 cargas eléctricas en el canal se mueven a través de la membrana durante la activación (Catterall, 2001).

La hipótesis de Catterall y cols., (1986; 2000), sobre la base molecular de la dependencia de voltaje, propone que el campo eléctrico interno cerca de la membrana, al ser negativo, atrae fuertemente los segmentos S4 que se encuentran cargados positivamente forzándolos hacia adentro de la célula, éstos residuos cargados de S4 son estabilizados en el ambiente transmembrana, al interactuar con aminoácidos cargados negativamente en segmentos adyacentes, altamente conservados en canales iónicos (Catterall, 2012).

La despolarización de la membrana favorecería el movimiento de los segmentos S4 hacia afuera, iniciando un cambio conformacional que abriría el poro. Yang y Horn (1995) han reportado evidencia del desplazamiento de S4 hacia afuera por medio de la sustitución de reactivos sulfidril cargados, midiendo la tasa de reacción en función del potencial de membrana, se observa en particular una mayor accesibilidad al exterior de 3 cargas situadas en el segmento S4 del dominio DIV durante la despolarización (Sheet y cols., 2003; Catterall y cols., 2005). Subsecuentes estudios de fijación de voltaje, de fluorescencia y de

modelaje molecular apoyan el modelo de hélice corrediza (*sliding-helix*), mostrando que el segmento S4 se mueve a través del campo eléctrico transmembranal, a una distancia de aproximadamente 5 Å con respecto al sitio hidrofóbico de la membrana (Catterall, 2012).

### 1.1.5 Inactivación.

Para transmitir información a través del disparo repetitivo de potenciales de acción en circuitos neuronales y el control de la excitabilidad en células musculares y nerviosas se requiere de una inactivación y recuperación rápida de los canales de sodio. Por lo que éstos se abren en respuesta a depolarizaciones e inactivan en un rango de 1 a 2 ms (Catterall 2012).

Un modelo comúnmente aceptado de la inactivación del canal de Na<sup>+</sup>, propone que el asa intracelular que conecta el dominio III y el IV, constituye la compuerta de inactivación, doblándose hacia el extremo de salida, bloqueando el poro desde dentro durante despolarizaciones sostenidas, gracias a un par de residuos de glicina que actúan a manera de bisagra (Catterall 2001;2012).

Los residuos de Isoleucina, Fenilalanina y Metionina (IFM), situados entre el segmento S6 y S1 juegan un papel crítico en este tipo de inactivación rápida “clásica” (West y cols., 1992; Catterall 2001) (fig 3). Mediante métodos multidimensionales de resonancia magnética (NMR), se ha determinado la estructura tridimensional de la porción central de la compuerta de inactivación. Ésta se compone de un  $\alpha$  hélice flanqueada por dos giros, donde el segundo de ellos contiene el dominio IFM; la metionina se encuentra interactuando con dos residuos de tirosina del  $\alpha$  hélice, lo que produce que la fenilalanina se encuentre expuesta al solvente sugiriendo que éste residuo es el que ocluye el poro durante la inactivación (Rohl y cols., 1999).

El dominio receptor para la compuerta de inactivación incluye también aminoácidos hidrófobos situados en el extremo intracelular del segmento S6, del dominio IV y el asa intracelular que conecta el segmento S4 al S5 del dominio III y el S4 al S5 del dominio IV. (Catterall, 2001).

Aunque se ha argumentado que la mutación de éstos 3 residuos (IFM) por glutaminas QQQ elimina la inactivación del canal (Catterall y cols., 2005; Hille 2001), experimentos realizados en el laboratorio de biofísica de la Universidad Autónoma de Puebla indican que la delección del dominio IFM no elimina por completo la inactivación del canal. El canal sodio Nav1.4 con la delección de IFM, se recupera de la inactivación aproximadamente un 80% después de 5s al serle aplicado un pulso de -20mV (datos no publicados).

El acople energético de la activación con la inactivación ha sido asociado con el movimiento hacia el medio extracelular del segmento S4 del dominio IV, el cual es propuesto como la señal que inicia el proceso de activación del canal y al mismo tiempo pone en marcha el proceso de inactivación (Chahine y cols., 1998). En particular, los autores han mostrado que la neutralización de la arginina más externa de S4 del dominio IV, la cual está asociada a paramiotonia congénita, afecta el acople entre activación e inactivación en la isoforma Nav1.4 de humano y rata (Chahine y cols., 1994).

### 1.1.6 Inactivación Lenta.

A la inactivación rápida le sigue un periodo refractario de milisegundos en el cual el canal no puede volver a abrirse, sin embargo, este periodo puede durar más tiempo (en la escala de segundos a décimas de segundos) en respuesta a despolarizaciones de mayor duración, debido a cambios conformacionales en diferentes dominios que afectan el poro del canal, constituyendo el tipo de inactivación lenta (Hille, 2001). Este tipo de inactivación es estructural, farmacológica y cinéticamente distinta y se considera en general que la inactivación lenta involucra la parte exterior del poro. Varios estudios indican que la inactivación lenta contribuye a la regulación del potencial de membrana, las propiedades de disparo y la adaptación de frecuencia de espigas. Dicha inactivación lenta depende del potencial de reposo así como de la historia previa de disparos de potenciales de acción, por lo que algunos autores argumentan que constituye un mecanismo de memoria molecular (Vilin y cols., 2001; Ulbricht, 2005).

Las propiedades de la inactivación lenta varían de acuerdo a la isoforma. En los canales hNav1.5 es menor y posee una tasa más lenta que en hNav1.4, en la cual su probabilidad es mayor, por lo que podría jugar un papel importante en la fatiga muscular del músculo esquelético. Yury y cols., han apoyado la idea de que la probabilidad de la inactivación lenta esté determinada por la mayor (en Nav1.4) o menor (Nav1.5) flexibilidad del asa P en el DII S5-S6. En particular encontraron que substituyendo V754 en hNav1.4 por la isoleucina correspondiente (I891) en hNav1.5 produjo una inactivación lenta de estado estable indistinguible de la del canal hNav1.5 nativo (Vilin y cols., 2001).

### 1.1.7 Canalopatías.

Se ha descubierto un gran número de patologías asociadas a canales iónicos también llamadas canalopatías; entre las cuales destacan las enfermedades genéticas como las formas hereditarias de parálisis periódica, arritmias cardiacas, epilepsia y dolor crónico. En la mayoría de los casos, estas constituyen enfermedades génicas autosómicas dominantes en las que las mutaciones causan una efecto tipo ganancia o pérdida de función a nivel molecular y celular (Catterall, 2012). Un listado de algunas de las principales canalopatías asociadas a cada isoforma se encuentra en la tabla 1.

Dependiendo del órgano al que afectan la canalopatías se dividen en: 1) Canalopatías de sodio cerebrales, que está asociadas los genes que codifican las isoformas Nav1.1, Nav1.2, la subunidad  $\beta 1$  y Nav1.6), éstas incluyen casos familiares de ataxia (inhabilidad de coordinar movimientos voluntarios musculares), epilepsia y desórdenes epiléptico-convulsivos. 2) Canalopatías de sodio del músculo esquelético, asociadas al gen de la isoforma Nav1.4, incluyendo miotonías (contracciones involuntarias o espasmos tónicos), síndromes de miastenia (debilidad muscular) y parálisis. 3) Canalopatías de sodio cardiacas, asociadas a la isoforma Nav1.5 y Nav1.8 (recientemente identificada en tejido cardiaco) que producen alteraciones en la conducción ventricular. 4) Canalopatías de sodio de nervios periféricos, que incluyen mutaciones en las isoformas Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, se asocian a síndromes de dolor periférico (hiperalgesia) incluyendo dolor neuropático e inflamatorio (Savio-Galimberti y cols., 2012).

En el caso de las mutaciones de la isoforma Nav1.1, se han descrito más de 200, las cuales generan tanto ganancia, como pérdida de función, la mayoría de la cuales ejercen sus efectos epileptogénicos al reducir las corrientes de sodio de neuronas GABAérgicas, éstas

inhiben normalmente a otras neuronas a través de la liberación del ácido gamma-aminobutírico (GABA), la reducción de corriente de sodio en neuronas GABAérgicas disminuye la liberación de este neurotransmisor, lo que resulta en una pérdida de inhibición generalizada en el cerebro (Ragsdale y cols., 2008). Este tipo de canalopatías comprende ataques epilépticos durante el primer año de vida como la epilepsia mioclónica severa en la infancia (SMEI) y el cribado genético de la isoforma Nav1.1 se utiliza como herramienta de diagnóstico en niños con ataques prematuros (Savio-Galimberti y cols., 2012).

Algunos grupos han reportado efectos de tipo ganancia de función (hiperexcitabilidad) a partir de mutaciones en la isoforma Nav1.2, asociadas a ataques epilépticos neonatales-infantiles benignos familiares (BFNIS). Dos de estas mutaciones (R223Q y R1319Q) causaron corrimientos positivos de las curvas de activación e inactivación (Scalmani y cols., 2006).

Liao y cols., también reportan una ganancia de función de dos mutaciones del canal Nav1.1 (co-expresado con las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) las cuales aceleran la recuperación de la inactivación rápida y alteran la dependencia de voltaje de activación (Liao y cols., 2010).

Algunas mutaciones en el canal de sodio de músculo esquelético, alteran el mecanismo de inactivación rápida y/o lenta, produciendo canales hiperactivos, resultando en los paramiotonía congénita (PC) y parálisis periódica hipercalémica (HyperPP), dos de las primeras canalopatías en ser descubiertas (Catterall, 2000). Aunque 4 de estas mutaciones se ubican en el segmento S4 del dominio IV la mayoría se ubican en la compuerta de inactivación o en el dominio receptor para la compuerta de inactivación del canal.

Cabe mencionar que tres diferentes sustituciones de la glicina 1306 de la isoforma Nav1.4, río arriba de la compuerta de inactivación, ubicada en el linker intracelular entre el dominio III y DIV fueron descubiertas en pacientes con miotonía. Los registros electrofisiológicos de células de músculo estriado de estos pacientes revelan un incremento de la constante de inactivación ( $\tau = 1.6-2.1$  ms,  $\tau$  control = 1.2 ms). La disfunción y la severidad de la miotonía fueron correlacionadas con la longitud, ramificación y carga de las de la cadena lateral de las sustituciones de esta glicina (Lerche y cols., 1993).

Las isoformas Nav1.7 y Nav1.8 han sido propuestas como proteínas clave relacionadas al procesamiento del dolor periférico y en el desarrollo del incremento a la sensibilidad al dolor asociada a inflamación y a daño al tejido. Éstas son dos de las isoformas cuya asociación a la subunidad  $\beta 1$  repercute en la cinética del canal. (Vijayaragavan y cols., 2001).

Se considera que la isoforma Nav1.7 es la principal mediadora de la neuropatía en este tipo de desórdenes, mientras que Nav1.8 está involucrada en la mecanotransducción de dolor en articulaciones (Savio-Galimberti y cols., 2012).

Goldberg y cols.,(2007) han identificado mutaciones que truncan la proteína Nav1.7 en pacientes con indiferencia congénita al dolor, en 7 países diferentes. En esta condición, mutaciones en ambos alelos del gen que codifica para el canal Nav1.7 (e.g. R277X, Y328X, W897X) producen un efecto tipo pérdida de función al truncan la proteína que codifica para este canal, originando en el individuo la incapacidad de percibir los estímulos dolorosos, sin ninguna otra disfunción simpática aparente. Debido a esto, se ha propuesto que fármacos inhibidores selectivos para Nav1.7 constituirían analgésicos ideales (Cummins y cols., 2007; Goldberg y cols., 2007; Lampert y cols., 2010).

Por otro lado, 3 mutaciones que producen ganancia de función, de esta isoforma están asociadas a la eritromelalgia heredada, la cual se caracteriza por dolor urente, elevación de la temperatura de la piel, excesiva vasodilatación, y dolor crónico en pies y manos. Estas mutaciones bajan el umbral de activación del canal, la expresión de los mutantes puntuales de Nav1.7: F1449V, L858H y A863P en neuronas de la raíz del ganglio dorsal bajan el umbral de corriente del potencial de acción e incrementan el número de potenciales de acción en respuesta a estímulos causando hiperexcitabilidad (Dib-Hajj y cols., 2009).

Otras 8 mutaciones en los linkers intracelulares entre los dominios III y DIV de Nav1.7 están asociadas al trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD), caracterizado por dolor intenso durante el movimiento intestinal en regiones perianales, en infantes que con la edad incluye dolor mandibular. Estas mutaciones también producen hiperexcitabilidad y reducen la inactivación rápida, sin afectar la activación. Sin embargo la mutante I1461T induce un corrimiento de la curva de conductancia hacia voltajes despolarizantes, mientras que los mutantes A1632E, I1461T, T1464I, y M1627K producen un corrimiento hacia la derecha de la curva de inactivación de estado estable (Fertleman y cols., 2006; Estación y cols., 2008 Savio-Galimberti y cols., 2012).

Los efectos de la mutante de Nav1.7: A1632E, asociada a un fenotipo clínico con características de eritromelalgia y PEPD se consideran de tipo ganancia de función causando hiperexcitabilidad. Sin embargo la inactivación rápida del mutante es significativamente más lenta e incompleta en un rango de voltaje de -30 a +40 mV, al igual que la recuperación de la inactivación, a -100, -80 y -60 mV (Fertleman y cols., 2006).

Cabe mencionar que, a diferencia de los pacientes con eritromelalgia heredada, para los cuales no hay tratamiento farmacológico, los pacientes con PEPD responden favorablemente al ser tratados con carbamazepina (Dib-Hajj y cols., 2009).

La mutación R125C del gen *Scn1B* (que codifica para la subunidad  $\beta 1$ ) ha sido identificada en un paciente como la causa autosomal recesiva del síndrome de Dravet, conocido también como epilepsia severa mioclónica de la infancia, tal mutación disminuye significativamente la expresión de la proteína en la superficie de células de mamífero, sin embargo los autores observan que si R125C consigue expresarse, ésta es capaz de modular la corriente de Nav1.2 tal como el fenotipo nativo de  $\beta 1$  lo hace (Patino y cols., 2009). El síndrome de Dravet, caracterizado por convulsiones y disfunción cognitiva, también está asociado a mutaciones en el gen *Scn1A* (gen de Nav1.1) (Bender y cols., 2012).

### 1.1.8 Neuromodulación

En preparaciones sinaptosómicas se ha encontrado que los canales de sodio reducen su conductancia al ser fosforilados por quinasas dependientes de AMPc. Los picos de corriente de sodio también se reducen al activarse receptores del tipo D1 junto con su consecuente cascada de señalización de AMPc. Tal modulación se debe principalmente a la fosforilación de una serina y al anclaje de la PKA cerca del canal a través de una proteína AKAP-15 (Catterall, 2000).

Adicionalmente, los canales de sodio son fosforilados por la PKC, por lo que la activación de los receptores muscarínicos resulta en la desaceleración de la inactivación y la reducción del pico de corriente, la primera producto de la fosforilación de un residuo

situado en la compuerta de inactivación y la segunda debido a la fosforilización de sitios en el asa intracelular entre los dominios DI y DII (fig 2).

### 1.1.9 Características Farmacológicas.

Diversas toxinas biológicas producidas por animales y plantas, ejercen su efecto tóxico, modificando las propiedades de los canales de sodio. De acuerdo a cómo alteran la función del canal de Na<sup>+</sup>, las toxinas se clasifican en: a) toxinas bloqueadoras del poro; b) toxinas que modifican la compuerta de activación uniéndose a sitios intramembranales y c) toxinas que modifican la compuerta de inactivación uniéndose a sitios extracelulares (Marban y cols., 1998).

Entre estas toxinas se incluyen las guanidinas heterocíclicas solubles en agua: tetrodotoxina (TTX), la cual se encuentra en el pez globo, en moluscos, cangrejos, pulpos y ranas, y la saxitoxina (STX), que se obtiene de un dinoflagelado marino; los compuestos policíclicos solubles en lípidos: veratridina (alcaloide de Liliaceas), aconitina (proveniente de plantas del género *Aconitum*) y batracotoxina (BTX) (toxina de la piel del sapo *Phyllobates aurotaenia*); y los polipéptidos de bajo peso molecular como los aislados del veneno del escorpión y de la anémona de mar (e.g. antopleurina A y B, ATX II) (Marban y cols., 1998).

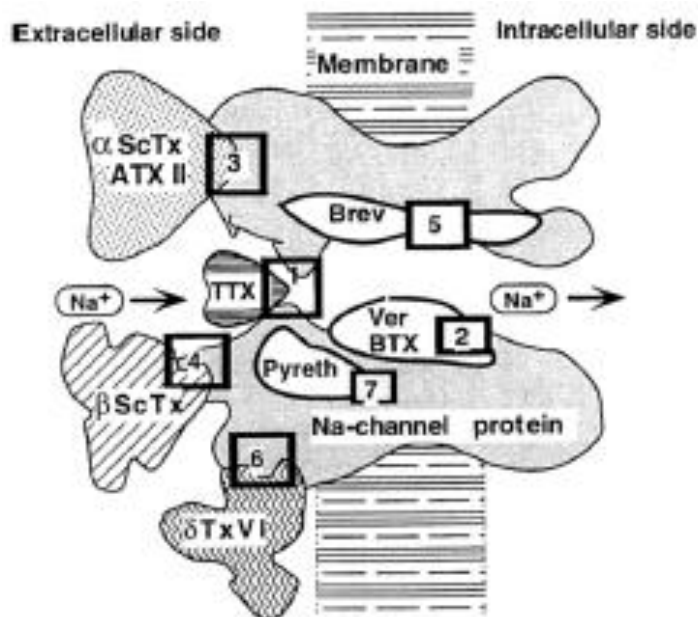
Como se había mencionado antes las toxinas TTX y STX actúan en la superficie extracelular del canal, y ambas bloquean su activación, al igual que la  $\mu$ -conotoxina, la cual es un inhibidor competitivo de la unión de STX a los canales de sodio musculares, pero no de la isoforma neuronal. Estas tres toxinas comparten el sitio de unión 1 (Cruz y cols., 1985; Wingerd y cols., 2012).

El sitio de unión 2 se encuentra entre segmentos transmembranales del canal y las toxinas cuyo que se unen en este sitio, poseen en términos generales el efecto opuesto, es decir prolongan la actividad del canal de sodio y reducen la selectividad. Como la veratridina (de las hierbas liliáceas del género *Veratrum*), y de origen animal, la batracotoxina la cual se encuentra en ranas del género *Phyllobates* y *Dendrobates*, aunque en realidad es producida por coleópteros Melryda. (Tikhonov 2008; Wingerd y cols., 2012).

Se ha propuesto que estas toxinas se unen preferencialmente a la conformación activada del canal dejándolo en el estado abierto (Salceda y Ortega, 2009). Por ejemplo la veratridina, que es una mezcla de varios alcaloides neurotóxicos, activa al canal al disminuir el potencial de membrana, lo cual provoca su apertura, es decir, cambia la curva de activación y hace más lenta la inactivación (Tikhonov 2008).

El sitio de unión 3 está caracterizado por la unión de toxinas polipeptídicas animales, de escorpiones del norte de África, anémonas marinas, algunas especies de araña y al menos, de una avispa. Éstas toxinas prolongan el potencial de acción de neuronas y células musculares al bloquear o enlentecer la inactivación del canal (Salceda y Ortega, 2009).

**Fig 4. Sitios de unión de ligandos al canal de sodio.** La tetrodotoxina bloquea el canal caracterizando al sitio 1. Las toxinas de escorpión  $\alpha$ ScTx y de anémoma ATX II se unen al sitio 3 en la porción extracelular. La toxina de escorpión  $\beta$  ScTx al sitio 4, al sitio 6 se une la atracotoxina  $\delta$ Tx VI de la araña de Sídney de tela de embudo. El insecticida natural piretro se une al sitio 7. La brevetoxina derivada de dinoflagelados se une al sitio 5, el sitio 2 es caracterizado por la unión de la toxina de plantas liláceas veratridina y la batracotoxina BTX encontrada en ranas de la familia dendrobatidae (Rogers y cols., 1996).



Las toxinas de escorpión y anémoma poseen de 40 a 80 residuos, aunque se han encontrado una toxina de anémoma con apenas 27 residuos

(ATX-III, de *Anemonia sulcata*), así como varias toxinas de escorpión con 30-40 residuos. Éstas disminuyen la velocidad del proceso de inactivación, por lo que mantienen durante más tiempo la corriente de sodio que se produce por la acción del estímulo eléctrico (Salceda y Ortega, 2009).

Al sitio 4, se unen las toxinas  $\beta$  de escorpiones americanos, como los del género *Centruroides*. Éstas péptidos desplazan la dependencia de voltaje del mecanismo de inactivación hacia potenciales más negativos, induciendo actividad neuronal espontánea. Su unión al canal es independiente del potencial de membrana y en el caso de la isoforma neuronal Nav1.2 el residuo G845 en el DII juega un papel clave para la unión, junto con algunos otros residuos extracelulares como E779 en el lazo extracelular IIS1-S2, E837 y L840 en el lazo extracelular de IIS3-S4, los cuales al ser mutados, reducen al afinidad del canal a las toxinas  $\beta$  de escorpión (Salceda y Ortega, 2009).

El sitio 5 constituye un dominio hidrofóbico al cual se unen algunas toxinas producidas por dinoflagelados (organismos unicelulares que forman parte del plancton marino) como las brevetoxinas (PbTx) y las ciguatoxinas (CTX) liposolubles, aisladas de los dinoflagelados *Ptychodiscus brevis* (organismo asociado a las mareas rojas) y *Gambierdiscus toxicus* (relacionado con la intoxicación por la ingesta del pez del arrecife conocida como ciguatera). Estas toxinas cambian el umbral de activación hacia potenciales más negativos y modifican la activación e inactivación. La gran diferencia con respecto a las anteriores toxinas es que éstas se unen al canal cuando éste está cerrado, modificando la reactivación del canal inactivado, en tanto que la PbTx-3, induce estados de preapertura, generando diferentes estados de apertura. El sitio receptor 5 comprende una parte de los segmentos S5-S6 del dominio IV (Salceda y Ortega, 2009).

Los fármacos antiarrítmicos, anticonvulsivos y anestésicos locales, comprenden una familia de inhibidores de canales de sodio que comparten similitudes químicas y estructurales. En general estos son moléculas liposolubles catiónicas (a pHs fisiológicos), eficaces en el tratamiento de desórdenes de hiperexcitabilidad debido a su inhibición preferente a canales en estado inactivado (Ahern y cols., 2008).

Los anestésicos locales bloquean la corriente de sodio, al disminuir la excitabilidad celular y son utilizados en la clínica para tratar síntomas asociados a enfermedades del músculo esquelético, como las miotonías. Los anestésicos locales como la lidocaína y benzocaína y las drogas antiarrítmicas de clase I como mexiletina, disminuyen la excitabilidad de las membranas biológicas, bloqueando canales de sodio, éste puede ser tónico o fásico (dependiente de uso). Se cree que ingresan al canal por la parte intracelular y se unen al poro interno del canal, aunque también pueden unirse al canal abierto, su sitio de unión al estado inactivado es de alta afinidad y precisa de 2 aminoácidos F1764 y Y1771 (en el dominio DIVS6, en la isoforma Nav1.2) o F1579 y Y1586 (en Nav1.4). (Catterall, 2000; Ahern y cols., 2008).

### 1.1.10 Subunidades $\beta$ .

Todas las subunidades  $\beta$  poseen un dominio inmunoglobulínico extracelular estructuralmente homólogo al dominio variable de la superfamilia Ig a la que pertenecen las moléculas de adhesión celular (CAMs). Las inmunoglobulinas o anticuerpos, están formadas por 4 cadenas polipeptídicas en forma de Y, dos cadenas ligeras (L) idénticas (240 aa aprox.) y dos cadenas pesadas (H) idénticas (440-600 aa aprox.), cada tipo de cadena presenta un dominio constante C-terminal y uno variable N-terminal (V-set), el dominio variable en ambas cadenas constituye el sitio de unión al antígeno (dos de éstos en cada inmunoglobulina) (Hawkins, 1982).

La subunidad  $\beta 1$  fue aislada y caracterizada por primera vez por Isom y cols., en 1992, codificada en el gen SCN1B, en la rata presenta otra variante (por *splicing* alternativo)  $\beta 1A$ . Se cree que ésta es producto de la aparente retención de un intrón, y es homóloga a  $\beta 1$  solo en cuanto al dominio inmunoglobulínico, sin embargo  $\beta 1A$  solo se expresa durante el desarrollo embrional, su expresión disminuye después del nacimiento y coincide con el inicio de la expresión de  $\beta 1$ . No obstante  $\beta 1A$  se ha inmunolocalizado en corazón y en el ganglio de la raíz dorsal de rata adulta. Esta variante presenta una mayor extensión que  $\beta 1$ , su extremo amino terminal y el pliegue inmunoglobulínico son idénticos sin embargo su dominio extracelular juxtamembranal al igual que su dominio transmembrana e intracelular COOH terminal, son significativamente diferentes al de  $\beta 1$  (Kazen-Gillespie y cols., 2000).

De manera similar la variante por *splicing* alternativo del gen SCN1B del humano,  $\beta 1B$  es producida por retención del intrón 3. Sin embargo, el carboxilo terminal de  $\beta 1B$  comparte menos del 33% de identidad con la proteína  $\beta 1A$  de rata. Las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  se asocian no-covalentemente a la subunidad  $\alpha$ , mientras que las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 4$  se encuentran unidas covalentemente a la subunidad  $\alpha$  mediante un puente de disulfuro (Brackenbury e Isom, 2008).

La subunidad  $\beta 1$  también establece asociaciones heterofílicas con varias moléculas inmunoglobulínicas de adhesión celular, como la N-cadherina, contactina, neurofascina-155 neurofascina-186, NrCAM y  $\beta 2$  (Isom, 2001).

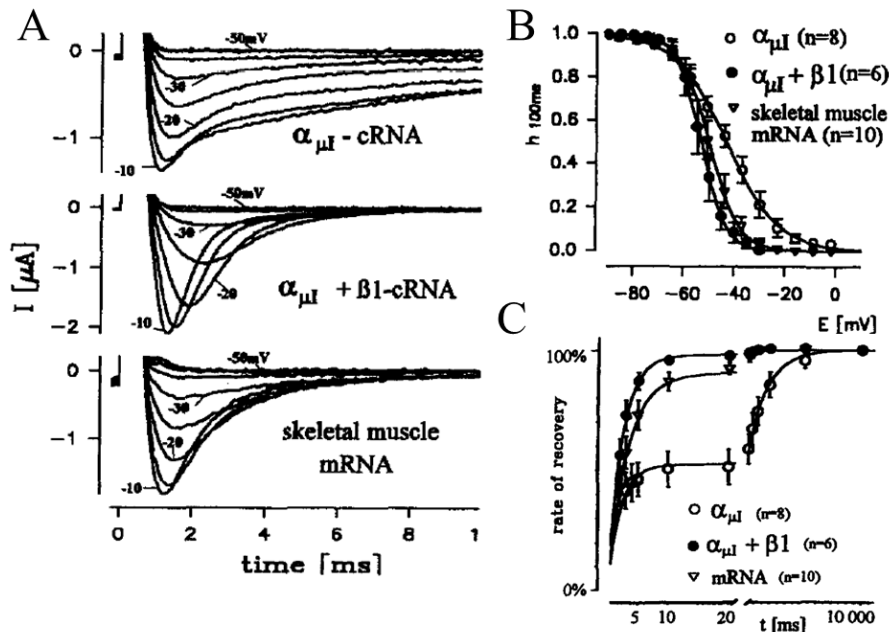
El grupo de Isom sugiere que el reclutamiento de ankirina que resulta de la adhesión  $\beta 1$ - $\beta 1$  depende de la fosforilación del sitio Y181. Sobresale el hecho de que un mutante de  $\beta 1$  que “imita” el estado de fosforilación, Y181E no recluta ankirina y no modula la cinética de la corriente de sodio, aunque la interacción  $\alpha$ - $\beta$  se conserva (Patino e Isom, 2010).

### 1.1.11 Modulación de la corriente de sodio por la subunidad $\beta 1$ .

Cuando la estructura primaria y la expresión funcional de la subunidad  $\beta 1$  fue publicada por Isom y cols., (incluyendo a Goldin y Catterall en 1992), reportaron que la coexpresión de subunidades  $\beta 1$  con subunidades  $\alpha$ , incrementa el tamaño del pico de corriente de sodio, acelera su inactivación y modifican la dependencia de voltaje de inactivación hacia potenciales de membrana más negativos, (Isom, 1992).

La hipótesis de mayor aceptación, propone que la subunidad  $\beta 1$  estabiliza a la  $\alpha$  en una conformación que inactiva y recupera (*gating*) en modo rápido. En la ausencia de  $\beta 1$ , la subunidad  $\alpha$  puede fluctuar entre dos conformaciones, resultando en un modo rápido y uno lento de *gating*.  $\beta 1$  podría alterar el equilibrio entre estos dos estados, favoreciendo el modo rápido de *gating*. Esto explicaría porque ambos modos son evidentes cuando solo la subunidad  $\alpha$  es expresada en ovocitos de *Xenopus*, pero el modo de *gating* rápido prevalece cuando la subunidad  $\beta 1$  es coexpresada (Bennett y cols., 1993).

En general, la co-expresión de la subunidad  $\beta 1$  con varias isoformas de la subunidad  $\alpha$  de vertebrados acelera la inactivación, cambia la dependencia de voltaje de inactivación de estado estable y aceleran la recuperación de la inactivación (Patton y cols., 1994; Chen y Cannon 1995; Makita y cols., 1996; Vijayaragavan y cols., 2001; Spampanato y cols., 2004; Tan y cols., 2011). La figura 5 muestra la modulación que ejerce esta subunidad sobre la subunidad  $\alpha$  de la isoforma de músculo esquelético (antes conocida como  $\mu I$ , ahora denominada Nav1.4).



**Fig 5. Registros de canales de sodio rNav1.4** (antes conocidos como  $\mu I$ ) expresados en ovocitos, en ausencia y presencia de la subunidad  $\beta 1$ . (A) trazos representativos de corrientes obtenidas a los diferentes potenciales de voltaje. (B) Curva de inactivación de estado estable de los mismos grupos. (C) Recuperación de la inactivación de los mismos grupos. Los ovocitos fueron transfectados con RNAc de  $\beta 1$  obtenido de cerebro de rata y el RNAm aislado de músculo esquelético de rata. (tomado de Wallner y cols 1993).

Las isoformas de la subunidad  $\alpha$  canal de sodio de cerebro, músculo esquelético y de cardiomiocito, son moduladas en ovocitos de rana por la subunidad  $\beta 1$ , pero no por la subunidad  $\beta 2$ . La secuencia de rata para  $\beta 1$  es un 19% idéntica (y 35.5% similar) a  $\beta 2$

Además, se ha observado que el dominio extracelular de  $\beta 1$  es esencial para esta modulación (Chen y Cannon 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998;

McCormick y cols., 1999). Mediante estudios con quimeras de ambas subunidades Zimmer y Benndorf, concluyen que el dominio extracelular de  $\beta 1$  es suficiente para modular el canal Nav1.2 pero no el Nav1.5 (Zimmer y Benndorf, 2002). Aunque algunos autores sugieren que la subunidad  $\beta 1$  contiene múltiples dominios de interacción con las subunidades  $\alpha$ , intra y extracelulares (Spampanato y cols., 2004; McEwen et al., 2004). Sin embargo la asociación funcional intracelular de al menos la isoforma Nav1.2 se lleva a cabo indirectamente a través de la unión de ambas a la ankirina G, cual también interactúa con el citoesqueleto (McEwen et al., 2004; Brackenbury e Isom 2008).

En la tabla 1 (pág 24), se lista las referencias de los estudios donde se ha encontrado un papel funcional de  $\beta 1$  en la modulación de la corriente de sodio, el tipo de tejido en donde cada isoforma se expresa, así como las principales canalopatías asociadas. Cabe notar el hecho de que la evidencia de la modulación de la isoforma Nav1.4 es particularmente consistente.

Spampanato y cols., encontraron que la subunidad  $\beta 1$  modula la dependencia de voltaje de inactivación (pero no de activación) de la isoforma Nav1.1, acelera la recuperación de la inactivación y reduce la acumulación de inactivación ante la aplicación repetida de pulsos a 39Hz. La co-expresión de  $\beta 1$  en ovocitos de rana indujo un corrimiento de la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales más hiperpolarizantes. Además, tal efecto es disminuido al co-expresar el mutante de Nav1.1: D1866Y, tal sitio se encuentra en el asa C-terminal, intracelular del dominio DIV (Spampanato y cols., 2004).

Otros estudios electrofisiológicos con quimeras de las isoformas Nav1.4/Nav1.5 del canal sugieren que la modulación se debe a la asociación molecular de dominios extracelulares de ambas subunidades (Makita y cols., 1996; Qu y cols., 1999; McCormick y cols., 1999). McCormick y cols., observaron que al coexpresar la subunidad  $\alpha$  con una proteína quimérica que posee el dominio extracelular de  $\beta 1$  unido a un anclaje lípido de glicofosfatidilinositol (GPI) (un glicolípido involucrado en la modificación posttranscripcional de algunas proteínas), los efectos de la cinética del canal eran los mismos que cuando se expresaba la subunidad  $\beta 1$  intacta (McCormick y cols., 1999).

Sin embargo, la inserción y anclaje a la membrana parece ser indispensable, ya que Meadows y cols., encontraron que el mutante  $\beta 1_{STOP}$ , en células CHL, el cual presenta una deleción de 34 aminoácidos (a partir de I166) en el dominio C-terminal intracelular, presenta pérdida de modulación y en ovocitos de *Xenopus* requiere de la sobre expresión (x10000) para ver restablecida su función. Además de que no resulta posible la co-inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta 1_{STOP}$  (Meadows y cols., 2001).

Makita y cols., (1996) diseñaron quimeras de las asas extracelulares de la subunidad  $\alpha$  de las isoformas de rata Nav1.5 y Nav1.4. Mutando sistemáticamente cada asa S5-S6 de cada dominio y registrando su respuesta en la cinética de la  $I_{Na}$  ante la coexpresión de la subunidad  $\beta 1$ , proponen que las asas del dominio DI y DIV están predominantemente implicadas en la interacción  $\alpha$ - $\beta 1$  que subyace al efecto electrofisiológico típico de  $\beta 1$  sobre el canal. En particular sus resultados parecen sugerir que el comportamiento cinético típico que  $\beta 1$  induce en el canal de sodio solo precisa que el canal exprese un fragmento extracelular de 145 aminoácidos del dominio DI y un fragmento de 62 aminoácidos del DIV de la secuencia de la subunidad  $\alpha$  de la isoforma Nav1.4 (Makita y cols., 1996).

McCormick y cols., también hallan que, el dominio intracelular, no es esencial para que  $\beta 1$  module el canal, truncando la proteína, pero procurando mantener su orientación en membrana. Además, este estudio, incluye el registro de diferentes proteínas  $\beta 1$  con deleciones y sustituciones por alaninas, en el cual se identifican 3 residuos ácidos (E23, E25, E27), los cuales, al ser neutralizados, reducen la modulación de la tasa de inactivación, sin afectar la asociación del mutante con la subunidad  $\alpha$ , ni su efecto en la recuperación de la inactivación (McCormick y cols., 1998).

De acuerdo con esta idea, posteriores registros de corrientes persistentes con quimeras  $\beta 1\beta 4$ , sugieren que el dominio intracelular de  $\beta 1$ , no necesita interactuar directamente con el C-terminal de la subunidad  $\alpha$  ni con la compuerta de activación rápida (dominio citoplásmico DIII-DIV), en lugar de esto, el dominio extracelular (y quizás el transmembrana) de  $\beta 1$ , podría estabilizar alostéricamente al canal en estados no conductivos (Aman y cols., 2009).

Qu y cols., mediante el uso de quimeras Nav1.2/Nav1.5 observaron que al sustituir el segmento IVSS2-S6 (GLLAPILNSG PPDCDPEKDH PGSSVKGDCG NPS) de Nav1.2, por el correspondiente en Nav1.5, se producía un canal que no aceleraba su mecanismo de compuerta en respuesta a la presencia de la subunidad  $\beta 1$ , lo que sugiere, que la sustitución de esta región, reduce la afinidad de la subunidad  $\alpha$  por la de  $\beta 1$ . Sin embargo, esta reducción del efecto de  $\beta 1$ , pudo ser parcialmente compensado al expresar altos niveles de esta subunidad en ovocitos, por lo que es probable que la sustitución adicional de una región en DIS5-S6, sea necesaria para abolir los efectos de  $\beta 1$  por completo (Qu y cols., 1999).

La transfección de RNAc de la subunidad  $\alpha$  Nav1.4 en ovocitos de *X. laevis* muestra una fracción de canales mayor que poseen una constante de inactivación hasta 10 veces más lenta en células embrionarias de riñón humano (HEK-293). Este comportamiento cinético es similar al observado en preparaciones nativas, lo que indicaría que la subunidad  $\beta 1$  se expresa endógenamente en células de mamíferos. En efecto, Moran y cols., detectaron la presencia de mRNA de la variante por *splicing*  $\beta 1A$  en células HEK-293, en realidad los autores detectaron el DNAc codificado en las primeras 400 pares de bases del gen de  $\beta 1$ , la cual, se propone se ensambla al canal acelerando su inactivación, en especial considerando que la región funcional putativa, el dominio extracelular N-terminal de  $\beta 1$  (de 142 residuos) está bien conservado en esta variante de *splicing* (Moran y cols., 2000). Por lo tanto la expresión en ovocitos de rana resulta especialmente útil el estudio de la estructura-función de la interacción  $\alpha$ - $\beta 1$  del canal de sodio.

Otros estudios indican que las subunidades del canal de sodio también pueden interactuar con sus porciones intracelulares en algunas isoformas. La mutación D1790G (en un dominio intracelular de Nav1.5), está implicada en el síndrome de QT largo tipo 3 (LQT-3), y se ha sugerido que interrumpe la interacción  $\alpha$ - $\beta$  cuando se expresa en células HEK (An y cols., 1998). Aunque la relevancia funcional de tal evento, en cuanto a la cinética de la corriente no es claro, efectivamente, se ha descrito que dominios intracelulares de  $\beta 1$  establecen complejos de asociación con el citoesqueleto, reclutando ankirina y RPTP $\beta$  (proteín tirosín fosfatasa parecido a receptor).

Se argumenta que  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , al igual que otras CAMs (moléculas de adhesión celular) de la familia L1, establecen interacciones trans-homofílicas (entre proteínas iguales, pero en otra célula) las cuales ponen en marcha un mecanismo de transducción de señales causando que sus dominios intracelulares recluten ankirina<sub>G</sub>, finalmente

promoviendo la agregación celular en nódulos de Ranvier y terminaciones axonales de mamíferos (Isom, 2001).

En la inactivación rápida, se ha observado que el efecto de  $\beta 1$  sobre la inactivación lenta no depende del dominio citoplásmico de  $\beta 1$  y la mutación C121W (la cual, afectaría decisivamente la topología inmunoglobulínica extracelular de  $\beta 1$ ), afecta la capacidad que  $\beta 1$  tiene para evitar que el canal entre en este estado prolongado de inactivación. La conclusión de los autores, después de expresar un mutante de la subunidad  $\alpha$ , deficiente de inactivación rápida, es que la subunidad  $\beta 1$  probablemente ejerce sus efectos en el canal

**Tabla 1.** Distribución, modulación por la subunidad  $\beta 1$  y canalopatías asociadas de las 4 isoformas de mamífero del canal de sodio. Modificado de Savio-Galimberti y cols., 2012.

Subunidad $\alpha$	Gen	Expresión	TTX EC <sub>50</sub>	Evidencia de modulación de la corriente por $\beta 1$	Canalopatías asociadas	Referencias
Nav1.1	SCN1A	Sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), células de la raíz del ganglio dorsal (DRG) y túbulos T in miocitos.	6nM	Smith y Goldin. (1998). Spanpanato y cols. (2004).	Síndromes epilépticos heredables (e.g. GEFS, Dravet, West.), migraña y autosimo familiar.	Fukuoka y cols. (2008), Spanpanato y cols. (2004), Ragsdale cols. (2008), Dichgans y cols. (2005),
Nav1.2	SCN2A	SNC, axones amielínicos y pre-mielínicos	12nM	Isom y cols. (1992), Patton y cols. (1994)	Síndromes epilépticos heredables.	Scalmani y cols. (2006).
Nav1.3	SCN3A	SNC embrional y miocitos cardiacos.	4nM	Tan y cols., (2011)	Contribuidor potencial a dolor neuropático posterior a lesiones espinales.	Hains y cols (2003).
Nav1.4	SCN4A	Músculo esquelético	5nM	Cannon y cols. (1993), Tong y cols. (1993), Wallner y cols. (1993), Makita y cols. (1996), Vilin y cols. (1999).	Parálisis periódica hipercalémica (Hyper PP), paramiotonia congénita (PC), miotonia agravada por potasio, síndrome miasténico susceptibilidad a hipertermia	Cannon (1997)
Nav1.5	SCN5A	Miocitos cardiacos, músculo inmaduro o denervado y algunas neuronas de SNC.	2-6 $\mu$ M Resist.	<u>Sin modulación:</u> Makita y cols. (1996), Vilin y cols. (1999).	Síndrome de QT largo congénito, de Brugada, de muerte infantil repentina, otras arritmias.	Wang y cols. (1995), Chen y cols. (1998), George (2005).
Nav1.6	SCN8A	SNC (hipocampo, células Purkinje, astrocitos), células DRG y de Schwann, túbulos T in miocitos.	1nM	Tan y cols., (2011), Zhao y cols. (2011).	Ataxia cerebelar y enfermedad de las placas motoras terminales en ratones.	Kohrman y cols (1996), Burgess y cols (1995).
Nav1.7	SCN9A	Todo tipo de neuronas DRG y simpáticas, células de Schwann y neuroendócrinas.	4nM	Vijayaragavan y cols. (2001). Farmer y cols. (2012)	Indiferencia congénita al dolor (CIP), eritromelalgia familiar primaria, desorden paroximal de dolor extremo (PEPD)	Lampert y cols. (2010)
Nav1.8	SCN10A	Células DRG, corazón humano y neuronas intracardiacas.	60mM resistente	Vijayaragavan y cols. (2001), Vijayaragavan y cols (2004), Zhao y cols. (2011), Wilson (2011)	Síndromes de dolor periférico y alteraciones de conducción ventricular.	Chambers y cols. (2010), Sotoodehnia y cols. (2010).
Nav1.9	SCN11A	Neuronas tipo C en células DRG (nocicepción).	40mM Resist.	N/A	Dolor episódico autosomal dominante y síndromes hiperalgésicos	Zhang y cols (2013)

mediante la interacción con las asas extracelulares del poro de  $\alpha$  (Webb y cols., 2009).

### 1.1.12 Modulación Farmacológica de la Subunidad $\beta 1$ .

La afinidad y eficacia de algunos inhibidores de los canales de sodio son alterados por los niveles de expresión de las subunidades  $\beta 1$  (Uebachs y cols 2004; Wilson y cols 2011).

La respuesta del canal a drogas moduladoras de relevancia clínica (como lidocaína y carbamazepina), consiste en una inhibición compleja de la corriente de sodio, produciendo bloqueo tónico y fásico (dependiente de uso), que generalmente involucra cambios hacia potenciales negativos; lo que indica que estos se unen con mayor afinidad al estado inactivado de los canales. En general, éste tipo de fármacos, presentan diferencias sutiles en sus efectos sobre diferentes isoformas del canal de sodio (Cummins y cols., 2007). El sitio de unión de los anestésicos locales (*e.g.* benzocaína, lidocaína, etidocaína), se encuentra en el poro interno del canal de sodio e involucra principalmente (en Nav1.4) a la F1579 en el DIVS6, L1880 en el DIIS6, Y1586 en el DIVS6 y N434 en el DIS6 (Lipkind y Fozzard 2005).

Por otra parte, los anticonvulsivos (*e.g.* carbamazepina, fenitoína y lamotrigina) aunque diferentes estructuralmente, a los anestésicos locales, interactúan con algunos de los aminoácidos con los que éstos interactúan. La acción de las drogas anticonvulsivas se lleva a cabo desde el exterior celular, a diferencia de los anestésicos locales cuya acción es desde el compartimento intracelular (Lipkind y Fozzard y cols., 2010).

Incluso los antidepresivos tricíclicos (como la imipramina), de la misma forma que los anticonvulsivos y anestésicos locales ejercen un tipo de bloqueo similar dependiente de uso, el cual está implicado en el control del dolor. La evidencia apunta a que carbamazepina, lidocaína e imipramina se unen a un sitio común en el canal de sodio con el motivo aromático, que estos compuestos comparten (Yang y cols., 2010).

Algunos experimentos sugieren que la subunidad  $\beta 1$  modifica no solo las propiedades biofísicas del canal de sodio, sino también sus propiedades farmacológicas, en específico su respuesta a anticonvulsivos. Se ha observado que la mutación C121W, en  $\beta 1$ , asociada a epilepsia generalizada con episodios febriles (GEFS+) en el gen *SCN1B*, reduce el bloqueo inducido por fenitoína en células que expresan el canal Nav1.3 (Lucas y cols., 2005).

Además, estudios en ratones knock-out de *SCN1B*, indican que la sensibilidad del canal a carbamazepina, depende de la presencia de  $\beta 1$  (Uebachs y cols., 2010). Los autores observaron que la carbamazepina induce un incremento paradójico de las corrientes de sodio persistentes en ratones knock-out *SCN1B*, lo que resulta en una reducción del bloqueo de disparo repetitivo en neuronas *Scn1b* null. Sin embargo, esto no sucede al aplicar lacosamide, un nuevo agente antiepileptico. (Uebachs y cols., 2012).

La co-expresión individual de la subunidad  $\beta 1$ , además de modular la corriente de sodio de canales Nav1.8, incrementa la  $k_{on}$  del bloqueo producido por la conotoxina  $\mu O$ -MrVIA/B, la cual posee propiedades analgésicas, afectando fuertemente la afinidad de ésta por el canal. Los autores proponen que este hecho podría abrir la puerta al diseño de estrategias para la utilización terapéutica de esta conotoxina, además de que el uso de ésta y

otros compuestos moduladores podría permitir la evaluación funcional de la composición de subunidades  $\beta$  de canales de sodio en neuronas (Wilson y cols. 2011).

Los insecticidas pyrethroides, como el terfluthrin, se unen a la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio alterando sus propiedades biofísicas y la conducción eléctrica del sistema neuronal de insectos y otros organismos. Tan y cols., encontraron que la coexpresión de la subunidad  $\beta 1$  en canales Nav1.6 (abundantes en cerebro adulto), modula la acción de tefluthrin, confiriendo una mayor sensibilidad al componente dependiente de uso que este insecticida ejerce sobre el canal Nav1.6 (Tan y cols., 2011).

### 1.1.13 Knock-outs de $\beta 1$ .

Los ratones knock-out del gen *Scn1b*(-/-) presentan ataxia y sacudidas mioclónicas bilaterales a partir del día 10 posnatal, además de otras características similares a las que presentan los pacientes del síndrome de Dravet, una reducción en la expresión de Nav1.1 en el hipocampo y presión cardiaca más lenta (intervalos QT y RR prolongados). Éstos ratones mueren en la adolescencia al día 21 postnatal (Chen y cols., 2004; Brackenbury e Isom, 2008).

En estos ratones existe una regulación a la baja de canales Nav1.5 y Nav1.1 y a la alta de Nav1.3, en una subpoblación de neuronas piramidales en el área CA2/CA3 del hipocampo y una reducción de nodos de Ranvier maduros en el nervio óptico (Chen y cols., 2004; Brackenbury e Isom, 2008).

Sin embargo, los ratones que presentan un solo alelo nativo *Scn1b*(-/+), no tiene convulsiones espontáneas y tienen un promedio de vida normal. Los datos electrofisiológicos en diferentes sistemas de expresión, además del análisis genético de pacientes, parecen indicar que un solo alelo nativo de *Scn1b* es suficiente para mantener la excitabilidad eléctrica normal en el cerebro, mientras que el fenotipo nulo *Scn1b*(-/-) produce hiperexcitabilidad tanto en ratones como humanos. Aunque el fenotipo heterocigótico *Scn1b*(-/+ ) no presenta predisposición ataques epilépticos, los autores sugieren que los genes *Scn1a* y *Scn1b* poseen juntos un papel crítico en la regulación de la excitabilidad en el hipocampo (Bender y cols., 2012).

## 1.2 Epilepsia Generalizada con Ataques Febriles (GEFS).

Wallace y cols., mostraron en 1998, por primera vez, que una mutación (C121W) en subunidades accesorias del canal de sodio, produce una patología en el sistema nervioso central. Los autores registraron ovocitos de *X. laevis* donde coexpresaron el mutante C121W de  $\beta 1$  junto con la subunidad  $\alpha$  de Nav1.2 y encontraron que se había perdido la típica aceleración de la corriente mediada por  $\beta 1$ , es decir, el registro de corriente es descrito como virtualmente idéntico a la corriente generada por la subunidad  $\alpha$  por sí sola, lo que implicaría que esta substitución de triptófano por cisteína (en el sitio 121), da lugar a un cambio estructural que impide que la subunidad  $\beta 1$  acelere la inactivación y recuperación de la corriente  $I_{Na}$ . Sin embargo, no se determinó si este mutante de  $\beta 1$  se encuentra asociado a la subunidad  $\alpha$  o si quiera se encuentra insertada en membrana (Isom, 2001).

Sin embargo Meadows y cols., más tarde, proponen que la mutación C121W no destruye completamente los determinantes requeridos para la modulación del canal, sino

que solo disminuye la eficacia de la modulación funcional de  $\beta 1$ , debido a la disminución de la afinidad de  $\beta 1$  a la subunidad  $\alpha$  del canal rNav1.2 $\alpha$ , ya que ellos encuentran que el mutante puede modular completamente la corriente si se co-transfecta 100 veces la cantidad de RNA que el gen nativo de  $\beta 1$  requiere para modular la corriente (Meadows y cols., 2002).

Estos investigadores argumenta que la pérdida de la modulación funcional de la subunidad  $\beta 1$  a causa de la mutación C121W, incrementa la disponibilidad de canales a potenciales de membrana hiperpolarizantes, reduce el *rundown* dependiente de estimulaciones de alta frecuencia de los canales, sin afectar el curso temporal ni la dependencia de voltaje de activación. Y aunque esta mutación no disminuye la inserción de canales en membrana, si reduce los niveles de agregación celular (Meadows y cols., 2002).

Dos aminoácidos en el dominio extracelular de  $\beta 1$ : R85 y C121, están asociados a epilepsia familiar. Las mutaciones R85C y R85H en el dominio extracelular inmunoglobulínico de  $\beta 1$  han sido identificadas en individuos de dos familias con epilepsia generalizada con ataques febriles (GEFS+); Xu y cols., reportan en este estudio, que R85C da como resultado una pérdida total de función en la modulación de los canales de sodio de humano (hNav1.2) co-expresados en células HEK293T, mientras que R85H cambia la dependencia de voltaje de estado estable de inactivación lenta, sin tener efecto en las cinéticas. Ambas mutaciones parecen no tener efecto sobre la cinética rápida de la subunidad  $\alpha$ , sin embargo afectan la inactivación lenta del canal hNav1.2 (Xu y cols., 2007).

### 1.3 Otras patologías asociadas a las subunidades $\beta$ .

Además de la epilepsia GEFS+, las subunidades accesorias del canal de sodio, han sido vinculadas a una serie de canalopatías. Por ejemplo, todas las subunidades  $\beta$ , presentan sitios de corte extracelulares para la secretasa BACE1, la cual es responsable de la producción del péptido amiloide A $\beta$ , central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. La expresión de ésta enzima se incrementa en respuesta al envejecimiento y a eventos estresantes y sus niveles en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer, se correlacionan con la severidad de los déficits cognitivos. (Evin y cols., 2010).

El procesamiento de Nav $\beta 2$  por BACE1 y la secretasa- $\gamma$ , regula el metabolismo del canal de sodio en células neuronales. El corte de esta secretasa, genera una forma de subunidad  $\beta$  soluble que contiene el dominio inmunoglobulínico, éste es capaz de inducir el crecimiento de neuritas de células granulosas de cerebelo *in vitro* (Brackenbury e Isom, 2008). Subsecuentemente las subunidades  $\beta$  pueden ser cortadas por presenilina-1 y/o presenilina-2 en el complejo de secretasa- $\gamma$ , liberando su dominio intracelular; en particular, se ha sugerido que el dominio intracelular de  $\beta 2$  podría regular la transcripción de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio (Brackenbury e Isom, 2008).

En el modelo experimental encefalomiелitis alérgica para esclerosis múltiple, la supervivencia aumenta en ratones *knock-out* de *Scn2b* (gen de  $\beta 2$ ), como resultado de la disminución de la regulación a la baja de Nav1.2 en respuesta a la demielinización (O'Malley e Isom, 2006).

Los canales de sodio dependientes de voltaje se han descrito en varias líneas celulares cancerígenas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Éstos potencian procesos involucrados en metástasis, como la migración e invasión. Se ha detectado DNAm de *Scn1B*, *Scn2B* y

*Scn4B* en líneas celulares humanas de cáncer de próstata y de pecho (Brackenbury e Isom, 2008). Mediante DNA de interferencia se ha podido disminuir los niveles de SCN1B/ $\beta$ 1 en células metastásicas MCF-7 lo que resulta en una reducción de la adhesión y migración celular, postulando a  $\beta$ 1 como un controlador de la migración de células de cáncer de mama a través de interacciones de adhesión celular (Isom, 2001). Además se ha sugerido que la detección de *Scn1B*/ $\beta$ 1 podría servir como un marcador de la transición al fenotipo metastásico en cáncer de mama (Brackenbury e Isom, 2008).

Hernandez-Plata y cols., han reportado la expresión funcional de canales de sodio en células de biopsias de cáncer cervical (CaC). En particular se encontraron altos niveles de RNAm de la isoforma Nav1.6 y la subunidad  $\beta$ 1. El bloqueo por las toxinas TTX y Cn2 (específica para Nav1.6) no afectó la proliferación ni la migración de éstas células, pero redujo la invasividad en un 20% en ensayos *in vitro* de cultivos primarios (Hernandez-Plata y cols., 2012).

El DNAm para el gen *Scn4B* se encuentra disminuido en cerebro en la enfermedad de Huntington, debido a que la subunidad  $\beta$ 4 promueve procesos de neurogénesis (neuritas y densidad dendríticas), su regulación a la baja, podría relacionarse a la neurodegeneración característica del Huntington. La ausencia o pérdida génica de  $\beta$ 4, podría constituir un marcador pronóstico para ésta enfermedad (Isom, 2001).

Makita N. y cols., han observado que la presencia de  $\beta$ 1 modifica el voltaje medio de activación y acelera la recuperación de la inactivación del canal mutante T1620M de Nav1.5. Ésta mutación, está asociada a la fibrilación ventricular idiopática (IVF), específicamente constituye una de las 3 mutaciones del gen *Scn5* que se han encontrado en el síndrome de Brugada, descrito por primera vez en 1992, el cual, es diagnosticable mediante un electrocardiograma y puede ser atribuido a una repolarización temprana, en áreas despolarizadas del ventrículo derecho o a anomalías focales en la conducción del ventrículo derecho. La mutación T1620M se localiza en un asa extracelular entre el segmento S3 y S4 del dominio IV (DIV/S3-S4) y en ovocitos de *X. laevis* produce un cambio en la dependencia de voltaje del estado estable de la inactivación hacia potenciales despolarizantes y una aceleración de la recuperación de la inactivación del 20 al 30% (Makita y cols., 2000). Watanabe y cols., encontraron, en pacientes con fibrilación auricular, otras dos mutaciones en la subunidad  $\beta$ 1, R85H, D153N; estas mutaciones se encuentran en sitios altamente conservados entre mamíferos. R85H al co-expresarse con la isoforma Nav1.5 aumentan el voltaje medio de activación y disminuye el de inactivación de estado estable (Watanabe y cols., 2009).

La mutación E87Q se encontró en una línea familiar Turca asociada al síndrome de Brugada, una canalopatía caracterizada por fibrilación ventricular y ligada a muerte cardíaca súbita (Watanabe y cols., 2008).

#### 1.4. Toxinas $\alpha$ de Escorpión.

De las 600 especies de escorpiones, destacan los de la familia Buthinae por la toxicidad de los péptidos que sintetizan. Éstos poseen de 60 a 80 aminoácidos que poseen alta afinidad por los canales de sodio, la cual se correlaciona con su potencial toxicológico. Esta unión específica, al interferir con la fase despolarizante rápida del potencial de acción en neuronas y músculos, provoca parálisis. La toxina Lqh $\alpha$ IT del escorpión (en *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, pueden ocasionar la muerte de un animal por arritmia y parálisis, al desacelerar la inactivación rápida de los canales de sodio prolongando el potencial de acción de las células excitables (Gonoi y cols. 1984; Upadhyay, 2003).

De todas las drogas y ligandos que modifican la cinética del canal de sodio, cabe mencionar el caso de las toxinas peptídicas  $\alpha$  del veneno de escorpión, ya que del mismo modo que la subunidad  $\beta$ 1, su sitio de unión es extracelular y su efecto (aunque opuesto) es sobre la inactivación rápida. Su unión al sitio receptor es dependiente del voltaje, por lo que su asociación molecular está relacionada con el cambio conformacional que ocurre durante la activación dependiente de voltaje, involucrando el segmento transmembrana sensor de voltaje o alguna estructura de compuerta del canal (Salceda y Ortega, 2009).

Cabe mencionar que aunque las toxinas de anémona, generalmente más pequeñas, no guardan relación estructural (no son homólogas) con las toxinas  $\alpha$  de escorpión, ambos tipos de toxinas se unen al sitio 3, en la superficie extracelular del canal de sodio. Estas tienen propiedades farmacológicas similares y se desplazan recíprocamente del sitio de unión (Salceda y Ortega, 2009). Dicho lo anterior, destaca el hecho de que existen residuos básicos en ambas toxinas que resultan determinantes para su unión con el canal, la cual es dependiente de voltaje y cuya afinidad disminuye durante la despolarización (Rogers y cols., 1996; Upadhyay y cols., 2003).

En la unión de la toxina  $\alpha$  de escorpión y la de anémona marina participan aminoácidos del asa extracelular S3-S4 del dominio IV, particularmente algunos residuos en el segmento IVS3, contribuyen a la diferencia de afinidad de la unión de la toxina  $\alpha$  con la isoforma cardíaca y neuronal del canal de sodio. También se sugiere que esta región es importante para el acople de la activación con la inactivación rápida del canal, debido a que se cree que ambas toxinas se unen a un sitio receptor extracelular, fijando el canal en una posición en la cual es posible su activación, más no su inactivación rápida (Rogers y cols., 1996).

Lo que parece ocurrir, teóricamente es que durante la despolarización, cuando los segmentos S4 de la subunidad  $\alpha$  del canal se desplazan hacia el espacio extracelular, las toxinas de este grupo son atraídas electrostáticamente al asa IVS3-S4, formando interacciones con los residuos E1613 de los canales de sodio de neuronas de cerebro de rata, D1612 en los canales de células cardíacas, y D1428 en los canales de sodio de músculo esquelético (Rogers y cols., 1996).

Schnur y cols., (2008) han identificado algunos de los determinantes moleculares que caracterizan la unión de la toxina Lqh $\alpha$ IT al canal de sodio de insecto Nav-para por medio de análisis de resonancia magnética nuclear (NMR), a partir de la unión de la neurotoxina  $\alpha$  con péptidos aislados derivados de la secuencia del asa extracelular S3-S4 del dominio IV (DIVS3-S4) que corresponden al sitio receptor 3 en mamíferos. (Schnur y cols., 2008).

## 1.5 Planteamiento del problema.

Las subunidades  $\beta$  de los canales de sodio dependientes de voltaje intervienen en procesos celulares como la excitabilidad eléctrica, la adhesión celular, la transcripción y la migración. Además, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central, en procesos de plasticidad y en patologías como la epilepsia, arritmias cardíacas, nocicepción y cáncer (Brackenbury & Isom, 2008).

La evidencia acumulada hasta el momento indica que la subunidad  $\beta 1$  modula la corriente de sodio interactuando extracelularmente (Qu y cols 1999; Zimmer y Bendorf 2002). Mediante esta asociación molecular la subunidad  $\beta 1$  modifica la cinética y la sensibilidad a voltaje del canal, en particular acelera la inactivación y recuperación de la inactivación y cambia la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes en canales Nav1.4 (Wallner y cols., 1993) (figura 5).

Resulta necesario conocer a detalle los determinantes moleculares de dicha asociación funcional, ya que hasta el momento solo se ha implicado una triada ácida (ExDxD) en el dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$ , la neutralización de estos 3 aminoácidos reduce la fracción de canales que inactivan de forma rápida en un 22% (McCormick y cols., 1999). También se ha implicado la participación de las asas extracelulares del dominio IV de la subunidad  $\alpha$  (Qu y cols. 1999) (figura 1).

Por medio de modelaje molecular por homología y análisis bioinformáticos se propone identificar residuos que participen fundamentalmente en la modulación de la corriente de sodio que la subunidad  $\beta 1$  ejerce sobre la subunidad  $\alpha$ .

## 2. Justificación.

Debido a la modulación que ejerce la subunidad  $\beta 1$  sobre la corriente de sodio al interactuar extracelularmente con la subunidad  $\alpha$ , el estudio de los determinantes moleculares de dicha interacción, así como sus repercusiones electrofisiológicas, podrían tener implicaciones importantes en el entendimiento de los procesos fisiológicos y patologías asociadas a los canales de sodio.

Actualmente se desconoce el sitio de unión entre estas subunidades y aunque existen ciertos indicios de dominios y aminoácidos que pudieran intervenir en la interface  $\alpha$ - $\beta 1$ , los reportes en la literatura son escasos y la principal evidencia de los principios que gobiernan esta interacción no han avanzado en 14 años (McCormick y cols., 1999; Brackenbury e Isom, 2001).

Ya que hasta el momento no se ha cristalizado ninguna subunidad accesoria  $\beta$ , proponemos un modelo por homología, a escala atómica de  $\beta 1$  con el fin de estudiar las bases moleculares de la interacción funcional Nav1.4- $\beta 1$ .

## 3. Hipótesis.

Los residuos identificados por medio de métodos computacionales durante el desarrollo del presente trabajo en la subunidad  $\beta 1$  contribuyen fundamentalmente a la modulación electrofisiológica que esta proteína ejerce sobre el canal de sodio.

## 4. Objetivos generales.

- 1) Generar y validar modelos estructurales a resolución atómica de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  del canal de sodio.
- 2) Identificar los sitios de relevancia funcional por los cuales la subunidad  $\beta 1$  es capaz de interactuar con la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio.
- 3) Describir los posibles determinantes moleculares de la interacción  $\alpha$ - $\beta 1$  que subyacen a la modulación que ejerce  $\beta 1$  sobre la corriente de sodio.

## 5. Objetivos particulares.

1. Generar modelos estructurales de las subunidades del canal de sodio.
  - 1.1 Extender el modelo 3D a escala atómica de la subunidad  $\alpha$  del poro del canal, modelando los segmentos S5 transmembranales para tener los puntos de anclaje donde se insertan las asas extracelulares de ésta subunidad.
  - 1.2 Evaluar el modelo de la subunidad  $\alpha$  con respecto a las últimas estructuras cristalizadas del canal de sodio (e.g NavAb).
  - 1.3 Generar un modelo por homología a resolución atómica de la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio y evaluar cuantitativamente el modelo en base a parámetros de calidad.
  - 1.4 Calcular y analizar las características estructurales y fisicoquímicas del modelo de  $\beta 1$  y evaluar los cambios producidos por mutantes de ésta subunidad.
2. Elucidar los sitios de mayor probabilidad de contacto (interface proteica) entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$ .
  - 2.1 Realizar análisis bioinformáticos, filogenéticos y basados en estructura secundaria para identificar los sitios de asociación molecular más probables.
  - 2.2 Diseñar y generar mutaciones *in silico* en el modelo de la subunidad  $\beta 1$ .
  - 2.3 Explorar el espacio conformacional, los cambios estructurales y fisicoquímicos de cada residuo nativo y mutante mediante simulaciones computacionales por métodos de mecánica molecular.
3. Generar, expresar y registrar las mutaciones de los residuos en la subunidad  $\beta 1$  que interfieran o irrumpan la asociación funcional.
  - 3.1 Generar mutantes puntuales por reacción de PCR.
  - 3.2 Expresar los canales nativos Nav1.4 con y sin la subunidad  $\beta 1$  y sus mutantes en ovocitos de *Xenopus laevis*.
  - 3.3 Registrar las corrientes de sodio de los canales nativos y mutantes aplicando los protocolos electrofisiológicos pertinentes para estudiar la relación corriente-voltaje, la conductancia, la dependencia del voltaje de activación e inactivación de estado estable, la inactivación, la recuperación de la inactivación y la dependencia de uso de canales nativos y mutantes, con el fin de diseccionar el efecto funcional del cambio estructural de cada mutación.

## 6. Material y Métodos.

### 6.1 Predicción de Estructura Secundaria.

Con el objetivo de ubicar la disposición relativa de los aminoácidos de las subunidades con respecto a la membrana celular, se efectuó el análisis de hidropatía de las secuencias de rNav1.4 y rβ1 mediante el software MPex 3.2 (Snider y cols., 2009) (apéndice 12.2). Mediante el programa AGADIR se evaluó la predisposición específica de cada residuo, (tomando en cuenta su posición en la cadena) para constituir parte de un segmento helicoidal, el cual además predice la localización de “giros conformacionales” o cambios de dirección en la elongación de la cadena polipeptídica (Petukhov y cols., 2002).

### 6.2 Análisis Bioinformático.

Se empleó un alineamiento interespecífico múltiple de la subunidad β1 para identificar dominios altamente conservados que podrían estar críticamente relacionados con la modulación de los canales de sodio dependientes de voltaje. Considerando que las secuencias de β1 en vertebrados son ortólogos y existe evidencia que sugiere que los efectos moduladores están conservados entre especies (Chopra y col., 2007). Los alineamientos fueron obtenidos mediante varios algoritmos (ver apéndice 12.1) y los mejores puntajes fueron obtenidos con MUSCLE (Edgar, 2004) y el método de alineamiento tridimensional Smith-Waterman de matriz BLOSUM-62 con 30% de peso a las similitudes de estructura secundaria (Smith and Waterman 1981). Con el propósito de comparar las secuencias de diferentes especies del canal de sodio se construyeron fenogramas mediante el método NJ en el paquete de software VEGA ZZ 2.3.2 (Pedretti y cols., 2004).

### 6.3 Modelaje por Homología.

Varios modelos atómicos de β1 fueron generados y comparados estructuralmente. Para este propósito, se hizo uso de modelaje por homología automatizado parcial y total mediante 3 acercamientos: I-TASSER (Zhang 2008), Geno3D (Combet et al., 2002) y CPHmodels-3.0 (Nielsen et al., 2010). El refinamiento y optimización energética se realizó con VEGA ZZ 2.3.2 (Pedretti et al., 2004) y Chimera UCSF (Meng et al., 2006). La calidad estereoquímica de los modelos fue evaluada por el servidor VADAR (Willard y cols., 2003) y QMEAN (Benkert y cols., 2009).

### 6.4 Cálculo de Potenciales Electroestáticos.

La superficie de potencial electrostático fue calculada con Chimera UCSF bajo el campo de fuerza AMBER ilustrado con la escala de colores de Coulomb mediante la ecuación:

$$\varphi = \sum \left[ \frac{q_i}{\epsilon * d_i} \right]$$

, donde  $\varphi$  es el potencial (que varía en el espacio),  $q$  son las cargas atómicas parciales,  $d$  es la distancia de los átomos  $i$  y  $\epsilon$  la constante dieléctrica dependiente de distancia, e.g.  $\epsilon = 4$  para representar el efecto del medio o solvente.

Las propiedades electrostáticas de las cavidades de posible unión a las proteínas fueron calculadas mediante Fpocket VEGA ZZ 2.3.2 (Le Guilloux y cols., 2009).

### 6.5 Predicción de sitios de glicosilación.

La probabilidad de N-glicosilación de los 4 sitios potenciales en la subunidad  $\beta 1$  fue calculada mediante el servidor NetNGlyc 1.0 (Gupta y cols., 2004).

### 6.6 Anclaje molecular de proteínas.

La simulación de *docking* rígido proteína-proteína de los monómeros de  $\beta 1$  fue realizado con el software Hex 6.1 (Ritchie y Venkatraman 2010).

### 6.7 Electroforesis y mutagénesis puntual.

El DNAc de rNav1.4 clonado en el vector pGW1H fue proporcionado gentilmente por Eduardo Marbán (Universidad de John Hopkins) y el plásmido pGEMHEnew, en el que se encuentra clonado el gen SCN1B que codifica para la subunidad  $\beta 1$  fue proporcionado por Thomas Zimmer (Universidad Friedrich Schiller, Jena).

Se efectuó una digestión enzimática de una muestra del plásmido pGEMHEnew, a 37°C por 90 minutos con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Se agregó 0.6  $\mu\text{L}$  de enzima, 2  $\mu\text{L}$  de DNA, 6.4  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de búfer, (a una concentración de 0.334 ng/ $\mu\text{L}$ ). Posteriormente, una muestra de ambos productos de digestión se corrió en un gel de agarosa del 1% por electroforesis.

El diseño de los oligonucleótidos para la generación de los mutantes fue realizado mediante la herramienta en línea *Oligo Analyzer* de *Integrated DNA Technologies, Inc.* Los oligonucleótidos diseñados fueron mandados a sintetizar y una vez hidratados (1:10 2  $\mu\text{L}$ ), con el fin de corroborar la concentración a la que se encuentra cada oligo y ajustar la cantidad que se usará de cada uno para la reacción de PCR se realizó un corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se colocaron dos muestras de éstos, a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 100ng/ $\mu\text{L}$ , junto con una muestra del gen SCN1B de rata que codifica para la subunidad del canal de sodio  $r\beta 1$  (33.4 ng/ $\mu\text{L}$ ).

Las mutaciones fueron generadas mediante el kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange® II. Para la reacción de PCR se utilizó 5  $\mu\text{L}$  de búfer 10X, 1.2  $\mu\text{L}$  de DNA, 1.5  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido sentido y 1.5  $\mu\text{L}$  antisentido, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 3  $\mu\text{L}$  solución QuickSol, 34.8  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O y 1  $\mu\text{L}$  pfuUltra DNA polimerasa.

Después de aplicar los ciclos de desnaturalización del DNA plantilla, hibridación de los oligonucleótidos que contienen la mutación y elongación por la polimerasa, se realizó la digestión de la plantilla de DNA (secuencia nativa) la cual al estar metilada es reconocida y degradada por la enzima Dpn I.

El producto de PCR es posteriormente transformado en bacterias ultracompetentes para ser ligado (*nick repair*) y multiplicado. El proceso de transformación se realizó por choque térmico (10  $\mu\text{L}$  DNA, 90  $\mu\text{L}$  de TCM) seguido de una centrifugación y la siembra de 1, 10 y 100  $\mu\text{L}$  de bacterias en medio LB con ampicilina. Debido a que la cepa bacteriana es

vulnerable a ampicilina, únicamente las bacterias que han incorporado y expresado exitosamente el plásmido pGEMHEnew, (el cual confiere resistencia a ampicilina) crecerán en el medio, éstas son congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente a una muestra de bacterias transformadas se le fue extraído el vector que contiene la secuencia del mutante R89A, mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit de purificación de plásmido HiSpeed® de Qiagen. Las bacterias son lisadas con hidróxido de sodio, el producto es filtrado en columnas donde se une únicamente el DNA, el cual se precipita finalmente con isopropanol.

Con el fin de corroborar que los efectos de la proteína mutante sobre el canal se debieran exclusivamente a la substitución puntual diseñada de la subunidad  $\beta 1$ , se mandó a secuenciar el producto de PCR de mutagénesis (el plásmido donde se encuentra clonada la proteína mutante) en el Instituto de Biotecnología UNAM campus Cuernavaca.

### **6.8 Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana.**

La rana *Xenopus laevis* (*Xenopus* 1; Ann Arbor, MI. USA) es anestesiada por inmersión (30 minutos) en una solución de Tricaína (0.2% de ácido 3-aminobenzoico etil-ester [tricaína; Sigma Chemical Co., St Louis, MO]); una vez anestesiada se somete a una cirugía abdominal para obtener los lóbulos ováricos que contienen a los ovocitos. Se realiza una pequeña incisión de  $\sim 3$  mm en el abdomen, se remueven secciones de los lóbulos ováricos cortando porciones pequeñas de  $\sim 1$  cm, colocándolos en una caja Petri conteniendo solución OR-2.

Durante todo el transcurso de la cirugía la rana es mantenida en una cama fría y constantemente humectada con solución OR-2. Los lóbulos ováricos se colocan en tubos de ensayo que contienen colagenasa disuelta en solución OR-2 (tipo 1A Sigma, 1.3 mg/ml). Se realizan tres periodos de agitación mecánica (en forma orbital) dos periodos de 30 min y uno de 15 min con lavado (solución OR-2) y cambio de solución enzimática entre los periodos. Dicho proceso permite separar a los ovocitos de los lóbulos ováricos y remover el tejido folicular que recubre a cada ovocito. Después de la digestión enzimática los ovocitos son colocados en una caja Petri con solución ND-96. Se lava 3 veces para remover la solución OR-2.

Se seleccionan sólo los ovocitos que tienen una forma esférica bien definida con una división clara entre ambos polos (animal y vegetal), y con un diámetro  $\sim 1$  mm (diámetro que corresponde a los estadios V y VI, ovocitos maduros). Se utiliza DNAc debido a la facilidad de la técnica y a los resultados óptimos que se obtienen con su aplicación. Para la transfección del DNAc se utiliza la técnica de inyección intranuclear empleando un microinyector automático (Nanoliter 2000 Pump-head y Micro4™ pump controller, WPI, Sarasota, FL. USA). Un volumen total de aproximadamente 282ng/ $\mu\text{l}$  que contiene el DNAc de la subunidad Nav1.4, subclonado en el vector pGW1H (British Biotechnology), se diluyen 5 $\mu\text{l}$  de agua estéril inyectable y se inyectan de 25 a 30nl en cada ovocito seleccionado.

El canal Nav1.4 es co-expresado con la subunidad  $\beta 1$  de cerebro de rata o cada uno de sus mutantes (proporción 1:5). Usando este procedimiento se estima que la cantidad de DNAc inyectada es suficiente para que se expresen suficientes subunidades  $\beta 1$ , para que la mayoría de las subunidades  $\alpha$  expresadas se encuentren asociadas con una subunidad  $\beta 1$  (Isom y cols., 1992; Nuss y cols., 1995). La subunidad  $\alpha$  produce un canal funcional, atribuyéndole las propiedades cinéticas de activación e inactivación del canal de sodio, pero

la deficiencia de la subunidad  $\beta 1$  en ovocitos produce un cambio significativo en la cinética del canal de sodio (Nuss y cols., 1995). Posteriormente los ovocitos son incubados en la solución ND-96 durante un periodo de 24 hrs a 18°C.

### **6.9 Registro electrofisiológico.**

Los registros de fijación de voltaje se desarrollan en ovocitos de 1 a 4 días posteriores a la inyección a temperatura ambiente (22-23°C) utilizando la técnica de doble microelectrodo; para el registro de la corriente de sodio se utiliza un amplificador Warner OC -725C (Warner Instrument Corp., Hamden, CT. USA) el cual es comandado utilizando el programa pClamp8 (Axon Instrument, Union City, CA. USA). La solución de registro es perfundida utilizando un sistema de perfusión (Val404®, CIDES Tecnología, México). Para minimizar los errores en el control de la fijación de voltaje solamente se utilizan ovocitos con corrientes de fuga mínimas ( $\leq 0.1 \mu\text{A}$ ) y las corrientes capacitivas se compensan manualmente. Los electrodos (TW120F-6, WPI, Sarasota, FL. USA) se llenan con KCl 3M, de una resistencia final de 0.5 a 0.8 M $\Omega$  (Schreibmayer y cols., 1994).

### **6.10 Soluciones.**

- Solución OR-2 (en mM): NaCl 82.5; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5, para la digestión enzimática se adicionó colagenasa 1.3 mg/ml (tipo 1A, Sigma), pH 7.6 (Li y cols., 1999).
- Solución ND-96 (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 1.8; HEPES 5; ácido pirúvico 5; teofilina 0.5; gentamicina 50  $\mu\text{g/ml}$ , pH 7.6
- Solución para registro (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1; BaCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5, pH 7.6.

### **6.11 Protocolos experimentales y análisis de datos.**

Para generar la corriente de sodio en el ovocito se aplica un protocolo de pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV hasta +50 mV en incrementos de 10 mV con una duración de 30 ms. Para construir la relación corriente contra voltaje se mide la magnitud del pico de la corriente generada en cada paso de voltaje y se normaliza contra el pico máximo de la corriente obtenida en condiciones control; estos valores son graficados en función del potencial de membrana.

Para analizar el efecto de inactivación en estado estacionario se emplea un protocolo convencional de doble pulso. Este protocolo parte de un potencial de sostenimiento de -100 mV y se aplican pulsos condicionantes con duración de 1s de -120 a +20 mV con incrementos de 10 mV, cada pulso es seguido por un retorno al potencial de sostenimiento durante 2 ms y posteriormente se aplica el pulso de prueba a -20 mV con duración de 25 ms. Para obtener la relación de estado estable se mide la magnitud del pico de la corriente generada por el pulso de prueba, y se grafica en función del potencial de membrana del pulso condicionante; los datos normalizados son ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann,

$$I_{norm} = \frac{1}{1 + e^{\left[ \frac{V - V_{1/2}}{dx} \right]}} + A$$

, donde  $V_{1/2}$  es el voltaje medio de inactivación,  $dx$  es la pendiente,  $A$  es el componente lineal residual. La conductancia del sodio ( $g_{Na}$ ) se calcula a partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje. Mediante la ecuación:

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{E_m - E_{eq}}$$

, donde  $g_{Na}$  es la conductancia de membrana al sodio,  $I_{Na}$  es el pico de corriente correspondiente a cada valor del potencial de membrana  $E_m$ , y  $E_{eq}$  es el potencial de equilibrio del sodio (cuyo valor teórico es de +40 mV). Los datos obtenidos son normalizados con respecto a la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) y ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann. El curso temporal de inactivación al pico de corriente (a un voltaje de -20mV para canales Nav1.4) fue ajustado a una ecuación monoexponencial:

$$y = A1 \cdot e^{\left( \frac{-x}{\tau} \right)} + y0$$

, donde  $A1$  es la fracción relativa de corriente que inactiva con una constante de tiempo  $\tau$ ,  $x$  es el tiempo y  $y0$  es la amplitud del componente de estado estable.

La recuperación de la inactivación de la  $I_{Na}$  es estudiada utilizando un protocolo de doble pulso. En estos experimentos la  $I_{Na}$  es inactivada por la aplicación de un pulso condicionante de 500 ms a -20 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV y posteriormente se retorna al potencial de sostenimiento durante un periodo de tiempo variable ( $\Delta t$ ) antes de aplicar un segundo pulso (pulso de prueba) a -20 mV durante 20 ms. El curso temporal de la recuperación de la inactivación es determinado midiendo la relación de la amplitud de la  $I_{Na}$  generada durante la aplicación del pulso de prueba entre la magnitud de la  $I_{Na}$  generada durante la aplicación del pulso condicionante, esta relación es graficada en función del  $\Delta t$ . Los datos graficados son ajustados con una función exponencial doble

$$y = A_1 \cdot e^{\left[ \frac{-x}{\tau_1} \right]} + A_2 \cdot e^{\left[ \frac{-x}{\tau_2} \right]} + y0$$

, donde  $A_1$  y  $A_2$  son las fracciones relativas de corriente que inactivan con las constantes de tiempo  $\tau_1$  y  $\tau_2$  respectivamente,  $y0$  es la amplitud del componente de estado estable.

Todas las gráficas y ajustes se realizan utilizando los programas OriginPro7 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 8.02 y 9 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos los datos son presentados como  $\pm$  el error estándar de  $N$  experimentos. La significancia de la diferencia entre medias se calcula mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Considerándose estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ .

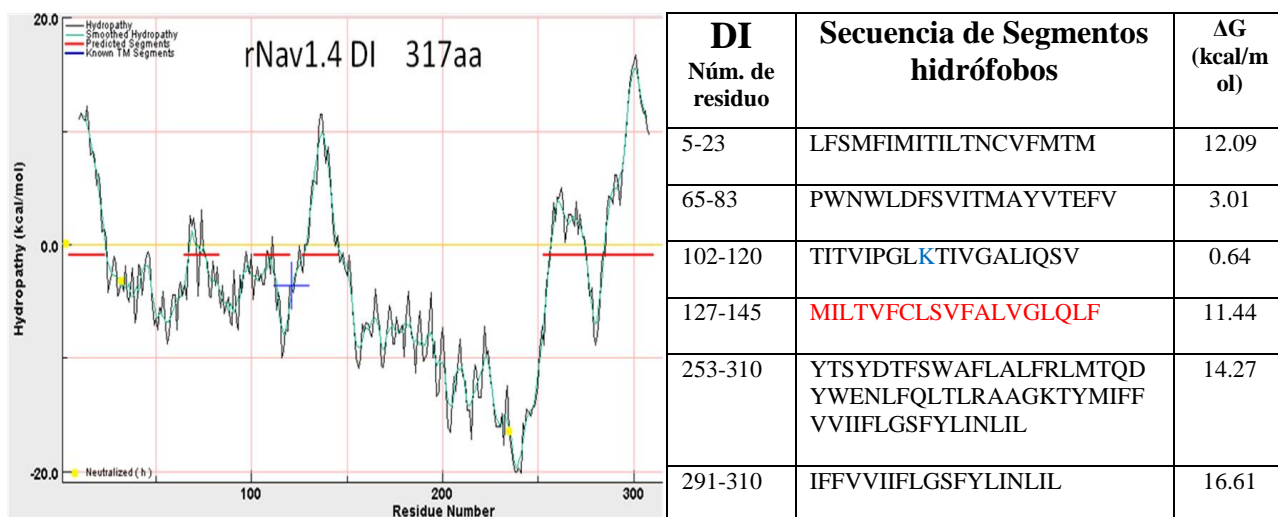
## 7. Resultados.

### 7.1 Extensión del modelo de la subunidad $\alpha$ .

El modelado de los segmentos S5 de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio, han permitido establecer los puntos de anclaje del total de las asas extracelulares, las cuales, según indica una línea de evidencia electrofisiológica, podrían estar implicadas en el establecimiento de una asociación molecular con la subunidad  $\beta 1$  (Makita y cols., 1996; Qu y cols., 1999).

#### 7.1.1 Inserción de dominios transmembrana: Identificación y modelaje de los segmentos S5.

La distribución de dominios extracelular, transmembrana e intracelular de la subunidad  $\alpha$  de la isoforma rNav1.4 depositados en las bases de datos (Uniprot, NCBI) (en específico del dominio IV), no coincide con publicaciones anteriores ni con el modelo 3D (Hille 2001; Scior 2009), por lo que se procedió a delimitarlos y definirlos. El resultado del análisis de hidropatía predice 6 segmentos transmembranales por dominio, la ubicación de dichas regiones son diferentes a las de la base de datos de NCBI. Con base a algoritmos de predicción de estructura secundaria, el grado de exposición al solvente y el índice de hidropatía, se definieron por consenso 4 secuencias helicoidales e hidrófobas que constituyen los segmentos transmembrana S5 de la subunidad  $\alpha$ . (Las asas que constituyen el vestíbulo extracelular del poro del canal unen a los segmentos S6 con el asa reentrante P y ésta asa con el S5 en cada dominio, (fig 6) (ver apéndice 11.2)



**Fig.6 Gráfica de hidropatía del dominio I del canal de sodio rNav1.4 (izquierda).** El cambio en la energía libre  $\Delta G$  al trasladar esta región de la proteína de una bicapa lipídica a un medio polar (agua) es graficado en función de la localización del amino ácido en la secuencia del dominio. Las líneas horizontales cerca del eje X (rojas) indican segmentos cuya inserción en membrana es la más termodinámicamente favorable. La tabla de la derecha reporta las secuencias de estos segmentos asociadas a su valor de  $\Delta G$ . En rojo la secuencia del segmento antepenúltimo que correspondería los segmentos S5.

La longitud de las secuencias de S5 fue restringida a 23 aminoácidos coincidiendo con la estructura molde original (canal de potasio MthK). Del mismo modo se definieron las longitudes y las secuencias de las 8 asas extracelulares (2 de cada dominio) del canal cuyas longitudes son de 110, 7, 21, 7, 31, 17, 18 y 28 aminoácidos.

Al considerar lo que se conoce del canal de sodio, es posible proponer una distribución plausible de sus residuos. Esta proteína es un heterotetrámero en el cual cada dominio posee 6 segmentos transmembrana (S1-S6), el cuarto de los cuales (S4), posee cargas positivas y constituye el sensor de voltaje por lo que su valor de  $\Delta G$  será menor, es decir precisaría menos energía al pasar a un medio polar que los demás segmentos transmembrana y es debido a esta propiedad que, durante despolarizaciones, los segmentos S4 aumentan su superficie expuesta hacia el lado extracelular. En cuanto al dominio I, MPex reconoce 4 segmentos hidrófobos de 19 aminoácidos y uno de 58, en este caso los residuos 102 a 120 con un valor de 0.64kcal/mol, constituiría la región donde se ubica el segmento S4. El último segmento es anormalmente largo, con una región intermedia que posee valores negativos de  $\Delta G$ , la cual constituiría la asa extracelular localizada entre el asa re-entrante P y el segmento S6 (ver fig 1). Por lo tanto se puede identificar al segmento transmembranal S5 con una secuencia MILTVFCLSVFALVGLQLF, la cual coincide con la secuencia propuesta para S5 en la base de datos NCBI (región: 252 a 274, secuencia: dvmiltvfc~~lsvfalv~~glqlfmg). La ubicación del S2, requeriría de un análisis más exhaustivo, ya que el sistema no sugiere la ubicación transmembranal de este segmento, que se encontraría entre los residuos 24 a 64 debido a que esta región es heterogéneamente polar y posee únicamente valores negativos de  $\Delta G$ .

Del mismo modo, para cada gráfica por dominio se identifican 2 asas extracelulares, i.e. regiones con un valor negativo de cambio de energía libre ubicadas entre el segmento transmembrana final S6 y el asa P re-entrante, el pico positivo de  $\Delta G$  anterior a estas regiones correspondería al segmento S5 y el pico positivo de  $\Delta G$  anterior a S5 deberá poseer un valor siempre menor, pero positivo de  $\Delta G$ , ya que pertenece al segmento sensor de voltaje (transmembranal pero rico en cargas positivas) S4. De tal forma que se observa un patrón de distribución en la localización de las asas extracelulares entre S5 y S6, i.e. siempre justo a los 150 residuos en dirección carboxilo terminal de las regiones que comprenden S5 según la base de datos NCBI (a partir del dominio II). (DIIS5 región: 756..778, secuencia: wietmwdcmevagqamcltvflm, DIIS5 región: 1215..1236, secuencia: nvkvnynvnglglyslqlqvaf, DIV región: 1535..1556, secuencia: lnpilnsgppdcdptlenpgtn). Este mismo análisis se efectuó para cada dominio de la secuencia del canal Nav1.4

Posterior a la ubicación de las regiones S5, se calculó por consenso, la estructura secundaria por aminoácido, con la finalidad de realizar un mejor alineamiento con la estructura molde MthK (pdb:1lnq), sobre la cual también se efectuó cada uno de los análisis. El potencial de contenido helicoidal del molde, debe coincidir con el de la proteína blanco, la cual se ubicará en diferentes regiones debido a que ésta, a diferencia del molde es un heterotetrámero.



modelo por campos de fuerza (CHARMM22\_prot) (3000 pasos de simulación Trust) a fin de evitar contactos estéricos y relajar repulsiones electrostáticas sin modificar innecesariamente las coordenadas originales del molde, de manera similar a estudios *in silico* previos sobre el canal de sodio (Scheib y cols., 2006).

### 7.1.2 Identificación de los posibles sitios de unión en la subunidad $\alpha$ .

Gracias al análisis de hidropatía y al depósito de información en la base de datos NCBI se identificaron las 8 asas próximas al poro del canal Nav1.4 (entre el segmento S5 Y S6) que podrían interactuar con la subunidad  $\beta$ 1 extracelularmente (tabla 2).

**Tabla 2.** Composición aminoacídica de las asas extracelulares del canal de sodio Nav1.4. En colores, la predicción de la estructura secundaria consenso de JPred. H.- predisposición a formar alfa hélices, E.- predicción a formar hojas beta.

Dominio/asa	Secuencia	Longitud (aa)	Carga+ No. of aa	Carga - No. of aa	Carga total	Pro	Gly	Hidrofóbicos (A,I,V,Y,W,F,M,L)
<b>DI/1</b>	MGNLRQKCVRWPPPMNDTNTT H-H---EEE----- WYGNDTWYSNDTWYGNDTWYI ----- NDTWNSQESWAGNSTFDWEAY ----- INDEGNFYFLEGSNDALLCGN ----- SSDAGHCPEGYECIKAGRPN -----EEEE----- YGYTS -----	110	6 (5.4%)	15(14%)	-9.9	5(4.5%)	11(10%)	35 (31.8%)
<b>DI/2</b>	LTLRAAG HHH---H	7	1(14.3%)	0 (0%)	0.9	0 (0%)	1(14.3%)	4(57.2%)
<b>DII/1</b>	GKSYKECVCKIASDCNLPRWH HH-----	21	5(23.8%)	2(9.5%)	2.1	1(4.8%)	1(4.8%)	6(28.5%)
<b>DII/2</b>	CMEVAGQ HHHH---	7	0(0%)	1(14.3%)	-1.1	0(0%)	1(14.3%)	3(42.8%)
<b>DIII/1</b>	ERFDISVVNNKSESESLMYTG -----EEEE----- QVRWMNVKVN -----	31	4(12.9%)	2(6.4%)	-0.1	0(0%)	1(3.2%)	12(38.7%)
<b>DIII/2</b>	AAVDSREKEEQPHYEVN HHH-----	17	3(17.6%)	5(29.4%)	-2.8	1(5.8%)	0(0%)	5(29.4%)
<b>DIV/1</b>	MSNFAYVKKESGIDDMFN HHHH-----	18	2(11.1%)	3(16.6%)	-1.1	0(0%)	2(11.1%)	6(33.3%)
<b>DIV/2</b>	PILNSGPPDCDPTLENPGTNV HHH----- RGDCGNP -----	28	1(3.6%)	4(14.3%)	-3.1	6 (21.4%)	4 (14.3%)	13 (46.4%)

Dos estudios previos con quimeras de los canales Nav1.5-Nav1.4 y Nav1.2-Nav1.5 han propuesto que las asas extracelulares del dominio I y del dominio IV son determinantes para la modulación funcional  $\alpha$ - $\beta$ 1 (Makita y cols., 1996; Qu y cols., 1999). Por lo tanto se procedió a comparar mediante alineamientos múltiples las secuencias de las asas DI/1 y DIV/2 en los canales que son modulados por la subunidad  $\beta$ 1. Como se puede apreciar en la figura 9, el asa DIV/2 se encuentra mucho más conservada entre las isoformas.

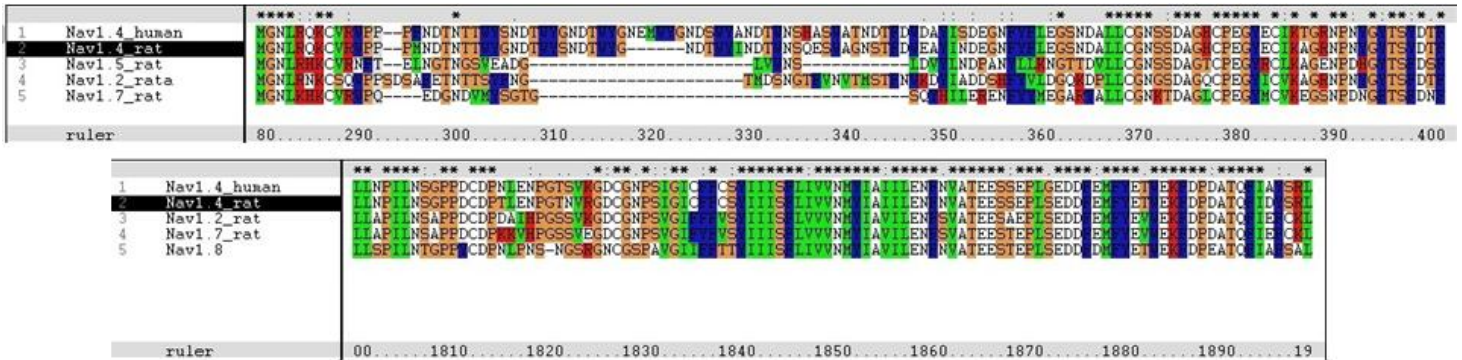


Fig 9. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de 2 asas extracelulares entre los segmentos transmembrana S5-S6. En el panel superior, el asa más próxima al segmento S5 del dominio I, denominada: DI/1 y en el panel inferior, el asa más próxima al segmento S6 del dominio IV, denominada DIV/2. Las secuencias corresponden a 5 isoformas de canales de sodio de rata y (Nav1.4 de humano). Generado por Clustal X en VEGA ZZ 2.3.2.

Debido a que las asas extracelulares del canal de sodio constituyen regiones intrínsecamente desordenadas, su modelaje requiere de otros métodos (analogía, *ab initio*, etc.). Se identificaron 4 posibles moldes de estructuras cristalizadas para modelar el asa DIV/2 de las subunidad  $\alpha$  Nav1.4, como se muestra en la figura 10. El alineamiento manual basado en los giros de las asas y la superposición tridimensional, muestra una buena correspondencia en los dominios de proteínas a pesar de su baja homología. La amilasa porcina (1kxq) posee un valor de RMSD (raíz cuadrada del cuadrado del promedio de la distancia entre los carbonos  $\alpha$  de los residuos alineados Å) de 0.5Å a lo largo de un alineamiento de 54 aminoácidos, con respecto a la amilasa humana (3blk). Además, la amilasa porcina posee un porcentaje de identidad de 28% con la región target del canal Nav1.4 (asa DIV/2).

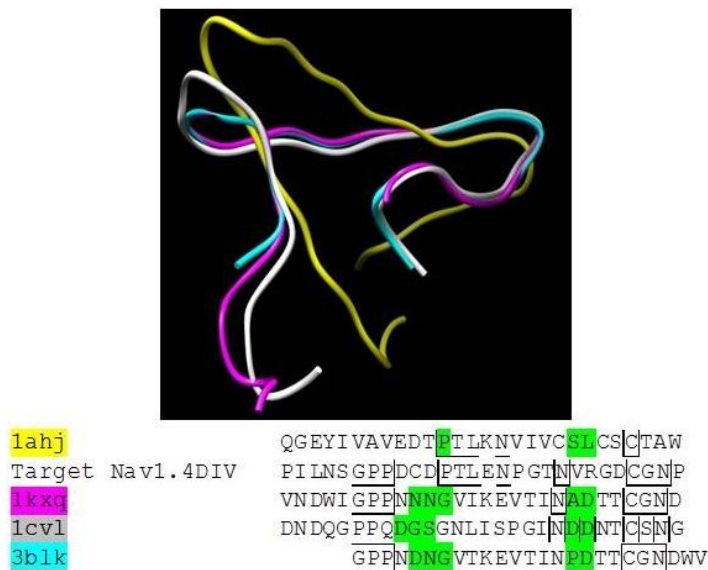
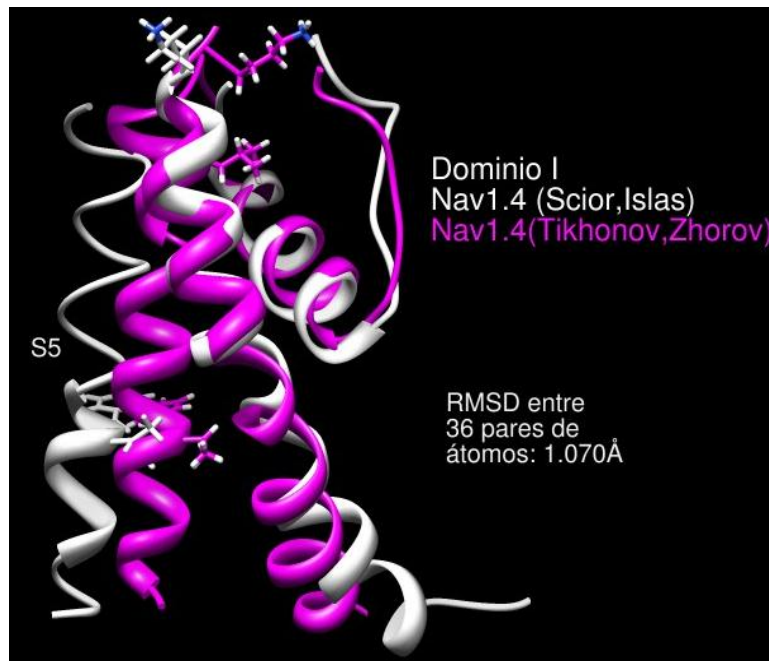


Fig 10. Superposición 3D y alineamiento de posibles moldes del asa extracelular del dominio DIV de Nav1.4. En el panel inferior se muestra el alineamiento manual de regiones estructuralmente análogas al asa DIV/2 del canal Nav1.4 en las 4 proteínas identificadas como posibles moldes. Los aminoácidos en verde constituyen los giros de cambio de dirección en la elongación de la cadena. Se distinguen los bordes de las regiones conservadas en las secuencias. En el panel superior se muestra la superposición tridimensional de las 4 regiones molde. En gris una lipasa bacteriana (PDB: 1clv), en magenta una amilasa porcina (PDB: 1kxq), en amarillo una nitril-hidratasa bacteriana (PDB: 1ahj), en azul una amilasa salival humana (PDB: 3blk).

### 7.1.3 Comparación del modelo Nav1.4 $\alpha$ con el canal bacterial NavAb.

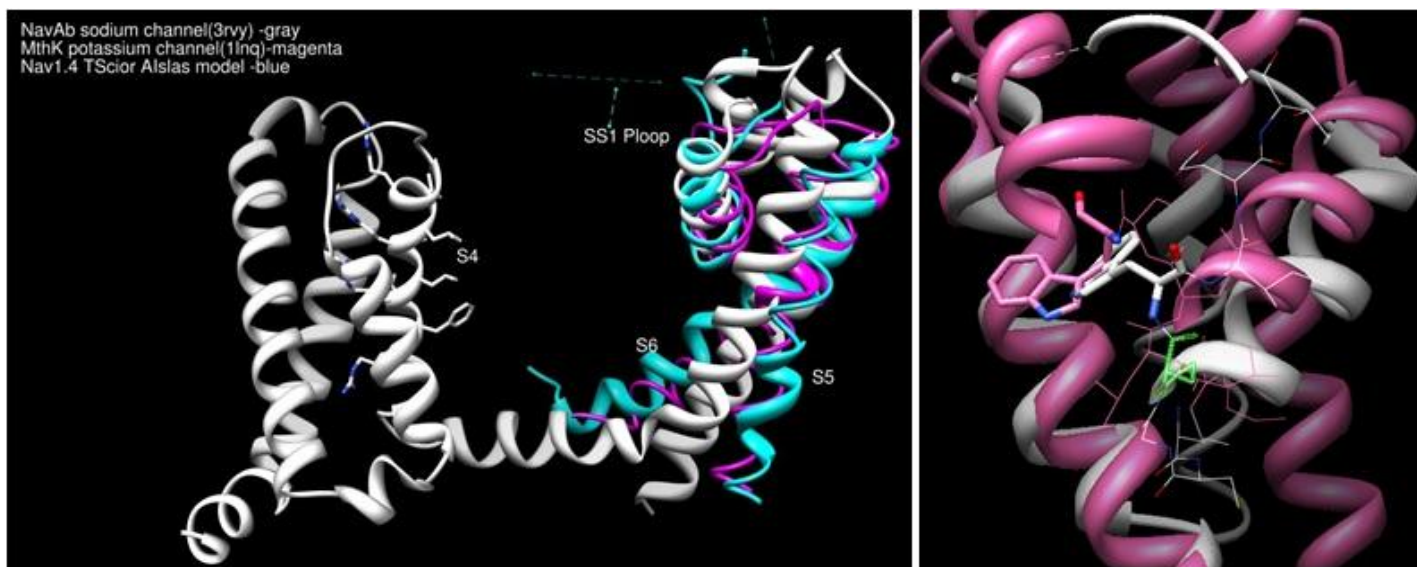
El modelo (en coordenadas 3D extensión: .pdb) de canal abierto desarrollado por Tikhonov y Zhorov (2005), fue proporcionado por los autores y fue comparado con los modelos desarrollados. Este modelo fue desarrollado a partir del mismo molde (canal de potasio bacterial MthK) y contiene los segmentos S5 de cada dominio unido al asa P y ésta a su vez unida al segmento S6 del canal de sodio, sin embargo las asas que unen los segmentos transmembranas no son las del canal de sodio (son las asas mucho más cortas del canal de potasio).



**Fig 11. Superposición del dominio DI del modelo de canal de sodio de Scior T (2009) con el propuesto por Tikhonov D B y Zhorov B S.** Aunque la orientación de algunas cadenas laterales difiere en algunos pares de residuos comparados en la figura, la desviación entre carbonos  $\alpha$  (expresada por la raíz cuadrada del cuadrado del promedio de la distancia) es de menos de 2 Å. Se efectuó un alineamiento tridimensional global (Needleman-Wunsch, con la matriz de puntaje BLOSUM-62) específico entre el segmento S6 y la asa P de cada modelo. Como se puede observar el modelo de Tikhonov y cols., las hélices transmembrana se encuentran a una menor distancia, en parte por la restricción de haber conservado las asas cortas del canal de potasio, a diferencia del modelo de Scior cuyas estructuras han sido relajadas por cálculo de campos de fuerza y las distancias corregidas para evitar solapamientos o contactos estéricos.

De particular interés resulta la comparación de la corona de triptófanos (W402C, W756C, W1239C, W1531A) en el vestíbulo extracelular del poro del canal Nav1.4, puesto que el triptófano 756, ubicado en el dominio II, ha sido identificado como el sitio de unión al agente animalárico primaquina, resultado de investigaciones realizadas en el laboratorio de biofísica del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla (Scior et al., 2010; Salinas-Stefanon et al., 2011).

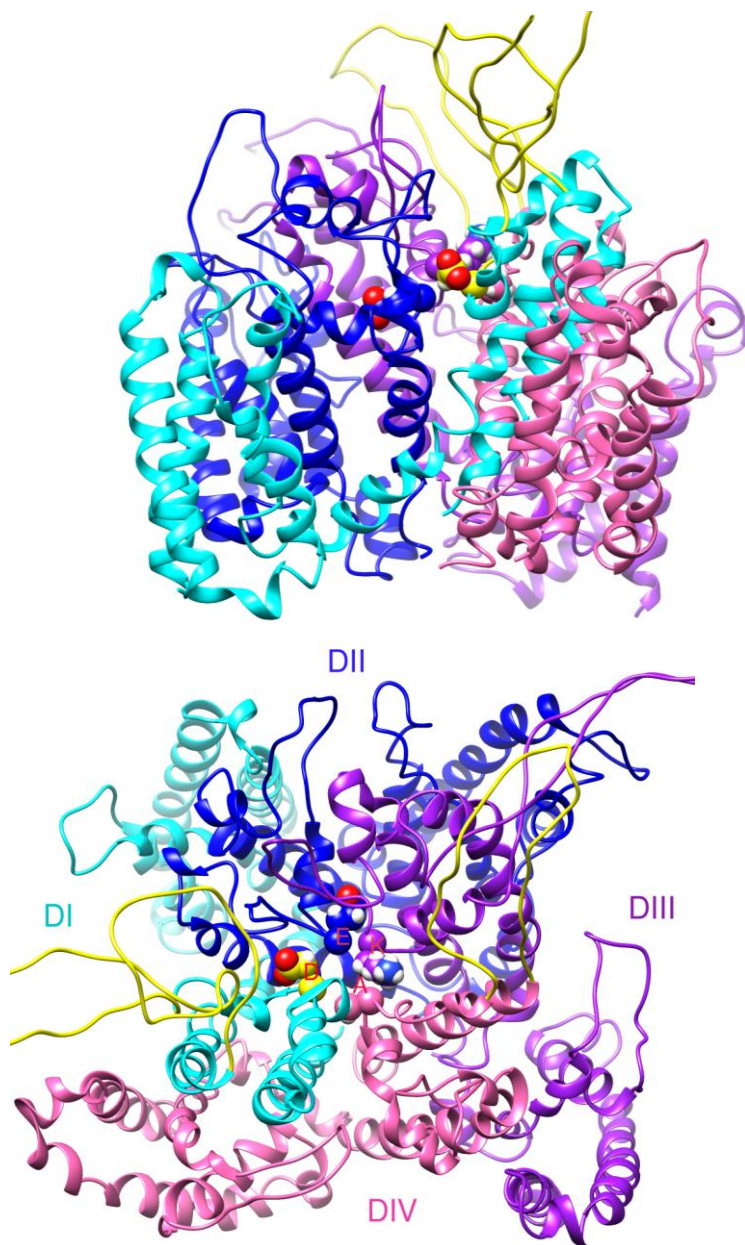
La superposición tridimensional de los dominios II del poro y filtro de selectividad (SS2-S6) del modelo de Nav1.4 con la estructura cristalizada de NavAb, muestra una buena correspondencia *i.e.* RMSD = 1.024Å. A pesar de la baja identidad aminoacídica entre éstas (16%). NavAb posee un triptófano en el sitio correspondiente a W756, la orientación de su cadena lateral es similar a la del modelo de Nav1.4. (fig 12).



**Fig 12. Superposición tridimensional del modelo Nav1.4 y su estructura molde con la estructura cristalizada del canal NavAb** (código PDB: 3rvy). En el panel de la izquierda se muestran los dominios I del modelo de Nav1.4 (en cian) y su molde, el canal de potasio MthK (en magenta), sobrepuestos al monómero canal de sodio bacterial NavAb (en gris). En el panel de la derecha se muestra la superposición del dominio II del modelo (en rosa) con el canal NavAb (en gris). El triptófano 756 en representación de bastón se sobrelapa parcialmente a un triptófano cercano en la secuencia de NavAb, aunque existe un gap en el sitio correspondiente en el alineamiento global.

### 7.1.4 Modelaje de la subunidad $\alpha$ a partir del canal NavAb.

La estructura homotetramérica del canal NavAb fue generada a partir del homodímero (código PDB: 3RVY). La secuencia de ésta fue alineada con la isoforma Nav1.4 de rata, poniendo especial atención a la correspondencia de sus regiones transmembranales. Varios modelos de fueron generados por medio de Modeller 9.12 (Eswar y cols., 2006), e inspeccionadas manualmente. Las regiones intracelulares del mejor modelo obtenido, fueron removidas y cada una de los 8 asas extracelulares S5-S6 fueron remodeladas y optimizadas (fig 13). El modelo final fue sometido a una minimización energética bajo el campo de fuerza AMBER99.

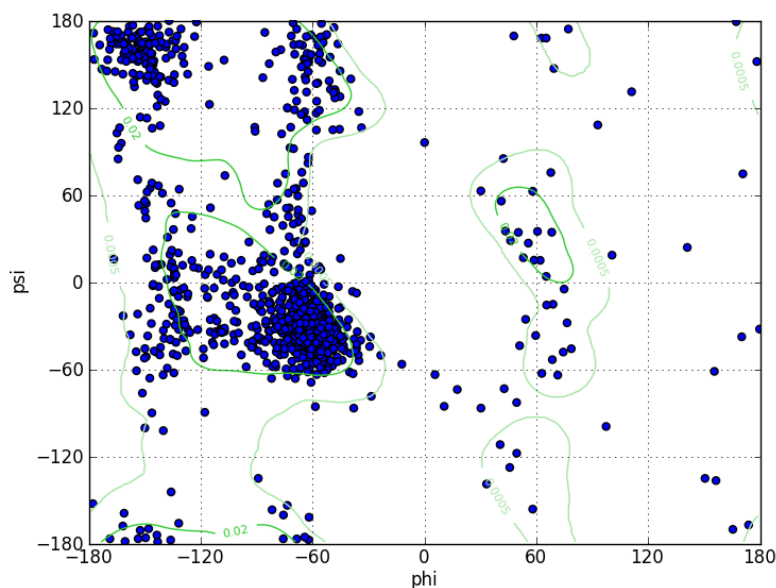


**Fig 13. Modelo 3D de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio rNav1.4.** Vista transmembrana, en el panel superior y vista extracelular, en el panel inferior. El modelo incluye los segmentos transmembrana (S1-S6) y las asas extracelulares de los 4 dominios. En cian el dominio I, en azul marino el dominio II, en morado el dominio III y en rosa el dominio IV. Los amino ácidos del filtro de selectividad DEKA se encuentran en representación de radios de van der Waal. Las asas de probable interacción con la subunidad  $\beta 1$  en amarillo, (La primera asa S5-S6 del dominio I y la segunda asa S5-S6 del dominio IV) (Makita y cols., 1996; Qu y cols., 1999).

El alineamiento final del homotetrámero NavAb y el heterotetrámero rNav1.4 indica un porcentaje de identidad de 27%, con una desviación de la raíz cuadrada promedio (RMSD) entre 95 pares de átomos, de 1.146 Å. La calidad estereoquímica del modelo fue analizada y optimizada, mediante VEGA ZZ 3.0.1 y Chimera 1.8. En el modelo obtenido, todas las longitudes de enlace son válidas, ningún anillo aromático se interseca y el filtro de selectividad DEKA se encuentra alineado. El modelo incluye 1071 residuos, que comprende el 59% de la secuencia total de rNav1.4 (código de acceso Uniprot: P15390). El análisis de Ramachandran (fig 14) muestra que el 77% de los residuos del homotetrámero de la estructura molde (NavAb) está dentro de las regiones permitidas, y el 70% de los residuos del modelo se encuentra en estas regiones permitidas. El puntaje GA341 del modelo, basado en potenciales estadísticos es de 1. Se considera que un modelo, en general confiable, posee un valor de  $>0.7$ , lo que indica una probabilidad mayor al 95% de que la proteína tenga el plegado correcto (Melo y Sali 2007).

Sin embargo, antes de realizar simulaciones con el modelo, éste debe ser refinado con mayor precisión, con el fin de resolver 12 contactos o *clashes* estéricos (sobreapilamiento de van der Waals  $\geq 0.6$  Å), modelar rotámeros con ángulos  $\phi$  y  $\psi$  para los aminoácidos excluidos de las regiones admisibles en el análisis de Ramachandran (fig 14) disminuir su energía potencial.

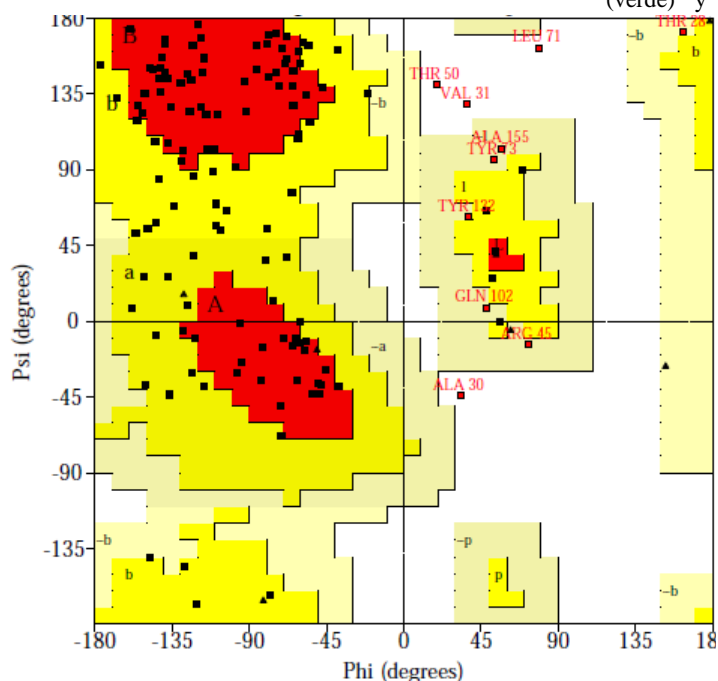
**Fig 14. Mapa de Ramachandran del modelo de rNav1.4 en desarrollo.** Los puntos azules representan los valores de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de los aminoácidos del modelo. Las regiones en verde muestran la probabilidad de la combinación de éstos ángulos basado en la estructura de proteínas de alta resolución (Lovell y cols., 2003).



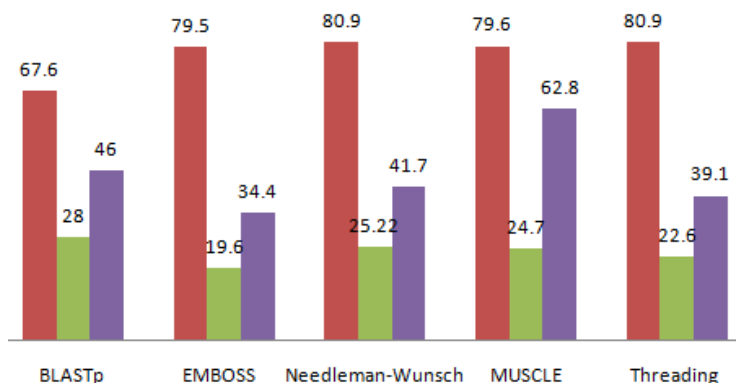


La proteína mielínica de adhesión a membrana P0 constituyó el mejor molde para modelar el dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$ . Varios algoritmos de alineamiento fueron utilizados obteniendo un porcentaje de identidad de 28%, (BLASTp) y un porcentaje de sustituciones equivalentes del 63% (MUSCLE). Mediante el protocolo de modelado I-TASSER (por roscado) se generaron 5 modelos de  $\beta 1$ .

A continuación se describen los parámetros de calidad para el mejor modelo.



Alignment of rBeta1 to Myelin Protein P0  
Algorithm Performance



**Fig 17. Desempeño de 5 diferentes algoritmos de alineamiento,** primera barra (rojo) de izquierda a derecha el porcentaje de secuencia target alineada (*coverage*), segunda barra el porcentaje de identidad (verde) y tercera barra (morado) el porcentaje de sustituciones (positivos).

**Fig. 18. Mapa de Ramachandran del modelo de la subunidad  $\beta 1$ .**

Las regiones en rojo corresponden a los residuos con la combinación más favorable de ángulos diédricos  $\phi$  (entre N-C $\alpha$  y C-N) y  $\psi$  (entre C-N y C $\alpha$ -C), las regiones A y a denotan combinaciones de residuos que forman un  $\alpha$  hélice, las B y b tienden a formar parte de una hoja  $\beta$ . El 57.1% del modelo está en las regiones más favorables, un adicional 35.3% en regiones adicionalmente permitidas, un 4.5% en regiones generosamente permitidas y un 3% en regiones no permitidas.

El análisis de Ramachandran indica que el 57.1% del modelo seleccionado tiene la combinación más favorable de ángulos  $\phi$  y  $\psi$ , el 99.9% de las longitudes de enlaces y el 88.2% de los ángulos de enlace se encuentran dentro de los límites admisibles. El método DFire obtiene un valor de energía libre promedio de -227.26 poco más estable que la propia estructura cristalizada que posee un valor de -217.79. La raíz cuadrada de la distancia promedio (RMSD) de los C $\alpha$  es de 0.91Å, este valor junto con otras dos pruebas (TM-score  $0.37 \pm 0.12$ , C-score: -3.08) indican que la similitud estructural con la proteína molde es significativa.

En base al conjunto de pruebas QMEAN la calidad total del modelo es de 0.371, la cual está por encima del promedio para proteínas del mismo tamaño (+/-10%) determinadas experimentalmente que es de 0.35.

### 7.2.1 Topología de la subunidad $\beta 1$ .

El dominio inmunoglobulínico extracelular de  $\beta 1$  presenta un pliegue de dos 2 hojas  $\beta$  plegadas y 8 giros (cambios de dirección en la elongación de la cadena). El número de segmentos  $\beta$  en los cinco mejores modelos generados varía, el mejor modelo presenta 5 segmentos  $\beta$  antiparalelos en una hoja y 2 en la otra. También se observan 3 motivos tipo horquilla, (*i.e.* segmentos pequeños helicoidales de 3 a 4 residuos de longitud cercanos a un giro) (fig. 19).

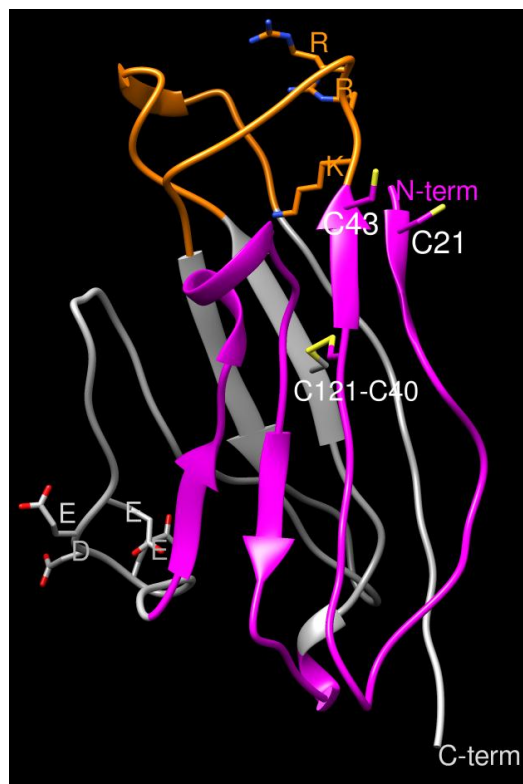
El cálculo de isopotenciales electrostáticos permite la identificación de dos motivos altamente cargados, el principal cuenta con 4 residuos ácidos consecutivos E81, E82 y D83 E84 (el asa del primer giro entre las hojas  $\beta$  que forman el pliegue Ig) y otra región positiva de 3 residuos básicos consecutivos K44, R45, R46, en el asa distal del segundo giro entre las hojas  $\beta$  del dominio Ig.

Estos motivos varían  $0.53\text{\AA}$  (RMSD) entre 7 pares de átomos ( $C\alpha$ ) del molde y  $1.44\text{\AA}$  (RMSD), entre 4 pares de átomos respectivamente, indicativo de la desviación conformacional de la estructura cristalizada.

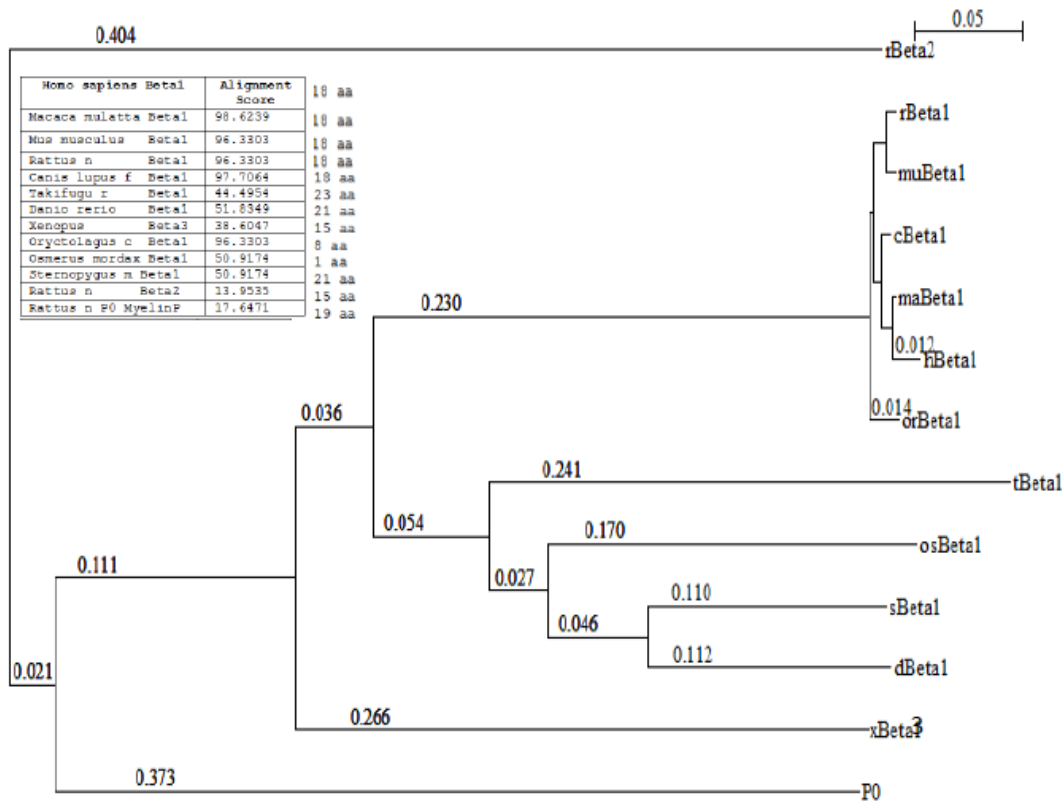
### 7.2.2 Análisis Bioinformático para identificar residuos esenciales para la modulación del canal de sodio.

Con el fin de identificar aminoácidos en la subunidad  $\beta 1$ , esenciales para la modulación del canal de sodio, se realizó un alineamiento de múltiples secuencias de diferentes especies de vertebrados. Tomando en consideración que existe evidencia de que  $\beta 1$  modula la corriente de sodio en vertebrados mamíferos y no mamíferos, pero no en invertebrados donde otra proteína diferente cumple esta función (Chopra y cols., 2007; Du y cols., 2009). De tal forma que se generó un fenograma por el algoritmo Neighbor Joining, mediante NJplot a partir del alineamiento de múltiples secuencias obtenido con ClustalX (fig 20).

El alineamiento muestra aminoácidos altamente conservados entre especies, lo cual sugiere que la sustitución de éstos, constituiría una mutación deletérea, es decir, tendría un efecto negativo en el fenotipo y disminuiría la adecuación biológica, por lo que no se encuentra en poblaciones actuales de ninguna especie. De esta forma resulta probable que tales aminoácidos desempeñen un papel funcional importante en la proteína.



**Fig 19. Modelo de la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio,** en magenta una de las dos hojas  $\beta$  que forman el pliegue Ig, contiene 5 segmentos  $\beta$  antiparalelos. Las distancias relativas de las cadenas laterales de residuos que forman segmentos  $\beta$  están más restringidas en su espacio conformacional (*e.g.* C43 y C21 cerca del extremo amino terminal), que las de los aminoácidos que forman bucles aleatorio (*random coil*) (*e.g.* en naranja). El puente de disulfuro que establece C40 con C121 estabiliza el pliegue Ig.



**Fig 20. Fenograma generado a partir del alineamiento de las secuencias proteicas de  $\beta 1$  de 9 especies de vertebrados (4 mamíferos y 5 peces) junto con 3 proteínas homologas que no modulan el canal, específicamente:  $\beta 3$  de rana, la proteína de mielina P0 y  $\beta 2$  de rata ( $r\beta 2$ ,  $rP0$  y  $x\beta 3$ ). El inserto muestra el puntaje de similitud de las secuencias de todas las especies con respecto a la  $\beta 1$  de humano. Las distancias génicas evidencian una relación más estrecha dentro del taxón de mamíferos que dentro del de peces. Además la secuencia  $h\beta 1$  difiere mucho más con la de  $h\beta 2$  (13.5) y  $h\beta 3$  (43.7) de humanos que con la  $\beta 1$  de cualquier otra especie.**

A partir de este análisis bioinformático de datos reportados en la literatura e incluyendo información aportada por el modelo 3D de  $\beta 1$ , se hizo un registro y selección de los aminoácidos que podrían desempeñar un papel importante en la modulación  $\alpha$ - $\beta$  del canal de sodio. Producto de estos análisis, se identificó a la Arg89 en la secuencia de la subunidad  $\beta 1$ , ésta podría jugar un papel importante en la modulación de la corriente del canal.

La arginina 85, la cual es bastante conservada, está asociada a casos familiares de epilepsia generalizada con episodios febriles + (GEFS+). Frente a este alineamiento, puede apreciarse que la poseen todas las secuencias moduladoras del canal e incluso  $r\beta 2$ , la cual no lo modula. También observamos que la arginina 89 se encuentra completamente conservada en todas las proteínas, lo cual sugiere que es imprescindible para algún proceso esencial (figura 21).

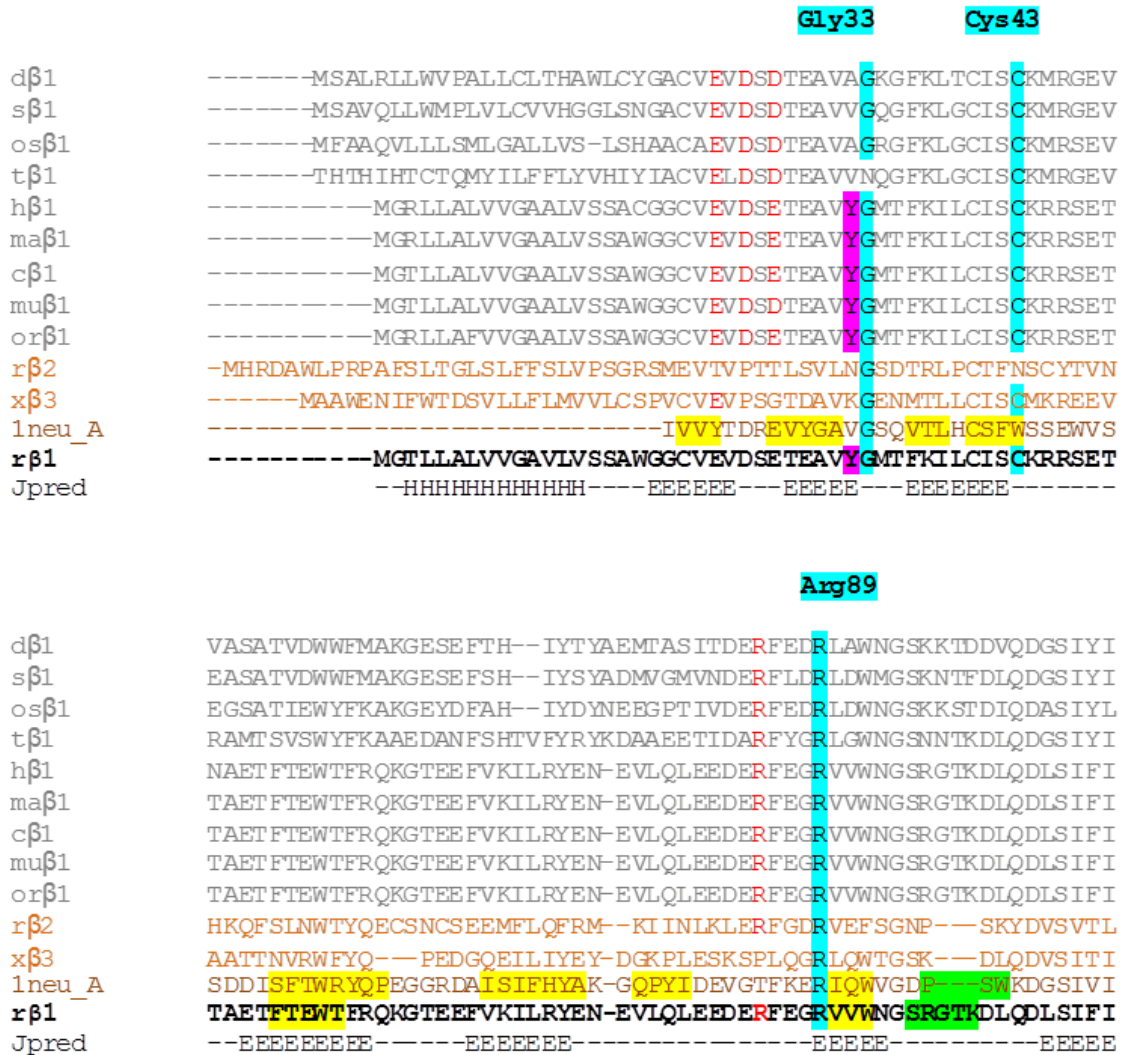
### 7.2.3 Identificación de puntos calientes (*hotspots*) potenciales.

Un *hotspot* es un aminoácido ubicado en la interface de un complejo protéico (o zona de contacto entre dos proteínas), tal que, si es mutado, reducirá la energía de unión entre dichas proteínas ( $\Delta\Delta G > 2.5 \text{Kcal/mol}$ ). Estadísticamente, las argininas tienen la mayor probabilidad (12.7%) de constituir *hotspots* en una interface proteína-proteína (Ofrañ y Rost 2007).

Se ha identificado en el modelo de la subunidad  $\beta 1$  generado en el presente trabajo, a la arginina 89 (R89) como probable *hot spot* entre la interface  $\alpha$ - $\beta 1$ , por lo que se ha decidido generar la mutación puntual R89A, con el fin de evaluar sus efectos sobre la corriente de sodio, en base a las siguientes observaciones:

- 1) Su cadena lateral se encuentra expuesta al solvente.
- 2) Se localiza en una región flexible y opuesta al motivo E23D25E27 (considerado importante para la modulación de la corriente mediada por  $\beta 1$  por McCormick y cols. 1998)
- 3) Posee una carga opuesta a la predominante en las asas del vestíbulo externo de la subunidad  $\alpha$ , por lo que sugiere que su carga es la característica fisicoquímica que tendría más importancia para asociación  $\alpha$ - $\beta 1$  del canal de sodio.
- 4) Aunque es un aminoácido con carga positiva, el modelo sugiere que esta se encuentra neutralizada gracias al puente de sal que ejerce con E87; por lo que resulta factible suponer que la aproximación de un dominio con un carga negativa de mayor magnitud (como es el caso del vestíbulo extracelular de la subunidad  $\alpha$  Nav1.4) conseguiría romper el puente de sal intramolecular y establecer una asociación electrostática intermolecular por un mecanismo alosterico de asociación molecular conocido como *induced fit*. Este mecanismo, consiste en un cambio de conformación secuencial reversible de una proteína inducido por un ligando u otra proteína al asociarse con ésta (Changeux, 2012).
- 5) R89 está conservada tanto en la isoforma humana como la de rata de  $\beta 1$  y en la subunidad  $\beta 2$ , la cual aunque no modula el canal, si se encuentra asociada a la subunidad  $\alpha$ .
- 6) Aunque R89 también está conservada además en la proteína de mielina P0, la cual es el molde para el modelaje de  $\beta 1$  y no modula la corriente (McCormick y cols., 1998) el residuo E89 (similar o equivalente) no se encuentra ni en  $\beta 2$  ni en P0.
- 7) McCormick y cols. (1999) diseñaron 5 proteínas quiméricas (r $\beta 1$ /P0) cada una de las cuales modula la corriente justo como el canal nativo asociado a  $\alpha$  aunque éstas poseen sustituciones de subdominios enteros (extracelulares inmunoglobulínicos). En uno de los mutantes, el residuo R96 fue remplazado por una serina (como parte de la sustitución de región: GSR por DIS), sin ningún cambio funcional aparente. Sin embargo todas las quimeras funcionales conservan R89.

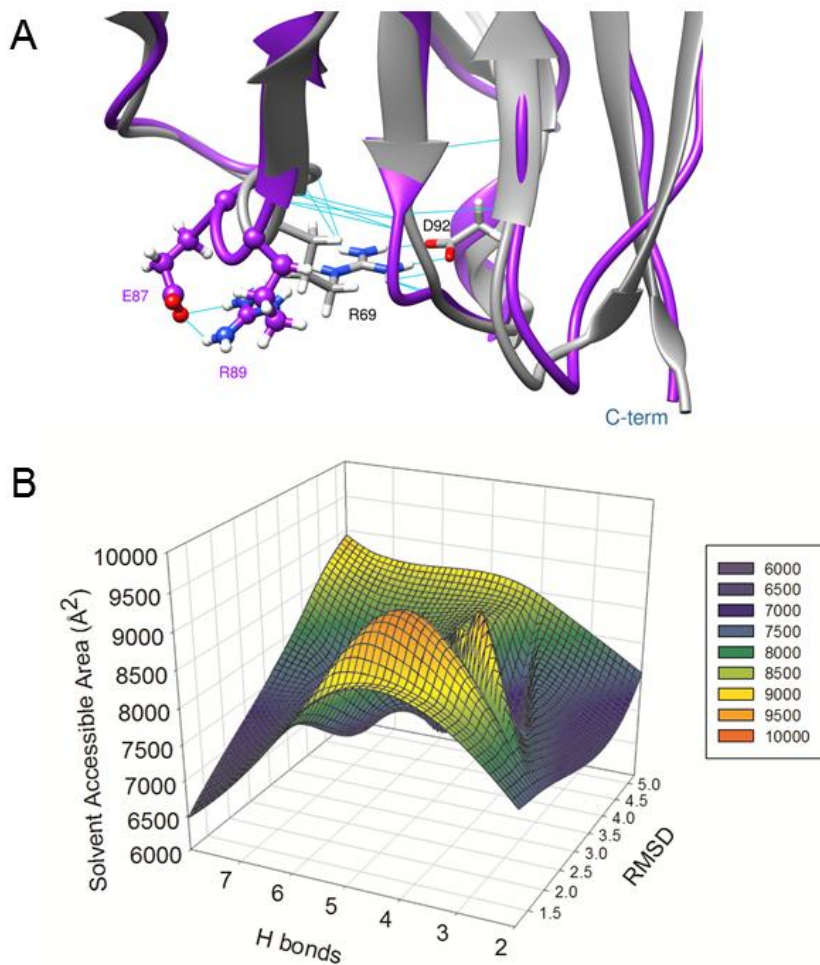
Se ha sugerido, con base a estudios estadísticos, que normalmente participan 10 puentes de hidrógeno en asociaciones proteína-proteína, sin embargo solo el 5% de los residuos que se encuentran en la interface constituyen *hotspots*, es decir contribuyen más 2kcal/mol en una interfece típica de 1 200 to 2000 Å<sup>2</sup> (Xu et al, 1997; Ofrañ & Rost 2007).



**Fig. 21. Alineamiento interespecífico de secuencias de la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio.** Las secuencias de vertebrados (líneas en gris 1-9) alineadas con 3 proteínas relacionadas: la secuencia de rata de  $\beta 2$ , la secuencia de  $\beta 3$  de rana y la proteína de mielina P0 (líneas en marrón 10-12). Los sitios conservados de probable importancia funcional se encuentran marcados en cian. La triada ácida (EDE) está implicada en la modulación de los canales de sodio dependientes de voltaje (de rojo en el primer panel). Las mutaciones a cisteína o histidina de la arginina 85 (de rojo en el segundo panel) están asociadas a casos familiares de epilepsia generalizada con episodios febriles más (GEFS+). Las regiones marcadas en amarillo y verde forman láminas  $\beta$  y hélices  $\alpha$  respectivamente. El consenso de predicción de estructura secundaria para la secuencia de  $\beta 1$  (calculada mediante Jpred) se presenta en la línea 14.

De particular utilidad ha sido el cálculo del área accesible al solvente en la predicción de *hotspots* (Guney y cols., 2008; Xia y cols., 2010), además Xu y cols., (1997) argumentan que diferencias en la geometría de los puentes de hidrógeno y puentes de sal intramoleculares juegan un papel fundamental en la formación de interfaces, por lo que resulta ventajoso analizar detalladamente la libertad conformacional de los enlaces de hidrógeno, próximos a nuestro propuesto hot spot R89 de acuerdo a los modelos de  $\beta 1$  generados, comparando el área accesible al solvente y la variación estructural de éstos con respecto a la estructura molde, la proteína de mielina P0.

En la figura 22 se puede apreciar que el puente salino del modelo de  $\beta 1$  es más accesible al solvente que el correspondiente en su estructura molde. Además, los modelos generados indican que existe la posibilidad de formación de puentes de hidrógenos adyacentes (media=4, en un radio de 3Å) a esta arginina 89, que coinciden con un aumento en la superficie accesible al solvente total, con una desviación en RMSD  $\sim >5\text{Å}$  (fig 22 B). Esto hace probable que la sustitución de la cadena lateral de este amino ácido provoque un cambio electrostático en una región del dominio extracelular de  $\beta 1$  expuesto al solvente y por lo tanto accesible a la subunidad  $\alpha$ .

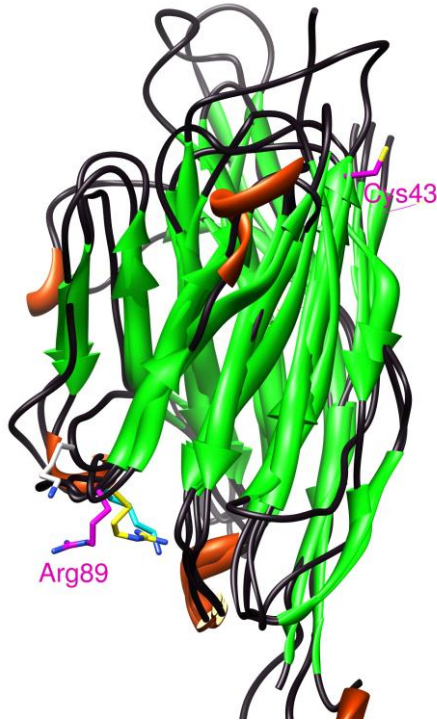


**Fig 22. (A) Puente salino en el modelo de la subunidad  $\beta 1$  (morado), entre R89 y E87. La estructura molde P0 (en gris) está superpuesta al modelo. La arginina correspondiente también forma un puente salino intramolecular, (R69 con D92). (B) Características conformacionales de R89 en los 11 modelos de  $\beta 1$  y su molde P0. El número de puentes de hidrógeno próximos a R89 (3Å) en el eje x está graficado contra el área accesible al solvente del dominio extracelular total junto con una medida de variación de cada modelo con respecto a su molde (la raíz cuadrada del cuadrado del promedio de la distancia entre los carbonos  $\alpha$  del molde y los del modelo en Å).**

Por lo tanto se propuso la sustitución de la R89 por una alanina, con el fin de evaluar la contribución de la cadena lateral de éste aminoácido a la modulación que ejerce  $\beta 1$  sobre el canal Nav1.4, mediante la generación del mutante R89A.

Otros sitio altamente conservado es la glicina 33 (G33) cercana al extremo amino terminal, la cual se propone, constituye una bisagra de asa en el giro en la elongación de la cadena, la cual forma una hoja  $\beta$  plegada antiparalela. Esta hoja  $\beta$  contiene el motivo E23 D25 E27, el cual se encuentra fuertemente implicado en la modulación que ejerce esta subunidad sobre el canal (McCormick 1998).

También se puede observar (en las figuras 21 y 32), que el amino ácido que precede a G33, la tirosina 32 (Y32), se encuentra conservado entre especies en menor grado, su cadena lateral aromática polar, de acuerdo al modelo se encuentra expuesta al solvente en una región más próxima a la membrana celular. Con el fin de evaluar la importancia funcional de este motivo de bisagra se propuso la sustitución de Y32 por una alanina y G33 por una metionina con el fin de introducir una cadena lateral hidrófoba voluminosa, la cual desestabilizaría la asociación  $\alpha$ - $\beta 1$ . Por lo que se generaron los mutantes Y32A y G33M independientemente.



**Fig 23. Superposición tridimensional del modelo de la subunidad  $\beta 1$  con 3 proteínas Ig cristalizadas:** NTRK2\_HUMAN, TRGC2\_HUMAN, y un anticuerpo de camello VHH. A pesar de su divergencia funcional, las hojas  $\beta$  aniparalelas (en verde) y los segmentos  $\alpha$  hélices (en naranja) se encuentran altamente conservados. Los aminoácidos en el sitio correspondiente a R89 se encuentran en representación de bastones.

observar que la cisteína 43 (C43), se encuentra altamente conservada y el plegamiento terciario del modelo del dominio extracelular de  $\beta 1$ , indica que se encuentra cercana a la cisteína 21, lo que sugiere que podría establecer un puente de disulfuro. Existe evidencia

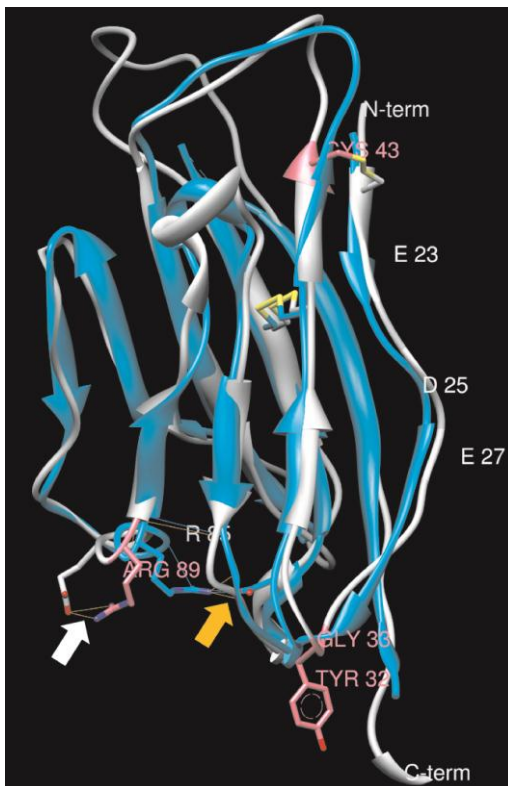
Adicionalmente, se identificaron otras proteínas cristalizadas Ig, cuya estructura secundaria es altamente conservada, a pesar de su divergencia funcional y su baja identidad aminoacídica. Una tirosín-kinasa, un receptor T y un anticuerpo, presentan la misma disposición general del pliegue inmunoglobulínico (fig 23).

El potencial para formar un enlace electrostático en el residuo equivalente a R89 está altamente conservado. Su probable relevancia funcional resulta evidente en las proteínas Ig, *i.e.*, siempre constituye un residuo básico (arginina o lisina) a pesar de la baja identidad de las secuencias de aminoácidos de éstas proteínas con la subunidad  $\beta 1$  (< 25%). En particular 2 proteínas en la posición equivalente, se encuentran formando un puente de sal con un ácido aspártico o glutámico en un rango de distancia de  $\sim 5\text{\AA}$ . Finalmente el alineamiento Smith-Waterman 3D indican puntajes de 25%, 16 y 28% de homología para cada una de las estructuras Ig.

Otros sitios de interés son las cisteínas próximas al extremo amino terminal. Se puede

experimental de la formación de este puente de disulfuro para los aminoácidos correspondientes en la subunidad  $\beta 3$  del canal de sodio (Yereddi y cols. 2013); por lo que se evaluó los efectos de la sustitución de la cisteína 43 por una alanina mediante la generación del mutante C43A. El cual elimina este hipotético enlace covalente intracatenar.

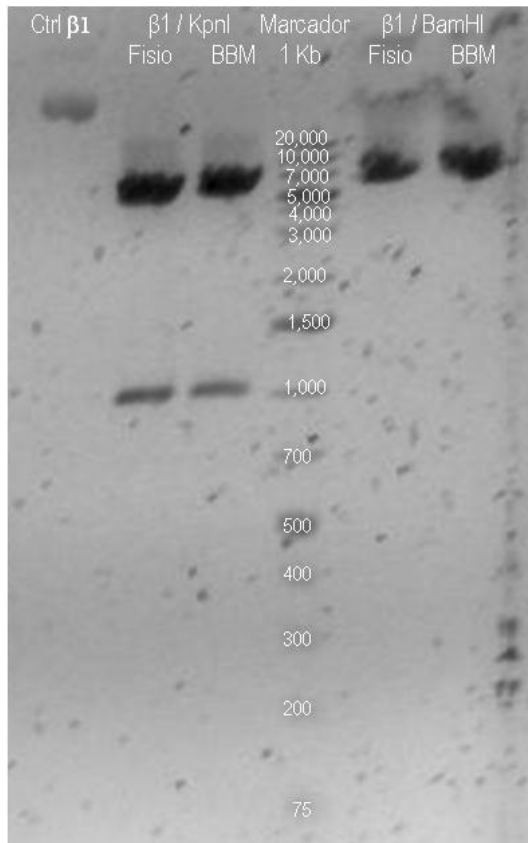
En resumen, el modelo propone que existen dos enlaces intracatenares que al ser neutralizados, reducirían la modulación de la corriente, que la subunidad  $\beta 1$  ejerce sobre el canal Nav1.4. Estos enlaces son: un puente de disulfuro entre C21 y C43 y un enlace no-covalente, constituye un puente de sal entre E87 y R89 (flecha en blanco figura 24), el cual al ser neutralizado por la mutación R89A no tiene efecto sobre la modulación de voltaje del canal Nav1.4.



**Fig 24. Superposición tridimensional del modelo del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio (en gris) con su estructura molde, la proteína de mielina P0 (código PDB: 1neu) (en azul).** Los resultados experimentales del presente trabajo sugieren que los residuos en rosa son de importancia funcional para la modulación que esta subunidad ejerce sobre el canal Nav1.4. Las flechas indican puentes de sal intramoleculares en  $\beta 1$ , en el que participa R89 y otro en el que participa R85, cuyos mutantes R85C y R85H están asociados a epilepsia (GEFS+) (Xu et al., 2007). Se ilustra la ubicación relativa de la triada ácida (E23 D25 E27) la cual constituye el dominio mayormente implicado en la modulación del canal de sodio (McCormick y cols., 1999; Brackenbury e Isom 2011).

#### 7.2.4 Mapeo de restricción del gen SCN1B ( $r\beta 1$ ) y secuenciación.

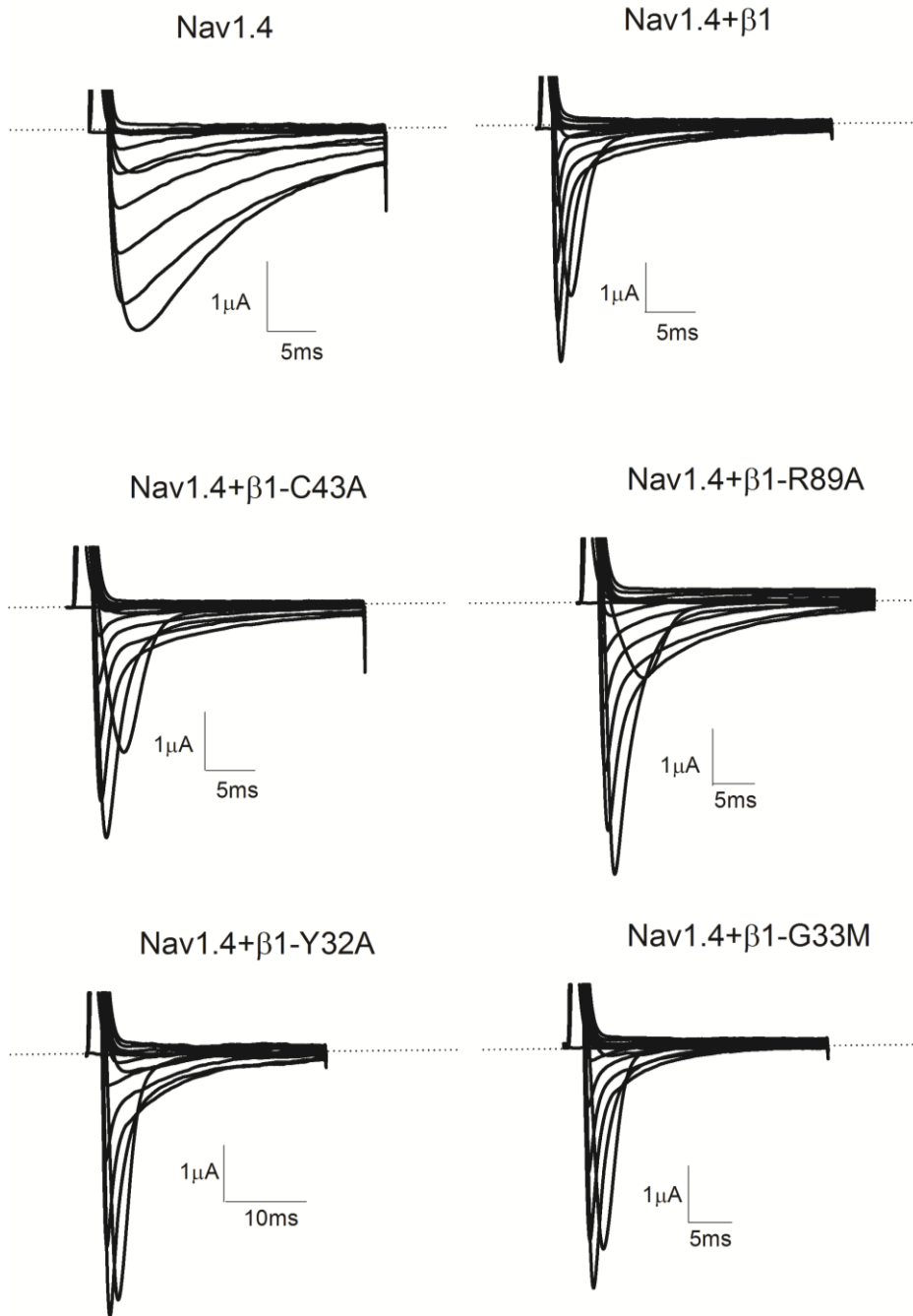
La electroforesis en gel muestra que el vector de  $\beta 1$  posee 2 sitios de corte para la enzima KpnI, uno de los cuales se sabe de antemano, se encuentra en el vector pGEMHEnew y el otro se ubicaría en la secuencia del gen SCN1B. Por lo tanto la enzima genera dos fragmentos de aproximadamente 7000 y 1000 pares de bases. Además este vector posee un sitio de corte BamHI y debido a que el producto de digestión al correr en gel genera solo un fragmento esto indica que el gen SCN1B no posee ningún otro sitio de corte para esta enzima y el vector corre más rápido que el control debido a que ha sido linearizado al ser cortado en un solo sitio (fig 25).



**Fig 25. Detección por electroforesis en gel de agarosa de la clona del gen SCN1 que codifica la subunidad  $\beta 1$  en condiciones control, (en la primera banda) y digerido con las enzimas de restricción KpnI (segunda y tercera banda) y BamHI (quinta y sexta banda). Las muestras del mismo vector provienen de diferentes laboratorios, Instituto de Fisiología BUAP (Fisio) y el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Toluca (BBM).**

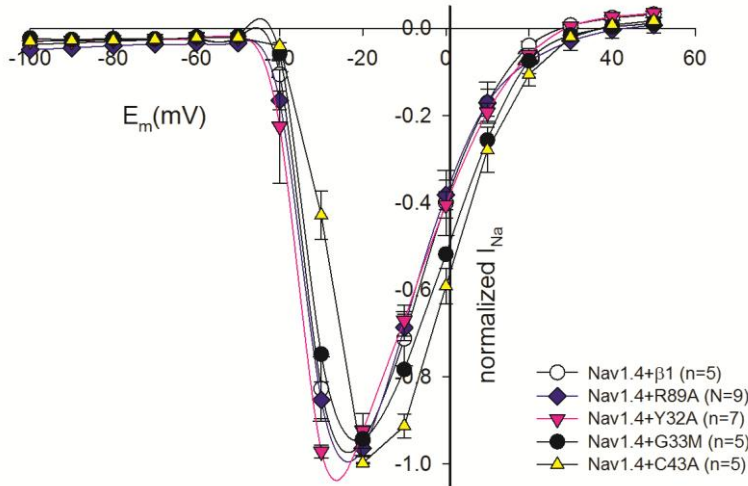
Las mutaciones fueron corroboradas mediante la secuenciación de nucleótidos de las regiones en las que se encuentran. Una vez recibida la secuenciación de las cadenas sentido (Fw) y antisentido (Rv) de la región de interés del plásmido alinearon éstas, con la correspondiente secuencia nucleotídica (obtenida de la base de datos NCBI) del gen de  $\beta 1$  (Scn1b). La figura 26 muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica del mutante R89A con el gen nativo Scn1b (codones de inicio y término en gris).





**Fig 27.** Trazos representativos de las corrientes del canal Nav1.4 con y sin  $\beta 1$  y con los mutantes puntuales de  $\beta 1$  generados a partir de un protocolo de pasos despolarizantes de -100 mV a +50 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV con una duración de 30 ms.

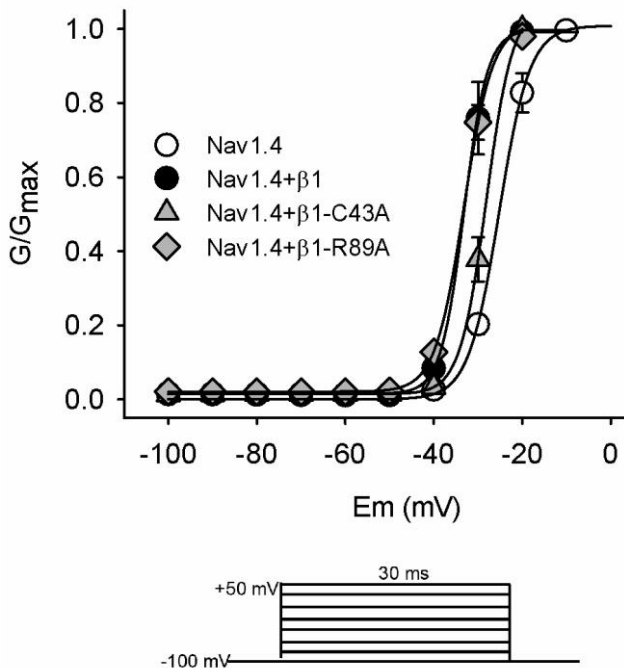
La relación corriente voltaje del canal Nav1.4 indica que el canal empieza a activarse a partir de -40mV, registrando el pico de corriente al rededor de -20mV, y un potencial de equilibrio ( $E_{eq}$ ) de +40mV aproximadamente (fig 28). No se encontraron diferencias significativas entre las corrientes normalizadas al pico ( $P=0.79$ ), ni entre las corrientes al pontencial de equilibrio ( $P=0.131$ ), entre ningún grupo.



**Fig 28. Relación corriente voltaje (I-V) del canal Nav1.4 con y sin  $\beta 1$  y cada uno de sus mutantes.** Se muestra el promedio normalizado al pico de corriente  $\pm$  ES. Las corrientes fueron generadas a partir de un protocolo de pasos despolarizantes de -100 mV a +50 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV con una duración de 30 ms.

### 7.3.1 El mutante $\beta 1$ -C43A altera la modulación del voltaje de activación que la subunidad $\beta 1$ ejerce sobre el canal Nav1.4.

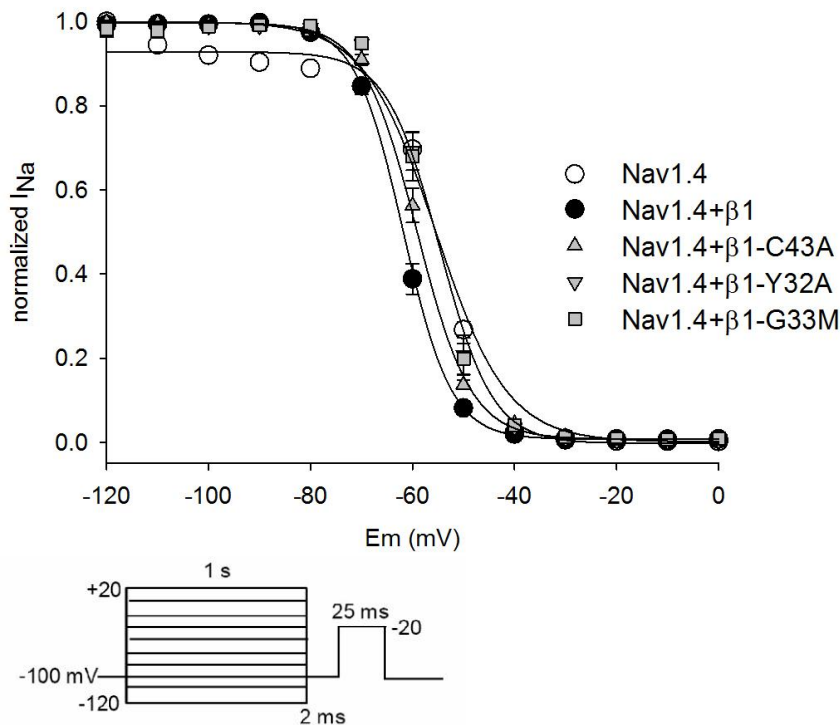
La figura 29 muestra que la co-expresión de la subunidad  $\beta 1$ , induce un desplazamiento de la curva de activación de los canales Nav1.4 hacia potenciales más hiperpolarizantes. Este efecto es alterado por el mutante C43A, a diferencia de la co-expresión con el mutante R89A. C43A indujo un aumento significativo del voltaje medio de activación, lo que es considerado un efecto de pérdida de función de la subunidad  $\beta 1$  sobre la modulación que ejerce en el voltaje de activación (tabla 4). Éste efecto fue exclusivo del mutante C43A como se puede apreciar, al comparar los voltajes medios de activación de cada mutante en el panel inferior de la figura 29.



**Fig 29. Curvas de conductancia de la corriente de sodio del canal Nav1.4 en ausencia y presencia de la subunidad  $\beta 1$  y dos de sus mutantes puntuales.** Los datos de cada grupo fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann (panel superior). Las conductancias fueron calculadas a partir de las corrientes obtenidas mediante el protocolo en el panel de en medio y normalizadas con respecto a la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) (n=5-9). Los voltajes medios ( $V_{1/2}$ ) de activación de cada grupo fueron comparados con respecto al fenotipo nativo *i.e.* Nav1.4+ $\beta 1$  y son mostrados en la tabla4 (pág 64)

### 7.3.2 Los mutantes de $\beta 1$ -C43A, $\beta 1$ -Y32A y $\beta 1$ -G33M alteran la modulación del voltaje de inactivación que esta subunidad ejerce sobre el canal Nav1.4.

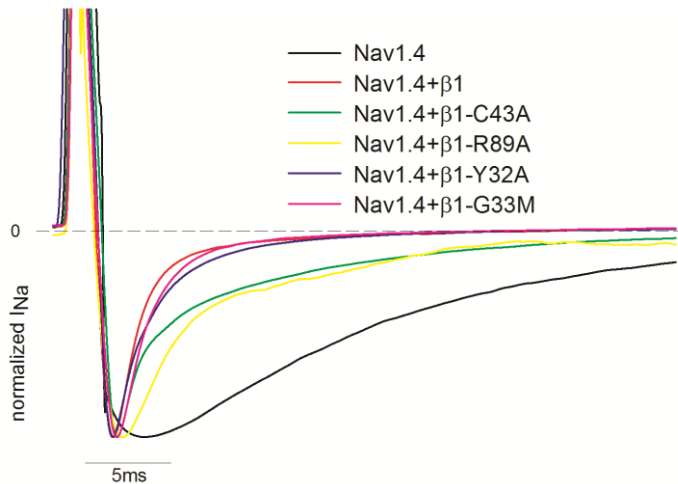
Como se aprecia en la figura 28, la co-expresión de la subunidad  $\beta 1$ , induce un desplazamiento de la curva de inactivación de estado estable, hacia potenciales más h perpolarizantes y este efecto es alterado debido a las mutaciones C43A, Y32A y G33M. La C43 se encuentra en la primera hoja  $\beta$ , cercana al extremo amino terminal, mientras que Y32 y G33 constituyen la primera horquilla o giro en la elongación de la cadena en dirección carboxilo terminal del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  (fig 32). Note que la sustitución de R89, situada en otra horquilla mucho más distal al amino terminal, no induce esta segunda clase de efecto pérdida de función (figs 30, 31 y 32).



**Fig 30.** Curvas de inactivación de estado estable de la corriente de sodio del canal Nav1.4 en ausencia y presencia de la subunidad  $\beta 1$  y tres de sus mutantes puntuales. Los datos de cada grupo fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann, se muestra el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar ( $n=5-9$ ). El protocolo doble de inactivación aplicado se muestra en la esquina inferior izquierda.

### 7.3.3 Los mutantes $\beta 1$ -C43A y $\beta 1$ -R89A enlentecen la inactivación de los canales Nav1.4.

La subunidad  $\beta 1$  típicamente acelera la cinética del canal de sodio, en ausencia de esta subunidad, la fase de inactivación al pico y la recuperación de la inactivación de los canales Nav1.4 es significativamente enlentecida. La figura 33, ilustra la desaceleración de la fase de inactivación inducida por los mutantes  $\beta 1$ -C43A y  $\beta 1$ -R89A con respecto al fenotipo nativo Nav1.4+ $\beta 1$  en trazos representativos. Solo estos 2 mutantes indujeron una desaceleración de la inactivación de la corriente.

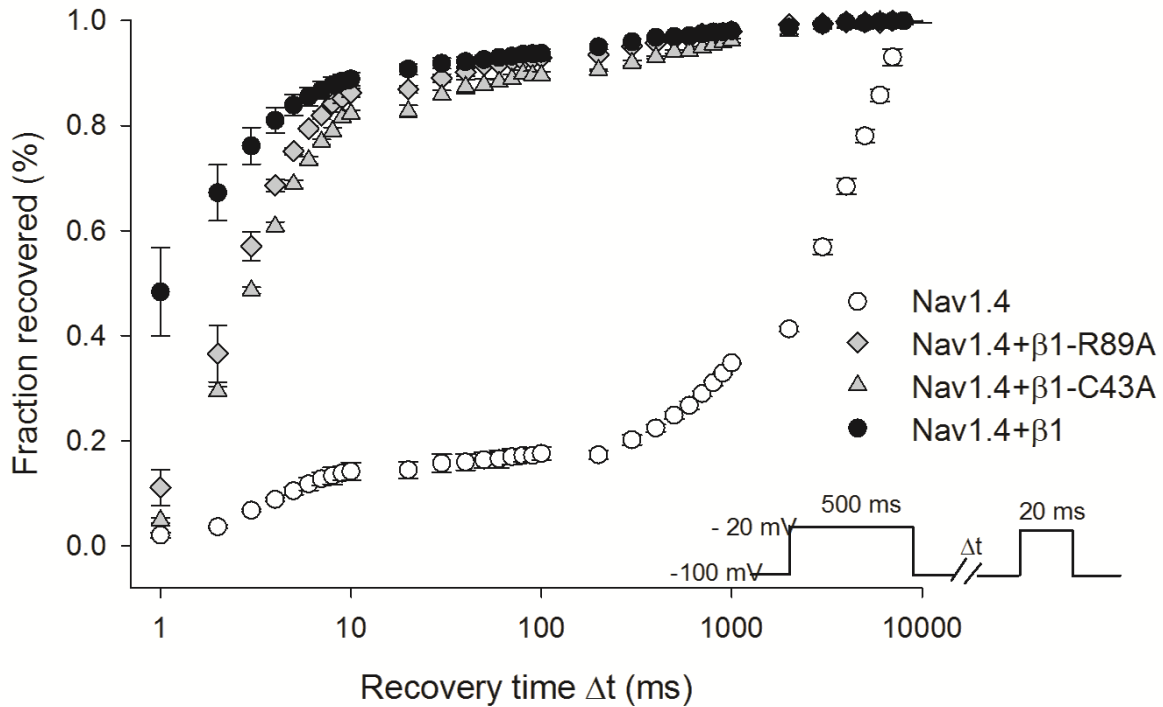


**Fig 33. Trazos representativos superpuestos normalizados de corrientes Nav1.4**, obtenidas al aplicar un pulso despolarizante de -20mV (voltaje al pico) a partir de un potencial de sostenimiento de -100mV.

Los datos del curso temporal de inactivación al pico de corriente fueron ajustados, célula por célula a una ecuación exponencial simple. La constante de tiempo de inactivación de  $\beta 1$ -R89A fue significativamente mayor que la del fenotipo nativo (tabla 5). Los datos de Nav1.4+ $\beta 1$ -C43A y Nav1.4 (- $\beta 1$ ) no se ajustaron a esta ecuación.

### 7.3.3 Los mutantes $\beta 1$ -C43A y $\beta 1$ -R89A enlentecen la recuperación de la inactivación de los canales Nav1.4.

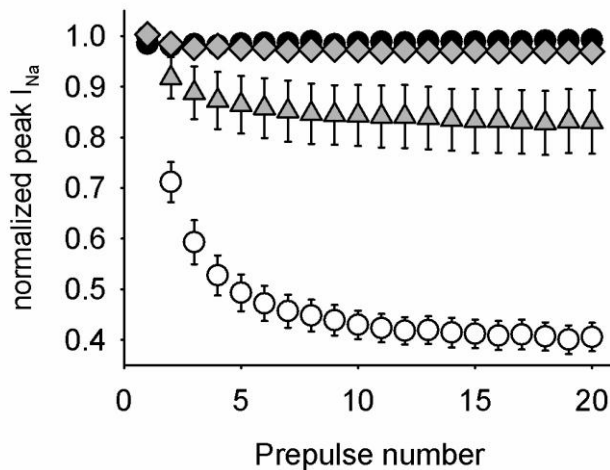
En la figura 34 se muestra la recuperación de la inactivación de canales Nav1.4 en ausencia y presencia de la subunidad  $\beta 1$  y dos de sus mutantes. El fenotipo nativo (Nav1.4+ $\beta 1$ ) produce una recuperación de la corriente de cerca del 50% después del primer milisegundo; R89A y C43A desaceleraron este proceso en un 90 y 95% respectivamente ( $P < 0.05$ ). La fracción recuperada de R89A fue diferente del fenotipo nativo después de una  $\Delta t$  de 10 ms ( $P = 0.05$ ), sin embargo C43A fue significativamente diferente hasta una  $\Delta t$  de 100 ms ( $P = 0.05$ ). Los datos de cada ovocito de cada grupo fueron ajustados individualmente y el promedio de las constantes de tiempo de cada grupo fueron comparadas. Solo la constante de tiempo de recuperación rápida ( $\tau_{fast}$ ) de C43A fue diferente de la de Nav1.4+ $\beta 1$  (tabla 4).



**Fig 34. Recuperación de la inactivación de canales Nav1.4 en ausencia y presencia de la subunidad  $\beta 1$  y sus mutantes C43A y R89A**, éstos produjeron una desaceleración de la recuperación en un 33% y 10% aproximadamente con respecto al fenotipo nativo Nav1.4+ $\beta 1$ . Los datos representan el promedio de cada grupo  $\pm$  el error estándar ( $n=4-9$ )

### 7.3.5 El mutante $\beta 1$ -C43A induce una acumulación de inactivación.

La presencia de la subunidad  $\beta 1$  acelera, en algunas isoformas del canal de sodio, la recuperación ante despolarizaciones a altas frecuencias. Como se muestra en la figura 35, la corriente generada por la subunidad  $\alpha$  de Nav1.4 descendió a un 70% después del segundo pulso a 1Hz de frecuencias y mostró una acumulación de inactivación (*rundown*) de alrededor del 60%, con respecto al control después de despolarizaciones repetidas. El mutante C43A indujo una reducción del 10% de la corriente después del segundo pulso y tuvo un *rundown* de  $\sim 20\%$ ; a diferencia de los datos de R89A y el fenotipo nativo (Nav1.4+ $\beta 1$ ).



A una frecuencia de 5Hz, se observó el mismo 20% de *rundown* para C43A sin efecto para el resto de los grupos.

#### **Fig 35. Estimulación repetida a 1Hz.**

Efecto de la co-expresión de la subunidad  $\beta 1$  y sus mutantes en corrientes de canales Nav1.4 generadas mediante un tren de estimulación de 20 pulsos partiendo de un potencial de sostenimiento de  $-100$  mV hasta  $-20$  mV con una duración de 30 ms. ( $n=5-9$ ). Nav1.4 círculos abiertos, Nav1.4+ $\beta 1$  círculos cerrados, Nav1.4+ $\beta 1$ -C43A triángulos,

**Tabla 4:** Parámetros biofísicos de la dependencia de voltaje de activación e inactivación.

Tipo de canal	Activación $V_{1/2}$ (mV)	Pendiente	Inactivación $V_{1/2}$ (mV)	Pendiente
Nav1.4	$-25.9 \pm 0.5^{***}$	$1.8 \pm 0.3^{***}$	$-54.5 \pm 0.4^{***}$	$5 \pm 0.31$
Nav1.4+ $\beta$ 1	$-33.4 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.1$	$-61.8 \pm 0.3$	$4.7 \pm 0.1$
Nav1.4+ $\beta$ 1-C43A	$-29 \pm 0.1^{***}$	$1.8 \pm 0.3^{***}$	$-59.1 \pm 0.4^{**}$	$6.5 \pm 0.2^{***}$
Nav1.4+ $\beta$ 1-R89A	$-33 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.1$	$-62.6 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.2$
Nav1.4+ $\beta$ 1-Y32A	$-34 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1^{**}$	$-56 \pm 0.3^{***}$	$4.6 \pm 0.1$
Nav1.4+ $\beta$ 1-G33M	$-32.5 \pm 1$	$2.3 \pm 0.1$	$-56 \pm 0.4^{***}$	$4.7 \pm 0.1$

Los valores fueron obtenidos de los ajustes a la ecuación de Boltzmann para cada grupo (n=5-9). Las diferencias significativas fueron determinadas mediante una prueba ANOVA de una sola vía seguida por una prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples con respecto al fenotipo nativo Nav1.4+ $\beta$ 1 (\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$  < 0.001).

**Tabla 4.1:** Valores P de las comparaciones múltiples de los voltajes medios de activación

	Nav1.4	Nav1.4+ $\beta$ 1	Nav1.4+ $\beta$ 1-C43A	Nav1.4+ $\beta$ 1-R89A	Nav1.4+ $\beta$ 1-Y32A	Nav1.4+ $\beta$ 1-G33M
Nav1.4		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Nav1.4+ $\beta$ 1	<0.001		<0.001	0.633	0.478	0.569
Nav1.4+ $\beta$ 1-C43A	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001
Nav1.4+ $\beta$ 1-R89A	<0.001	0.633	<0.001		0.572	0.461
Nav1.4+ $\beta$ 1-Y32A	<0.001	0.478	<0.001	0.572		0.081
Nav1.4+ $\beta$ 1-G33M	<0.001	0.569	<0.001	0.461	0.081	

**Tabla 4.2:** Valores P de las comparaciones múltiples de los voltajes medios de inactivación

	Nav1.4	Nav1.4+ $\beta$ 1	Nav1.4+ $\beta$ 1-C43A	Nav1.4+ $\beta$ 1-R89A	Nav1.4+ $\beta$ 1-Y32A	Nav1.4+ $\beta$ 1-G33M
Nav1.4		<0.001	<0.001	<0.001	0.108	0.139
Nav1.4+ $\beta$ 1	<0.001		0.002	0.397	<0.001	<0.001
Nav1.4+ $\beta$ 1-C43A	<0.001	0.002		<0.001	<0.001	<0.001
Nav1.4+ $\beta$ 1-R89A	<0.001	0.397	<0.001		<0.001	<0.001
Nav1.4+ $\beta$ 1-Y32A	0.108	<0.001	<0.001	<0.001		0.994
Nav1.4+ $\beta$ 1-G33M	0.139	<0.001	<0.001	<0.001	0.994	

**Tabla 5:** Parámetros cinéticos de la inactivación y recuperación de la inactivación.

Tipo de canal	Constante de inactivación $\tau_{\text{inac}}$ (ms)	Constante de recuperación rápida $\tau_{\text{fast}}$ (ms)	Fracción de canales de Rec rápida ( $F_{\text{fast}}$ )	Constante de recuperación lenta $\tau_{\text{slow}}$ (ms)
<b>Nav1.4</b>	NA	4.7±0.4***	0.01	10931±2704***
<b>Nav1.4+β1</b>	0.6±0.03	1.7±0.3	0.93	236±88
<b>Nav1.4+β1-C43A</b>	NA	2.7±0.04**	0.89	636±36
<b>Nav1.4+β1-R89A</b>	2.6±0.3***	2.3±0.1	0.92	376±40
<b>Nav1.4+β1-Y32A</b>	0.48±0.04	NA	NA	743±44
<b>Nav1.4+β1-G33M</b>	0.46±0.03	NA	NA	760±30

Los parámetros de la inactivación fueron obtenidos del ajuste a una ecuación monoexponencial y los de la recuperación de la inactivación fueron obtenidos de un ajuste a una ecuación biexponencial. (n=4-9), con excepción de Y32A Y G33M que se ajustaron mejor a una monoexponencial. Cada célula se ajustó individualmente y los promedios fueron comparados con respecto al fenotipo nativo Nav1.4+β1, Las diferencias significativas fueron determinadas mediante una prueba ANOVA de una sola vía seguida por una prueba Holm-Sidak para comparaciones múltiples (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$  \*\*\* $P < 0.001$ ).

#### 7.4 Simulación de los efectos fisicoquímicos de los mutantes de la subunidad β1.

Con el fin de investigar el cambio en la energía potencial electrostática producida por cada mutante, se calculó la isosuperficie del potencial electrostático molecular (ESP) del modelo de β1. En breve, se genera una isosuperficie, a partir de la ley de Coulomb (ver métodos sección 6.4) y en base al cálculo cargas atómicas parciales (método de mecánica molecular) (ver apéndice 12.5.2).

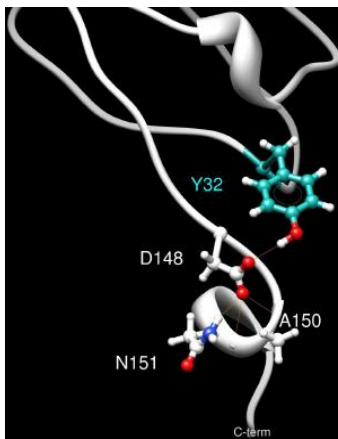
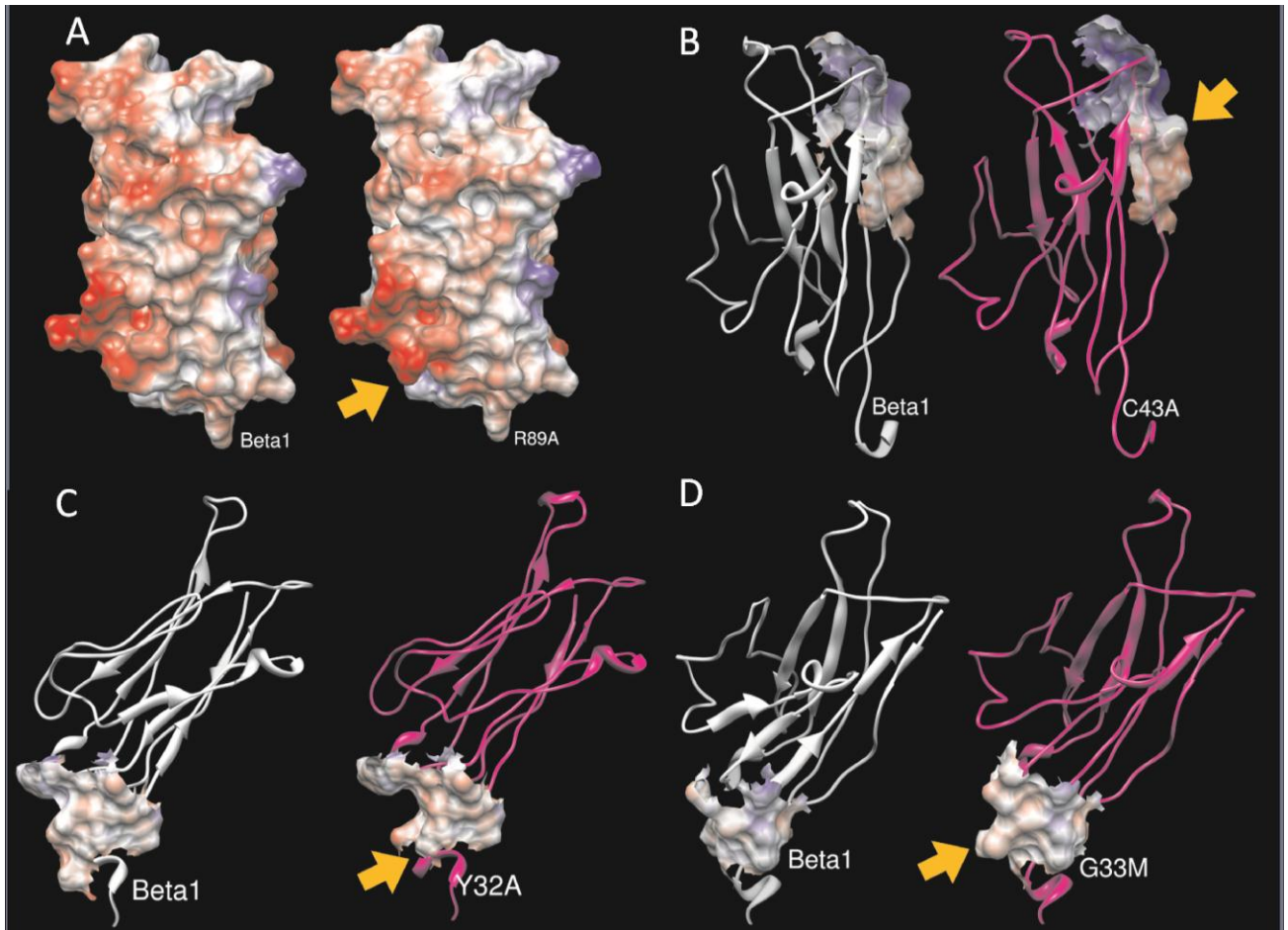
En la figura 36 A se aprecia el aumento local de acidez producida por la sustitución neutralizante de la R89 por alanina, debido a la pérdida del puente de sal intramolecular propuesto entre E87 (flecha amarilla fig 36 A) con su cadena lateral ahora reactiva. Este cambio electrostático no afectó la dependencia de voltaje ni de activación ni de inactivación.

El modelo predice que el mutante C43A produce un aumento local en el área polar, debido a la liberación del grupo tiol de la cisteína 21 (flecha amarilla fig 36 B), sin embargo, los resultados experimentales sugieren un posible aumento de entropía, de este modo reduciendo la rigidez del extremo amino terminal, el cual parece participar críticamente en la modulación de la dependencia de voltaje de activación e inactivación del canal.

En efecto, otras manipulaciones estructurales en el primer giro de este extremo amino terminal introducidas por medio de mutaciones puntuales, perturban selectivamente la dependencia de voltaje de inactivación. Los mutantes Y32A y G33M indujeron un desplazamiento de la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales más despolarizantes, comparado con el fenotipo nativo Nav1.4+β1 (fig 30). Sin embargo estos

mutantes, no modificaron la dependencia de voltaje de activación ni tuvieron efectos significativos sobre la cinética de inactivación y recuperación.

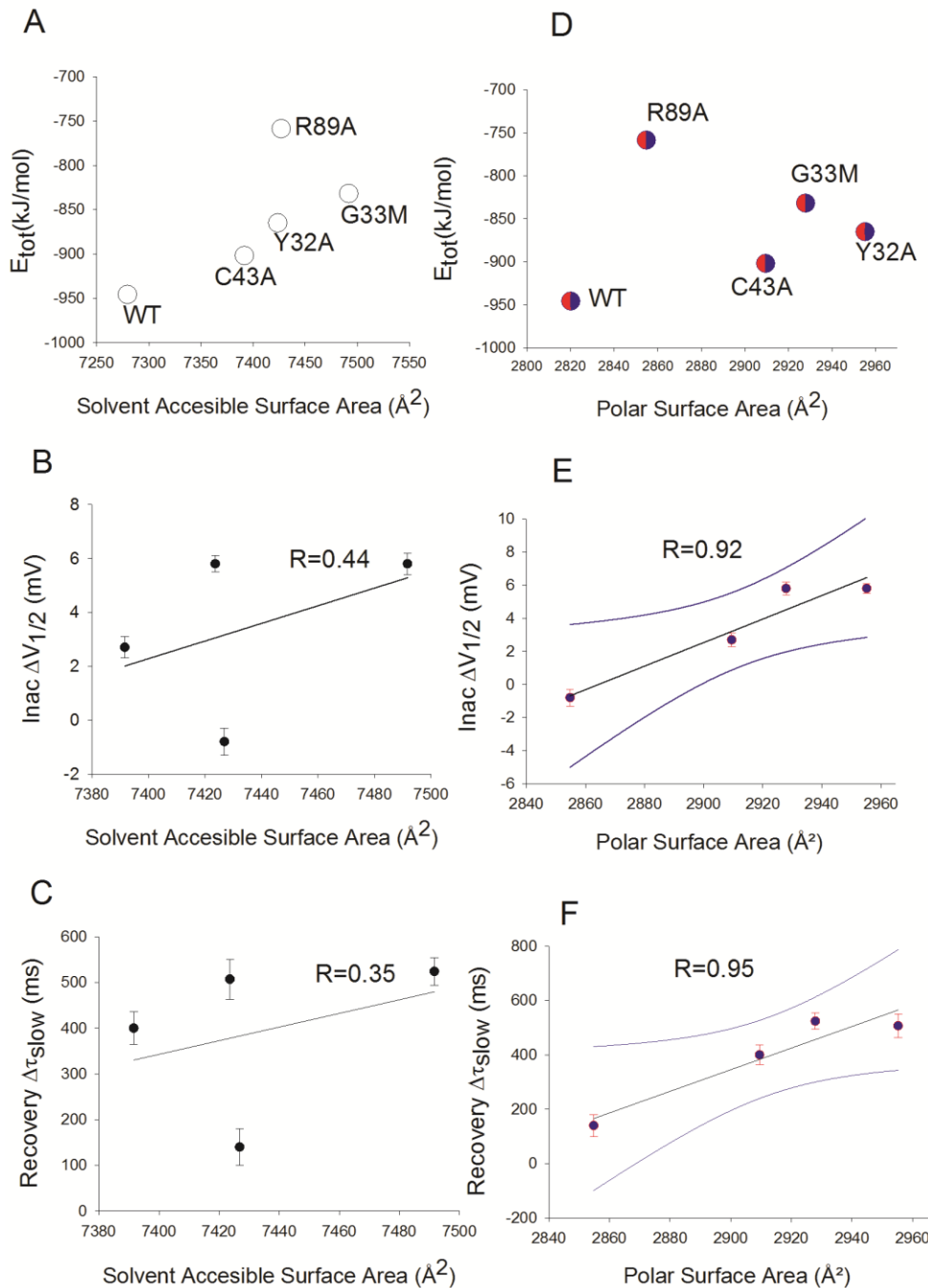
El modelo de  $\beta 1$  muestra que la sustitución la tirosina 43, por alanina, descubre un residuo ácido (E148), previamente involucrado en una red de puentes de hidrógeno (incluyendo D148, A150 y D151) con el grupo hidroxilo de Y43 (fig 36 C y panel inferior). La sustitución del residuo consecutivo de glicina por metionina (G33M), introduce una cadena lateral voluminosa e hidrofóbica (fig 38 D) produciendo el mismo efecto de pérdida de función selectiva que produjo Y43A.



**Fig 36. Efectos estructurales y electrostáticos de los mutantes de  $\beta 1$ .** La superficie potencial electrostática (ESP) en la escala de color de Coulomb para: (A)  $\beta 1$ -R89A, esta mutación incrementó la carga negativa debido a la pérdida de un puente de hidrógeno entre R89 y E87, cuyo grupo carboxílico se encuentra ahora expuesto y reactivo. (B) La ESP en un radio de 7Å de la posición 43 en  $\beta 1$ -C43A, esta sustitución impide la formación de un enlace disulfuro intramolecular teórico entre C21 y C43, incrementando la entropía en una región de por sí escasamente regular. (C) La ESP en un radio de 5Å del residuo 32, la sustitución de tirosina en  $\beta 1$ -Y32A incrementa la polaridad desestabilizando una red coordinada de puentes de hidrógeno, debido a la pérdida de un hidroxilo, el cual se encontraba previamente compartiendo un hidrógeno con N148 y la reducción en hidrofobicidad debido a la pérdida del anillo aromático fenil de la tirosina (panel de la esquina inferior izquierda). (D) La ESP en un radio de 5Å de la posición 33 en  $\beta 1$ -G33M, éste mutante introduce una cadena lateral larga, hidrofóbica. Los cálculos fueron hechos bajo el campo de fuerza AMBER/Gasteiger.

Los métodos para la predicción de *hotspots* suelen dividirse en a) métodos basados en energía, es decir en el cálculo de energía libre que produce, por ejemplo la sustitución por alanina de un residuo en particular y b) métodos basados en características, es decir, discriminan posibles *hotspots* del resto de los residuos de la proteína, a partir de su secuencia, estructura o una combinación de ambas (Xia y cols., 2010).

Dentro de las características empleadas en este segundo tipo de métodos se encuentra, el cálculo del área superficial accesible al solvente (Guney y cols., 2008; Tuncbag y cols., 2009; Xia y cols., 2010) y el área polar superficial (Xia y cols., 2010; Eric y cols., 2013). Estos parámetros fueron calculados para los modelos de  $\beta 1$  y sus cuatro mutantes.



**Fig 37 Características energéticas y superficiales globales del modelo del dominio extracelular de  $\beta 1$  y sus mutantes y su relación con el cambio en los parámetros electrofisiológicos del canal Nav1.4.** La energía libre total ( $E_{tot}$ ) fue calculada después de una minimización energética bajo el campo de fuerza CHARMM27 con un gradiente de convergencia de  $1 \times 10^{-5}$  pasos. La diferencia entre el voltaje medio de inactivación ( $\ln ac \Delta V_{1/2}$ ) de los 4 mutantes con respecto al fenotipo nativo (Nav1.4+ $\beta 1$ ) en función del área superficial accesible al solvente (B) y en función del área polar superficial (E). La diferencia en la constante de tiempo lenta de recuperación de la inactivación ( $\Delta \tau_{slow}$ ) de los 4 mutantes con respecto al fenotipo nativo (Nav1.4+ $\beta 1$ ) en función del área superficial accesible al solvente (C) y en función del área polar superficial (F). Los datos en B, C, E y F fueron ajustados a una regresión lineal simple y se muestra su coeficiente de regresión y los límites de confianza al 95% curvas en azul.

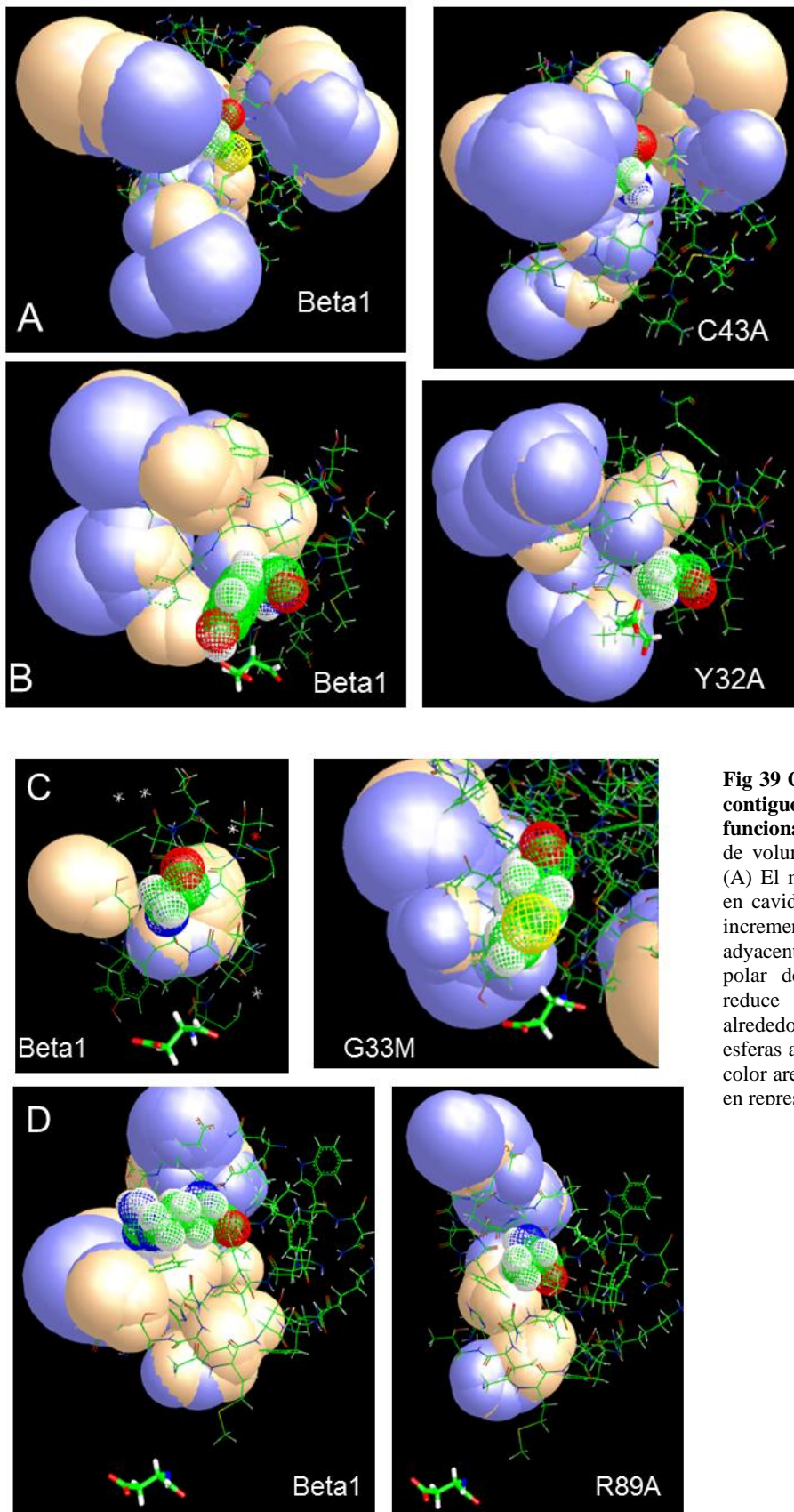
En la figura 37 A y D se aprecia que todos los mutantes incrementaron la energía libre total, el área superficial accesible al solvente y el área polar superficial del dominio extracelular de  $\beta 1$ .

Resulta interesante el hecho de que la neutralización de la arginina 89 parece producir el mayor aumento en energía libre, lo que podría indicar que el propuesto puente de sal (entre R89 y E87) da estabilidad a la estructura de  $\beta 1$ . Sin embargo a pesar del aumento local de acidez que este mutante generaría (fig 36 A) el aumento en el área polar superficial total, en comparación con los otros mutantes es bajo para R89A. Por otra parte, el mutante que posee un mayor incremento en el área polar superficial es Y32A, lo que refleja la magnitud de la desestabilización de la red de enlaces de hidrógeno propuesta (fig 36, panel inferior).

Con el fin de investigar si existe relación entre éstos parámetros *in silico* y los cambios electrofisiológicos experimentales de  $\beta 1$  y sus cuatro mutantes, se realizaron regresiones lineares simples, por mínimos cuadrados de los cambios en el voltaje medio y de las constantes de tiempo de inactivación y recuperación de los mutantes con respecto al fenotipo Nav1.4+  $\beta 1$ . Se puede apreciar que el área polar superficial total parece ser directamente proporcional al cambio en el voltaje medio de inactivación ( $Inac \Delta V_{1/2}$ ) y a la diferencia en la constante de tiempo lenta de recuperación de la inactivación ( $\Delta \tau_{slow}$ ) de los 4 mutantes con respecto al fenotipo nativo (Nav1.4+ $\beta 1$ ) (fig 37 E y F). A diferencia del área superficial accesible al solvente donde no hay correlación (fig 37 B y C).

Si los residuos de importancia funcional identificados en el presente estudio constituyen verdaderos *hotspots*, los dominios de la subunidad  $\alpha$  se ubicarían en cavidades adyacentes a estos residuos de  $\beta 1$ . El cálculo descriptivo de estas cavidades fue llevado a cabo mediante el software Fpocket (Le Gilloux y cols., 2009). El cual ilustra estas posibles cavidades en forma de burbujas que representan grupos caracterizados de esferas alpha, un concepto originalmente propuesto para describir la geometría de sitios de unión a ligandos (Liang y cols., 1998). Cada esfera alpha conecta en su superficie cuatro átomos equidistantes, coloreadas de acuerdo a su polaridad. Una esfera alpha que conecte al menos 3 átomos apolares (con una electronegatividad  $< 2.8$ ) es considerado apolar, sin este no es el caso la esfera es considerada polar (en violeta).

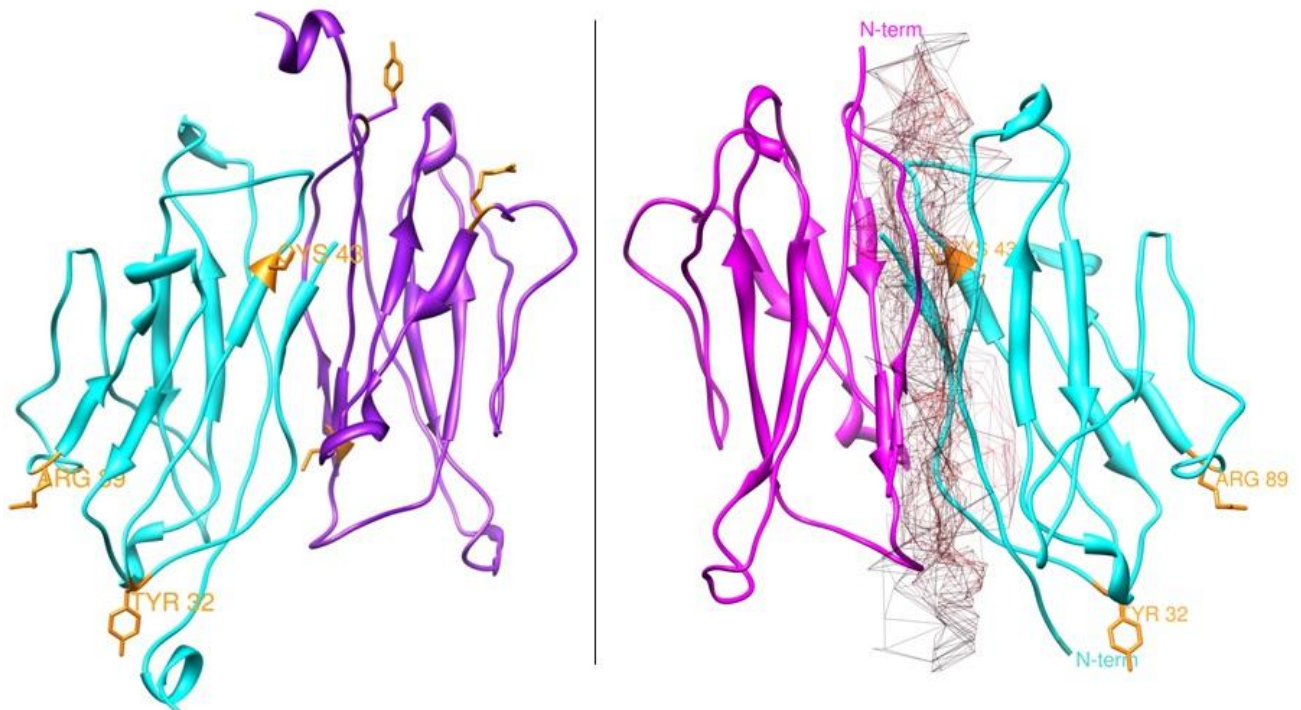
Como se aprecia en la figura 39 A, la sustitución C43A incrementa el volumen de una esfera polar adyacente, pero imposibilita la formación de otra por debajo de este residuo. El mutante Y32A incrementa la formación de cavidades polares y las redistribuye en dirección carboxilo terminal, es decir hacia donde se ubicaría la membrana celular. La introducción de la cadena lateral apolar de metionina mediante el mutante G33M, produce contra-intuitivamente, un aumento en las cavidades polares locales y además es el mutante que produce el segundo mayor aumento en el área polar superficial total (fig 37 D).



**Fig 39 Grupos de esferas alpha (Fpockets) contiguos (10Å) a residuos de interés funcional identificados** (en representación de volumen de van der Waals de alambre). (A) El mutante C43A genera un incremento en cavidades polares. (B) El mutante Y32A incrementa la polaridad de las cavidades adyacentes (C) G33M incrementa el área polar de esferas alfas locales (D) R89A reduce el número de cavidades apolares alrededor de este aminoácido. Grupos de esferas alpha polares en violeta y apolares en color arena. El residuo C-terminal se muestra en representación de bastones en B, C y D.

### 7.5 Dimerización de la subunidad $\beta 1$ .

Aparte de modular el mecanismo de compuerta del canal, la subunidad  $\beta 1$  interactúa con otras subunidades  $\beta 1$  a través de interacciones trans-homofílicas de adhesión celular. Se ha propuesto que dicha interacción podría llevarse a cabo de célula a célula en los nodos de Ranvier (Isom 2001). Por lo que la subunidad  $\beta 1$  debe poseer un sitio de unión para su dimerización, además de su sitio de unión a la subunidad  $\alpha$ . Mediante simulaciones de docking proteína-proteína, se identificó un posible sitio de unión, el cual, como se observa en la figura 40, no interfiere con los sitios que subyacen a la modulación de la corriente.



**Fig 40. Dimerización del dominio extracelular la subunidad  $\beta 1$ .** La simulación de anclaje molecular muestra que en la asociación de los monómeros (en cian y magenta respectivamente), no intervienen los sitios identificados de los que depende la modulación de la corriente (en dorado, representación de bastones). El panel de la derecha muestra la imagen especular de la derecha en la cual se ha calculado la superficie de la interface entre ambos monómeros.

## 8. Discusión.

El objetivo principal de esta tesis, que combina mutagénesis sitio-dirigida, registros electrofisiológicos y simulaciones *in silico*, es el de estudiar la participación funcional de residuos particulares en la subunidad  $\beta 1$ . Elucidar los posibles determinantes moleculares que subyacen a la modulación de la corriente que esta subunidad ejerce sobre el canal Nav1.4 y adquirir indicios de la localización de su interface.

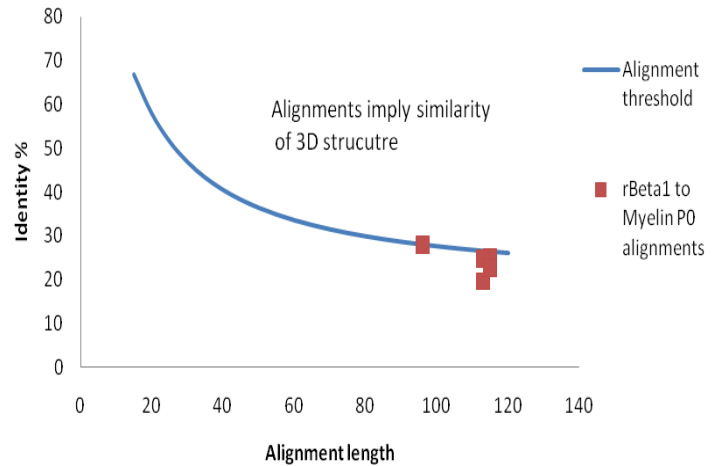
### 8.1 Modelaje de la subunidad $\beta 1$ .

En términos generales dos proteínas son consideradas homólogas (*i.e.* relacionadas entre sí por evolución divergente de un ancestro común) si su porcentaje de identidad es mayor al 30% para una secuencia de 200 a 250 residuos que constituye del 25 al 30% de un dominio típico de una proteína citosólica (Scior y Wahab 2007), (fig 42).

Dicho lo anterior es indispensable señalar que se ha demostrado que la estructura proteica es más conservada que la secuencia proteica entre homólogos. Por lo que el modelado de proteínas por homología se basa en la premisa razonable de que dos proteínas homólogas compartirán una similitud estructural significativa.

Un porcentaje de identidad menor al 20% entre dos proteínas molde-target constituye lo que en modelado por homología se denomina “zona crepúsculo” (Chothia y Lesk 1986). No obstante, a pesar de una identidad extremadamente baja (15%), la similitud general espacial podría permitir el modelado computacional por homología (Scior y Wahab 2007).

Por lo tanto, aunque el objetivo con respecto a la subunidad  $\beta 1$  no es determinar si esta posee una proximidad



**Fig 42. El número de pares de residuos alineados en función del porcentaje de identidad.** La curva denota el umbral de homología, donde todo par de proteínas cuyos valores están por encima de ésta, poseen similitud estructural significativa. Los puntos corresponden a los valores de los alineamientos de la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio con la proteína mielínica P0.



**Fig 43. Superposición del dominio extracelular  $\beta 1$  con su estructura molde.** Estructura cristalizada de la proteína mielínica de adhesión a membrana P0 (gris) a 1.9Å de resolución superpuesta al modelo de la subunidad  $\beta 1$  (magenta). Ambas estructuras forman el pliegue Ig de 2 hojas  $\beta$ , sin embargo  $\beta 1$  posee 3 segmentos  $\beta$  plegados menos que la proteína P0.

evolutiva estrecha con la proteína mielínica P0, si esto es cierto, al menos hasta cierto grado, ambas compartirán una topología lo suficientemente similar para generar a partir de la estructura experimental de P0 un modelo realista de  $\beta 1$  y útil en el estudio de su estructura-función (fig 43).

Los puntajes de los alineamientos (globales, i.e. excluyendo a BLASTp el cual es local) de ambas proteínas se encuentran ligeramente por debajo del límite propuesto para implicar automáticamente una similitud estructural (fig 17). El análisis de los sitios de interés funcional requirió de comparaciones con otras estructuras cristalizadas, los cuales resultaron altamente conservados a pesar de la baja identidad con éstas estructuras inmunoglobulínicas (fig 45).

## 8.2 Efectos de pérdida de función selectivos e independientes.

Los resultados electrofisiológicos nos permiten apreciar dos tipos de pérdida de función, 1) La reducción en la disponibilidad de canales Nav1.4 durante la inactivación y la recuperación producidos por C43A y R89A, y 2) pérdida de la modulación de voltaje de activación (por el mutante C43A) y de inactivación de estado estable (por los mutantes C43A, Y32A y G33M).

En el caso del mutante R89A su efecto en la cinética es selectivo, ya que no disminuyó la capacidad de modulación de voltaje de esta subunidad. Similarmente Y32A y G33M no disminuyeron la aceleración de la inactivación y recuperación que esta subunidad ejerce sobre corrientes Nav1.4. Esto sugiere que los dos tipos de modulación que ejerce la subunidad  $\beta 1$  sobre los canales Nav1.4 i.e. la dependencia de voltaje y la aceleración de la cinética dependen de dos sitios distintos de asociación molecular y son entre sí independientes.

Otros autores han llegado a ésta misma interpretación al realizar registros en quimeras de las asas extracelulares de los canales Nav1.2 y Nav1.5 (Qu y cols., 1999). En dicha publicación los autores argumentan que varias asas extracelulares influyen la dependencia de voltaje de activación e inactivación, mientras que el asa DIVSS2-S6 (segunda asa en dirección carboxilo terminal del dominio IV) juega un papel determinante en la modulación de la cinética que ejerce  $\beta 1$  (Qu y cols., 1999).

Por otro lado, en el presente estudio el mutante C43A impactó significativamente todos los parámetros electrofisiológicos, incluyendo la dependencia de uso, es decir produjo una acumulación de la inactivación mayor que el fenotipo nativo. Sin embargo nuestra interpretación es que este mutante puntual desestabiliza un dominio de mayor extensión al impedir la unión covalente tener C21 y C43.

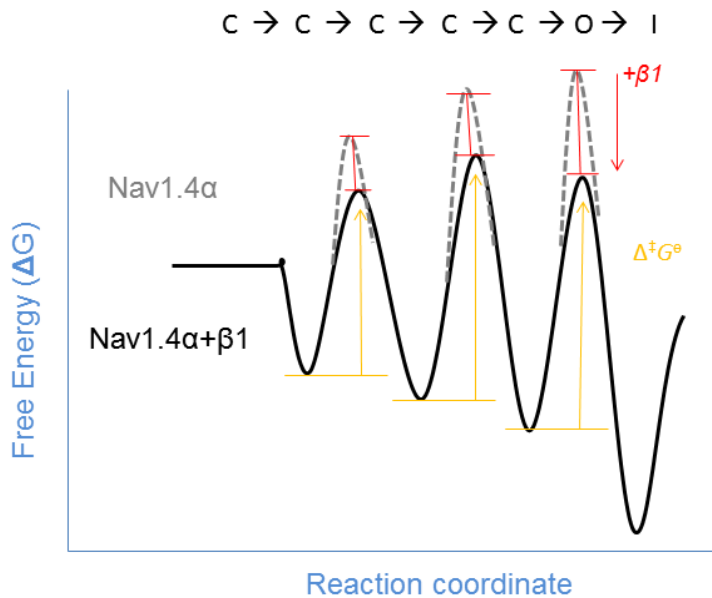
## 8.3 Modulación de $\beta 1$ de acuerdo a la teoría de transición de estado.

Se debe tomar en cuenta que dado que los canales iónicos dependientes del voltaje son complejos proteicos altamente flexibles, cambios conformacionales significativos deben de ocurrir durante sus transiciones entre los estados en reposo, activado e inactivado en respuesta a despolarizaciones (O'Reilly y cols., 2008). Por lo tanto se debe considerar la existencia de múltiples y transitivos modos de asociación molecular (*binding modes*) entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$  del canal de sodio. En efecto ésta es la interpretación que sugieren los efectos selectivos anteriormente mencionados, la cual concuerda con el modelo de estado para asociaciones reversibles proteína-proteína, en el que re-arreglos

conformacionales optimizan la unión molecular, generalmente involucrando movimientos de cadenas laterales (Xu y cols., 1997).

Varios estudios experimentales y numéricos, incluyendo registros de canal unitario y simulaciones de teoría de tasa de Eyring han, por mucho tiempo, apoyado la teoría de que la subunidad  $\beta 1$  modula las corrientes del canal de sodio dependiente de voltaje al causar un cambio en la fracción de canales del mecanismo de compuerta de modo lento al rápido sin afectar la cinética de cada modo (Isom y cols., 1992; Bennett y cols., 1993; Patton y cols., 1994). Esto implica que las subunidades  $\alpha$  por si solas son capaces de inactivar y recuperarse en un modo rápido (i.e., cuando ~50% de canales están recuperados de la depolarización al pico en 1ms, fig 34), pero la probabilidad de que lo hagan es baja, i.e. el proceso es termodinámicamente desfavorable (Bennet y cols., 1993).

Consecuentemente la unión de la subunidad  $\beta 1$  a la  $\alpha$  reduce la barrera de energía de tal modo que la probabilidad de transitar en el modo rápido incrementa debido a la formación de la interface funcional proteína-proteína, como se esquematiza en la figura 44.



**Fig. 44** Diagrama de estado del perfil de energía de Eyring para mecanismo de compuerta del canal Nav1.4 con y sin  $\beta 1$ . La depolarización pone en marcha el mecanismo de activación del canal, al disminuir la barrera energética standard ( $\Delta^\ddagger G^\circ$ ). La asociación molecular entre subunidades reduce la barrera energética para las transiciones de estados cerrados y abierto hacia el estado inactivado, reduciendo el tiempo de inactivación del canal Nav1.4+  $\beta 1$  (adaptado de Bennet y cols., 1993).

Si bien tanto los resultados experimentales y predicciones computacionales coinciden con esta teoría, también introducen el argumento de que el efecto alostérico por el cual  $\beta 1$  es capaz de incrementar la disponibilidad de canales en el modo rápido y el efecto alostérico por el cual  $\beta 1$  modula la dependencia de voltaje, no dependen uno del otro. Los resultados experimentales revelan que R89A reduce la disponibilidad de canales que inactivan y recuperan rápido sin afectar la dependencia de voltaje o la disponibilidad de canales ante despolarizaciones repetidas a 1Hz.

#### 8.4 Interpretación de la relación estructura-función de R89.

El dominio extracelular de  $\beta 1$  al igual que las asas del vestíbulo extracelular de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio son predominantemente ácidas. Los cálculos electrostáticos predicen una carga neta de entre -8 y -7 (bajo campos de fuerza AMBER y CHARMM respectivamente) para el dominio extracelular de  $\beta 1$  (142 residuos).

La razón fundamental detrás de la neutralización de la arginina 89 fue la de forzar una pérdida de carga positiva en una región de posible interacción con la subunidad  $\alpha$ . Sin embargo la interacción  $\alpha$ - $\beta$ 1 en esta región debe ser un evento tardío, dado que este residuo no perturba la activación y gradual pero consistentemente desaceleró la inactivación y la recuperación. De acuerdo con los estudios *in silico*, se propone que R89 interviene con su cadena lateral en un puente de sal expuesto al solvente, el cual se rompe al aproximarse al vestíbulo externo de la subunidad  $\alpha$  y a continuación, después de la despolarización se une directamente a ésta. Tal evento molecular side-flipping de asociación molecular intracatenario a intercatenario, adecuadamente apoya los presentes hallazgos a cerca de lo que causa este cambio en la fracción de canales de modo lento a rápido sin modificar el voltaje medio de inactivación (tablas 4 y 5).

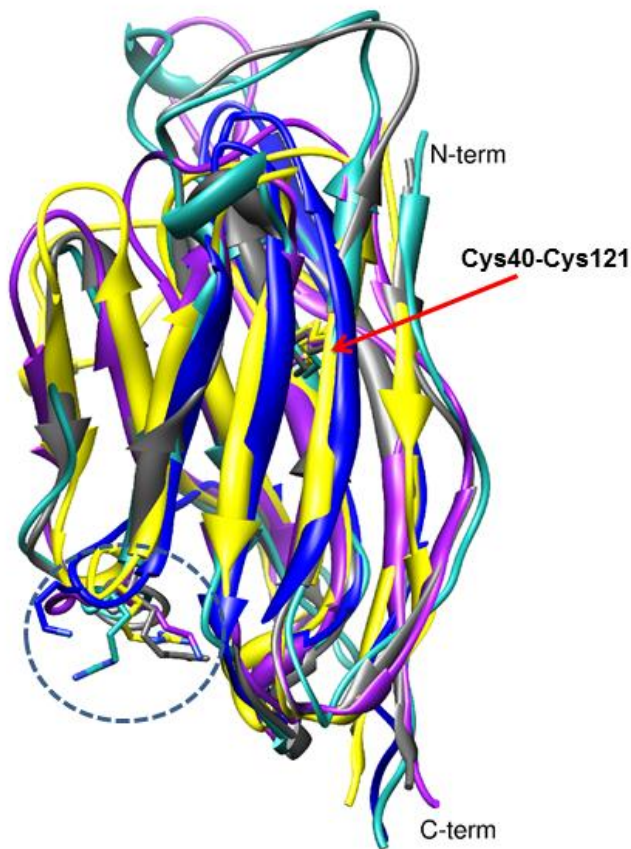
Interesantemente, la escala de tiempo de la rotación de cadenas laterales de un aminoácido, es decir el proceso que ha sido modificado por la mutación, ocurre en una escala de tiempo de  $1 \times 10^{-7}$  ms (Hille 2001). En esta escala de tiempo se calcula que se llevan a cabo movimientos atómicos de una amplitud de 0.1 a 10 Å. Además, el largo de la cadena lateral de una arginina en una conformación termodinámicamente favorable es de 6.18 Å (Dunbrack 2002). Por lo tanto, dado que la inactivación del canal Nav1.4+ $\beta$ 1 sucede en  $\sim$ 1ms, es posible que este side-flipping molecular de R89 involucre varios pasos, es decir, la formación y rompimiento de varios puentes de hidrógeno, antes de establecer una asociación molecular proteína-proteína con átomos vecinos, como lo sugiere la comparación de los modelos de  $\beta$ 1 (fig 22 B)

Con la finalidad de explorar el espacio conformacional posible del aminoácido R89, se llevaron a cabo simulaciones de minimización energética por el método de gradientes conjugados en VEGA ZZ 2.3.2 de éste aminoácido en solvente (en interacción con moléculas de agua). Se observó, a partir del mejor modelo 3D generado anteriormente de  $\beta$ 1 que R89 presenta una longitud de 5.69 Å (del carbono alfa al nitrógeno del grupo guanidina de R89), sin embargo también se registran isómeros conformacionales (o rotámeros) de R89, que bajo las mismas condiciones de minimización energética, pueden alcanzar hasta 7.18 Å (Dunbrack 2002; Pettersen y cols., 2004).

En el modelo atómico original de  $\beta$ 1, la arginina 89, establece un puente de sal intramolecular con el glutamato 87 con una fuerza de unión o energía libre de -0.32 kcal/mol, y ésta aumenta después de una simulación en solvente de agua a -0.45 kcal/mol, éste puente de sal es conservado aun en un rotámero de R89 cuya cadena lateral alcanza una mayor longitud (probabilidad = 0.065, energía de enlace = -0.21 kcal/mol). Tal es la magnitud del cambio de energía libre que conllevaría la sustitución R89A en el mutante, puesto que la cadena lateral de alanina no es reactiva, además del establecimiento de un puente de hidrógeno de R89A entre la cadena principal de la valina 90 y la alanina 89 con una energía de -0.06 kcal/mol. Como referencia Bennett y cols., (1993) han calculado a partir de datos experimentales electrofisiológicos, mediante la teoría de Eyring que los cambios en el mecanismo de compuerta del canal generados por la subunidad  $\beta$ 1 pueden ser explicados por un disminución de 2.68 kcal/mol en la tasa limitante de la barrera energética producto de la unión  $\beta$ 1 a la subunidad  $\alpha$  del canal Nav1.4, específicamente para la recuperación de la inactivación (Bennett y cols., 1993).

### 8.5 Interpretación de la relación estructura-función de C43.

Por otra parte el mutante C43A produce efectos de pérdida de función generalizados, inducidos probablemente a una significativa introducción de entropía translacional producto de la pérdida de este hipotético enlace disulfuro entre C21 y C43, permitiendo mayor flexibilidad al asa amino terminal en el que la cisteína 21 se encuentra (fig 38). En base a la comparación con proteínas cristalizadas, argumentamos que este cambio estructural no pudo haber causado un colapso de la estructura, debido a que ninguna de las



estructuras inmunoglobulínicas cuyo plegamiento es notablemente similar al modelo de  $\beta 1$  poseen un puente disulfuro en el sitio correspondiente a C43, sin embargo todas ellas conservan un motivo de hoja  $\beta$  antiparalela (fig 45).

Fig 45 Superposición tridimensional del modelo de la subunidad  $\beta 1$  con 3 proteínas Ig cristalizadas: NTRK2\_HUMAN, TRGC2\_HUMAN, y un anticuerpo de camello VHH (códigos PDB: 1neu\_A, 1wwb\_X, 1hxm\_B, 1kxq\_H). Se observa un puente disulfuro altamente conservado uniendo los dos filamentos  $\beta$  que forman el pliegue inmunoglobulinico de sándwich  $\beta$  (flecha en rojo). Los aminoácidos en el sitio correspondiente a R89 se encuentran en representación de bastones, dentro del círculo punteado. ( $\beta 1$  en cian, 1wwb\_X en azul marino, 1hxm\_B en magenta y 1kxq\_H en amarillo).

No obstante no se puede excluir la posibilidad de que el tráfico a lo largo del citoesqueleto o la inserción de membrana de este mutante haya disminuido debido a

la alta eficiencia del promotor del vector pGEMHEnew, en el cual se encuentra insertado el gen SCN1B ( $\beta 1$ ). De este modo la amplitud de corriente no puede ser comparada entre grupos.

Coincidentemente Yu y colaboradores (2005) obtuvieron resultados similares con la subunidad  $\beta 3$  del canal de sodio, cuando probaron la misma sustitución en la cisteína correspondiente. El mutante C24A en  $\beta 3$  (correspondiente a C43A en  $\beta 1$ ) produjo un ligero cambio en el voltaje de medio de activación del canal Nav1.5 y modificó significativamente el de inactivación (Yu y cols., 2005).

En otra serie de estudios C24A impidió la unión homofílica a la subunidad  $\alpha$ , según mostraron los ensayos de inmunoprecipitación en células HEK293. La interpretación de los autores es que el enlace disulfuro, del que C24 forma parte, no participa directamente en el sitio de unión para su dimerización, sino que contribuye a orientar los residuos que interactúan en la asociación molecular  $\alpha$ - $\beta 1$  (Yerredy y cols., 2013). De la misma forma, las

simulaciones de anclaje molecular de  $\beta 1$  en este trabajo, sugieren una participación importante de la cisteína correspondiente, C43 en el establecimiento de asociaciones trans-homofílicas, ya que esta se encuentra próxima al sitio de unión de dimerización propuesto (fig 40). Lo cual también indicaría que el puente disulfuro perdido debido a la mutación C43A, no participa directamente en la interface Nav1.4- $\beta 1$ , sino que contribuye a la unión estabilizando los residuos en interacción directa con la subunidad  $\alpha$ .

Un reciente estudio *in silico* también involucró la participación de C43 en el sitio de unión  $\beta 1$ - $\beta 1$ . Además el modelo del complejo dimérico de esta subunidad presentado en esta tesis, coincide con el modelo de dicha publicación, en particular 16 de los 20 amino ácidos involucrados en la interface  $\beta 1$ - $\beta 1$  según los resultados publicados se encuentran en la interface propuesta en la figura 40 (Liu y cols., 2013).

El mutante G33M constituye la sustitución que introduciría la mayor entropía rotacional *per se* (debido a su larga y flexible cadena lateral), en efecto fue el mutante con mayor aumento en el área superficial accesible al solvente y el segundo en incremento de energía libre total (fig 37). Interesantemente éste no presentó un efecto de pérdida de función evidente sobre la inactivación del canal, sin embargo su comportamiento cinético no se ajustó a una ecuación exponencial, a diferencia del fenotipo nativo, R89A y Y32A. De la misma forma, el hecho de que C43A no se ajustara a esta caída exponencial sugiere un incremento comparable en la entropía causada por la pérdida del enlace covalente que C43 podría estar formando con C21. Sin embargo es difícil apoyar este posible incremento en la entropía de C43A a partir de los cálculos de energía libre por mecánica molecular exclusivamente, por lo que se precisaría de dinámicas moleculares para proporcionar una mejor explicación de los resultados experimentales.

El área polar total del dominio extracelular de  $\beta 1$  parece estar involucrada en la modulación del voltaje de inactivación y en la cinética del canal Nav1.4, a diferencia de área superficial accesible al solvente. La correlación estos parámetros *in silico* con resultados electrofisiológicos experimentales indican que el área polar podría ser directamente proporcional al cambio del  $V_{1/2}$  de inactivación y al cambio en la constante de tiempo lenta de recuperación de la inactivación (fig 37).

Esto significa que la reducción de la superficie apolar por los mutantes puntuales está asociada a los efectos pérdida-de-función en sensibilidad de voltaje y cinética. Lo que coincide con estudios previos que indican que las interacciones hidrofóbicas contribuyen a la estabilidad de la interface proteína-proteína. Sin embargo, también se ha observado que en regiones intrínsecamente desordenadas las interacciones polares juegan un papel mayor que en complejos protéicos estructurados (Wong y cols., 2013). Como se ha mencionado anteriormente, se propone que las asas del vestíbulo extracelular de la subunidad  $\alpha$  con las que ésta podría interactuar con  $\beta 1$  constituyen regiones intrínsecamente desordenadas.

La desaceleración de la recuperación de la inactivación y el incremento en la acumulación de inactivación (o *rundown*) durante estimulaciones a altas frecuencias podría ser importante para restringir la hiperexcitabilidad durante la conducción del dolor y las neuropatologías como la epilepsia (Meadows y cols., 2002). El mutante R89A retardó la recuperación de la inactivación sin incrementar la acumulación de la inactivación, mientras que el mutante C43A perturbó ambos efectos (fig 35).

## 8.6 Magnitud del efecto de los mutantes de $\beta 1$ .

Aunque la reducción en la fracción de canales bajo el protocolo de recuperación de R89 y C43 se limita a los 10 y 100 ms, sus efectos no son triviales en comparación con reportes en la literatura al respecto. Importantemente, la principal evidencia a cerca de los principios que gobiernan la asociación  $\alpha$ - $\beta 1$  no ha avanzado en poco más de 13 años (McCormick y cols., 1999; Brackenbury e Isom 2011). Concretamente se ha propuesto que la triada ácida E23, D25, E27 localizada entre los sitios conservados C43 y Y32 juega un papel fundamental en la modulación  $\alpha$ - $\beta 1$ . Los autores concluyen que ocurre un 22% de reducción en la fracción de canales que inactivan en el modo rápido comparado con el fenotipo nativo Nav1.2+ $\beta 1$  cuando la subunidad  $\alpha$  es co-expresada con el triple mutante de  $\beta 1$ -E23Q-D25Q-E27Q (McCormick y cols., 1999). Este mutante no produjo una desaceleración significativa de la recuperación de canales Nav1.2+ $\beta 1$ - E23Q-D25Q-E27Q (McCormick y cols., 1999). En cambio el mutante C43A si produjo una constante de tiempo de recuperación de la inactivación significativamente mayor y su efecto en la cinética es claro (tabla 5, fig 36).

Por otra parte Xu y cols., (2007) observaron que la mutación  $\beta 1$ -R85C, encontrada en casos familiares de epilepsia generalizada con convulsiones febriles (GEFS+) solo modifica las constantes de tiempo de inactivación del canal Nav1.2 a potenciales hiperpolarizantes de +20mV a +50mV, pero no a potenciales cercanos al pico de corriente del canal de sodio (-20mV) (Xu y col., 2007), los autores encuentran, al igual que en el presente estudio, diferencias significativas de los mutantes R85H y R85C en los primeros milisegundos del curso temporal de la recuperación de la inactivación rápida, sin embargo solo hasta los 10 ms, mientras que nuestro mutante R89A genera diferencias durante una ventana de tiempo más amplia, hasta los 100ms, (fig 36).

En dicha publicación el mutante R85C pero no R85H afectó la inactivación de los canales. En el presente estudio el modelo de  $\beta 1$ , tras ser sometido a pasos de refinamiento indicó que R85 podría formar puentes de sal al igual que R89. La discrepancia encontrada en el estudio experimental de Xu y cols., (2007) puede ser simulada computacionalmente; la histidina, siendo una base débil reemplaza a la arginina reorganizando la red de interacción no covalente, mientras que la sustitución por cisteína la desorganiza.

Por otra parte la neutralización del glutamato 87, con el cual, según el modelo R89 establece un puente de sal, está asociada a otra canalopatía. La mutación E87Q ha sido identificada en una familia turca afectada por el síndrome de Brugada (Watanabe y cols., 2008).

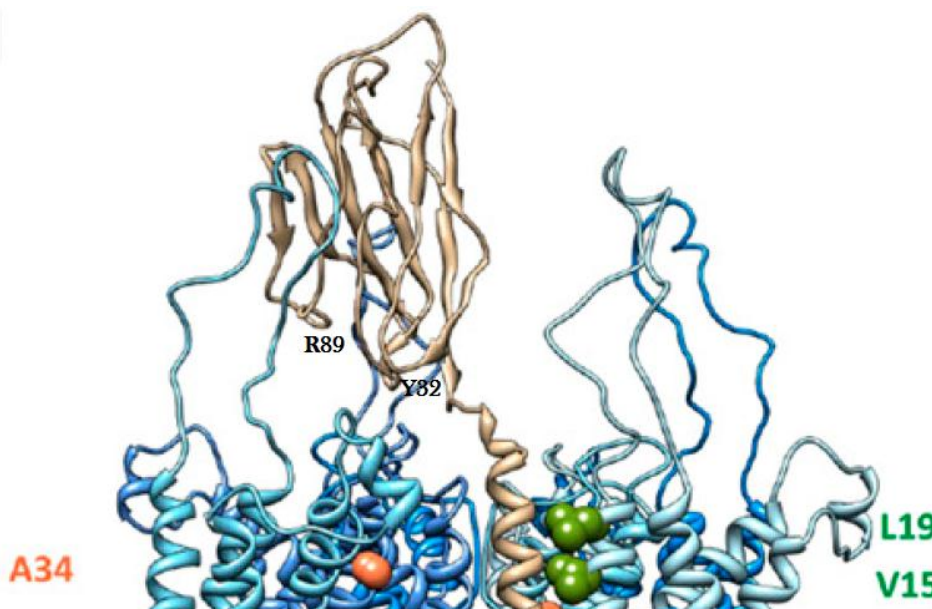
El mutante C121W está también asociado a casos familiares de GEFS+ y epilepsia del lóbulo temporal (Meadows y cols., 2002; Scheffer y cols., 2007) Esta mutación, a diferencia del mutante C43A, alteraría significativamente el pliegue inmunoglobulínico ya que se puede observar en el modelo que ésta cisteína se encuentra realizando un puente disulfuro con C40, el cual mantiene unidas ambas hojas  $\beta$  plegadas y además existe evidencia experimental de la existencia del puente disulfuro C40-C121 en  $\beta 1$  (Barbieri y cols., 2012). Esta asociación covalente se encuentra conservada en las estructuras cristalizadas con las que se compara el modelo de  $\beta 1$  (fig 45).

Resulta interesante el hecho de que esta mutación no disminuye la translocación de subunidades  $\alpha$  en la membrana, sin embargo si reduce sus capacidades adhesivas, disminuyendo la agregación celular, por lo que se argumenta que el enlace covalente del dominio inmunoglobulínico es esencial para que la capacidad de la subunidad de formar uniones homofílicas  $\beta 1$ - $\beta 1$  (Meadows et al., 2002). Lo que también sugerimos que pasaría con el mutante C43A en base a las simulaciones de anclaje molecular (fig 37).

Los autores argumentan que el mutante C121W aumenta la excitabilidad observada en epilepsia debido a efectos más sutiles como la modificación de la fracción de canales (hNav1.3) disponibles que abren a potenciales de membrana subumbral y reduciendo el *rundown* dependiente de frecuencia de la corriente de sodio. En el fenotipo nativo ( $\alpha$ Nav1.3+ $\beta 1$ ) se registra una reducción aproximada del 60% después de la aplicación de un tren de 100 pulsos (por 5ms, a -10mV, 80Hz), mientras que en células que expresan el mutante C121W la corriente solo se reducen en un 20 a 30% (Meadows et al., 2002). En contraste, el mutante C43A incrementó el *rundown* de la corriente Nav1.4- $\beta 1$  bajo despolarizaciones repetitivas a una frecuencia menor, de 1Hz, constituyendo una pérdida de función.

### 8.7 Asociación de $\beta 1$ a canales de potasio.

Recientemente se ha descubierto que la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio se coensambla y modula canales de potasio dependientes de voltaje (Marionneau y cols., 2012). Nguyen y cols., (2012) han reportado que  $\beta 1$  modula los canales Kv1 y Kv7, pero no Kv3 e identificaron distintos dominios involucrados en tal modulación. Los autores proponen un modelo del complejo Kv1.2- $\beta 1$  en el que el segmento transmembrana establece contactos clave con el segmento S5 de la subunidad  $\alpha$  de potasio, los aminoácidos involucrados son la leucina 13 y 17 (numeración transmembrana), sin embargo observan que varios residuos altamente conservados en  $\beta 1$  se asocian al canal Kv1.2 (Nguyen y cols., 2012).



**Fig 46. Vista lateral del modelo del canal homotetramérico de potasio Kv1.2 con la subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio.** Los monómeros están en 4 diferentes colores azules, la subunidad  $\beta 1$  en café claro y los residuos de los segmentos S1 y S5 de la subunidad  $\alpha$  expuestos a los lípidos de membrana que difieren dentro de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje se muestran en esferas naranja y verde respectivamente. En negro se muestra la posición relativa de los residuos extracelulares de la subunidad  $\beta 1$  identificados en el presente trabajo, de interés funcional para la modulación del canal Nav1.4 (adaptado de Nguyen y cols., 2012).

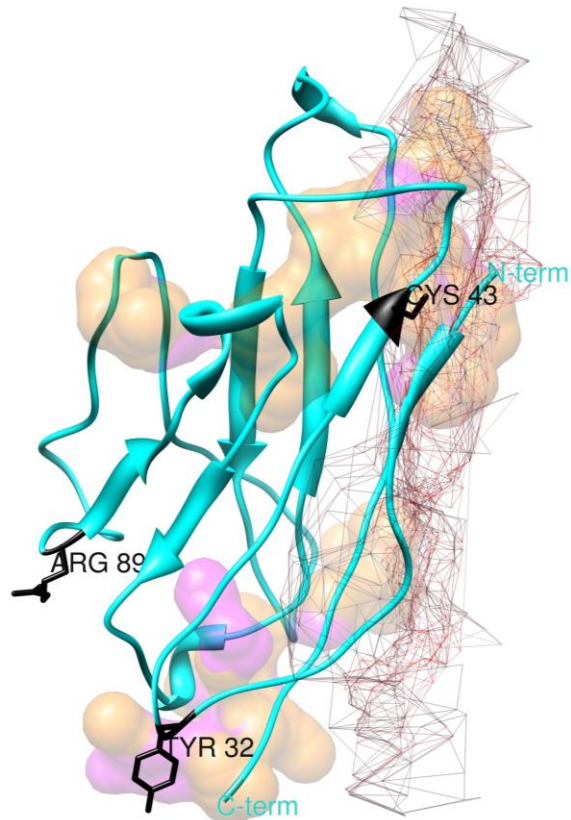
La interface incluye dos asas extracelulares de este canal. Resulta interesante observar que dos de los sitios identificados en el presente trabajo se encuentran en la interface Kv1.2- $\beta 1$  (fig 46).

Finalmente, la interpretación de los resultados del presente trabajo coinciden con el modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC) sobre la modulación alostérica proteína-proteína, en cuanto a que: I) la mutaciones pueden modificar el equilibrio alostérico espontáneo entre el estado conformacional relajado y tenso de un complejo proteico (para el caso de Nav1.4- $\beta 1$ , entre el modo lento y rápido de mecanismo de compuerta y entre el estado  $\beta 1$ -sensible y  $\beta 1$ -insensible a voltaje). Y II) en un sistema de interacción entre subunidades proteicas (o protómeros) en membrana, varias clases de respuestas a señales regulatorias específicas pueden existir, desde transiciones de fase graduadas (desaceleración de la inactivación) hasta respuestas discretas todo-o-nada (pérdida de la modulación del voltaje de inactivación), dependiendo de la isomerización y la energía libre de la interacción entre protómeros en ensamblajes de proteínas largas y periódicos (Changeux 2012).

## 9. Perspectivas.

El presente estudio, esboza la existencia de dos o más modos de asociación molecular  $\alpha$ - $\beta 1$  del canal de sodio parcialmente independientes. Uno de los cuales subyace a la modulación de voltaje y el otro a la modulación de la cinética.

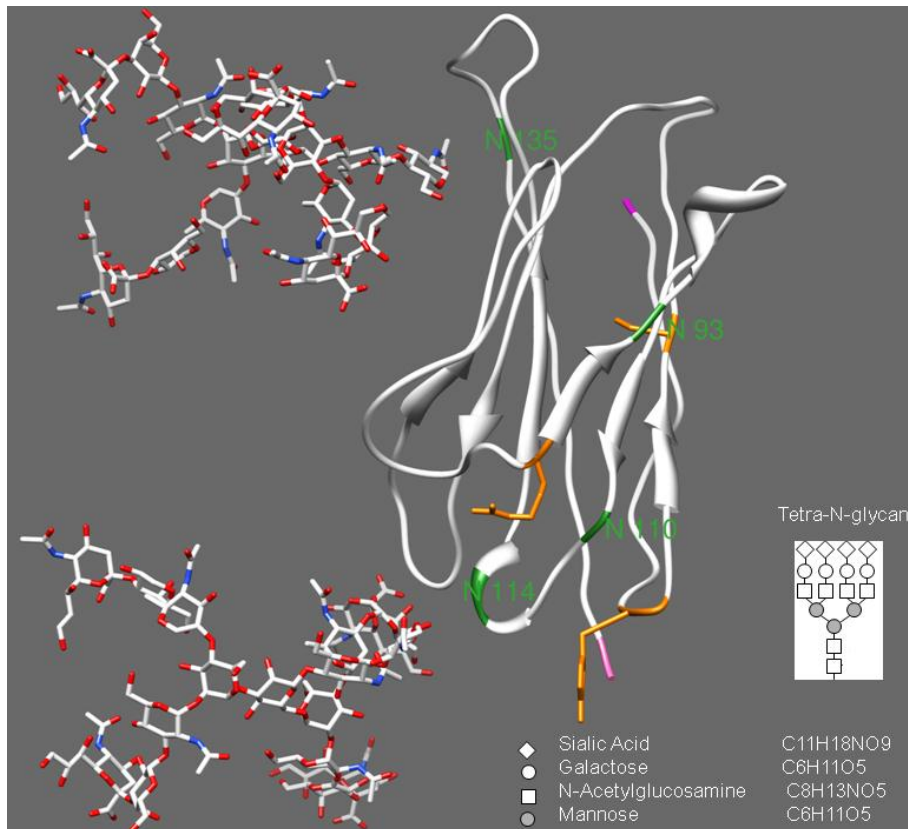
Esto podría implicar que 2 o más asas extracelulares de la subunidad  $\alpha$  interactúan con dominios discretos de  $\beta 1$ , como en el caso de la asociación al canal Kv1.2 (fig 46) (Nguyen y cols., 2012). La determinación y modelaje de los aminoácidos en la subunidad  $\alpha$  que participan en tal asociación representa un reto mucho más grande debido a que estos, muy probablemente están contenidos en regiones intrínsecamente desordenadas y poco conservadas entre las isoformas (tabla 2 y fig 13). A pesar de esto, a la luz de la literatura (Makita y cols., 1996) y en base al presente análisis *in silico* se propone la existencia de *hotspots* en las asas extracelulares DI/1 y DIV/2. Ésta última posiblemente interactúe con regiones cercanas a R89 en la subunidad  $\beta 1$  para modular la cinética del canal.



**Fig 47. Modelo del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$ .** Los sitios identificados de relevancia estructural-funcional en representación de bastones en negro. Las cavidades intramoleculares polares en magenta y las apolares en amarillo. La superficie de interface para la dimerización se muestra en representación de malla.

Estudios comparativos preliminares sugieren que la comparación de interfaces de estructuras cuyo pliegue Ig es similar al de  $\beta 1$ , podrían ser de utilidad para la elucidación de la interface  $\alpha$ - $\beta 1$  y la identificación de otros *hotspots* (Scior y cols., 2013 datos no publicados).

Se ha reportado que la subunidad  $\beta 1$  posee un alto grado de N-glicosilación, específicamente, se ha detectado la presencia de ácidos siálicos, lo que indica la presencia de N-tetraglicanos híbridos maduros, aunque su composición exacta no ha sido determinada (Messner y Catterall., 1985). Además existen reportes contradictorios respecto al papel funcional de esta modificación postraducciona en la modulación de la corriente (McCormick y cols., 1998; Johnson y cols., 2004). Se realizó un análisis *in silico* para la predicción del estado de glicosilación de la subunidad  $\beta 1$  el cual identifica 4 sitios de N-glicosilación. Las asparaginas 114 y 135 poseen una probabilidad de glicosilación de 0.5 y 0.6 respectivamente. Teóricamente la adición de tetraglicanos típicos, que contienen ácidos siálicos en estos posibles sitios de glicosilación no interferiría con la asociación de dominios de la subunidad  $\alpha$  alrededor de los amino ácidos de importancia funcional identificados en este trabajo (en naranja en la figura 41).



**Fig 41. Modelo del dominio extracelular de la subunidad  $\beta 1$  glicosilada.** Los posibles sitios de N-glicosilación en verde. Un tetraglicano típico está unido a dos residuos de asparagina, N135 Y N114, en representación de bastones (enlace glicosílico no mostrado). Los sitios de interés funcional en naranja. El amino terminal en magenta y el carboxilo terminal en rosa. La fórmula de cada tetraglicano y la composición de un N-tetraglicano híbrido, maduro, típico se muestra en la parte inferior.

Resulta necesario considerar el papel de la glicosilación de ambas subunidades del canal, ya que se ha encontrado la presencia de carbohidratos que constituyen hasta el 36% de la masa de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Messner y Catterall, 1985). La transferencia de N-glicanos a las proteínas comienza en la cara citoplásmica del retículo endoplásmico (RE) y ésta es subsecuentemente remodelada a través del RE y en el aparato de Golgi por un complejo de glicosidasas y glucosiltransferasas acopladas a membrana. Estas enzimas son altamente sensibles al ambiente fisiológico y al estado bioquímico de la célula en la que

estas se expresan (Varki y cols., 2009). Además, existe evidencia de una asociación temprana de la subunidad  $\beta 1$  con la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio dentro del retículo endoplásmico para su posterior migración a través del citoesqueleto (Zimmer y Benndorf, 2002). Debido a esto resulta probable que la unión a la subunidad  $\alpha$  determine los sitios de glicosilación de  $\beta 1$ .

Si los sitios de interés funcional descritos en este trabajo participan en dicha asociación  $\alpha$ - $\beta 1$  temprana en el citosol, los residuos de asparagina libres capaces de glicosilarse serían N114 y N135 (fig 41). Los resultados preliminares del modelo in silico de glicosilación muestra dos grupos de N-tetraglicano asociados a cada uno de estos residuos, ya que se ha sugerido la presencia de al menos un carbohidrato complejo que probablemente contenga residuos de ácido siálico (Messner y Catterall, 1985).

Aunque Bennet y cols., sostienen que la glicosilación del canal de sodio es esencial para la modulación de la corriente en varias isoformas (Bennett y cols., 1997; Johnson y cols., 2004), McCormick y colaboradores no encontraron efectos significativos al mutar los 4 sitios posibles de glicosilación en el dominio extracelular de  $\beta 1$ . Estos autores mutaron individualmente cada asparagina a glutamina y generaron una la doble mutante N110Q-N114Q, sin observar una pérdida de función significativa en ningún caso (McCormick y cols., 1998).

Como se ha argumentado los resultados experimentales y los estudios computacionales podrían contribuir al entendimiento de algunas de las patologías asociadas a la interacción de  $\beta 1$  con los canales de sodio, introduciendo la intrigante posibilidad de diseñar fármacos que selectivamente interfirieran con un proceso biofísico específico. Bajo este contexto, sería de particular interés el explorar si los mutantes diseñados presentan también estos efectos de pérdida de función selectiva en canales Nav1.7. Estos canales participan importantemente en nocicepción, están asociados a patologías neuropáticas y se conoce que son modulados por la subunidad  $\beta 1$  (Vijayaragavan y cols., 2001; Farmer y cols., 2012). El desarrollo de compuestos que interrumpan selectivamente la interacción entre Nav1.7 y  $\beta 1$  podría abrir la puerta al diseño de fármacos que combatan específicamente el dolor periférico (Theile y Cummins 2011).

## 10. Conclusiones.

- La subunidad  $\beta 1$  del canal de sodio modula la dependencia de voltaje y la cinética del canal Nav1.4 mediante una asociación extracelular no covalente.
- Mediante métodos bioinformáticos, de modelaje molecular y registros electrofisiológicos se identificaron residuos en el dominio extracelular de  $\beta 1$  cuya participación es crítica para ésta modulación.
- El mutante C43A perturba la capacidad de esta subunidad para modular la dependencia de voltaje de activación e inactivación, además de la aceleración de la inactivación y la recuperación e incrementa la acumulación de inactivación ante despolarizaciones repetidas a 1Hz en canales Nav1.4.
- El mutante R89A perturba selectivamente la capacidad de  $\beta 1$  para acelerar la inactivación y recuperación de canales Nav1.4, sin afectar la modulación de voltaje.

- Los mutantes Y32A y G33M en la orquilla del primer giro (amino terminal) de la subunidad  $\beta 1$  suprimen selectivamente la modulación del voltaje de inactivación que esta subunidad ejerce sobre canales Nav1.4.
- Los estudios de modelaje por homología y simulaciones *in silico* de  $\beta 1$  sugieren la existencia de dos enlaces intramoleculares involucrados en la asociación funcional del complejo Nav1.4- $\beta 1$ . Un enlace disulfuro entre C21 y C43 y un puente de sal entre R89 y E87.
- El modelo tridimensional del dominio extracelular de  $\beta 1$  propone la existencia de una interface para la asociación homofílica (dimerización) y dos sitios de glicosilación (N135 y N114) que no interfieren con los posibles dominios de asociación con la subunidad  $\alpha$ .
- El modelo sugiere que existe una cavidad entre R89 y Y32 que funcionaría como sitio de asociación entre la subunidad  $\alpha$  y  $\beta 1$  en canales de sodio Nav1.4.

## 11. Publicaciones.

Scior TF, Islas AA, Martínez-Morales E, Cuanalo-Contreras K, Millan-Perezpeña L, Salinas-Stefanón EM (2011). An *in silico* approach to primaquine binding to Trp756 in the external vestibule of sodium channel Nav 1.4. *J Receptor, Ligand Channel Res* 4:41 – 48. *Y Biophysical Journal*, vol. 102, issue 3, pp. 327a-328a.

Islas AA, Sánchez-Solano A, Scior TF, Millan-Perezpeña L, Salinas-Stefanón EM. Identification of Nav $\beta 1$  residues involved in the modulation of the sodium channel Nav1.4 *PLOS ONE* [PONE-D-13-24763R1 ] (aceptado Oct 21, 2013).

Perez-Cortes, E, Islas AA, Arevalo J, Mancilla-Simbro, C, Monjaraz, E, Salinas-Stefanon, EM. Modulation of the transient outward current (I<sub>to</sub>) in rat cardiac myocytes and human Kv4.3 channels by mefloquine. *BMC Pharmacology and Toxicology* (MS ID: 9801305811113649) (bajo revision 23 Oct 2013).

## 12. Apéndice

### 12.1 Alineamientos de Secuencias Aminoacídicas.

La proteína de estudio (en este caso la de las subunidades del canal de sodio) se denomina target o estructura/secuencia objetivo, mientras que la(s) proteína(s), que poseen información experimental disponible que se emplea(n) para la generación del modelo se denomina molde. Una proteína molde debe de guardar una relación estrecha con la proteína target, ya sea de homología (cercanía filogenética) o analogía (similitud funcional), ambas relaciones implicarían una parecido de las secuencias target y molde, por lo que el alineamiento de ambas es necesario para determinar la utilidad de la proteína molde en la generación del modelo estructural de la proteína target.

Con el fin de garantizar el mejor posible alineamiento entre la estructura molde y la estructura blanco (target) se ha hecho uso de diferentes algoritmos de alineamiento.

BLASTp (vía NCBI): herramienta de búsqueda de alineamiento básico local, requiere de solo la secuencia lineal como input, considera una secuencia iniciadora de alineamiento (“semilla”) de solo 3 aminoácidos y utiliza la matriz de puntaje de sustitución BLOSUM-62. Una Matriz de Puntajes de Sustitución asigna valores a cada tipo posible de cambio de aminoácido o sustitución entre los 20 tipos de aminoácidos basado en las frecuencias de sustituciones observadas en proteínas evolutivamente relacionadas. La utilización de estas matrices para evaluar los alineamientos asume que las tasas de mutación estimadas entre proteínas estrechamente relacionadas (85% idénticas) pueden ser extrapoladas a proteínas más distantes entre sí, por lo que es posible especificar empíricamente la probabilidad relativa con la que cada residuo muta a otro residuo específico a través de la historia evolutiva.

Needleman-Wunsch (vía Chimera UCSF): consiste en un alineamiento global tipo, el cual, toma en consideración similitudes de estructuras secundarias, dándoles un peso en el puntaje calculado a partir de la matriz de puntaje BLOSUM-62 (Pettersen y cosl., 2004).

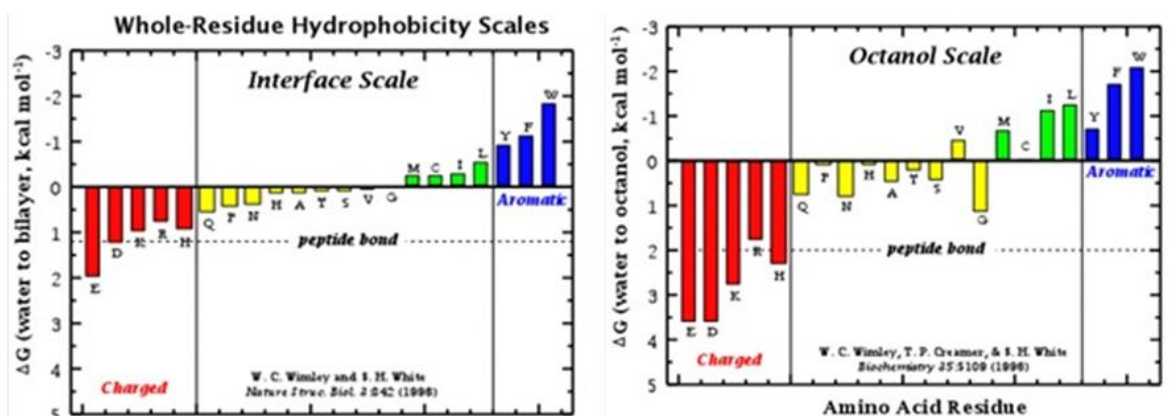
MUSCLE (vía NCBI): comparación múltiple de secuencias por predicción logarítmica, a partir de secuencias lineales se construye un alineamiento progresivo en el que se ejecuta un refinamiento utilizando transformadas de Fourier.

Los alineamientos resultantes a partir de cada método son comparados y evaluados en base a diversos parámetros como el porcentaje identidad (Id%).- No. de residuos idénticos en las dos secuencias (dividido entre la longitud de la secuencia más corta), el porcentaje de secuencia blanco alineada (*coverage*), el porcentaje de sustituciones equivalentes, “reemplazos conservativos” o “positivos”.- es el cambio de un aminoácido por otro de la misma clasificación fisicoquímica o con el cual posee similitudes determinantes (*e.g.* carga, polaridad, aromaticidad, hidrofobicidad, flexibilidad, volumen etc.). El valor de S-score se obtiene de la suma de los valores por cada posición alineada (calculados en base a los valores de una matriz de puntajes de sustitución) menos los valores por cada brecha (penalizaciones por cada no-continuidad). El valor E es el número de diferentes alineamientos con puntajes equivalentes o mejores que se espera encontrar al azar en una base de datos. Entre menor sea el valor E el S-score es más significativo.

## 12.2 Análisis de Hidropatía.

Este consiste en mostrar el valor teórico del cambio de energía ( $\Delta G$ ) que se obtendría al mover una región de un péptido de una bicapa fosfolipídica a un medio acuoso, al tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los residuos que contiene. Esto es un indicador de la probabilidad de que tales regiones se encuentren embebidas en membrana o expuestas al solvente (*e.g.* solución extracelular o citosol, etc.). Valores altos de  $\Delta G$  (Kcal/mol) indican que es termodinámicamente desfavorable (porque precisa de energía) conducirlos a un medio acuoso por lo que es probable que constituyan dominios transmembrana. El análisis de hidropatía de las secuencias de las subunidades del canal de sodio ha sido efectuado mediante el software MPex 3.2 (Snider y cols., 2009).

Este programa está diseñado para el análisis de secuencias de proteínas de membrana mediante el método de gráfico de hidropatía de Kyte y Doolittle (1982), una de las escalas empleadas es la escala de hidropatía experimental de residuo completo determinada en el laboratorio de Stephen White de la Universidad de California Irvine, incluyendo las contribuciones del enlace peptídico, se ha determinado la escala para a) interfaces de membrana POPC (fosfatidilcolina) y para b) n-octanol (fig 48).



**Fig 48.** Escalas de hidropatía experimental de residuo completo determinada en el laboratorio de Stephen White, Universidad de California Irvine.

## 12.3 Predicción de Estructura Secundaria.

Con el fin de determinar la probabilidad de que cualquier secuencia dada de aminoácidos del canal forme un hélice  $\alpha$ , una hoja  $\beta$  plegada o un asa de disposición al azar se ha hecho uso de diversos servicios en línea los cuales mediante diferentes algoritmos asocian para cada residuo un tipo de estructura secundaria junto con un valor de confianza o certeza de la predicción.

Uno de los métodos para este fin es Jpred un servidor que calcula a partir de la secuencia lineal de amino ácidos, 2 tipos de perfiles (y un consenso final) basados en diferentes métodos de predicción con redes neuronales múltiples. Jpred, primero compara la secuencia target contra proteínas cuya estructura ha sido determinada y depositada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB), por medio de alineamientos BLAST. Ya que se ha observado que la manera más confiable de predecir la estructura secundaria de una proteína es por similitud con otras proteínas de estructura conocida. (Cole y cols., 2008).

Además del consenso final del tipo de estructura secundaria, así como valores de confianza, Jpred devuelve 2 perfiles de predicciones: la predicción en base al algoritmo HMM (modelos markovianos escondidos), el cual constituye una máquina probabilística finita usada para modelar secuencias estocásticas, este tipo de algoritmos es “entrenado”, es decir aprende a corregir sus predicciones. El segundo perfil devuelve la predicción PSSM (matriz de puntaje de posición específica) en el cual la secuencia es alineada con secuencias en la base de datos UniRef90, por medio de PSI-BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica, iterativo de posición específica), con 3 iteraciones y filtrada por redundancia. Jpred posee un porcentaje de predicción correcto de 81.5% (Cole y cols., 2008).

Otros métodos empleados, se basan en descripciones energéticas de la elongación de segmentos helicoidales, como el programa AGADIR, el cual predice el contenido helicoidal de péptidos monoméricos considerando interacciones de corto alcance; además predice la localización de “giros conformacionales” o cambios de dirección en la elongación de la cadena peptídica. AGADIR se basa en la teoría de hélice/bucle (hélix/coil theory), la cual consiste en descripciones energéticas de polipéptidos cortos para formar hélices  $\alpha$ , basadas en mecánica estadística. A partir de esta teoría se desarrollan algoritmos que cuantifican la tendencia helicoidal de secuencias de amino ácidos (Lacroix y cols., 2002).

Uno de los métodos automáticos de modelaje utilizado fue I-TASSER. Este servicio en línea utiliza un alineamiento tipo roscado o enfilamiento (*Threading*) que consiste en alinear las secuencias en base al cambio de energía libre generado al incorporar las cadenas laterales de la estructura target a la cadena principal del molde (por lo que se requiere coordenadas de la estructura). El alineamiento que genere un menor valor de  $\Delta G$  (más favorable) es seleccionado. Se calculan perfiles DSSP (estructura secundaria definida de proteínas), algoritmo con el cual se asignan estructuras secundarias a cada aminoácido de acuerdo a las coordenadas a resolución atómica de la proteína. El ambiente TASSER toma en cuenta predicciones de diferentes algoritmos de enfilamiento que incluyen cálculo de accesibilidad al solvente (Roy y cols., 2010).

#### **12.4 Distancias Génicas y construcción de fenogramas.**

La construcción de árboles filogenéticos posee varias aplicaciones dentro de la investigación biológica actual. Una de ellas es la inferencia de función de proteínas (Hollich y cols., 2005).

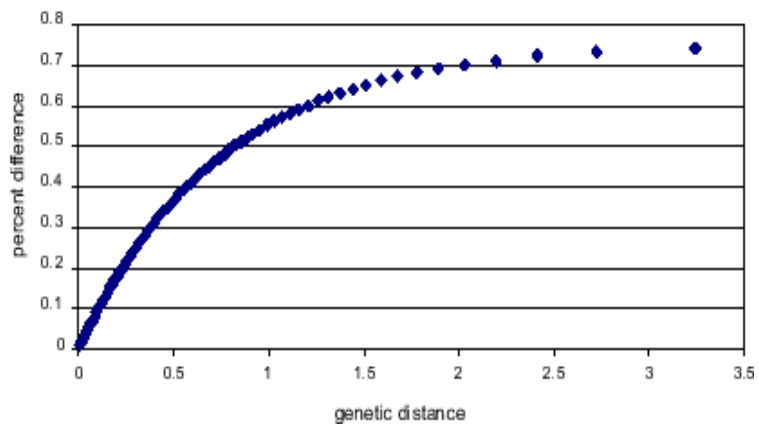
Como ejemplo de esto, específicamente válido para el canal de sodio, se ha comprobado la participación sobresaliente de residuos de asparagina en el segmento S6, en la inactivación lenta, los cuales son los aminoácidos más conservados incluso en secuencias bacteriales (Payandeh y cols., 2012).

Existen dos tipos de métodos para construir árboles filogenéticos, el fenético, basado en distancias génicas y el cladístico, basado en caracteres. Éste primero mide la distancia pareada o disimilitud entre dos secuencias de diferentes especies, la cual corresponde al número de mutaciones o eventos evolutivos desde que dos especies divergieron (Higgs y Manchester, 2001). Sin embargo no todas las mutaciones se encuentran registradas en las secuencias actuales a comparar, por lo que el contar el número crudo de diferencias entre dos secuencias (*hamming method*) no refleja necesariamente la

historia evolutiva de una secuencia. Por lo que se ha propuesto calcular la distancia génica (K) a partir del modelo de Jukes-Cantor;

$$K = -3/4 \ln(1 - 4/3p)$$

Donde K, la distancia génica es el número promedio de sustituciones y p es el porcentaje de diferencia. Ésta relación revela que la corrección se incrementa con la distancia génica, pero cuando el porcentaje de diferencia se satura (75%), la distancia génica no es conocida (LANS, 2010), (fig 49).



**Fig 49. Modelo de estimación de distancia génica propuesto por Jukes y Cantor (1969), el cual estima los límites de confianza para estimar el grado de divergencia evolutiva a partir del porcentaje de diferencia de secuencias actuales tomado de LANS, 2010).**

En el presente trabajo se hace uso de NJ (neighbour joining method), uno de los más populares métodos para construir árboles o fenogramas con el propósito de comparar las secuencias de diferentes especies y diferentes isoformas del canal de sodio.

Este algoritmo no asume la hipótesis del reloj molecular (MCH), es decir no mide la distancia evolutiva solo en base a la tasa promedio de acumulación de mutaciones, de hecho ajusta la tasa de variación entre ramas (Perrière y cols., 1996).

Se comienza con un árbol en estrella no resuelto y cada par de secuencias es evaluado para ser unidas, mientras que la suma de la longitud de todas las ramas es calculada del árbol resultante. El par de secuencias que produce la suma menor es considerado el par de vecinos más cercanos y se unen, posteriormente se insertan nuevas ramas entre este par y el resto del árbol y la longitud de ramas es recalculada. El proceso se repite hasta que solo una terminal está presente, por lo que se produce como resultado un solo árbol, el cual podría ser parcial o sesgado ya que los errores en estimación de distancia son exponencialmente largos para distancias largas (Wen-Hsiung y cols., 1991).

## 12.5 Modelaje Molecular.

El modelado molecular consiste en el desarrollo de modelos matemáticos que constituyen representaciones de entidades químicas con información asociada a sus propiedades fisicoquímicas fundamentales, además de su posición relativa en coordenadas cartesianas. Existen dos tipos principales de modelos matemáticos, el modelaje por mecánica molecular y el modelaje por química cuántica o *ab initio*. El primero aplica mecánica newtoniana clásica a la representación y el comportamiento de átomos y enlaces (en lugar de núcleo y electrones). Las posiciones atómicas son ajustadas para adecuarse a parámetros empíricos conocidos como longitud de enlaces y ángulos derivados de mediciones experimentales.

El segundo tipo de modelo se sustenta exclusivamente en la física cuántica teórica y sus ecuaciones para describir la interacción entre núcleos cargados positivamente alrededor de una nube de electrones cargados negativamente. Generalmente no utiliza parámetros experimentales, derivando un modelo exclusivamente a partir de principios teóricos, por lo que se conoce como métodos *ab initio* (Williamson y cols., 2006).

Idealmente la ecuación relativista dependiente de tiempo de Schrödinger describe las propiedades de los sistemas moleculares con gran precisión, sin embargo cualquier sistema de más de unos cuantos átomos no puede ser manipulado a nivel *ab initio*. Por lo tanto resulta necesario el uso de aproximaciones; a mayor nivel de complejidad y entre mayor sea la duración del proceso de interés, más severas será las aproximaciones requeridas.

La ecuación de Schrödinger:

$$i\hbar \delta/\delta t \psi = \hat{H} \psi$$

Es una expresión matemática compleja que describe completamente la química de un sistema molecular donde:  $\psi$  es la función de onda, la amplitud probabilística para configuraciones diferentes del sistema en tiempos diferentes,  $i\hbar \delta/\delta t$  es el operador de energía ( $i$  es la unidad imaginaria y  $\hbar$  es la constante de Planck reducida) y  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano. Debido a la dificultad de esta ecuación, se hace uso de computadoras en conjunto con simplificaciones y parametrizaciones empíricas para resolver esta ecuación (Hess y cols., 2006).

El modelaje por homología de una proteína (blanco o target) consiste en: a) identificar un homólogo cuya estructura haya sido determinada experimentalmente (molde), b) encontrar el mejor alineamiento molde-blanco, c) mutar computacionalmente cada aminoácido de la proteína blanco en el lugar correspondiente del esqueleto de la estructura resuelta experimentalmente y d) refinar y evaluar el modelo eliminando contactos estéricos, optimizando ángulos y longitudes de enlace (validación estereoquímica) y obteniendo una conformación de baja energía libre (validación termodinámica) sin diferir mucho de la estructura molde (validación biológico-evolutiva) (Höltje y cols., 2003).

### 12.5.1 Determinación Experimental de Estructuras Moleculares.

Los datos experimentales de donde provienen los parámetros de geometría molecular, provienen de estudios de difracción de rayos X de cristales, estudios de difracción de neutrones y electrones y espectroscopía de microondas (Allen y cols., 1987; Williamson y cols., 2006). La primera compilación más importante fue la Publicación Especial de Sociedad Química No. 11: “Tablas de Distancias Interatómicas y Configuración en Moléculas e Iones”, la cual resume los resultados obtenidos por métodos de difracción y espectroscopía anteriores a 1956 (Allen y cols., 1987).

La cristalografía de rayos X, ha sido empleada ampliamente para la determinación de estructuras moleculares a resolución atómica, las cuales son depositadas en bases de datos como el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank), la cual contiene más de 85 000 estructuras (Neutze y cols., 2004; Bogan 2013).

La cristalografía de rayos X consiste en purificar proteínas y forzarlas a formar estructuras cristalinas regulares de entre decenas de micrómetros a milímetros. A estos cristales se les aplica radiación sincrotrónica (emitida al acelerar partículas cargadas a través de un campo magnético). La difracción (o los patrones de cambio de dirección de los

fotones) al pasar por la proteína cristalizada son medidas en un detector, produciendo puntos o manchas, llamadas puntos Bragg. La incidencia del haz de rayos X de las proteínas ordenadas y los patrones de dispersión codifican las posiciones de los átomos de la molécula de estudio. Con el fin de reducir el daño que la radiación produce en la proteína, este procedimiento es realizado en condiciones criogénicas. (Neutze y cols., 2004; Bogan 2013).

El desarrollo de modificaciones a esta técnica, como la incidencia de rayos X coherentes, rayos X laser de electrones libres y cristalografía serial de femtosegundos, ha permitido la elucidación de estructuras de proteínas difíciles de cristalizar, glicosiladas y a temperatura ambiente, a una resolución de  $< 2\text{\AA}$  ( $2 \times 10^{-4} \mu\text{m}$ ). La emisión de pulsos de rayos X de una duración de 10 femtosegundos han permitido incluso la exploración del movimiento de átomos y electrones en reacciones químicas (Bogan 2013).

### 12.5.2 Mecánica Molecular.

El término “Mecánica Molecular” (MM) es empleado para designar un conjunto de métodos computacionales ampliamente aceptados para calcular geometrías y energías moleculares. La energía potencial de un conjunto de átomos es calculada por medio de la ecuación de Hooke:

$$E_{\text{tot}} = \sum E_{\text{st}} + \sum E_{\text{bend}} + \sum E_{\text{tors}} + \sum E_{\text{vdw}} + \sum E_{\text{elect}}$$

La energía total de una molécula ( $E_{\text{tot}}$ ) es igual a energía de estiramiento de sus enlaces  $E_{\text{st}}$  más la energía de rotación de ángulos ( $E_{\text{bend}}$ ) más la energía de torsión ( $E_{\text{tors}}$ ) más la energía de van der Waals ( $E_{\text{vdw}}$ ), cual puede ser repulsiva o atractiva dependiendo de la distancia internuclear, más la energía electrostática ( $E_{\text{elect}}$ ).

Las propiedades electrónicas de las moléculas están definidas por la distribución de sus electrones alrededor de sus núcleos positivos, en mecánica molecular, éstas son convertidas en cargas atómicas parciales o puntuales, una característica molecular reducida a propiedades atómicas, estos valores no son observables pero son de utilidad para correlacionar o predecir propiedades moleculares químicas o físicas (Höltje y cols., 2003).

La mecánica molecular permite calcular la energía estérica de una molécula en término de las desviaciones a valores óptimos, “relajados o no restringidos” de distancia de enlace, ángulos y torsiones. Estos valores no restringidos junto con constantes de fuerza (parámetros de ajuste derivados empíricamente) constituyen un campo de fuerza (FF).

### 12.5.3 Campos de Fuerza.

Un campo de fuerza constituye, una función matemática con parámetros empíricos usada para describir la energía potencial de un sistema de partículas. Existe una amplia variedad de métodos para derivar estos parámetros para ser utilizados en mecánica molecular, por lo que el mejor método a elegir, depende de que propiedades se quieren calcular (Wang y cols., 2000).

Los parámetros empíricos reproducen los datos experimentales de un conjunto de moléculas (*training set*). Las constantes de fuerza son estimadas empíricamente y

optimizadas para reproducir los datos experimentales de otro conjunto de moléculas (diferente *al training set*) (Wang y cols., 2004).

Generalmente las longitudes de enlaces en equilibrio y los ángulos de enlace provienen de experimentos de difracción de rayos X y cálculos *ab initio* de alto nivel. Los valores energéticos calculados a partir de diferentes campos de fuerza son comparados con las energías conformacionales determinadas experimentalmente de acuerdo a 6 clases de mediciones: I) cambio de entalpía de vaporización ( $\Delta H$  gas phase), II) cambio de energía de vaporización ( $\Delta E$  gas phase), III) cambio de energía libre de Gibbs de vaporización ( $\Delta G$  gas phase), IV) cambio de entalpía en solución ( $\Delta H$  solution), V) cambio de energía libre de Gibbs en solución ( $\Delta G$  solution), VI) cambio de energía libre de Gibbs en solución a baja temperatura ( $\Delta G$  solution low temperature) Wang y cols., 2000).

La idea básica de la mecánica molecular es que los enlaces poseen longitudes y ángulos naturales, los valores de equilibrio de éstos y las correspondientes constantes de fuerza usadas en la función de energía potencial están definidas en el campo de fuerza y son denotadas como parámetros del campo de fuerza (Höltje y cols., 2003).

La energía de estiramiento de enlaces está dada por:

$$E_{\text{str}} = 1/2 k_b (r - r_0)^2$$

Donde  $k_b$  es la constante de fuerza de estiramiento de enlace en  $\text{kJ/mol}\cdot\text{\AA}^2$ ,  $r$  es la longitud real del enlace y  $r_0$  es la longitud del enlace sin restricciones o de equilibrio.

La energía de rotación de ángulo está dada por:

$$E_{\text{bend}} = 1/2 k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

Donde  $k_\theta$  es la constante de fuerza de rotación de ángulo en  $\text{kJ/mol}$ ,  $\theta$  es el ángulo entre dos enlaces adyacentes y  $\theta_0$  es el valor de equilibrio de este ángulo en grados.

La energía de torsión de enlace está dada por:

$$E_{\text{tors}} = 1/2 k_\tau \{(1 + \cos(n\tau - \Phi_0))\}^2$$

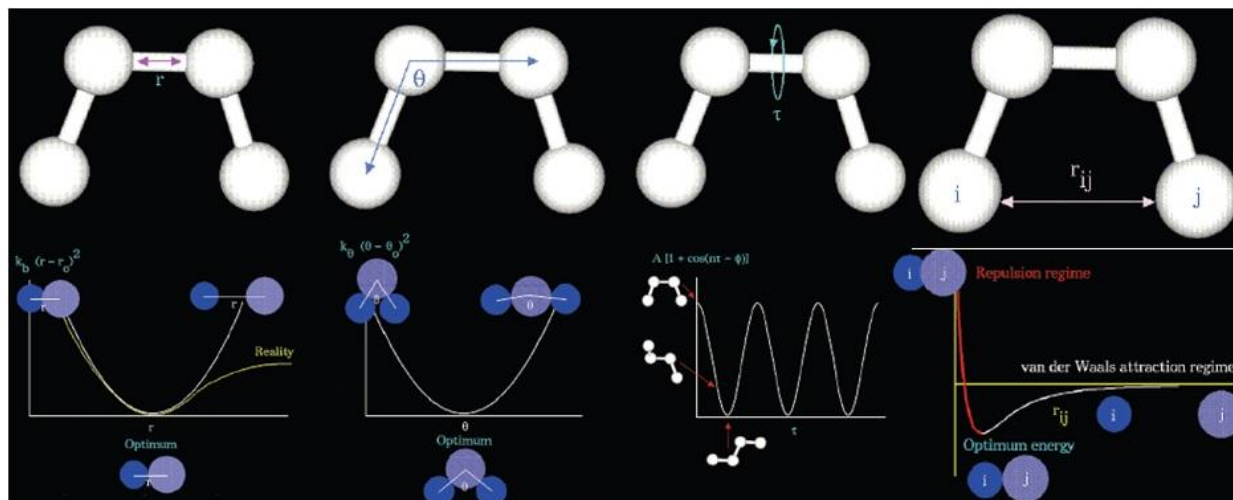


Fig 50. Representación gráfica de parámetros para el cálculo de la energía potencial molecular por Mecánica Molecular (MM). La energía potencial total está en función de (de izquierda a derecha) la longitud del enlace, el ángulo entre dos enlaces adyacentes, la torsión entre dos enlaces y la energía de van der Waals entre dos átomos no enlazados (tomado de Hess y cols., 2010).

Donde  $k_\tau$  es la constante de torsión en kJ/mol·deg,  $n$  es la periodicidad (número de energía mínima en un ciclo, usualmente 2 o 3 dependiendo de la simetría del enlace) y  $\Phi_0$  es el ángulo torsional de referencia en grados (usualmente  $0^\circ$  para una función coseno con un valor energético máximo a los  $0^\circ$  o a los  $180^\circ$ ) (Hess y cols., 2010).

La interacción de van der Waals entre dos átomos independientes es usualmente representado por el potencial Lennard-Jones, el cual presenta variantes de acuerdo al tipo de campo de fuerza (FF) que se emplee, una de ellas está dado por:

$$E_{\text{vdw}} = \sum A_{ij}/r^{12} - \sum B_{ij}/r^6$$

Donde  $A_{ij}$  es el coeficiente de repulsión,  $B_{ij}$  el coeficiente de atracción y  $r$  la distancia entre los átomos es  $i$  y  $j$ .

Finalmente se utiliza una función para tomar en cuenta la fuerza electrostática entre dos átomos introduciendo un término de interacción Coulombica dado por:

$$E_{\text{elec}} = \{1/\epsilon\} \{(Q_1 Q_2)/r\}$$

Donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica,  $Q_1$  y  $Q_2$  son las cargas de los átomos en interacción y  $r$  es la distancia.

La constante dieléctrica para un solvente polar como el agua es 80, para solventes no polares es de 2 y para proteínas se determina en base a su superficie expuesta al solvente, entre menos expuestas menor será el valor de  $\epsilon$ . La constante dieléctrica se utiliza como una medida macroscópica de la polarizabilidad de un medio en lugar de tomar en cuenta la polarizabilidad de cada átomo.

Algunos campos de fuerza (FF) incluyen otros términos (e.g. *out-of-plane*, puentes de hidrógeno) y usan funciones de energía potencial más diferenciadas, pero en términos

generales la energía del campo de fuerza (energía potencial total) es una medida de las restricciones estéricas intramoleculares, por lo que es importante modificar las coordenadas iniciales de los átomos de cualquier modelo para llegar a un valor mínimo o suficientemente bajos (*i.e.* una conformación estable) (Höltje y cols., 2003).

A temperatura ambiente, la energía de una molécula es tal que sus átomos se encuentran en movimiento permanente, las posiciones relativas de los sustituyentes en un enlace sencillo varían en el tiempo. Por lo tanto cada compuesto con uno o varios enlaces simples existe en cada momento en muchos diferentes rotámeros o **confórmeros**. La composición cualitativa y cuantitativa de esta mezcla está cambiando permanentemente, sin embargo solo los confórmeros de baja energía se encuentran con mayor frecuencia (Höltje y cols., 2003).

#### 12.5.4 Métodos de minimización energética.

La optimización geométrica es un cálculo estándar en la química computacional cuyo fin es encontrar la conformación más relajada o la de menor energía de una molécula. Este método involucra un proceso iterativo en donde a cada paso la geometría molecular es modificada ligeramente y la energía de la molécula es comparada con la del ciclo anterior. Mientras que el cálculo de transición de estado es el procedimiento inverso a la optimización geométrica, éste método busca la estructura de máxima energía (Williamson y cols., 2006).

En una reacción termodinámicamente controlada, la diferencia energética entre dos conformaciones se debe frecuentemente al impedimento estérico. Si la molécula de estudio se optimiza en una conformación, se puede hacer uso del cálculo de punto único (*single point calculation*) para determinar cuanta energía se necesita para que se forme la conformación no preferida. En este caso el método solo realiza un ciclo computacional para calcular la energía de una geometría particular fija (Williamson y cols., 2006).

Existen 3 tipos principales de optimización geométrica o minimización energética por campos de fuerza: I) Aquellos que solo hace uso de evaluación de funciones, en donde cada paso se hace en base a los resultados de evaluaciones previas, como en el método simplex. II) Aquellos que utilizan primeras derivadas, las derivadas parciales de la energía potencial con respecto a todas las coordenadas, en los programas de dinámicas moleculares (MD), son iguales a las fuerzas con signo negativo). Ejemplos de éste tipo de métodos son el algoritmo de *Steepest Descend*, *Conjugate Gradient* y *Powell*. Y por último III) Aquellos métodos que utilizan segundas derivadas, éstos son superiores en cuanto a sus propiedades de convergencia cerca del mínimo local, sin embargo sufren de grandes requisitos de cálculo y almacenamiento de información. Ejemplo de éstos es el método Newton-Raphson (Höltje y cols., 2003; Williamson y cols., 2006).

El algoritmo de descenso *steepest descend* utiliza las primeras derivadas de la energía potencial (calculadas numéricamente) para aproximarse al mínimo energético, después de cada desplazamiento de cada átomo la energía es recalculada y el proceso se detiene una vez que se llegue a una condición mínima predeterminada. Éste algoritmo es particularmente útil para generar estructuras de baja energía a partir de información cristalográfica poco definida, o para relajar moléculas construidas gráficamente. En general es un buen acercamiento inicial, tosco e introductorio a subsecuentes minimizaciones empleando un algoritmo más avanzado como el de *conjugate gradients* (gradientes conjugados). Este algoritmo acumula información sobre la función de cada iteración,

previniendo la reversión de un progreso hecho con anterioridad. El más significativo gasto computacional y tiempo por iteración son compensados por una más eficiente convergencia al mínimo lograda por el método de gradientes conjugados (Höltje y cols., 2003; Williamson y cols., 2006).

Ya que el número de confórmeros que una proteína puede tener está en función del número de enlaces peptídicos, Cyrus Levinthal, en 1969 hizo notar que el tiempo de plegamiento en el que un péptido pueda alcanzar su estructura nativa puede ser astronómicamente largo, si se exploran todas las posibles conformaciones al azar.

Una proteína de 100 aminoácidos tendrá 99 enlaces peptídicos y por tanto 198 ángulos  $\theta$  y  $\phi$ . Si cada uno de estos ángulos puede estar en una de 3 formas estables, la proteína podría plegarse en un máximo de  $3^{198}$  conformaciones diferentes (incluyendo posibles redundancias). De esta forma si esta proteína adquiriese su configuración correcta probando secuencialmente todas las posibles conformaciones, requeriría de  $10^{87}$  segundos para encontrar su conformación nativa, lo cual es poco más tiempo que la edad del universo ( $6 \times 10^{17}$ ), sin embargo se conoce las proteínas adquieren su estructura nativa espontáneamente en una escala de microsegundos a decenas de segundos. Esto es conocido como la paradoja de Levinthal (Zwanzig y cols., 1992).

La paradoja se resuelve si el muestreo de conformaciones no es al azar sino guiado y acelerado por interacciones locales, lo que sugiere la formación de puntos nucleares de partida en el proceso de plegado debido a interacciones estables que forman secuencias locales de aminoácidos, lo que en simulaciones computacional se traduce en la introducción de funciones de potenciales energéticos (Zwanzig y cols., 1992).

### 12.5.5 Análisis Conformacional Sistemático.

El modelado molecular implica el proceso general de describir sistemas químicos complejos en términos de un modelo atómico realista con el objetivo de entender y predecir sus propiedades macroscópicas. Las propiedades macroscópicas físicas pueden ser de dos tipos: I) propiedades estáticas en equilibrio, como la constante de unión de un inhibidor a una enzima o la energía potencial promedio de un sistema, y II) propiedades dinámicas en no-equilibrio como los procesos de difusión en membranas, las dinámicas de cambio de fase o las cinéticas de reacción (Hess y cols., 2010).

Resulta necesario generar un conjunto representativo de una estructura a una temperatura dada con el fin de estimar sus propiedades macroscópicas. Además, el cálculo de energías libres y potenciales termodinámicos precisa de extensiones especiales a las técnicas de simulaciones moleculares. Éstas en principio proveen información atómica detallada, parte de la cual no es relevante para las propiedades macroscópicas de interés.

Lo cual abre una puerta a la simplificación de las descripciones de las interacciones y el promedio sobre detalles irrelevantes. La mecánica estadística es la ciencia que sirve de marco teórico para tales simplificaciones, *i.e.* considerar grupos de átomos como unidades o densidades y flujos en respuesta a gradientes termodinámicos en lugar de velocidades y aceleraciones individuales en respuesta a fuerzas (Hess y cols., 2010).

Existen dos tipos de métodos para generar conjuntos representativos en equilibrio y así explorar el espacio conformacional: a) por simulaciones Monte Carlo y b) por Dinámicas Moleculares (MD). El objetivo de éste último es reproducir el movimiento dependiente de tiempo de una molécula basándose en mecánica molecular (campos de

fuerza empíricos); por lo que la ecuación clásica de movimiento es resuelta a intervalos regulares de tiempo, representada por la segunda ley de Newton:

$$F_i(t) = m_i a_i(t)$$

Donde  $F_i$  es la fuerza en un átomo  $i$ , al tiempo  $t$ ;  $m_i$  es la masa del átomo y  $a_i$  es la aceleración del átomo  $i$  al tiempo  $t$ . El gradiente de la función de energía potencial se utiliza para calcular las fuerzas sobre los átomos, mientras que las velocidades iniciales de los átomos son generadas al azar al principio de la simulación. Basándose en las coordenadas atómicas iniciales del sistema, se pueden calcular nuevas posiciones y velocidades de los átomos al tiempo  $t$ , al moverse éstos a nuevas posiciones se genera una nueva conformación y el ciclo se repite en un número de pasos de tiempo predefinido. Si la configuración inicial está muy lejos de equilibrio la simulación de MD fallará, por lo que se requiere de una robusta minimización de energía previa (Höltje y cols., 2003; Hess y cols., 2010).

Las coordenadas a través del tiempo representan una trayectoria del sistema. La colección de conformaciones energéticamente accesible producida por este procedimiento se conoce como *ensemble* (Höltje y cols., 2003; Hess y cols., 2010).

Con el fin de explorar las diversas conformaciones (con posible relevancia biológica) que una macromolécula puede tener, se han diseñado métodos que varían sistemáticamente cada uno de los ángulos de torsión de la molécula para generar todas sus posibles conformaciones. Con el incremento adecuado en el ángulo se puede obtener una imagen completa de su espacio conformacional. Usualmente se utiliza un tamaño de paso (*step size*) de 30°, por lo que una rotación completa de 360° origina 12 conformaciones.

El número total de conformaciones depende tanto del tamaño del paso como del número de enlaces rotables ( $n$ ):

$$\text{No. de Conformaciones} = (360/\textit{step size})^n$$

En primer lugar se realiza una reducción de conformaciones llamada cribado de van der Waals ("*bum check*"), antes de calcular el potencial energético, este procedimiento excluye toda estructura en la que exista un solapamiento de volúmenes de átomos no directamente conectado entre ellos. El criterio matemático para determinar la validez de una conformación en este caso es simplemente el radio de van der Waals, así pues la tensión estérica (*steric strain*) se define como la interacción repulsiva que ocurre cuando dos átomos son forzados a estar a una distancia menor que sus radios atómicos (Höltje y cols., 2003).

A continuación se realiza el cálculo de energía potencial por mecánica molecular sin considerar las interacciones electrostáticas, esto con el fin de reducir el gasto de tiempo computacional y ya que se ha observado que se obtiene el mismo resultado al realizar este análisis conformacional *in vacuo* y sin considerar cargas. Si la inclusión de interacciones electrostáticas es justificada en el análisis conformacional es necesario emular el efecto del solvente ya que las cargas atómicas no solo dependen de la conectividad, sino que también son sensibles a su ambiente espacial discreto (Höltje y cols., 2003).

En segundo lugar se realiza una exclusión adicional fijando una ventana de energía, debido a que las conformaciones de alta energía se encuentran en una proporción insignificante. El valor para esta ventana de energía depende tanto del tamaño de la

molécula de estudio como del tipo de campo de fuerza aplicado y varía de entre 5 y 15kcal/mol. Por último las estructuras generadas se agrupan en clústers mediante un análisis de factor de acuerdo a la variación de sus ángulos de torsión y se elige un representante de cada “familia” o clúster con el que tenga menor energía (Höltje y cols., 2003).

### 12.5.6 Evaluación de los Modelos.

La calidad de los modelos se evalúa en términos de geometría molecular y de potenciales energéticos (ver mecánica molecular, energía potencial). Para evaluar la geometría de cada residuo, la prueba de Ramachandran determina las posibles combinaciones de valores de los ángulos diedro (ángulo entre dos planos) del enlace peptídico,  $\varphi$  (entre el enlace C $\alpha$  –N;) y  $\psi$  (entre el enlace C $\alpha$  –CO;) que cada aminoácido puede presentar en diferentes estructuras estables o regulares. Se ha observado que existen conjuntos (pares de valores de  $\varphi$  y  $\psi$  permitidos) y subconjuntos (pares de valores de  $\varphi$  y  $\psi$  más favorables) que corresponden a cada tipo de aminoácido formando un  $\alpha$ -hélice o un segmento  $\beta$  plegado, al graficar los valores de  $\varphi$  contra  $\psi$  de la proteína blanco (Höltje y cols., 2003).

De manera general, en cuanto a la calidad del modelo generado con respecto al molde se calcula el valor de RMSD (la raíz cuadrada del cuadrado del promedio de la distancia entre los carbonos  $\alpha$  del molde y los del modelo en Å), por tanto este valor es una medida de la variación del esqueleto del modelo con respecto al esqueleto del molde (estructura cristalizada), tal variación es en efecto debida a la inserción de las cadenas laterales de la proteína blanco. Del mismo modo, la prueba TM-score mide la similitud estructural al molde, ésta a diferencia del valor de RMSD resuelve el problema de “*error local*”, por el cual una diferencia en la orientación o dirección de la elongación de la cadena de aminoácidos genera un valor alto de RMSD a pesar de que la topología general sea correcta. El rango de valores de TM-score es de 0.17 a 0.5, a mayor valor, mejor es la topología de la proteína independientemente de su tamaño. El protocolo empleado para la generación del modelo (I-TASSER) calcula un puntaje de confianza específico llamado C-score para estimar la calidad del modelo, el cual toma en cuenta el alineamiento de fragmentos por enfilamiento (*threading*) y parámetros de convergencia de ensamblaje de los fragmentos generados y tiene un rango de [-5,2] donde entre menor sea el puntaje mayor es la calidad del modelo (Roy y cols., 2010).

Finalmente se empleo QMEAN, una prueba que contempla la evaluación de parámetros tanto estereoquímicos como termodinámicos para comparar la calidad total del modelo frente a estructuras determinadas experimentalmente, ésta es producto de la combinación lineal de 6 descriptores estructurales, de solvatación y de potenciales de interacción energéticos (Benkert y cols., 2009).

### 12.8 Activación del canal Nav1.4.

Para construir la gráfica relación corriente-voltaje (I-V), es de práctica común la aplicación de un protocolo de activación de pasos progresivos despolarizantes de 10 mV. Con el fin de excluir posibles errores de control de voltaje, solo ovocitos con corrientes iguales o menores a 6.5  $\mu$ A fueron considerados para el análisis, sin embargo como se muestra en la figura 51, es posible fijar el voltaje y obtener el mismo comportamiento

registrando corrientes Nav1.4 de mayor magnitud. La aplicación de un protocolo en pasos progresivos de 5mV indica el incremento suave de la magnitud de la corriente entre -40 y -20mV aproximadamente, como se ha reportado en el presente trabajo.

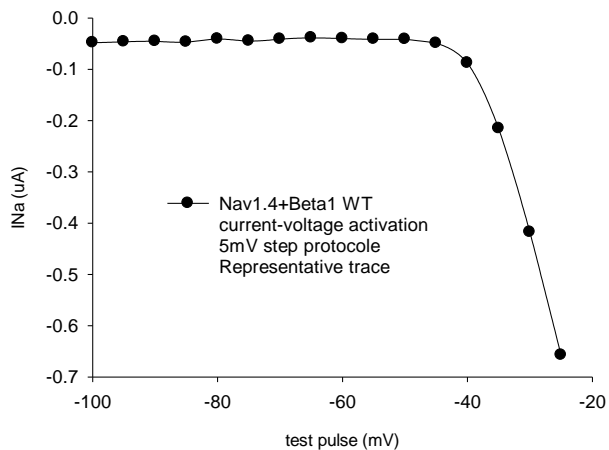


Fig 51. Corriente representativa del canal Nav1.4 co-expresado con la subunidad  $\beta 1$  obtenida mediante un protocolo que parte de un potencial de sostenimiento de -100 mV hasta -25 mV.de pasos progresivos despolarizantes de 5 mV.

### 13. Bibliografía.

Ahern CA, Eastwood AL, Dougherty DA, Horn R (2008) Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. *Circ Res.*;102(1):86-94.

Allen F, Kennard O, Watson DG, Brammer L, Orpen G, Taylor R (1987) Tables of Bond Lengths determined by X-Ray and Neutron Diffraction. Part I . Bond Lengths in Organic Compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 7/194.

Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL, Raman IM (2009) Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* 29(7):2027-42.

An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M, y cols., (1998) Novel LQT-3 mutation affects Na<sup>+</sup> channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits. *Circ Res* 83:141–6.

Balser, J.R. (1999) Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc. Res* 42:327-338.

Barbieri R, Baroni D, Moran O (2012) Identification of an intra-molecular disulfide bond in the sodium channel  $\beta$ 1-subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 420(2):364-7.

Barty A, Küpper J, Chapman HN (2013) Molecular imaging using X-ray free-electron lasers. *Annu Rev Phys Chem* 64:415-35.

Bender AC, Morse RP, Scott RC, Holmes GL, Lenck-Santini PP.(2012) SCN1A mutations in Dravet syndrome: impact of interneuron dysfunction on neural networks and cognitive outcome. *Epilepsy Behav* 23(3):177-86.

Beneski DA, Catterall WA (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:639–643.

Benkert, P., Schwede, T. and Tosatto, S.C.E. (2009). QMEANclust: Estimation of protein model quality by # combining a composite scoring function with structural density information. *BMC Struct Biol* 20;9:35.

Bennett PB Jr, Makita N, George AL Jr. (1993). A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* 326(1-3):21-4.

Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J Gen Physiol* 109(3):327-43.

- Brackenbury, WJ & Isom, LL. (2008). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: Potential for  $\beta$  subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1191-1203.
- Bogan MJ (2013) X-ray free electron lasers motivate bioanalytical characterization of protein nanocrystals: serial femtosecond crystallography. *Anal Chem* 85(7):3464-71.
- Burgess DL, Kohrman DC, Galt J, Plummer NW, Jones JM, Spear B, Meisler MH (1995) Mutation of a new sodium channel gene, *Scn8a*, in the mouse mutant 'motor endplate disease'. *Nat Genet* 10(4):461-5.
- Cannon SC, McClatchey AI, Gusella JF (1993) Modification of the Na<sup>+</sup> current conducted by the rat skeletal muscle alpha subunit by coexpression with a human brain beta subunit. *Pflugers Arch* 423(1-2):155-7.
- Cannon SC (1997) From mutation to myotonia in sodium channel disorders. *Neuromuscul Disord* 7(4):241-9.
- Catterall WA (2001) A one-domain voltage-gated sodium channel in bacteria. *Science* 294(5550):2306-8.
- Catterall, WA, Goldin, AL & Waxman, SG. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.
- Catterall WA. (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* 590(Pt 11):2577-89.
- Catterall, WA. (2000). From ionic currents to molecular mechanism: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.
- Chahine, M, Sirois, J, Marcotte, P, Chen, LQ & Kallen, RG. (1998). Extrapore Residues of the S5-S6 Loop of Domain 2 of the Voltage-Gated Skeletal Muscle Sodium Channel (rSkM1) to the  $\mu$ -Conotoxin GIIIA Binding Site. *Biophys J* 75, 236-246.
- Chahine M., George A. L., Jr., Zhou M., Ji S., Sun W., Barchi R. L., Horn R. (1994). Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. *Neuron* 12, 281-294.
- Chambers JC, Zhao J, Terracciano CM, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R, Navaratnarajah M, Lotlikar A, Sehmi JS, Kooner MK, Deng G, Siedlecka U, Parasramka S, El-Hamamsy I et al., (2010) Genetic variation in *SCN10A* influences cardiac conduction. *Nat Genet* 42(2):149-52.
- Changeux JP (2012) Allostery and the Monod-Wyman-Changeux model after 50 years. *Annu Rev Biophys* 41:103-33.

Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, McEwen DP, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL, Scheuer T, Shrager P, Catterall WA, Isom LL (2004) Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24:4030–4042.

Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q (1998) Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392(6673):293-6.

Chen, C & Cannon, SC. (1995). Modulation of Na<sup>+</sup> channel inactivation by the b1 subunit: a deletion analysis. *Pflügers Arch-Eur Physiol* 431, 195.

Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, McEwen DP, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL et al., (2004) Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24(16):4030-42.

Chopra S, Watanabe H, Zhong TP, Rodend M (2007) Molecular cloning and analysis of zebrafish voltage-gated sodium channel beta subunit genes: implications for the evolution of electrical signaling in vertebrates *BMC Evol Biol* 7: 113.

Chothia C and Lesk AM (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 5:823-6.

Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36:W197-201.

Combet C, Jambon M, Deléage G, Geourjon C (2002) Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* 18(1):213-4.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D and Morcydlowski E (1985) Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260:9280-9288.

Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. (2007) The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. *Pain* 131(3):243-57.

Dhar Malhotra J, C Chen, I Rivolta, H Abriel, R Malhotra, LN Mattei, FC Brosius, RS Kass, LL Isom (2001) Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse car. *Circulation* 103: 1303-10.

Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG. (2005) Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* 128:1847–1854.

Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG (2009) Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med* 10(7):1260-9.

Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M, Strom TM (2005) Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*. 366(9483):371-7.

Doolittle, R (1990) *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*. Methods in Enzymology, 183 R.F. (ed) Academic Press, NY.

Du Y, Nomura Y, Liu Z, Huang ZY, Dong K. (2009) Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels. *J Biol Chem* 284(49):33869-75.

Dunbrack R.L (2002) Rotamer libraries in the 21st century. *Curr.Opin.Bio* 12,431-440.

Evin G, Barakat A, Colin L. Masters (2010) BACE: Therapeutic target and potential biomarker for Alzheimer's disease, *Int J Biochem Cell Biol* 42(12):1923-6.

Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.

Estacion M, Dib-Hajj SD, Benke PJ, Te Morsche RH, Eastman EM, Macala LJ, Drenth JP, Waxman SG (2008) NaV1.7 gain-of-function mutations as a continuum: A1632E displays physiological changes associated with erythromelalgia and paroxysmal extreme pain disorder mutations and produces symptoms of both disorders. *J Neurosci* 28(43):11079-88.

Eswar N, Marti-Renom M A, Webb B., Madhusudhan M S, Eramian D, M. y cols., (2006) *Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER*. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 5:Unit 5.6. John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.

Farmer C, Cox JJ, Fletcher EV, Woods CG, Wood JN, Schorge S (2012) Splice variants of Na(V)1.7 sodium channels have distinct  $\beta$  subunit-dependent biophysical properties. *PLoS One* 7(7):e41750.

Feng G, Dedk P, Chopra M, & Hall L. M. (1995) Cloning and Functional Analysis of TipE, a Novel Membrane Protein That Enhances *Drosophila* para Sodium Channel Function. *Cell*, *Cell* 82(6):1001-11.

Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M (2006) SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52(5):767-74.

- Frank H. Yu, Vladimir Yarov-Yarovoy, George A. Gutman, and William A. Catterall (2005) Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol Rev* 57:387-395.
- Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y, Noguchi K (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons *J Comp Neurol* 510(2):188-206.
- George AL Jr (2005) Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 115(8):1990-9.
- Goldberg YP, MacFarlane J, MacDonald ML, Thompson J, Dube MP, Mattice M, Fraser R, Young C, Hossain S, Pape T, Payne B, et al.(2007) Loss-of-function mutations in the Na(v)1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet* 71:311–319.
- Goldin, Alan L. Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. (2002) *J Exp Biol* 205: 575-584.
- Guney E, Tuncbag N, Keskin O, Gursoy A (2008) HotSprint: database of computational hot spots in protein interfaces. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue):D662-6.
- Gonoi T, Hille B, Catterall WA (1984) Voltage clamp analysis of sodium channels in normal and scorpion toxin-resistant neuroblastoma cells. *J Neurosci* 4(11):2836-42.
- Gupta R, Jung E and Brunak S (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
- Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG (2003) Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 23(26):8881-92.
- Hawkins, J. D. (1982) The molecular biology of immunoglobulin synthesis. *Biochemical Education*, 10: 2–7.
- Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, Rivera M, Gomora JC (2012) Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer* 130(9):2013-23.
- Hess B., van der Spoel D., et al., (2001-2010) GROMACS Manual 4.5.4. Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. Royal Institute of Technology and Uppsala University, Sweden.
- Higgs P & Manchester, Introduction to Phylogenetics Methods (ITP series on-line seminars).
- Hille, B. (2001) Ion channels of excitable membranes Sunderland, MA. Sinauer Associates.

Hodges DD, Lee D, Preston CF, Boswell K, Hall LM, O'Dowd DK (2002) tipE regulates Na<sup>+</sup>-dependent repetitive firing in *Drosophila* neurons. *Mol Cell Neurosci* 19(3):402-16.

Hollich V, Milchert L, Arvestad L, Sonnhammer EL (2005). Assessment of protein distance measures and tree-building methods for phylogenetic tree reconstruction. *Mol Biol Evol* 22(11):2257-64.

Höltje HD, Sippl W, Rognan D, Folkers G (2003). *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Wiley VCH: Weinheim, Germany.

Isom L.L., KS De Jongh, DE Patton, BF Reber, J Offord, H Charbonneau, K Walsh, AL Goldin and WA Catterall (1992) Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256(5058):839-42.

Isom, LL (2001) Sodium Channel  $\beta$  Subunits: Anything but Auxiliary. *Neuroscientist*, 7, 42-54.

Jayasinghe S, Hristova K, White SH (2001) Energetics, stability, and prediction of transmembrane helices. *J Mol Biol* 312(5):927-34.

Johnson D, Montpetit ML, Stocker PJ, Bennett ES (2004) The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J Biol Chem* 279(43):44303-10.

Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J Biol Chem* 275(2):1079-88.

Kohrman DC, Smith MR, Goldin AL, Harris J, Meisler MH (1996) A missense mutation in the sodium channel *Scn8a* is responsible for cerebellar ataxia in the mouse mutant jolting. *J Neurosci* 16(19):5993-9.

Lacroix, E., Viguera AR & Serrano, L (1998) Elucidating the folding problem of  $\alpha$ -helices: Local motifs, long-range electrostatics, ionic strength dependence and prediction of NMR parameters. *J. Mol. Biol* 284, 173-191

Lampert A, O'Reilly AO, Reeh P and Leffler A (2010) Sodium channelopathies and pain. *Pflugers Arch* 460 249-63.

Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P (2009) Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics* 10:168.

Lerche H, Heine R, Pika U, George AL Jr, Mitrovic N, Browatzki M, Weiss T, Rivet-Bastide M, Franke C, Lomonaco M, et al (1993) Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III-IV linker. *J Physiol* 470:13-22.

Liang J, Edelsbrunner H, Woodward C (1998) Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci* 7(9):1884-97.

Liao Y, Deprez L, Maljevic S, Pitsch J, Claes L, Hristova D, Jordanova A, Ala-Mello S, Bellan-Koch A, Blazevic D, Schubert S, Thomas EA, Petrou S, Becker AJ, De Jonghe P, Lerche H (2010) Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain* 133(Pt 5):1403-14.

Lipkind GM, Fozzard HA (2005) Molecular Modeling of Local Anesthetic Drug Binding by Voltage-Gated Sodium Channels. *Mol Pharmacol* 68: 1611-22.

Lipkind GM, Fozzard HA.(2010) Molecular model of anticonvulsant drug binding to the voltage-gated sodium channel inner pore. *Mol Pharmacol* 78(4):631-8.

Liu Q, Jin Y, Wang K, Meng X, Yang Y, Yang Z, et al., (2013) Study of the residues involved in the binding of  $\beta 1$  to  $\beta 3$  subunits in the sodium channel. *C. R. Biologies*. Article in press.

Los Alamos National Security (LANS), Los Alamos National Laboratory (2010) How to make a phylogenetic tree. Copyright © 2005-2012 LANS LLC.

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC (2003) Structure validation by  $\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\chi$  deviation. *Proteins* 50(3):437-50.

Lucas PT, Meadows LS, Nicholls J, Ragsdale DS (2005) An epilepsy mutation in the  $\beta 1$  subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to phenytoin. *Epilepsy Res* 64(3):77-84.

Makita N, Bennett PB, George AL Jr (1996) Molecular determinants of  $\beta 1$  subunit-induced gating modulation in voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channels. *J Neurosci* 16(22):7117-27.

Makita N, Shirai N, Wang DW, Sasaki K, George AL Jr, Kanno M, Kitabatake A.(2000) Cardiac  $\text{Na}^+$  channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by  $\beta 1$ -subunit. *Circulation* 101(1):54-60.

Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 9(4):413-24.

Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G.F.,(1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels *J Physiol* 508(Pt 3): 647–657.

Marionneau C, Carrasquillo Y, Norris AJ, Townsend RR, Isom LL, Link AJ, Nerbonne JM (2012) The sodium channel accessory subunit  $\beta 1$  regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated  $\text{K}^+$  channels. *J Neurosci* 32(17):5716-27.

- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA (1998) Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem* 273(7):3954-62.
- McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. (1999). The Extracellular Domain of the  $\beta$ 1 Subunit Is Both Necessary and Sufficient for  $\beta$ 1-like Modulation of Sodium Channel Gating. *J Biol Chem* 274, 32638-32646.
- McEwen DP, Meadows LS, Chen C, Thyagarajan V, Isom LL. Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem* 279(16):16044-9.
- Meadows, L., Malhotra, J. D., Stetzer, A., Isom, L. L. and Ragsdale, D. S. (2001), The intracellular segment of the sodium channel  $\beta$ 1 subunit is required for its efficient association with the channel  $\alpha$  subunit. *J Neurochem* 76: 1871–1878.
- Meadows, LS, Malhotra, J, Loukas, A, Thyagarajan, V, Kazen-Gillespie, KA, Koopman, MC, Kriegler, S, Isom, LL & Ragsdale, DS. (2002). Functional and Biochemical Analysis of a Sodium Channel beta 1 Subunit Mutation Responsible for Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus Type 1. *J Neurosci* 22, 10699-10709.
- Melo F, Sali A (2007) Fold assessment for comparative protein structure modeling. *Protein Sci* 16(11):2412-26.
- Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE (2006) Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics* 7,339.
- Messner DJ, Catterall WA (1985) The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J Biol Chem* 260(19):10597-604.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, et al. (2000)  $\beta$ 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2308–13.
- Moran O, Nizzari M, Conti F.(2000) Endogenous expression of the beta1A sodium channel subunit in HEK-293 cells. *FEBS Lett* 473(2):132-4.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, et al. (2000)  $\beta$ 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2308–13.
- Neutze R, Huldts G, Hajdub J, van der Spoelb D (2004) Potential impact of an X-ray free electron laser on structural biology. *Radiat Phys Chem* 71 905-916.

Nguyen HM, Miyazaki H, Hoshi N, Smith BJ, Nukina N, Goldin AL, Chandy KG (2012) Modulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by the sodium channel  $\beta$ 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45):18577-82.

Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN (2010) CPHmodels-3.0 Remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic Acids Res* 1, 38 (Web Server issue):W576-81.

Nobel Media AB (2013) "The Nobel Prize in Chemistry 2003". Nobelprize.org. Web. 23 Sep. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2003/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/).

Noda, M, Shimizu, S, Tanabe, T, Takai, T, Kayano, T, Ikeda, T, Takahashi, H, Nakayama, H, Kanaoka, Y, Minamino, N, Kangawua, K, Matsuo, H, Raftery, M, Hirose, T, Inayama, S, Hayashida, H, Miyata, T & Numa, S (1984). Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.

Nuss HB, Chiamvimonvat N, Pérez-García MT, Tomaselli GF, Marbán E (1995) Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle ( $\mu$  1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 106(6):1171-91.

O'Malley HA, Isom LL. (2006) The role of sodium channel  $\beta$ 2 subunits in neuroprotection. *Society for Neuroscience (Annual Meeting Abstracts)* :727.2/D61.

Ofran Y, Rost B (2007) Protein-protein interaction hotspots carved into sequences. *EMBO J* 5:823-6. *PLoS Comput Biol* 3(7):e119.

O'Reilly AO, Eberhardt E, Weidner C, Alzheimer C, Wallace BA, Lampert A (2012) Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human cardiac sodium channel. *PLoS One* 7(7):e41667.

Orta, S.G., Bouchard, R.A., Morales, S.F. y Salinas, S.E (2002) Inhibition of cardiac Na<sup>+</sup> current by primaquine. *Bri. J. Pharm* 135:751-763.

Patino GA, Claes LR, Lopez-Santiago LF, Slat EA, Dondeti RS, Chen C, O'Malley HA, Gray CB, Miyazaki H, Nukina N, Oyama F, De Jonghe P, Isom LL. (2009) A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J Neurosci* 29(34):10764-78.

Patino GA, Isom LL. (2010) Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunits in development and disease. *Neurosci Lett* 486(2):53-9.

Patton, D. E., Isom, L. L., Catterall, W. A., and Goldin, A. L. (1994) The Adult Rat Brain Subunit Modifies Activation and Inactivation Gating of Multiple Sodium Channels *J. Biol.Chem* 269, 17649–17655.

Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2012) Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486(7401):135-9.

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475(7356):353-8.

Pedretti, L. Villa, G. Vistoli. (2004) VEGA ZZ 2.3.2 - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des* 18(3):167-73.

Perrière, G. and Gouy, M. (1996) WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78, 364-369.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605-12.

Petukhov, M., Uegaki, K., Yumoto, N. and Serrano, L (2002), Amino acid intrinsic  $\alpha$ -helical propensities III: Positional dependence at several positions of C terminus. *Protein Sci* 11: 766–777.

Qu Y, Rogers JC, Chen S-F, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA. (1999) Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel  $\alpha$  subunit in voltage-dependent gating and modulation by  $\beta$ 1 subunits. *J Biol Chem* 274:32647–54.

Qu, Y, Catterall, WA., et al., (1999). Functional Roles of the Extracellular Segments of the Sodium Channel  $\alpha$  Subunit in Voltage-dependent Gating and Modulation by  $\beta$ 1 Subunits. *J Biol Chem* 274, 32647-32654.

Ragsdale DS (2008) How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy? *Brain Res Rev* 58(1):149-59.

Ritchie D W, Venkatraman V (2010). Ultra-Fast FFT Protein Docking On Graphics Processors. *Bioinformatics*, 26, 2398-2405.

Rogers JC., Catterall et al., (1996) Molecular Determinants of High Affinity Binding of  $\alpha$ -Scorpion Toxin and Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the Na1 Channel  $\alpha$  Subunit *J Biol Chem* 271(27):15950-62.

Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, Klevit RE (1999) Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* 38(3):855-61.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5(4):725-38.

- Salceda E. y Ortega A. Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos* 74 (2009) 29-37.
- Salinas-Stefanon EM, Islas AA, Scior TF, Martinez-Morales E, Millan-PerezPeña L. (2012) An In-Silico Approach to Primaquine Binding to Trp756 in the External Vestibule of Sodium Channel Nav 1.4. *Biophysical J.* Vol. 102, Issue 3, pp. 327a-328a.
- Salinas-Stefanon EM, Martinez-Morales E, Scior TF, Millan-PerezPeña L (2011) A residue W756 in the P-loop segment of the sodium channel is critical for primaquine binding. *Eur J Pharmacol* 663(1-3):1-8.
- Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y (2001) The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409(6823):1047-51.
- Savio-Galimberti E, Gollob MH, Darbar D (2012) Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol* 3:124
- Scalmani P, Rusconi R, Armatura E, Zara F, Avanzini G, Franceschetti S, Mantegazza M (2006) Effects in neocortical neurons of mutations of the Na(v)1.2 Na<sup>+</sup> channel causing benign familial neonatal-infantile seizures. *J Neurosci* 26(40):10100-9.
- Scheib H, et al.(2006) Modeling the pore structure of voltage-gated sodium channels in closed, open, and fast-inactivated conformation reveals details of site 1 toxin and local anesthetic binding. *J Mol Model* 12:813–822.
- Schnur E, Turkov M, Kahn R, Gordon D, Gurevitz M, Anglister J (2008) NMR analysis of interaction of LqhalphaIT scorpion toxin with a peptide corresponding to the D4/S3-S4 loop of insect para voltage-gated sodium channel. *Biochemistry* 47(3):911-21.
- Scior, TR, Martínez-Morales, E, Cruz, S & Salinas-Stefanón, E. (2009). In silico modeling of toluene binding site in the pore of voltage-gate sodium channel. *J Receptor, Ligand Channel Res*, 2, 1-9.
- Scior T, Wahab A. (2007) Structure prediction of proteins with very low homology: A comprehensive introduction and a case study on aminopeptidase. In: Stanley P. Kaplan, editor. *Drug Design Research Perspectives*. Nova Science Publishers; p. 675–708.
- Seipel, K., and Schmid, V. (June 2005). Evolution of striated muscle: Jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev Biol* 282 (1): 14–26.
- Smith RD, Goldin AL. (1998) Functional analysis of the rat I sodium channel in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 18 (3): 811-20.
- Snider C, Jayasinghe S, Hristova K, White SH (2009) MPEX: A tool for exploring membrane proteins. *Protein Sci* 18:2624-2628.

Sotoodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI, Dörr M, Newton-Cheh C, Nolte IM, van der Harst P, Müller M, Eijgelsheim M, Alonso A, Hicks AA, Padmanabhan S et al., (2010) Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet* 42(12):1068-76.

Tan J, Choi JS, Soderlund DM (2011) Coexpression with Auxiliary  $\beta$  Subunits Modulates the Action of Tefluthrin on Rat Na(v)1.6 and Na(v)1.3 Sodium Channels. *Pestic Biochem Physiol* 101(3):256-264.

Theile JW, Cummins TR (2011) Recent developments regarding voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of inherited and acquired neuropathic pain syndromes. *Front Pharmacol* 2:54.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.

Tikhonov D. (2008) Mechanisms of action of ligands of potential-dependent sodium channels. *Neurosci Behav Physiol* 38(5):461-9.

Tong J, Potts JF, Rochelle JM, Seldin MF, Agnew WS (1993) A single B1 subunit mapped to mouse chromosome 7 may be a common component of Na channel isoforms from brain, skeletal muscle and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2):679-85.

Trimmer JS, Cooperman SS, Tomiko SA, Zhou JY, Crean SM, Boyle MB, Kallen RG, Sheng ZH, Barchi RL, Sigworth FJ, et al. (1989) Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* 3(1):33-49.

Tuncbag N, Gursoy A, Keskin O (2009) Identification of computational hot spots in protein interfaces: combining solvent accessibility and interresidue potentials improves the accuracy. *Bioinformatics* 25(12):1513-1520.

Uebachs M, Albus C, Opitz T, Isom L, Niespodziany I, Wolff C, Beck H (2012) Loss of  $\beta$ 1 accessory Na<sup>+</sup> channel subunits causes failure of carbamazepine, but not of lacosamide, in blocking high-frequency firing via differential effects on persistent Na<sup>+</sup> currents. *Epilepsia*. 53(11):1959-67.

Uebachs M, Opitz T, Royeck M, Dickhof G, Horstmann MT, Isom LL, Beck H.(2010) Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel beta subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents. *J Neurosci* 30(25):8489-501.

Ulbricht, W (2005) Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiol Rev* 85, 1271-1301.

Upadhyay, R K (2003) Computational analysis of evolutionary divergence of scorpion toxins *Indian J Biochem Biophys* 40(1):51-8.

- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Hudson HF, Stanley P y cols., (2009) Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vijayaragavan, K, O'Leary, ME & Chahine, M. (2001). Gating Properties of Nav1.7 and Nav1.8 Peripheral Nerve Sodium Channels. *J Neurosci* 21, 7909-7918.
- Vijayaragavan K, Powell AJ, Kinghorn IJ, Chahine M (2004) Role of auxiliary beta1-, beta2-, and beta3-subunits and their interaction with Na(v)1.8 voltage-gated sodium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 319(2):531-40.
- Vilin YY, Makita N, George AL Jr, Ruben PC (1999) Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys J.* 77(3):1384-93.
- Vilin YY, Fujimoto E, Ruben PC. (2001) A Single Residue Differentiates between Human Cardiac and Skeletal Muscle Na<sup>+</sup> Channel Slow Inactivation. *Biophys J.* 2001 May;80(5):2221-30.
- Wallner M, Weigl L, Meera P, Lotan I (1993) Modulation of the skeletal muscle sodium channel alpha-subunit by the beta 1-subunit. *FEBS Lett* 336(3):535-9.
- Wang J, Cieplak P, Kollman PA (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J Comput Chem* 21 No. 12, 1049-1074.
- Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* 25(9):1157-74.
- Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, Schwartz PJ, Keating MT (1995) Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet* 4(9):1603-7.
- Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, Jiramongkolchai K, Chopra S, Donahue BS, Kannankeril PJ, Roden DM. (2009) Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2(3):268-75.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Käb S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR (2008) Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118(6):2260-8.
- Webb J, Wu FF, Cannon SC (2009). Slow inactivation of the NaV1.4 sodium channel in mammalian cells is impeded by co-expression of the beta1 subunit. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 457(6):1253-63.

- Wen-Hsiung Li & Dan Graur, *Fundamentals of Molecular Evolution* (1991).
- Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, et al. (2003). VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 31: 3316–3319.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10910-4.
- Williamson, Minard, and Masters (2006) *Macroscopic and Microscopic Organic Experiments*. Chapter 5: Computational Chemistry. 5th ed. Brooks, Cole Publishing.
- Wingerd, J. S., Vetter, I. and Lewis, R. J. (2012) Voltage-Gated Sodium Channels as Therapeutic Targets, in *Therapeutic Targets: Modulation, Inhibition, and Activation* (eds L. M. Botana and M. Loza), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Wilson MJ, Zhang MM, Azam L, Olivera BM, Bulaj G, Yoshikami D (2011) Nav $\beta$  subunits modulate the inhibition of Nav1.8 by the analgesic gating modifier  $\mu$ O-conotoxin MrVIB. *J Pharmacol Exp Ther* 338(2):687-93.
- Wong ET, Na D, Gsponer J (2013) On the importance of polar interactions for complexes containing intrinsically disordered proteins. *PLoS Comput Biol* 9(8):e1003192.
- Xia JF, Zhao XM, Song J, Huang DS (2010) APIS: accurate prediction of hot spots in protein interfaces by combining protrusion index with solvent accessibility. *BMC Bioinformatics* 11:174.
- Xu D, Tsai CJ, Nussinov R (1997) Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng* 10(9):999-1012.
- Xu X, Jiang M, Hsu KL, Zhang M, Tseng GNJ (2008) KCNQ1 and KCNE1 in the IKs channel complex make state-dependent contacts in their extracellular domains. *Gen Physiol* 131(6):589-603.
- Xu, R, Thomas, EA, Gazina, EV, Richards, KL, Quick, M, Wallace, RH, Harkin, LA, Heron, SE, Berkovic, SF, Scheffer, IE, Mulley, JC & Petrou, S (2007). Generalized epilepsy with febrile seizures plus-associated sodium channel [beta]1 subunit mutations severely reduce beta subunit-mediated modulation of sodium channel function. *Neurosci* 148, 164-174.
- Yang YC, Huang CS, Kuo CC (2010) Lidocaine, carbamazepine, and imipramine have partially overlapping binding sites and additive inhibitory effect on neuronal Na<sup>+</sup> channels *Anesthesiology* 113(1):160-74.
- Zhang and Skolnick (2004) Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins* 57: 702-710.

Zhang XY, Wen J, Yang W, Wang C, Gao L, Zheng LH, Wang T, Ran K, Li Y, Li X, Xu M, Luo J, Feng S, et al., (2013) Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *Am J Hum Genet* 93(5):957-66.

Zhao J, O'Leary ME, Chahine M (2011) Regulation of Nav1.6 and Nav1.8 peripheral nerve Na<sup>+</sup> channels by auxiliary  $\beta$ -subunits. *J Neurophysiol* 106(2):608-19.

Zimmer T, Benndorf K (2002) The human heart and rat brain IIA Na<sup>+</sup> channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. *J Gen Physiol*. Dec;120(6):887-95.

Zwanzig R, Szabo A, Bagchi B (1992) Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):20-2.