



---

---

---

---

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Instituto de Ciencias**

**Posgrado en Ciencias Químicas**

**“El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$   
como regulador de hNa<sub>v</sub>1.7”**

Tesis para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Químicas**

**Área de Físicoquímica**

Presenta:

**M.C. Jordan Edilberto Ruiz Castelán**

**Director**

**Dr. Thomas Scior**

Laboratorio de Simulaciones Moleculares Computacionales

Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado de Ciencias Químicas, BUAP

**Codirector**

**Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante**

Laboratorio de Química Teórica, Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado de Ciencias Químicas, BUAP



JUNIO 2025

## AGRADECIMIENTOS

A Alonso

A Elo por apoyarme desde hace bastantes años, orientarme en los momentos difíciles y siempre estar ahí.

A Cristina (mi mama). ¡GRACIAS!

A mis amigos del LabDeSiMol Jorge, Kenia, Itzel, Israel; gracias por toda su enseñanza, amistad y apoyo.

A Caro Velasco por su amistad desde la licenciatura y siempre estar al pendiente de nosotros 3.

Dr. Tom Scior no tengo palabras para agradecer: su enseñanza, conocimiento, apoyo, orientación, libertad en el trabajo y confianza en muchas decisiones que he tomado desde la tesis de licenciatura hasta ahora. ¡Siempre le estaré muy agradecido!

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante muchas gracias por sus clases, tiempo, apoyo, orientación, conocimiento y la tranquilidad que me mostraba al orientarme en los meses de caos (fin de cada semestre), y darme la confianza en los congresos a los que asistimos, Muchas gracias.

Dra. Maru muchas gracias por sus palabras, confianza, orientación y siempre estar al pendiente de mis trabajos.

Dr. José Manuel Pérez Aguilar su manera de enseñar me ha dado un nuevo panorama, así mismo, su forma de hacer investigación; muchas gracias.

Dr. Julián Yunes por sus buenas orientaciones en la escritura de los seminarios desde maestría.

Dra. Norma muchas gracias por la plática que tuvimos en el aeropuerto de Chihuahua, me ayudo para tomar decisiones.

Dra. Lisset gracias por sus comentarios y apoyo en la orientación de congresos.

Familia Castelán Fernández por todo su apoyo incondicional.

Familia Arista Sánchez por todo su apoyo incondicional.

A las Instituciones:

# Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación



A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI, México)** por la beca de Doctorado con número de CVU 708844



A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP)** por el apoyo a través del proyecto: El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador de  $hNa_v1.7$



Laboratorio Nacional de Supercómputo  
del Sureste de México

Al **Laboratorio Nacional de Supercómputo de Sureste de México (LNS-BUAP)** por los recursos computacionales otorgados y el soporte para la realización de la tesis para la realización de esta tesis.



Al **Cuerpo Académico BUAP-CA-263** “Investigación Experimental-Computacional de Nuevos Materiales y Sistemas Biomoleculares” (SEP, PRODEP).

Los resultados de este estudio fueron presentados en los siguientes foros nacionales e internacionales:

1. Jordan E. Ruiz Castelán, Thomas Scior, Francisco J. Meléndez. **XXVII Simposio Interno** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, del 7 al 10 de noviembre del 2023, celebrado de manera virtual.
2. Jordan E. Ruiz Castelán, Tomas Scior, Francisco J. Meléndez. **LV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Tercer Congreso Virtual Asociación Farmacéutica Mexicana (AFM)** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, del 14-17 de noviembre de 2022, celebrado de manera virtual.
3. Jordan E. Ruiz Castelán, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **LatinXChem 2022** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, celebrado mediante la plataforma de X, el 28 noviembre de 2022, modalidad virtual.
4. Jordan E. Ruiz Castelán, Thomas Scior, Francisco J. Meléndez. **XXVIII Simposio Interno** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, del 13 al 16 de noviembre del 2023, celebrado de manera presencial.
5. Jordan E. Ruiz Castelán, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **LatinXChem 2023** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, celebrado mediante la plataforma de X, el 16 y 17 de octubre de 2023, modalidad virtual.
6. Jordan E. Ruiz Castelán, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **XVI Congreso Internacional Multidisciplinario del Investigación 2023**, con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, del 24 al 27 de octubre de 2023, modalidad virtual.
7. Jordan E. Ruiz Castelán, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **XXI Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, celebrado el 7 al 9 de noviembre de 2024, modalidad presencial.
8. Jordan E. Ruiz Castelán, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **LatinXChem 2024** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, celebrado mediante la plataforma de X, el 14 y 15 de octubre de 2024, modalidad virtual.
9. Jordan E. Ruiz Castelán, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Thomas Scior. **XXII Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica** con el trabajo “La unión y efecto de la subunidad  $\beta 3$  sobre el  $hNa_v1.7$ ”, celebrado el 7 al 9 de noviembre de 2024, modalidad presencial.
10. Jordan E. Ruiz Castelán, Thomas Scior, Francisco J. Meléndez. **XXIX Simposio Interno** con el trabajo “El rol estructural de la subunidad  $\beta 3$  como regulador del  $hNa_v1.7$ ”, del 11 al 14 de noviembre del 2024, celebrado de manera presencial.

**Artículo publicado:**

Ruiz-Castelan, J.E., Villa-Díaz, F., Castro, M.E., Melendez, F.J., Scior, T. The  $\alpha/\beta$ 3 complex of human voltage-gated sodium channel hNav1.7 to study mechanistic differences in presence and absence of auxiliary subunit  $\beta$ 3. *J Mol Model* 31, 168 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00894-025-06378-9>

## RESUMEN

El interactoma humano es el mapa de las interacciones moleculares entre proteínas humanas. Para explicar las interacciones que existen entre proteínas es necesario generar modelos 3D que ayuden a mostrar e identificar dichos contactos entre proteína-proteína. El estudio del interactoma puede ser un aliado relevante en el tratamiento de diversas enfermedades o padecimientos. En este proyecto en particular estamos interesados en los trastornos del dolor. Directamente la interacción de la subunidad  $\beta 3$  con la subunidad  $\alpha$  genera que el ion sodio pueda pasar más rápido por el filtro de selectividad y colocarse dentro del vestíbulo del canal  $hNa_v1.7$ . Así mismo, permite que el segmento S4 del dominio DIII del canal se mueva hacia arriba generando una modificación en el proceso de apertura del canal. Para describir directamente la forma y sitio de unión entre la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta 3$  del canal iónico  $hNa_v1.7$  se realiza un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) entre la subunidad  $\alpha$  y subunidad  $\beta 3$  del  $hNa_v1.7$  con sus estructuras cristalográficas respectivas para generar un modelo tridimensional completo mediante modelado por homología. Posteriormente, se lleva a cabo un acoplamiento molecular para conocer su sitio y forma de unión que tiene la subunidad  $\beta 3$  en la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$ ; el resultado muestra que el sitio de unión de la subunidad  $\beta 3$  es en el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$ , presentando interacciones entre K1287-F23 ( $\alpha/\beta 3$ ); R1290-F23 ( $\alpha/\beta 3$ ); Y1229-E159 ( $\alpha/\beta 3$ ); F1194-W172 ( $\alpha/\beta 3$ ); F1197-W172 ( $\alpha/\beta 3$ ); E1670-E52 ( $\alpha/\beta 3$ ); E1672-R52 ( $\alpha/\beta 3$ ). Para conocer la estabilidad de estas interacciones se prepara el sistema para realizar simulaciones de dinámica molecular. Los resultados muestran que el sistema es estable y los fenómenos debido a las interacciones son: 1) el movimiento del segmento S4 de la subunidad  $\alpha$  que da como resultado la activación del canal; y 2) las interacciones presentes en las asas que se encuentran en el dominio *Ig-like* de la subunidad  $\beta 3$  denominándose CDR's, que generan una disminución en el movimiento del ectodominio de la subunidad  $\alpha$ , provocando que los iones  $Na^+$  se acerquen más rápido a una asa que se encuentra entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio y que contiene residuos como ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y alanina que conforman el filtro de selectividad (DEKA) pasando al interior del canal. De esta manera, se muestra el sitio y forma de unión de la subunidad  $\beta 3$  al dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del canal  $hNa_v1.7$ ; y los efectos que el canal sufre al tener unida a la subunidad  $\beta 3$ .

# INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 CANALES IÓNICOS .....	3
2.2 CANAL DE SODIO .....	3
2.2.1. CANAL DE SODIO $Na_v1.7$ .....	5
2.2.2 MUTACIONES EN EL $hNa_v1.7$ .....	6
2.2.3 INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL $hNa_v1.7$ .....	8
2.3 SUBUNIDADES $\beta$ .....	9
2.3.1 SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	10
2.3.2 INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\beta_3$ CON OTRAS PROTEÍNAS .....	12
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	13
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	17
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
<b>7. MARCO TEÓRICO</b> .....	18
7.1 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS .....	18
7.2 MODELADO POR HOMOLOGÍA .....	21
7.2.1 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO .....	21
7.2.2 REFINAMIENTO DEL MODELO .....	22
7.2.3 EVALUACIÓN DEL MODELO 3D .....	22
7.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR ( <i>DOCKING</i> ) .....	23
7.3.1 EL ALGORITMO CLÁSICO PARA REALIZAR UN <i>DOCKING</i> .....	23
7.3.2 CÁLCULO DE LAS ENERGÍAS DE INTERACCIÓN .....	24
7.3.3 ALGORITMOS DE BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN .....	25
7.3.4 EVALUACIÓN PARA LA POSICIÓN ÓPTIMA .....	25
7.3.5 HERRAMIENTAS PARA HACER <i>DOCKING</i> .....	26

7.4 DINÁMICA MOLECULAR .....	27
7.4.1 MATEMÁTICAS DE LA DINÁMICA MOLECULAR.....	27
7.4.2 INTEGRACIÓN DE LAS ECUACIONES DE MOVIMIENTO .....	29
7.4.3 CÁLCULO DE TRAYECTORIA .....	31
7.4.4 PROPIEDADES TERMODINÁMICAS .....	32
<b>8. METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
8.1 BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS PRIMARIAS.....	33
8.2 MODELADO DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ .....	33
8.3 MODELADO DE LA SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	34
8.4 REFINAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS 3D .....	34
8.5 ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ Y LA SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	35
8.6 DINÁMICA MOLECULAR .....	36
8.7 EJECUCIÓN DEL SISTEMA COMPLETO PARA DINÁMICA MOLECULAR .....	39
8.8 DETERMINACIÓN DE FUERZAS DE INTERACCION USANDO APBS.....	39
<b>9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
9.1 GENERACIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ .....	41
9.2 GENERACIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	48
9.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ Y LA SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	53
9.4 DINÁMICA MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL hNav1.7 Y LA SUBUNIDAD $\beta_3$ .....	61
9.4.1 ANÁLISIS DE MOVIMIENTO DEL SEGMENTO S4 DEL DOMINIO DIII DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL CANAL hNav1.7. ....	79
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>100</b>
<b>11. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>104</b>
<b>13. PUBLICACIÓN.....</b>	<b>114</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metodología para la generación de la nomenclatura del canal de sodio.....	4
<b>Figura 2.</b> Representación de la topología del canal de sodio. ....	6
<b>Figura 3.</b> Representación estructural de la subunidad $\beta 3$ .....	10
<b>Figura 4.</b> Características que debe tener el archivo en formato FASTA .....	18
<b>Figura 5.</b> Alineamiento múltiple de secuencias (MSA) entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\alpha$ obtenida de UniProt y las estructuras cristalográficas a usar para su modelado por homología. ....	46
<b>Figura 6.</b> Modelo por homología 3D de la subunidad $\alpha$ del hNa <sub>v</sub> 1.7.....	46
<b>Figura 7.</b> Gráfica de validación del modelo 3D de la subunidad $\alpha$ del canal hNa <sub>v</sub> 1.7 usando los valores QMEAN.....	47
<b>Figura 8.</b> Cuadro de Ramachandran mostrando las posiciones que toman los ángulos Phi y Psi de la subunidad $\alpha$ del canal hNa <sub>v</sub> 1.7.....	48
<b>Figura 9.</b> Modelo por homología de la subunidad $\beta 3$ . ....	49
<b>Figura 10.</b> Gráfica de validación del modelo 3D de la subunidad $\beta 3$ usando los valores QMEAN. ....	50
<b>Figura 11.</b> Cuadro de Ramachandran mostrando las posiciones que toman los ángulos Phi y Psi de la subunidad $\beta 3$ .....	51
<b>Figura 12.</b> Superposiciones de los resultados con el canal Na <sub>x</sub> y con el Na <sub>v</sub> 1.7. (a) Estructura observada experimentalmente ( $\alpha/\beta 3$ de hNa <sub>x</sub> ) y modelo $\alpha/\beta 3$ predicho en superposición. ....	52
<b>Figura 13.</b> Representación de la posición aleatoria en la que se colocó a la subunidad $\beta 3$ respecto a la subunidad $\alpha$ para realizar los acoplamientos moleculares. ....	54
<b>Figura 14.</b> Resultados del docking proteína-proteína entre la subunidad $\beta 3$ y la subunidad $\alpha$ del hNa <sub>v</sub> 1.7. ....	56
<b>Figura 15.</b> Posición final del resultado de HDOCK de la subunidad $\beta 3$ (ligando) que se encuentra en el dominio DIII de la subunidad $\alpha$ del hNa <sub>v</sub> 1.7 .....	57
<b>Figura 16.</b> Interacción entre E52 de la subunidad $\beta 3$ con K1220 del dominio DIII de la subunidad $\alpha$ del hNa <sub>v</sub> 1.7. ....	58
<b>Figura 17.</b> Interacción entre el grupo carboxílico de E159 de la subunidad $\beta 3$ con el grupo -OH de Y1228 del dominio DIII.....	58
<b>Figura 18.</b> Interacción entre los residuos W172 de la subunidad $\beta 3$ con los residuos aromáticos F1194 y F1197 del dominio DIII. ....	59
<b>Figura 19.</b> Posición final del back docking realizado con la herramienta en línea HDOCK, .....	59
<b>Figura 20.</b> Posición final del back docking realizado en HADDOCK 2.4 usando como ligando a la subunidad $\beta 1$ (listón gris) y como receptor a la subunidad $\alpha$ (listo azul). ....	60
<b>Figura 21.</b> Sistema para generar una dinámica molecular .....	61

<b>Figura 22.</b> Gráficas de RMSD de la subunidad $\alpha$ y de la subunidad $\beta$ 3 del canal hNav1.7 durante 300 ns. .....	62
<b>Figura 23.</b> Representación de la interacción entre F23 – K1287 and F23 – R1290.....	63
<b>Figura 24.</b> Representación gráfica de la interacción entre V29, P30 con R1218.....	64
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica de la interacción entre P30-K1220, E32-K1220. ....	65
<b>Figura 26.</b> Representación gráfica de la interacción entre K98-D1282. ....	66
<b>Figura 27.</b> Representación gráfica de la interacción entre D99 y K1287. ....	68
<b>Figura 28.</b> Representación gráfica entre E159 y Y1228. ....	70
<b>Figura 29.</b> Representación gráfica de la interacción entre W172 – F1194 – F1197. ....	71
<b>Figura 30.</b> Representación gráfica de la interacción entre E176-W1193.....	73
<b>Figura 31.</b> Representación de la interacción entre E176-H1191.....	75
<b>Figura 32.</b> Representación de la interacción entre E188 y K1176. ....	76
<b>Figura 33.</b> Representación de la interacción entre R51-E1672.....	77
<b>Figura 34.</b> Representación de la interacción entre E52/E53 – K1670. ....	78
<b>Figura 35.</b> Gráfica de RMSD del dominio VSD <sub>DIII</sub> durante los 300 ns de MD. Los valores de RMSD reflejan a cambios de los átomos del segmento S4. ....	79
<b>Figura 36.</b> Gráfica de RMSF del VSD <sub>DI</sub> , VSD <sub>DII</sub> y VSD <sub>DIV</sub> de la subunidad $\alpha$ en los 300 ns de tiempo registrado. 80	
<b>Figura 37.</b> Gráfica de RMSF del dominio sensor de voltaje VSD <sub>DIII</sub> de la subunidad $\alpha$ durante los 300 ns de simulación. ....	82
<b>Figura 38.</b> Gráfica del RMSF del segmento S4 del VSD <sub>DIII</sub> de la subunidad $\alpha$ .....	83
<b>Figura 39.</b> Representaciones estructurales de los cambios de conformación del segmento S4 del canal de sodio.....	84
<b>Figura 40.</b> Representación gráfica de la interacción entre R1293 (morado) –E1212 (tan).....	85
<b>Figura 41.</b> Representación gráfica de la interacción entre E1240 (amarillo) – R1303 (beige).....	86
<b>Figura 42.</b> Representación gráfica de la interacción entre R1303 (fucsia) y D1262 (amarillo).....	87
<b>Figura 43.</b> Representación gráfica de la interacción entre D1262 – R1299.....	89
<b>Figura 44.</b> Representación gráfica de la interacción entre E1240 (arena) – R1299 (fucsia).....	90
<b>Figura 45.</b> Representación gráfica de la interacción entre D1230 (amarillo) – R1296 (magenta).....	91
<b>Figura 46.</b> Representación gráfica de la interacción entre F1237 (magenta) – R1299 (blanco).....	92
<b>Figura 47.</b> Representación gráfica de la interacción entre E1212 (gris oscuro) -R1290 (magenta). ....	93
<b>Figura 48.</b> Representación gráfica de la interacción entre E1212 (arena) – K1223 (gris oscuro). ....	94
<b>Figura 49.</b> Representación gráfica de la interacción entre D1230 (rosa) – R1293 (amarillo). ....	95
<b>Figura 50.</b> Gráfica de distancia del paso del catión sodio con los aminoácidos que conforman el filtro de selectividad DEKA. ....	96
<b>Figura 51.</b> Representación de la trayectoria del ion Na <sup>+</sup> en el hNav1.7.. ....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los canales de sodio respecto a su sensibilidad a tetrodotoxina.....	5
<b>Tabla 2.</b> Mutaciones que generan cambios en la cinética del canal de sodio hNa <sub>v</sub> 1.7 provocando enfermedades. ....	7
<b>Tabla 3.</b> Clasificación y localización de las subunidades $\beta$ en el cuerpo humano.....	9
<b>Tabla 4.</b> Mutaciones que presenta la subunidad $\beta$ 3 y que promueve la presencia de afecciones. ....	11
<b>Tabla 5.</b> Sistemas generados para obtener la estabilidad e interacciones en el complejo $\alpha/\beta$ 3 .....	38
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de identidad entre subunidades $\beta$ 1, $\beta$ 2 and $\beta$ 3 que provienen de distintas estructuras cristalográficas. ....	49
<b>Tabla 7.</b> El RMSD de la estructura crio-EM y el modelo de predicción de sitio de unión tridimensional entre la subunidad $\alpha$ y $\beta$ 3. ....	53

## 1. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones a través de los años están describiendo los procesos químico-biológicos de la sensación de dolor, realizando grandes avances en evidenciar las dianas moleculares/sitios moleculares que permiten el transporte de la señal y la generación del dolor. De manera concreta, el dolor es una experiencia sensorial generada por un daño tisular, nociceptivo o emocional. A nivel celular, la generación del dolor involucra la activación de canales iónicos como los canales sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ 's).

Existen varios subtipos o isoformas de los  $\text{Na}_v$ 's que se ven involucrados en la transferencia de señalización eléctrica para la sensación del dolor, entre los que están:  $\text{Na}_v1.7$ ,  $\text{Na}_v1.8$  y  $\text{Na}_v1.9$ . Estas isoformas se encuentran expresadas en neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico, específicamente en los ganglios de la raíz dorsal. Directamente, el canal de sodio dependiente de voltaje 1.7 de humano ( $\text{hNa}_v1.7$ ) es esencial para la generación del potencial de acción en las fibras que generan la percepción de sensaciones, denominadas fibras nociceptivas.

El dolor crónico que se presenta clínicamente durante mucho tiempo y de manera constante, relaciona al  $\text{Na}_v1.7$  en uno de sus mayores efectores para que se vea generado. Este canal se encuentra involucrado en afecciones como: 1) dolor crónico severo, 2) eritromelalgia y 3) trastorno paroxístico del dolor. Y esto es debido a cambios en sus aminoácidos (mutaciones) que se generan en el  $\text{hNa}_v1.7$  haciendo que se altere el proceso de excitabilidad neuronal y amplificando o desencadenando más tempranamente los potenciales de acción en las señales de dolor. De esta manera, el  $\text{Na}_v1.7$  es una proteína en estudio para la generación de nuevos fármacos que ayudan a la mitigación o disminución del dolor.

Las subunidades  $\beta$  son proteínas auxiliares que generan cambios en el proceso de transferencia de la señal del potencial de acción debido a su interacción con los  $\text{Na}_v$ 's. En la subunidad  $\beta3$ , se ha encontrado que puede generar cambios en la velocidad de la apertura y cierre en el  $\text{Na}_v1.5$  y  $\text{Na}_v1.7$ ; además, la subunidad  $\beta3$  también puede modificar la cantidad de canales que se pueden estar expresando en la membrana de las fibras nociceptivas.

El estudio *in silico* se ha vuelto una herramienta para la explicación de procesos biomoleculares fundamentales que forman parte de efectos o fenómenos vistos desde la parte

*in vitro* o *in vivo*. Asimismo, han permitido generar una reducción del uso indiscriminado de biomodelos (ratas, ratones, cobayos, etc.), ya que, si se aplica de manera correcta permite el estudio directo de la biomolécula de interés. Algunas de las herramientas que componen el estudio *in silico* son: i) el modelado por homología, que permite generar estructuras tridimensionales (3D) de proteínas, en las cuales su estructura plegada (estructura terciaria o cuaternaria) se desconoce y así poder describirlas; ii) acoplamiento molecular, que ayuda a explicar la forma en que una molécula (ligando, ADN o proteína) se une a una proteína de interés; y de esta manera, conocer los posibles sitios de unión; iii) la dinámica molecular, que desde el punto de vista químico-biológico permite explicar la estabilidad estructural de una proteína, la estabilidad de interacción entre un ligando y receptor, los cambios estructurales que pueden sufrir algunas proteínas debido a estímulos y todo esto reflejado a través del tiempo; y iv) el estudio mediante el software que resuelve la ecuación de Poisson-Boltzmann conocido como APBS (Resolutor Adaptativo de Poisson-Boltzmann -*Adaptative Poisson-Boltzmann Solver*- por sus siglas en inglés) permitiendo conocer la fuerza de las interacciones electrostáticas que le proporcionan estabilidad a la unión entre dos proteínas, un ligando y su proteína de interés y/o cargas que se presentan alrededor de una proteína que se encuentra en agua en características fisiológicas.

En este proyecto estudia de la interacción entre la subunidad  $\beta 3$  con la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$  usando técnicas computacionales como modelado molecular, acoplamiento molecular, simulaciones de dinámica molecular y APBS; con el objetivo de identificar el sitio de unión. De esta manera, conocer los aminoácidos y las fuerzas involucradas que permiten la interacción. Este proyecto se realiza debido a que se conocen efectos que tiene la subunidad  $\beta 3$  del canal de sodio sobre la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$ , pero se desconoce el sitio de unión y los aminoácidos que permiten la interacción y la modificación del movimiento clásico del  $hNa_v1.7$ .

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CANALES IÓNICOS

Estudios realizados desde 1939 a la actualidad han permitido que se lleven a cabo la comprensión del funcionamiento de los canales iónicos.<sup>1</sup> Los canales iónicos son proteínas que tienen la función de poros encontrándose en la membrana celular haciendo de mediadores para tener diversas concentraciones de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Ca}^{2+}$ ) tanto en la porción intracelular respecto a la extracelular.<sup>1</sup>

Estas estructuras macromoleculares juegan roles en los procesos excitatorios tanto en músculo como en sistema nervioso; asimismo, los canales iónicos tienen propiedades de apertura, inactivación y cierre. Además, se reconocen como parte fundamental en los procesos excitatorios en células excitables.<sup>1</sup>

### 2.2 CANAL DE SODIO

Los canales de sodio son macroproteínas que se encargan del paso de iones  $\text{Na}^+$  a través de la membrana permitiendo la electrogénesis (proceso de despolarización) en las células.<sup>2-5</sup> Este canal es un heterotetrámero conformado por alrededor de aproximadamente 2000 aminoácidos denominándose subunidad  $\alpha$ . Dentro de las zonas que presenta el canal de sodio se encuentra: i) el filtro de selectividad que se encuentra conformado por los aminoácidos Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E), Lisina (K) y Alanina (A) y que proporciona la elegibilidad a los iones; ii) la partícula de inactivación es una  $\alpha$  hélice intracelular conformada por los aminoácidos: Isoleucina (I), Fenilalanina (F), Metionina (M) y Treonina (T); que se mueven ocluyendo el poro del canal evitando que los iones sodio puedan pasar completamente por el canal; iii) hélice catiónica que se encuentra dentro del dominio sensor de voltaje (VSG por sus siglas en inglés *Voltage Sensor Domain*) y que está conformada por una gran cantidad de aminoácidos catiónicos, esta asa presenta un giro sobre su propio eje y se mueven aminoácidos hacia la parte extracelular permitiendo que el canal se active;<sup>6-8</sup> iv) fenestraciones son aperturas entre los dominios y que permiten el movimiento de sustancias a través de estas;<sup>9-11</sup> v) sitios específicos de unión a toxinas.<sup>12</sup>

La forma de clasificar a los canales de sodio fue realizada conforme se iban encontrando en las diversas zonas del cuerpo humano<sup>13,14</sup>. Para poder clasificarlos, se tomaron en cuenta algunas características como: i) el ion al que permea; ii) el estímulo que genera la activación del canal; iii) el gen en el que se encuentra su información para que se exprese; iv) isoforma del canal; y v) las posibles variantes genéticas debido a mutaciones que pueden existen<sup>2,7,13,15</sup> (véase **Figura 1**):



**Figura 1.** Metodología para la generación de la nomenclatura del canal de sodio. Para poder generarlo se describen las características de: i) el ion al que le permite el paso; ii) el estímulo que lo activa; iii) el gen en el que se encuentra; iv) isoforma del canal y v) las posibles variantes genéticas que existen.

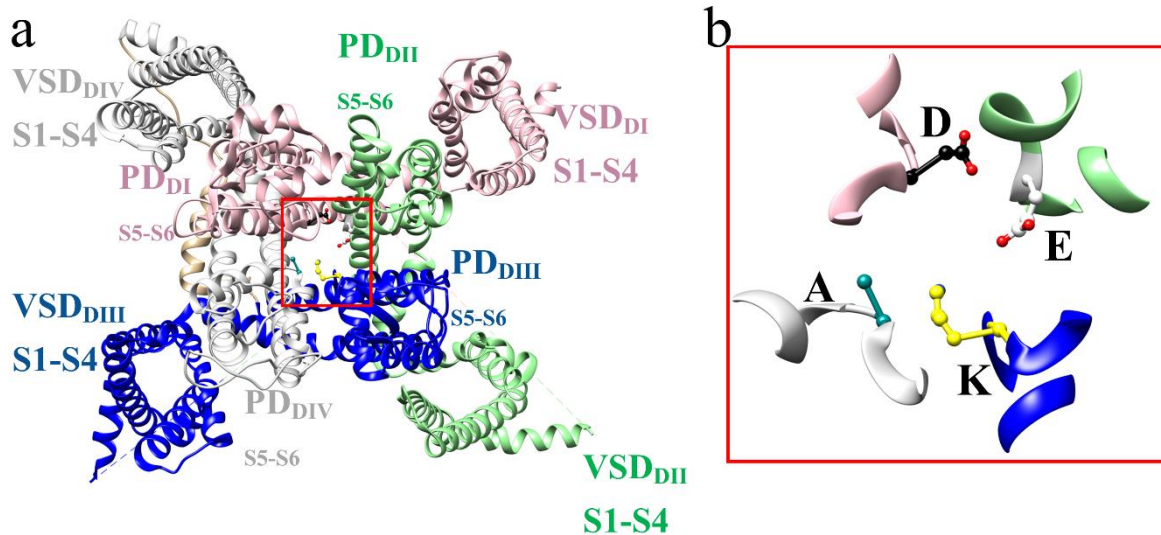
Otro tipo de clasificación para las isoformas del canal de sodio se genera debido a la afinidad que se tiene a tetrodotoxina (TTX).<sup>16</sup> Esta toxina se une directamente al filtro de selectividad del canal evitando que los iones  $\text{Na}^+$  puedan pasar al vestíbulo (interior del canal). Esta toxina se encuentra en el pez globo y se necesitan diversas concentraciones para bloquear el paso de iones  $\text{Na}^+$  por el canal.<sup>16,17</sup> Al cuantificar las concentraciones se pueden clasificar en sensibles a TTX ya que necesitan concentraciones nanomolares (nM) o resistentes ya que necesitan concentraciones microMolares ( $\mu\text{M}$ ) (véase **Tabla 1**):

**Tabla 1.** Clasificación de los canales de sodio respecto a su sensibilidad a tetrodotoxina.

Isoforma	Sensibilidad a TTX
Na <sub>v</sub> 1.1	Sensibles a TTX
Na <sub>v</sub> 1.2	
Na <sub>v</sub> 1.3	
Na <sub>v</sub> 1.4	
Na <sub>v</sub> 1.6	
Na <sub>v</sub> 1.7	
Na <sub>v</sub> 1.5	
Na <sub>v</sub> 1.8	
Na <sub>v</sub> 1.9	

### 2.2.1. CANAL DE SODIO Na<sub>v</sub>1.7

El canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC por sus siglas en inglés *voltage-gated sodium channel*) 1.7 de humano (hNa<sub>v</sub>1.7), también conocido como canal de sodio de tipo IX se codifica en el gen SCN9A de humano que contiene 113.5 kb<sup>18,19</sup> y está constituido por 1988 aminoácidos que se reorganizan tridimensionalmente y generan la subunidad  $\alpha$ . Esta subunidad se pliega generando 24 segmentos transmembranales que se agrupan en 4 grupos denominados dominios (véase **Figura 2a**). Dentro de su topología, la subunidad  $\alpha$  se acomoda para dar paso a la generación de cuatro dominios; cada dominio se encuentra conformado por: i) dominio sensor de voltaje (VSD por sus siglas en inglés *voltage sensor domain*) formado por los segmentos transmembranales S1-4, simbolizado por VSD<sub>DI</sub>, VSD<sub>DII</sub>, VSD<sub>DIII</sub>, y VSD<sub>DIV</sub>; y ii) por el dominio del poro (PD por sus siglas en inglés *pore domain*) constituido por los segmentos S5 y S6, mostrándose comúnmente por PD<sub>DI</sub>, PD<sub>DII</sub>, PD<sub>DIII</sub>, y PD<sub>DIV</sub>. Dentro del dominio del poro tiene cuatro aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y alanina) que conforman el dominio del filtro de selectividad, otorgando la selectividad al ion Na<sup>+</sup> (véase **Figura 2b**).<sup>2,3,13,20-24</sup>



**Figura 2.** Representación de la topología del canal de sodio. **a)** Diagrama de topología 3D del hNav<sub>v</sub>1.7, en el que se pueden observar los cuatro dominios que conforman el canal: DI-rosa, DII-verde, DIII-azul y DIV-gris, el dominio sensor de voltaje VSD y el dominio del poro PD; **b)** Aminoácidos que conforman el filtro de selectividad, conformándose por ácido aspártico (D color negro), ácido Glutámico (R color gris), lisina (K color amarillo) y alanina (A color cian). Figura realizada en Chimera.<sup>25</sup>

Esta subunidad  $\alpha$  se encarga de la generación de despolarización de la membrana celular que permite la generación y propagación de señales eléctricas; de tal manera que, en algunos casos se involucra en desórdenes de dolor,<sup>4,26,27</sup> epilepsia y convulsiones debido a fiebre. Haciendo que de manera directa, se encuentre relacionado con el control del potencial de acción en neuronas nociceptivas<sup>28</sup> que son importantes en enviar la sensación del dolor en el sistema nervioso periférico (SNP) y directamente en los ganglios de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés *Dorsal Root Ganglion*);<sup>29,30</sup> al generar este proceso, esta subunidad genera cambios estructurales que se denominan en estado “abierto-inactivado-cerrado”.

### 2.2.2 MUTACIONES EN EL hNav1.7

En el gen SCN9A que codifica para el hNav<sub>v</sub>1.7 se pueden presentar mutaciones que se relacionan con diferentes trastornos de dolor. Se presentan dos tipos de mutaciones:

a) Mutaciones de pérdida de función: Éstas pueden causar insensibilidad al dolor, donde las personas no pueden sentir dolor.

b) Mutaciones con ganancia de función: Se presenta en afecciones como la eritermalgia primaria (PE)<sup>26,31</sup> o el trastorno de dolor extremo paroxístico (PEPD),<sup>19,32</sup> en las que se experimenta un dolor crónico debilitante, debido al aumento de la actividad de los hNav1.7.<sup>33</sup>

El hNav1.7 también se ve relacionado en otros tipos de trastornos: si bien se identifica su papel en el dolor, también hay un creciente interés en su participación en afecciones neuropáticas:<sup>19,28,30</sup> como epilepsia<sup>34</sup> e incluso algunos trastornos psiquiátricos<sup>35</sup> (véase **Tabla 2**); siendo este canal un blanco biomolecular para la generación de fármacos.<sup>36-38</sup>

**Tabla 2.** Mutaciones que generan cambios en la cinética del canal de sodio hNav1.7 provocando enfermedades.

Mutación	Posición	Enfermedad	Referencia
Q -> R	10	Eritermalgia Primaria	18,39
F -> S	216	Eritermalgia Primaria	31,39
S -> T	241	Eritermalgia Primaria	40
N -> K	395	Eritermalgia Primaria	39
I -> T	859	Eritermalgia Primaria	30,39,41,42
A -> P	863	Eritermalgia Primaria	43
L -> F; L -> H	869	Eritermalgia Primaria	39,44
R -> Q	896	Indiferencia al dolor, congénita, autosómica recesiva (CIP)	28
R -> C	1007	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPDP)	19
V -> D; V -> F	1309	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPDP)	19

V -> F	1310	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	19
F -> V	1460	Eritermalgia Primaria	45
I -> T	1472	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	19
F -> V	1473	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	19
T -> I	1475	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	19
L -> P	1612	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	46
A -> E	1632	Eritermalgia Primaria Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	32,47
M -> K	1638	Trastorno de dolor paroxístico extremo (PEXPD)	19

---

### 2.2.3 INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL hNa<sub>v</sub>1.7

La subunidad  $\alpha$  del hNa<sub>v</sub>1.7 presenta interacciones que permite modular su proceso de apertura y cierre denominada cinética. A esta subunidad  $\alpha$  se le unen proteínas<sup>48</sup> como las subunidades  $\beta$ 1, que se une por acercamiento a la subunidad  $\alpha$  regulando el tiempo de la velocidad de inactivación<sup>16,28,49</sup> y de la misma manera, le proporciona estabilidad;<sup>20</sup> la subunidad  $\beta$ 2 se une a la subunidad  $\alpha$  mediante un enlace disulfuro, presentando modulación similar a la subunidad  $\beta$ 1;<sup>28,49</sup> la subunidad  $\beta$ 3 se une solo por acercamiento a la subunidad  $\alpha$

modificando la velocidad y tiempo de activación.<sup>50</sup> De la misma manera, la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés *Protein kinase C*) se une a S1479 localizada en la estructura de unión entre el dominio D<sub>III</sub> y D<sub>IV</sub> de la subunidad  $\alpha$  incrementando las corrientes resurgentes;<sup>51</sup> la proteína NEED4L se une al dominio C-terminal para que la subunidad  $\alpha$  sufra los procesos de ubiquitinación y la subsecuente endocitosis.<sup>52</sup>

### 2.3 SUBUNIDADES $\beta$

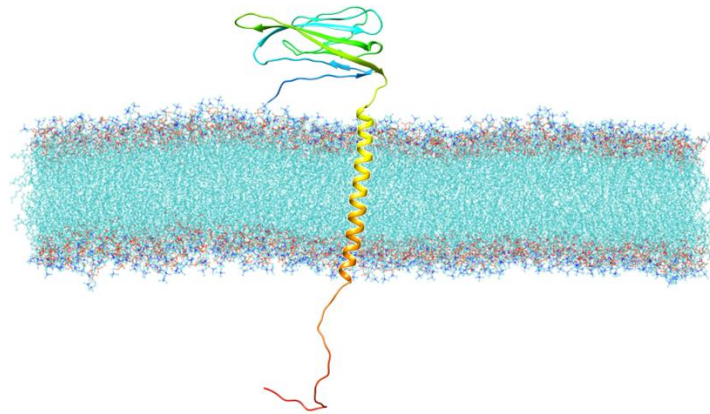
Las subunidades  $\beta$  son proteínas que se unen a los canales de sodio permitiendo que haya modificaciones en su cinética<sup>53,54</sup> y proporcionando estabilidad al canal.<sup>20,55</sup> Estas proteínas también se encuentran clasificadas dentro de las moléculas de adhesión celular (CAM's),<sup>56,57</sup> la clasificación de estas proteínas ha sido gracias a su localización y en los genes que ha sido encontrado (véase **Tabla 3**):<sup>53,58,59</sup>

**Tabla 3.** Clasificación y localización de las subunidades  $\beta$  en el cuerpo humano.<sup>53</sup>

Proteína	Gen	Localización en el cuerpo humano	Enfermedad relacionada
$\beta 1$	SCN1B	Sistema Nervioso Central (SNC), Corazón, Sistema Nervioso Periférico (SNP), Musculo Esquelético	Epilepsia, Arritmia Cardíaca, Cáncer
$\beta 1A/B$	SCN1B	Glándula Suprarrenal, SNC, SNP, Musculo esquelético	Epilepsia
$\beta 2$	SCN2B	SNC, Corazón, SNP	Respuesta alterada del dolor, convulsiones
$\beta 3$	SCN3B	Glándula suprarrenal, SNC, Riñon, SNP	Cáncer
$\beta 4$	SCN4B	SNC, Corazón, SNP, Músculo Esquelético	Enfermedad de Huntington

### 2.3.1 SUBUNIDAD $\beta$ 3

Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) al ser cruciales en la generación del potencial de acción en células excitables como las neuronas y las células musculares, su función se ve modificada por las subunidades  $\beta$ . Estas subunidades  $\beta$  desempeñan un papel en la modulación de la función de los canales (apertura-cierre),<sup>60-62</sup> pero no están directamente involucradas en la formación del poro del canal. La estructura de estas proteínas está conformada por un dominio N-terminal extracelular, un dominio *Ig-like* extracelular, un segmento transmembranal y un dominio C-terminal intracelular<sup>50,63</sup> (véase **Figura 3**). En el dominio *Ig-like* cuenta con asas que presentan las mayores variaciones en los aminoácidos cuando se compara con las secuencias de otras subunidades  $\beta$ , a estos sitios de unión se les denominan “CDR” o “regiones determinantes de complementariedad”,<sup>57</sup> que son las responsables de interactuar con antígenos, y en este caso con el canal de sodio.



**Figura 3.** Representación estructural de la subunidad  $\beta$ 3. Ésta se encuentra conformada por un dominio N-terminal e *Ig-like* extracelular, una hélice transmembranal y un dominio C-terminal intracelular.

La subunidad  $\beta$ 3 al unirse con los canales de sodio genera cambios en las funciones del canal, como:

1. Modulación de la activación e inactivación del canal de sodio.

La subunidad  $\beta 3$  afecta la velocidad de apertura (cinética de activación) de los canales de sodio, haciendo que cambie la rapidez con la que el canal se abre y cierra en respuesta a los cambios en el potencial de membrana. Esto genera un cambio en la forma en que se genera el potencial de acción y la rapidez con la que la célula se recupera.<sup>50,58,63</sup>

## 2. Orientación a la membrana.

La subunidad  $\beta 3$  puede ayudar a dirigir el canal a áreas específicas en la membrana celular debido a que la subunidad  $\beta 3$  puede modificar las glicosilaciones que se colocan en la subunidad  $\alpha$ ; y así, influir en dónde se inician los potenciales de acción o cómo se transmiten las señales.<sup>50,58</sup>

## 3. Conductancia.

En este caso, si bien la subunidad  $\beta 3$  no interacciona directamente en el poro (por donde pasan los iones), puede influir en la conductancia general del canal, es decir, en la velocidad con la que pasan los iones de  $\text{Na}^+$  a través del canal cuando está abierto.<sup>50,58</sup>

## 4. Relevancia clínica.

Las mutaciones en los genes que codifican las subunidades  $\beta$  de los canales de sodio (incluida la  $\beta 3$ ) pueden provocar diversas enfermedades, incluidos trastornos neurológicos y arritmias cardíacas (véase **Tabla 4**). El papel de la subunidad  $\beta 3$  en la modulación de la función del canal la convierte en un foco importante para la investigación relacionada con la epilepsia,<sup>64</sup> el dolor crónico y las enfermedades cardíacas.<sup>58</sup>

**Tabla 4.** Mutaciones que presenta la subunidad  $\beta 3$  y que promueve la presencia de afecciones.

Mutación	Posición	Enfermedad	Referencia
R -> K	6	Fibrilación Auricular	61
L -> P	10	Síndrome de Brugada, Fibrilación Auricular	61,65 65
A -> V	130	Fibrilación Auricular	60,61
M->T	161	Fibrilación Auricular	61

### **2.3.2 INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\beta$ 3 CON OTRAS PROTEÍNAS**

Los canales de sodio dependientes de voltaje se componen de múltiples subunidades, incluida una sola subunidad  $\alpha$  y una o varias subunidades  $\beta$  (como  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). La subunidad  $\beta$ 3 interactúa con la subunidad  $\alpha$  para estabilizar el canal y también puede influir en la respuesta del canal a otros factores como la temperatura, el pH<sup>23</sup> o los agentes farmacológicos; así mismo, participa en las vías de señalización celular que regulan la actividad del canal. Por ejemplo, en algunos tejidos, la subunidad  $\beta$ 3 participa en los mecanismos de señalización intracelular que afectan la forma en que el canal responde a los estímulos.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el descubrimiento de los fenómenos sobre la conducción nerviosa que se llevan a cabo en el axón gigante de calamar mediante los investigadores Hodgkin y Huxley en 1952,<sup>1</sup> hasta su clasificación e identificación como canales de iónicos, los canales de sodio dependientes de voltaje se han relacionado con los procesos de generación y propagación del potencial de acción en células que se pueden excitar. Estos canales conformados por una subunidad alfa, que es la responsable de la formación del poro y que a través del tiempo están presentando cambios estructurales que se denominan “estados abierto, inactivado y cerrado”, conociéndole a estas transformaciones como cinética del canal; permiten que los iones sodio puedan pasar desde la parte extracelular a la parte intracelular.<sup>47,49,66</sup> Esta propiedad de el paso de iones que también se le denomina “permeación” se puede ver modificada por proteínas auxiliares conocidas como subunidades  $\beta$ .<sup>49</sup> Estas proteínas además de modificar la cinética del canal también están relacionadas con la expresión del canal de sodio y localización.<sup>50</sup>

El hNav1.7 se encuentra codificado en el gen SCN9A y se encuentra expresado mayoritariamente en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal y fibras simpáticas. Dentro del funcionamiento de estos canales, se relaciona con la iniciación del potencial de acción en respuesta a estímulos nociceptivos y convirtiendo a este canal de sodio en un sitio clave para el estudio del dolor. Cambios en los aminoácidos en este canal se asocian a la aparición de afecciones relacionados con el dolor o con insensibilidad al dolor.<sup>26,42</sup>

Las subunidades  $\beta$  que van desde  $\beta 1$  a  $\beta 4$ , se encuentran codificadas en los genes SCN1B-SCN4B. Estas proteínas son auxiliares o accesorias que se pueden unir de forma covalente o solo por acercamiento a la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio. Esta unión permite que se modulen funciones del canal que van desde: el fenómeno de apertura y cierre, hasta el movimiento del canal para expresarse en la membrana.<sup>20,48,50</sup>

Directamente la subunidad  $\beta 3$  se encuentra en zonas muchísimo más específicas dentro del sistema nervioso. El papel que desempeña se encuentra muy poco estudiado y aunque hay evidencia cristalográfica de que puede formar heterodímeros con otras subunidades  $\beta$  al unirse con la subunidad  $\alpha$ , de manera concreta puede afectar la función y expresión en canales como el Nav1.5.<sup>62</sup>

Así, a pesar de conocer el papel de las subunidades  $\beta$  en la modulación de los canales de sodio. El efecto o cambio estructural que genera la subunidad  $\beta 3$  sobre la funcionalidad del canal  $hNa_v1.7$  sigue sin conocerse, ya que podría estar generando una modificación en la sensibilidad al voltaje necesario para que se realice la excitación de la membrana celular, afectando los procesos en la sensación del dolor.<sup>50,63</sup>

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los canales iónicos  $\text{Na}_v$  son vitales en diferentes procesos biológicos, como la comunicación celular, la secreción, la contracción del tejido muscular y la homeostasis. Su disfunción provoca un gran número de enfermedades que incluyen arritmias cardíacas, epilepsia, dolor neuropático e inflamatorio, parálisis periódica, migraña y cáncer. La elucidación del mecanismo de acción y sitio de unión de la subunidad  $\beta_3$  a los canales de sodio dependientes de voltaje  $\text{hNa}_v1.7$  precisa de la combinación de métodos: i) *in silico* mediante la generación de modelos moleculares, simulaciones de acoplamiento molecular y dinámica molecular; ii) *in vitro* al realizar de registros electrofisiológicos y mutaciones sitio dirigidas; iii) y cristalográficos en la producción de un cristal que muestre el complejo conformado entre ambas subunidades.

## **5. HIPÓTESIS**

1. La subunidad  $\beta 3$  se une al DIII del  $hNa_v1.7$  mediante interacciones electrostáticas
2. La posición que toma la subunidad  $\beta 3$  al unirse con el  $hNa_v1.7$  genera cambios en el proceso de activación del canal.
3. La subunidad  $\beta 3$  al interactuar con la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$ , genera un cambio en la velocidad de paso a través del canal.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Elucidar el sitio de unión entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 3$  del canal de sodio dependiente del voltaje de humano 1.7 (hNav1.7), mediante el uso de herramientas bioinformáticas y a través del modelado 3D.

### **6.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Generar mediante modelado por homología la isoforma del canal de sodio dependiente de voltaje hNav1.7 y subunidades beta cuya estructura tridimensional no se conoce.
- b) Identificar los residuos aminoacídicos y motivos que permiten dicha interacción entre Nav1.7 y  $\beta 3$ .
- c) Realizar el acoplamiento molecular para de la interacción molecular entre proteína y proteína (aquí llamado “interacción proteína - proteína”, PPI por sus siglas en inglés).
- d) Generar sistema/s para ejecutar simulaciones de dinámica molecular para las interacciones entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 3$  del hNav1.7.
- e) Generar un modelo de predicción de la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 3$  del hNav1.7.
- f) Evaluar los modelos generados. Al encontrar que los resultados del presente estudio computacional coinciden o son similares o comparables se consideran como validación de los modelos generados por bibliografía nueva.

## 7. MARCO TEÓRICO

### 7.1 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

Para comenzar se deben de conocer los conceptos de analogía y homología.

El alineamiento múltiple de secuencias es una metodología que permite realizar la comparación de dos o varias secuencias biológicas (proteínas, genes o ARN) para conocer el porcentaje de similitud y diferencias entre ellas. Esto se realiza con el objetivo de poder inferir la estructura tridimensional de una proteína, la función que puede presentar y la evolución que ha tenido a través del tiempo.<sup>67-70</sup>

Para poder realizar el alineamiento múltiple de secuencias es necesario el obtener las secuencias desde bases de datos confiables como “uniprot” en el caso de proteínas. En estas bases de datos se debe poner atención a las secuencias que se encuentren “curadas”; estas estructuras ya fueron revisadas por especialistas permitiendo tener la confianza al usarlas.

Las secuencias de aminoácidos se deben encontrar en formato FASTA, este formato contiene características como las que se muestran en la **Figura 4**. Estas secuencias deben de tener el primer identificador “>” denominado “signo de intercalación”, seguido de un identificador de secuencias “SeqID” que debe de ser único para la secuencia, el nombre que permite identificar a la secuencia que se va a usar; y por último, la secuencia propiamente dicha debe de contener 60 caracteres por renglón sin espacios. Estos archivos se guardan en formato .txt, .fasta, .fna, o .faa.

```
>sp|Q15858|SCN9A_HUMAN Sodium channel protein type 9 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606
GN=SCN9A PE=1 SV=3
MAMLPPPGPQSFVHFTKQSLALIEQRIAERKSKEPKKEEKDDDEEAPKPSSDLEAGKQLP
FIYGDIPPGMVSEPLELDPYYADKKTIFVLNKGKTIFRFNATPALYMLSPFSPLRRISI
KILVHSLFSMLIMCTILTNCIFMTMNNPPDWTKNVEYFTFTGIYTFESLVKILARGFCVGE
```

**Figura 4.** Características que debe tener el archivo en formato FASTA para utilizarse al hacer esta metodología. Se muestra el signo de intercalación en color verde claro, el identificador SeqID en color azul claro, nombre identificador en rosa y los primeros tres renglones de la secuencia del hNav1.7 que tiene 60 caracteres por renglón en color amarillo.

Dentro de los algoritmos que se utilizan para poder realizar el alineamiento múltiple de secuencias, se encuentran:

Algoritmo BLAST:<sup>71,72</sup> es un algoritmo de búsqueda local básico que considera secuencias iniciadoras de alineamiento conformada por tres aminoácidos que se va a conocer como *query words*. Al conocer las *query words* se les proporciona un valor denominado “*threshold score*” debido a que se hacen comparaciones entre éstas con la secuencia de referencia. La comparación se realiza mediante matrices que son conocidas como matrices de sustitución de bloques “*blossom*” que llegan a comparar los aminoácidos con parte de sus características fisicoquímicas en diferentes porcentajes.<sup>62,85,90</sup> A mayor porcentaje *blossom* se hace un alineamiento más exhaustivo. Este tipo de alineamiento se puede realizar en los programas libres Clustal W y Chimera.<sup>25,67</sup> Al realizar el alineamiento, BLAST evalúa el emparejamiento y los posibles huecos o zonas que no se alinearon (denominadas GAP).<sup>73,74</sup> La ecuación (1) muestra la manera de obtener el valor del alineamiento generado, se usan las características fisicoquímicas de los aminoácidos “*i*” y “*j*”, el tamaño de aperturas o zonas en donde no se alinean denominado “GAP” y el número total de los pares de aminoácidos alineados:

$$\text{Puntuación } (S) = \sum_{i=1}^N M(i,j) + \sum_{i=1}^{N-1} G \quad (1)$$

donde:

- $M(i,j)$ : es la puntuación de la matriz de sustitución de aminoácidos  $i$  y  $j$  en las secuencias alineadas.
- $G$ : apertura o tamaño del GAP
- $N$ : número total de pares de residuos alineados

El alineamiento BLAST tiene las siguientes características:<sup>75</sup>

- a) Es simple y rápido, y muy común en el área de bioinformática
- b) Es útil para comparar secuencias substancialmente diferentes, de diferente longitud
- c) Es útil para alineamientos múltiples en grandes bases de datos
- d) Optimiza una medida de similitud local con significado estadístico
- e) Busca subsecuencias relativamente conservadas

- f) Da un rango o valor al alineamiento

Algoritmo *Needleman-Wunsch*:<sup>73,75</sup> Permite encontrar el mejor alineamiento global entre 2 secuencias con el menor número de mutaciones. La base o matriz que se genera permite hacer mejores emparejamientos entre los aminoácidos alineados.

El algoritmo *Needleman-Wunsch* tiene las siguientes características:

- a) Es útil para comparar dos secuencias de aminoácidos de longitudes similares, con alto grado de similitud.
- b) Involucra programación dinámica e iterativa
- c) Puede considerar similitud de estructuras secundarias (cuando está presente una secuencia tridimensional disponible).
- d) Difícil de evaluar estadísticamente
- e) Impráctico para bases de datos grandes

El proceso general para realizar un alineamiento múltiple es el siguiente:

1. Entrada de Secuencias: Se introducen una o varias secuencias (proteína o ácidos nucleicos) en el programa a utilizar.
2. Construcción de la Matriz de Distancia: Se calculan similitudes entre cada par de secuencias, generando una matriz de distancias que reflejan las similitudes o diferencias son las secuencias entre sí.
3. Algoritmo de Alineamiento: Dependiendo del algoritmo, se utiliza una técnica para alinear las secuencias y formar un alineamiento final.
4. Ajuste Iterativo: El alineamiento puede ser refinado, mejorado en base a la calidad y precisión a medida que se avanza.
5. Salida del Alineamiento: El resultado es un alineamiento visual que muestra las secuencias alineadas, con las posiciones conservadas y las diferencias señaladas

Una de las mayores limitaciones de los algoritmos es el valor de alineamiento que arroja debido que no toman en cuenta las similitudes estructurales o similitudes de la función de la proteína.

## 7.2 MODELADO POR HOMOLOGÍA

El modelado por homología es una metodología utilizada para generar la estructura tridimensional de una proteína de interés mediante la comparación con una o más estructuras de proteínas homólogas y cuya estructura de las proteínas homólogas se conoce y que serán conocidas como plantillas *template*. Este proceso implica realizar un alineamiento múltiple de secuencias y la transferencia de la información estructural desde la proteína homóloga (cristalizada) a la proteína sin estructura 3D.

### 7.2.1 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

El modelo se genera utilizando una estructura como plantilla (*template*). Para cada residuo alineado de la proteína objetivo, se asigna su correspondiente estructura a partir de la plantilla. Este paso es fundamental para que se mantengan de las interacciones estructurales entre los residuos alineados.

Transformación de la estructura tridimensional: Dado un residuo  $i$  en la proteína objetivo, su coordenada  $P_i$  en la estructura 3D se calcula usando las coordenadas  $C_j$  del residuo correspondiente en la plantilla. Esto se puede hacer mediante transformaciones rígidas (rotaciones y traslaciones) que aseguren que las interacciones entre los residuos sean lo más similares posible.<sup>76,77</sup>

Ecuación de la rotación y traslación (2):

$$P_i = RC_j + T \quad (2)$$

donde:

- $P_i$  es la coordenada tridimensional del residuo en la proteína objetivo.
- $C_j$  es la coordenada tridimensional del residuo correspondiente en la plantilla.
- $R$  es la matriz de rotación que transforma la orientación.
- $T$  es el vector de traslación que ajusta la posición.

## 7.2.2 REFINAMIENTO DEL MODELO

Después de la generación del modelo inicial, se puede realizar un refinamiento para mejorar la calidad estructural. El refinamiento generalmente consta de una optimización de la energía para minimizar los contactos (*clashes*) debido a los impedimentos estéricos.

Optimización de energía: El modelo se ajusta mediante minimizaciones energéticas, donde la energía total de la estructura se calcula como la suma de varios términos, como la energía de van der Waals, la energía electrostática, la energía que proviene de los puentes de hidrógeno y la energía de solvatación.<sup>76-78</sup>

Función de energía total (3):

$$E_{Total} = E_{VdW} + E_{elec} + E_{H-bond} + E_{solv} \quad (3)$$

donde:

- $E_{vdW}$  es la energía de van der Waals.
- $E_{elec}$  es la energía electrostática.
- $E_{H-bond}$  es la energía de enlaces de hidrógeno.
- $E_{solv}$  es la energía de solvatación.

## 7.2.3 EVALUACIÓN DEL MODELO 3D

Después de obtener el modelo 3D, se realiza una evaluación utilizando herramientas de validación estructural como un cuadro de Ramachandran para evaluar la geometría de los ángulos de torsión y la calidad general de la estructura; esto se hace para evaluar si la minimización energética que se realizó previamente permite disminuir las tensiones de los enlaces en los aminoácidos.<sup>76-81</sup>

Programas que permiten realizar modelos tridimensionales con una validación interna son:

1. MODELLER<sup>76,77</sup> es un programa libre y se puede usar mediante línea de comandos o en una interfaz gráfica.
2. SWISS-MODEL<sup>79,80</sup> es un programa libre pero solo se puede ejecutar en línea.

3. Rosetta<sup>81</sup> es un programa libre pero muchas de sus herramientas se necesitan pagar para poder tener acceso.

### **7.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (*DOCKING*)**

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es una técnica bioinformática utilizada para predecir la interacción entre dos moléculas, entre un receptor que comúnmente es una proteína y un ligando que puede ser: i) una proteína, ii) un ácido nucleico; o iii) estructura química pequeña. De forma concreta, en el *docking* proteína-proteína permite conocer la manera en la que dos proteínas se unen para formar un complejo estable, y conocer: a) los aminoácidos que están en la interfaz de interacción, b) la manera de unión y c) la orientación que toman ambas proteínas al interactuar. Esto se realiza mediante la minimización de la energía libre del sistema.<sup>82,83</sup>

#### **7.3.1 EL ALGORITMO CLÁSICO PARA REALIZAR UN *DOCKING***

El proceso de *docking* molecular se realiza mediante los siguientes pasos:

##### 1) Preparación de las estructuras 3D:

La preparación de las moléculas para realizar el *docking* pueden presentarse dos casos: i) la proteína proviene de modelado por homología y ii) la proteína proviene desde una estructura cristalizada; el abordaje en cada uno de los casos es diferente. En el caso de que provengan de modelado por homología, la proteína debe de estar minimizada energéticamente para asegurar que la interacción es lo más cercano a la realidad. En caso de que la procedencia de la proteína sea de un cristal, la preparación inicia con la eliminación de moléculas de agua, la adición de átomos de hidrógeno (polares o totales) y la optimización de la estructura cuando se realiza un acoplamiento flexible.

##### 2) El sitio de unión:

Para que el *docking* sea exitoso es necesario conocer los posibles sitios activos en los que el ligando se podrá unir. En el caso de *docking* proteína-proteína los sitios de unión son grandes

regiones que se pueden estudiar mediante iso-superficies para poder conocer las características del sitio de unión.

### 3) Generación de conformaciones

Generalmente, el *docking* entre proteína-proteína permite que se generen las rotaciones de los aminoácidos para poder encontrar la mejor posición, denominándose *docking* flexible. HDOCK<sup>84</sup> y HADDOCK 2.4<sup>85</sup> permiten realizar este tipo de *docking*, HDOCK en la interfaz de usuario lo hace de manera automática sin darte la oportunidad de hacer un *docking* rígido; por otro lado, HADDOCK 2.4 te da la opción para hacer tanto un cálculo rígido, como uno flexible. En el caso de moléculas pequeñas AutoDock 4.2<sup>82</sup> y AutoDock VINA<sup>83</sup> permiten generar *docking* flexible siempre y cuando se seleccionen los enlaces que se van a poder rotar. En el caso de las proteínas, como todas las moléculas biológicas son flexibles. Esto significa que tanto el ligando y el receptor pueden cambiar su forma para ajustarse mejor. Este proceso de flexibilidad se modela mediante la rotación de los átomos haciéndose flexible debido a los enlaces que estos presentan.

- La flexibilidad se modela mediante la rotación de los enlaces entre los átomos, permitiendo diferentes conformaciones posibles.
- El espacio de conformaciones puede ser muy grande, por lo que se emplean métodos de búsqueda (como Monte Carlo, algoritmos evolutivos, o métodos de optimización) para explorar diferentes posibilidades.

### 7.3.2 CÁLCULO DE LAS ENERGÍAS DE INTERACCIÓN

Una parte clave del *docking* molecular es la evaluación de la energía de interacción entre las dos proteínas. La determinación de la posición, orientación y los aminoácidos que hacen la interacción más estable permite conocer la energía de interacción. La energía total (4) de interacción se puede expresar como la suma de diferentes términos:<sup>82,85</sup>

$$E_{total} = E_{desolvacion} + E_{estatica} + E_{flexibilidad} + E_{solvente} \quad (4)$$

- Energía de desolvatación: Representa la energía asociada con la eliminación de moléculas de agua de los sitios de interacción.
- Energía estática: Esta energía se refiere a las interacciones electrostáticas entre las moléculas, como las fuerzas de van der Waals, las interacciones de hidrógeno y las interacciones dipolo-dipolo.
- Energía de flexibilidad: Representa la energía asociada con los cambios conformacionales en las proteínas, modelando cómo las proteínas ajustan sus estructuras durante el acoplamiento.
- Energía de solvente: Calcula la interacción de las proteínas con el medio circundante (usualmente agua). Es importante para modelar la estabilidad en un entorno acuoso.

### 7.3.3 ALGORITMOS DE BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN

Los algoritmos que existen en el *docking* permiten buscar de manera eficiente en el espacio conformacional para encontrar la configuración más favorable. Los algoritmos más comunes son:<sup>86</sup>

- Monte Carlo (MC): Un algoritmo probabilístico que explora las configuraciones al azar y acepta o rechaza movimientos con base en la energía del sistema.<sup>86</sup>
- Algoritmos evolutivos: Utilizan una población de soluciones (conformaciones) que evolucionan mediante mutaciones, cruces y selecciones para mejorar las soluciones.
- Búsqueda de gradiente descendente: Un método que explora las configuraciones cercanas a la solución óptima de manera más dirigida.
- Búsqueda en espacio de 3D: Algunos métodos de docking utilizan transformaciones geométricas (rotaciones y traslaciones) para explorar cómo una proteína puede orientarse y ubicarse en diferentes posiciones respecto a la otra.

### 7.3.4 EVALUACIÓN PARA LA POSICIÓN ÓPTIMA

El resultado final del *docking* es una lista de posibles complejos proteína-proteína, clasificados según su energía de interacción. El algoritmo selecciona la configuración con la

energía total más baja, la cual se considera la conformación más estable y, por lo tanto, la predicción de cómo las proteínas se unirán en la realidad.

El resultado de acoplamiento molecular *docking* se realiza mediante la obtención de las siguientes energías:

**A) Energía de interacción entre átomos  $i$  y  $j$  (típicamente empleada para proteínas)**

**(5):**

$$E_{ij} = \frac{C}{r_{ij}^n} \quad (5)$$

donde  $C$  es una constante de fuerza de interacción,  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ , y  $n$  es un exponente que depende del tipo de interacción (por ejemplo, van der Waals o electrostática).

**B) Energía de interacción electrostática (6):**

$$E_{electrostatica} = \sum_{i,j} q_i q_j r_{ij} \epsilon \quad (6)$$

donde  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas de los átomos  $i$  y  $j$ ,  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos, y  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio.

### **7.3.5 HERRAMIENTAS PARA HACER *DOCKING***

Existen varias herramientas software populares que implementan docking molecular, algunas de las más conocidas son:

1. AutoDock: Un software que utiliza el método de Monte Carlo y algoritmos de búsqueda de gradiente para explorar el espacio conformacional y calcular las interacciones de las proteínas.<sup>82,83</sup>
2. HADDOCK: Un software basado en la información conocida de residuos que interactúan y utiliza simulaciones de dinámica molecular.<sup>85</sup>
3. ZDOCK: Un método de acoplamiento basado en FFT (siglas en inglés de *Fast Fourier Transform*) para realizar docking de proteínas.<sup>87</sup>

## 7.4 DINÁMICA MOLECULAR

En dinámica molecular (MD), el objetivo es simular el comportamiento temporal de un sistema de átomos y/o moléculas que en conjunto generan un sistema; realizándose bajo las leyes de la física clásica, generalmente utilizando las ecuaciones de movimiento de Newton. El procedimiento para obtener trayectorias en dinámica molecular implica calcular cómo cambian las posiciones y velocidades de las partículas a lo largo del tiempo en función de las interacciones interatómicas.<sup>88-90</sup>

### 7.4.1 MATEMÁTICAS DE LA DINÁMICA MOLECULAR

El proceso de simulación para la generación de una trayectoria en dinámica molecular implica varios pasos, desde la formulación de las ecuaciones de movimiento hasta la integración numérica para obtener las posiciones y velocidades de las partículas a lo largo del tiempo.

#### A) Ecuaciones del Movimiento de Newton

La base de la dinámica molecular es la segunda ley de Newton, que describe cómo cambian las posiciones de las partículas en función de las fuerzas que actúan sobre ellas. La ecuación general para una partícula  $i$  es (7):

$$F_i = m_i a_i \quad (7)$$

donde:

- $F_i$  es la fuerza que actúa sobre el átomo  $i$ ,

- $m_i$  es la masa de la partícula  $i$ ,
- $a_i$  es la aceleración de la partícula  $i$  (8), que se puede expresar como la derivada de la velocidad con respecto al tiempo:

$$a_i = \frac{dv_i}{dt} \quad (8)$$

- donde  $v_i$  es la velocidad de la partícula.

Las fuerzas  $F_i$  son generalmente derivadas de una función potencial  $V$  que describe las interacciones entre las partículas del sistema. Por ejemplo, para un sistema de partículas que están interactuando, la fuerza sobre una partícula  $i$  (9) se obtiene como el gradiente negativo del potencial total con respecto a las coordenadas espaciales:

$$F_i = -\nabla_i V(\{r_j\}) \quad (9)$$

donde  $r_j$  es el conjunto de las posiciones de todas las partículas.

## B) Interacciones entre partículas

El potencial  $V$  describe las interacciones entre las partículas dentro de un sistema. Un ejemplo típico es el potencial de Lennard-Jones para interacciones entre átomos no ligados (10):

$$V_{ij}(r) = 4\epsilon \left[ \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \right] \quad (10)$$

donde:

- $\epsilon$  es la profundidad del pozo de potencial (mide la intensidad de la interacción),
- $\sigma$  es la distancia a la que el potencial es cero (radio de corte),
- $r$  es la distancia entre las dos partículas que interactúan.

El potencial electrostático también es fundamental en muchas simulaciones, y está generado por la ley de Coulomb (11):

$$V_{electrostático}(r) = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (11)$$

donde:

- $q_1$  y  $q_2$  son las cargas de las partículas 1 y 2,
- $r$  es la distancia entre las dos partículas,
- $\epsilon_0$  es la constante de permitividad en el vacío.

## 7.4.2 INTEGRACIÓN DE LAS ECUACIONES DE MOVIMIENTO

Para obtener las trayectorias, es necesario resolver las ecuaciones de movimiento para de las partículas del sistema. Esto se hace a través de métodos numéricos de integración, ya que no se puede resolver analíticamente en la mayoría de los casos.

Uno de los métodos más comunes es el método de integración de Verlet, que es simple y eficiente para sistemas de partículas en simulaciones de dinámica molecular. El algoritmo de Verlet permite obtener las posiciones y velocidades de las partículas en cada paso de tiempo, generándose desde las posiciones de las partículas con base en las series de Taylor.

### A) Método de Integración Verlet

Desarrollando a partir de la posición y usando las series de Taylor se tiene:

$$f(t + \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^n(t)\Delta t^n}{n!} \text{ (futuro)} \quad (12)$$

$$f(t - \Delta t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^n(t)(-\Delta t)^n}{n!} \text{ (pasado)} \quad (13)$$

Desarrollando para futuro (12) se tiene (el valor en magenta vale 1) la ecuación (14):

$$\begin{aligned} f(t + \Delta t) &= \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^n(t)\Delta t^n}{n!} \\ &= \frac{f^0(t)\Delta t^0}{0!} + \frac{f^1(t)\Delta t^1}{1!} + \frac{f^2(t)\Delta t^2}{2!} + \frac{f^3(t)\Delta t^3}{3!} + \sum_{n=4}^{\infty} \frac{f^n(t)\Delta t^n}{n!} \quad (14) \end{aligned}$$

Desarrollando para pasado (13) se tiene (el valor en magenta vale 1) la ecuación (15):

$$\begin{aligned}
 f(t - \Delta t) &= \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^n(t)(-\Delta t)^n}{n!} = \\
 &= \frac{f^0(t)(-\Delta t)^0}{0!} - \frac{f^1(t)(\Delta t)^1}{1!} + \frac{f^2(t)(\Delta t)^2}{2!} - \frac{f^3(t)(\Delta t)^3}{3!} \\
 &\quad + \sum_{n=4}^{\infty} \frac{f^n(t) - \Delta t^n}{4!} \quad (15)
 \end{aligned}$$

Sumando ambas ecuaciones y por signos contrarios se eliminan algunos términos (términos en anaranjado), ecuación (16):

$$f(t - \Delta t) + f(t + \Delta t) = 2f^0(t) + \frac{f^2(t)\Delta t^2}{2!} + 2 \sum_{n=4}^{\infty} \frac{f^n(t)\Delta t^n}{4!} \quad (16)$$

Por truncamiento se elimina el término de la cuarta derivada (color azul) y despejando  $f(t + \Delta t)$  queda la ecuación (17):

$$f(t + \Delta t) = 2f^0(t) - f(t - \Delta t) + f^2(t)\Delta t^2 \quad (17)$$

El término en rojo genera las características del átomo en un instante anterior.

Retomando la ecuación (15) al realizar el truncamiento y permitiendo conocer las características del átomo en un instante anterior queda como:

$$f(t - \Delta t) = f^0(t) - f^1(t)(-\Delta t)^1 + \frac{f^2(t)(\Delta t)^2}{2!} \quad (18)$$

Al hacer cambio de variable en las ecuaciones (17) y (18) de “f” por el vector  $\vec{r}$  de posición, cambia a:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \vec{r}^2(t)\Delta t^2 \quad (17a)$$

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{r}(t)(\Delta t)^1 + \frac{\vec{r}^2(t)(\Delta t)^2}{2!} \quad (18a)$$

En las ecuaciones (17a) y (18a) permiten conocer la velocidad y aceleración; siendo estos los componentes dinámicos

Usando la ecuación (14) y despreciando desde los términos al cuadrado por ser valores muy pequeños y colocando todo en términos de la velocidad genera:

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \vec{v}(t) \quad (14b)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t) \quad (14b)$$

Y de esta manera también se conoce la aceleración de forma vectorial.

De esta manera, se genera el método de integración Verlet, Este método no requiere el cálculo explícito de las velocidades en cada paso, sino que las calcula de manera implícita a partir de las posiciones pasadas y actuales.

### 7.4.3 CÁLCULO DE TRAYECTORIA

El proceso final de una simulación implica realizar una serie de pasos temporales, en los cuales se actualizan las posiciones y velocidades de todas las partículas en función de las fuerzas calculadas en cada paso. El sistema va evolucionando a través de una secuencia de pasos de tiempo  $\Delta t$ , generando una trayectoria que describe cómo las posiciones de los átomos/moléculas cambian con el tiempo dentro de las condiciones periódicas de frontera, ya que permite que el sistema se mantenga constante.

En cada paso:

- Se calculan las fuerzas interatómicas a partir de la derivada del potencial,
- Se actualizan las posiciones de las partículas mediante la integración de las ecuaciones de movimiento,
- Se repite este proceso durante muchos pasos de tiempo para obtener la evolución completa del sistema.

#### 7.4.4 PROPIEDADES TERMODINÁMICAS

Una vez obtenidas las trayectorias, se pueden calcular varias propiedades termodinámicas, como la temperatura, presión, volumen y energía. La temperatura  $T$  (19) se calcula a partir de la energía cinética de las partículas:

$$T = \frac{2}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2 \quad (19)$$

donde:

- $N$  es el número de partículas,
- $k_B$  es la constante de Boltzmann,
- $v_i$  es la velocidad de la partícula  $i$ .

La energía potencial total se calcula evaluando el potencial total  $V$  de todas las interacciones en el sistema.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS PRIMARIAS

Se realizó una revisión de las secuencias de aminoácidos del hNav1.7, tomando las secuencias FASTA que se encuentran en la base de datos de UniProt. Para conocer si están curadas y completas, se realiza un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) en la herramienta en línea EMBL-EBI-Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/sss/fasta> y <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).<sup>68,71,72,91</sup> La revisión general de las estructuras cristalizadas que tienen código de PDB 6J8I, 7XVF y 4JPZ se realizaron en el programa Vega ZZ versión 3.2.3.<sup>92</sup>

### 8.2 MODELADO DE LA SUBUNIDAD $\alpha$

Para realizar el modelado 3D, se empleó la secuencia de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio hNav1.7, que fue obtenida de la base de datos de UniProt que tiene un código de UniProt Q15858 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15858/entry>).

El modelado por homología se realizó utilizando como andamio (*template*) a las estructuras que conforman a: i) el dominio N-terminal fue obtenido a partir del dominio N-terminal de la estructura cristalográfica que tiene como código de PDB 7XVF<sup>93</sup> que es del canal de sodio hNav1.7 en estado activado; ii) el área transmembranal y el ectodominio fue obtenido de la estructura cristalográfica que tiene como código de PDB 6J8I<sup>49</sup> que se encuentra en estado inactivado; iii) el dominio C-terminal fue generado a partir de la estructura cristalográfica que tiene como código de PDB 4JPZ;<sup>94</sup> iv) y las asas intracelulares y estructuras faltantes, fueron generadas usando la estructura generada por inteligencia artificial de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q15858>).<sup>95</sup>

Estos modelos fueron generados por partes usando el programa Modeller 9.14<sup>76,77</sup> usando como interfaz gráfica a Chimera versión 14.<sup>25</sup> Estos modelos al ser generados se unen mediante enlaces peptídicos usando el programa Pymol.<sup>96</sup>

Para comprobar la calidad de los modelos se verificaron usando el valor QMEAN, este valor se obtiene cargando el modelo 3D generado a la base de datos ExPasy QMEAN [<https://www.expasy.org/resources/qmean>].<sup>97-99</sup>

### **8.3 MODELADO DE LA SUBUNIDAD $\beta$ 3**

Para el modelado de la subunidad  $\beta$ 3, se empleó la secuencia en formato FASTA de UniProt que tiene como código Q9NY72 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NY72/entry>). Y se comparó con las diversas isoformas de la subunidad  $\beta$  para conocer su porcentaje de identidad y así generar el modelo por homología. Este análisis se realizó mediante un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) usando las secuencias en formato fasta y la herramienta en línea de EMBL-EBI Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).<sup>68,71,72,91</sup>

El modelado por homología fue generado usando el dominio N-terminal que se encuentra en la estructura cristalográfica que tiene como código de PDB 4L1D<sup>56</sup> y la zona transmembranal de la subunidad  $\beta$ 1 que se encuentra cristalizada en la estructura que tiene como código de PDB 6J8I.<sup>49</sup> Para modelar ambas partes se realizó mediante el programa Modeller 9.14<sup>76,77</sup> usando como interfaz gráfica a Chimera versión 14.<sup>25</sup> Estos modelos al ser generados se unen mediante enlaces peptídicos usando el programa Pymol.<sup>96</sup>

Para comprobar la calidad de los modelos se verificaron usando el valor QMEAN, este valor se obtiene cargando el modelo 3D generado a la base de datos ExPasy QMEAN [<https://www.expasy.org/resources/qmean>].<sup>97-99</sup>

### **8.4 REFINAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS 3D**

Para tener el modelo 3D en forma refinada y relajada estructuralmente, se tomaron ambas subunidades por separado; a cada una se le realizó un proceso de minimización energética y así los contactos entre aminoácidos fueron eliminados.

Para esto, la minimización se realizó durante 100 ps (picosegundos) bajo el campo de fuerza CHARMM36 en su versión 2021 ([http://mackerell.umaryland.edu/charmm\\_ff.shtml#gromacs](http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml#gromacs)) en el programa GROMACS en su versión 2021.4.<sup>90,100</sup> Ambas subunidades fueron colocadas cada una en un área en forma de cubo denominada “caja” a la que se agregó agua usando el modelo TIP3P; después de solvatarlo se agregó cloruro de sodio (NaCl) a una concentración 0.15 M.

Cada sistema se expuso a una temperatura de 310.15 K y se realizó una minimización energética de máximo 500,000 pasos en el que el sistema terminó de minimizarse hasta que se alcanzó una fuerza total menor a 1000 kJ/mol nm y de equilibrio NVT y NPT por 100 ps.

Posterior a la minimización, se realizó la visualización de los posibles contactos usando el programa Chimera. Esta observación se realizó mediante los siguientes pasos (*Menu > Tools > Structural Analysis > Find clashes/contacts*).<sup>25</sup> De la misma manera, se realizó la gráfica de los ángulos Psi y Phi mediante un cuadro de Ramachandran usando el programa SwissPDBViewer<sup>101,102</sup> mediante los siguientes pasos (*select > all; Wind > Ramachandran Plot*).

## **8.5 ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ Y LA SUBUNIDAD $\beta$ 3**

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) se realizó para conocer y determinar computacionalmente el sitio, forma, orientación que toma la subunidad  $\beta$ 3 al unirse/interaccionar con la subunidad  $\alpha$ . Esta metodología se llevó a cabo usando los programas de docking proteína-proteína en línea: i) HDock<sup>84,103</sup> y ii) HADDOCK<sup>85,104</sup>.

- a) Para realizar el acoplamiento molecular en HDock se necesitan ambas subunidades por separado en formato .pdb y siguiendo las características estándar de la página de internet: i) cargar al receptor, que es la subunidad  $\alpha$ ; y ii) cargar al ligando, que es la subunidad  $\beta$ 3. Y de esta manera se permite la generación de un acoplamiento ciego. El resultado se puede descargar y la página también permite su visualización. El

resultado arroja un valor de confiabilidad para que se lleve a cabo el complejo y la posición que están tomando ambas subunidades.

- b) Para ejecutar el acoplamiento en HADDOCK2.4, se necesitan ambas subunidades por separado seleccionando algunas opciones para que se lleve a cabo el acoplamiento y los pasos son: i) cargar a la proteína que se le denomina “receptor” que es la subunidad  $\alpha$ ; ii) cargar a la proteína que se le denomina “ligando” que es la subunidad  $\beta 3$ . Posterior a cargarlo, iii) se selecciona en el ligando y iv) el receptor a la posible interfaz/zona en la que podrían estar interaccionando (solo es una orientación para que el programa tenga una zona a la que le puede buscar con más exhaustividad), como máximo se seleccionan 150 aminoácidos de cada proteína.

El resultado al descargarlo arroja un valor de energía de interacción y la posición que están tomando ambas subunidades. Ambos resultados se visualizan en Chimera.

Para poder verificar los acoplamientos anteriores, se realizó un acoplamiento reverso (*Back docking*) en ambos programas en línea. a) En HDock se carga a la subunidad  $\alpha$  como receptor y a la subunidad  $\beta 1$  como ligando (estructura que se encuentra en complejo con la subunidad  $\alpha$  que tiene como código 6J8I). b) En HADDOCK2.4 se carga el receptor (subunidad  $\alpha$ ) y el ligando ( $\beta 1$ ), y se seleccionan 150 aminoácidos que se encuentran en su interfaz y se ejecuta.

De esta manera, si el programa arroja el mismo sitio y posición que tienen las proteínas recién cargadas en el cristal del cual provienen se estaría verificando que el programa si presenta capacidad para encontrar el sitio de unión entre ambas subunidades.

## 8.6 DINÁMICA MOLECULAR

Para realizar la dinámica molecular y sea un sistema representativo a la parte biológica, se realizó la generación de una membrana lipídica usando el modelo de lípido: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC por sus siglas en inglés) en la página de internet de CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>),<sup>105-107</sup> la membrana a ensamblar está conformada por 1298 cadenas de POPC, a la que se le minimiza energéticamente y se

equilibra de manera estructural conforme al NVT y NPT a una temperatura de 310.15 K para que cada cadena de POPC se relaje y se muevan de manera libre. El tiempo asignado para estos pasos de minimización y equilibramiento fueron los que la página de CHARMM-GUI nos arroja de manera automática.

Posterior a obtener la membrana equilibrada, se procede a colocar el resultado del acoplamiento (de aquí en adelante le llamaremos complejo  $\alpha/\beta$ ) en la orientación (posiciones “x”, “y” y “z”) que se encuentra reportada en la página de internet *Orientations of Proteins Membranes* (OPM);<sup>108</sup> esta posición permite asegurar que los resultados serán representativos debido a que estaremos colocando los aminoácidos en la posición idónea para que tengan las interacciones que se presentan en una membrana biológica.

Después de colocar el complejo  $\alpha/\beta$  en la posición que la página de OPM refiere, i) se procedió a procesar bajo el campo de fuerza CHARMM36 en condiciones en las que el dominio N-terminal y el C-terminal tengan carga positiva (+) y negativa (-), respectivamente; ii) se agregó una solvatación de todo el sistema bajo el tipo de agua TIP3P. Y finalmente, para tener el sistema armado, iii) se agregó una concentración de NaCl a una concentración de 0.15 M que estaría reflejando las concentraciones fisiológicas.

Como siguiente paso: se procede a bloquear el movimiento de las cadenas proteicas durante el proceso de minimización en el sistema, de esta manera se evita que los átomos que no son hidrógenos se muevan y cambien de posición. La manera de impedir el movimiento es agregar fuerzas restrictivas de 100,000 kJ/mol-nm<sup>2</sup> a los átomos pesados. Continuando con una minimización energética del sistema durante 500,000 pasos buscando que el sistema tenga una fuerza total menor a 1000 kJ/mol nm, esto evita que el sistema se despolimerice durante los equilibramientos termodinámicos.

Las últimas partes del procesamiento del Sistema constan de equilibramientos termodinámicos que tiene las siguientes características: (1) equilibramiento de tipo NVT usando el termostato modificado de *Berendsen V-rescale* con un algoritmo de restricción tipo LINCS a una temperatura de 310.15 K, esto se hace durante 500,000 pasos que da un total

de 1 ns; y (2) un equilibramiento de tipo NPT usando el baróstato de tipo *Parrinello-Rahman*, un termostato de tipo *Nose-Hoover*, una interpolación cúbica 4 (orden PME), una distancia media para las interacciones electrostáticas de 1.2 nm, una distancia media para las interacciones de corto alcance de tipo *van der Waals* de 1.2 nm, un espaciado de Fourier de 0.16, usando también el algoritmo restrictivo tipo LINCS a una temperatura de 310.15 K durante 1,500,000 pasos que equivalen a 3ns.

Se generaron varios sistemas para determinar: 1) la estabilidad del complejo  $\alpha/\beta$  en presencia y ausencia de la membrana lipídica y 2) determinar si las interacciones entre ambas proteínas se mantienen debido a la ausencia de una membrana lipídica (véase **Tabla 5**). La diferencia de temperaturas se generó debido a que en algunos campos de fuerza los lípidos de POPC a una temperatura de 323 K existe una ruptura generando una nula representación del ambiente biológico

**Tabla 5.** Sistemas generados para obtener la estabilidad e interacciones en el complejo  $\alpha/\beta$

Sistema	Temperatura (K)
Subunidad $\alpha$ completa en agua	310.15
Subunidad $\alpha$ completa en agua	323.00
Complejo $\alpha/\beta$ en agua	310.15
Complejo $\alpha/\beta$ en agua	323.00
Dominio DIII de la subunidad $\alpha$ / subunidad $\beta$ 3 en membrana lipídica	310.15
Dominio DIII de la subunidad $\alpha$ / subunidad $\beta$ 3 en membrana lipídica	323.00
Subunidad $\alpha$ completa en membrana lipídica	310.15
Subunidad $\alpha$ completa en membrana lipídica	323.00
Subunidad $\alpha$ completa / subunidad $\beta$ 3 en membrana lipídica	310.15
Subunidad $\alpha$ completa / subunidad $\beta$ 3 en membrana lipídica	323.00

## 8.7 EJECUCIÓN DEL SISTEMA COMPLETO PARA DINÁMICA MOLECULAR

Para completar el estudio y obtener la interfaz (interacción y estabilidad) del complejo  $\alpha/\beta$ , así como también el paso de iones sodio por el canal de sodio hNa<sub>v</sub>1.7, el sistema anteriormente preparado se ejecutó en el sistema GROMACS<sup>90,100</sup> en la versión 2021.4 bajo el integrador *leap-frog* resultando una dinámica que tiene 1,500,000 pasos generando 300 ns de tiempo de observación. La ejecución de la dinámica molecular se realizó en el Laboratorio Nacional de Supercomputo del Sureste de México (LNS).

La visualización del resultado de la dinámica molecular denominado “trayectorias” se observó en el programa VMD y se analizó mediante el script “*distance.tcl*” para medir las distancias entre los aminoácidos.<sup>109</sup> Las gráficas se generaron en el programa XMGrace.<sup>110</sup> Se calculó la desviación media cuadrática (RMSD por sus siglas en inglés *root-mean-square deviation*), que permite medir la estabilidad y los cambios de la proteína midiéndolo directamente de los carbonos alfa a través del tiempo<sup>111</sup>; esto se realiza a partir del comando *gmx\_rms*. Las fluctuaciones (RMSF por sus siglas en inglés *root-mean-square fluctuation*), se obtuvieron mediante *gmx\_rmsf* permitiendo conocer los cambios de los aminoácidos durante la dinámica molecular.

## 8.8 DETERMINACIÓN DE FUERZAS DE INTERACCION USANDO APBS

De los resultados de dinámica molecular (MD), se calculan las afinidades usando la herramienta base Linux de APBS (*Adaptative Poisson-Boltzmann Solver*) obtenido de <https://server.poissonboltzmann.org/>. Se obtuvieron las energías de interacción y las superficies accesibles a solvente (SAS por sus siglas en inglés).

Para calcular APBS se necesita primero pasar el archivo .pdb a .pdbqt, esto se realizó mediante: `pdb2pqr30 --ff=PARSE --ffout=PARSE --noopt --with-ph=7`, el nombre del archivo .pdb y el nombre del archivo a generar .pqr. Las opciones que se usan son: --ff=PARSE: es el campo de fuerza que se usa; --ffout=PARSE es el archivo con el formato de salida que está escrito en el campo de fuerza PARSE; --noopt: no se genera optimización de los hidrógenos que se encuentran en el aminoácido; --with-ph=7: se realiza el cálculo a pH de 7<sup>112</sup>. Después de tener las estructuras en formato .pdbqt, se necesita generar un archivo

que contenga los parámetros que van a describir a los átomos de los residuos y debe de contener: i) la especificación de las condiciones periódicas de frontera para que se pueda calcular la ecuación de Poisson-Boltzmann (pdie = 2.0); ii) Especificar el número de puntos que van a rodear el átomo/residuo por proceso (dime = 161 161 161); iii) Especificar el tamaño de la caja en la que se encuentran los átomos (cglen = 261 255 293); iv) Especificar directamente la caja para que se encuentren zonas en las que se realice el cálculo (fglen = 174 170 193); v) Especificar que se debe de resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann no lineal (npbe); vi) Especificar la constante dieléctrica para el solvente implícito (pdie = 2.0).<sup>113</sup>

## 9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 GENERACIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA SUBUNIDAD $\alpha$

Para generar el modelo 3D de la subunidad  $\alpha$  completa del hNav1.7 se realiza el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) para verificar las zonas que se van a modelar (véase **Figura 5**) de tal manera que se presentan estructuras del hNav1.7 a partir de: (1) el dominio N-terminal con la estructura 7XVF que presenta una estructura del hNav1.7 en estado desactivado con los segmentos S4 aun sin movimiento hacia la porción extracelular; (2) la zona transmembranal y el ectodominio con la estructura 6J8I se presenta el segmento DI en un estado activado y tiene los segmentos S4 del dominio DII y DIII en estado inactivado (aun sin el movimiento del segmento S4) y conociendo que las subunidades  $\beta$  actúan en el proceso de activación del canal, por eso se toma la estructura 6J8I; (3) estructuras faltantes con la estructura de AlphaFold; y (4) estructura del dominio C-terminal del canal hNav1.2 con la estructural 4JPZ. El uso de este dominio C-terminal es debido a que no se tiene la estructura cristalográfica del dominio C-terminal del hNav1.7 y por ende se toma esta estructura ya que presentan un porcentaje de identidad del 70 %.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
4JPZ|Chains ----- 0
7XVF|Chain|Sodium -----EKGGGARGGSGGGSWSHQPFEKGFYKDDDDKGTMAMLP PPGPQSFVHFTK 51
sp|Q15858|SCN9A_HUMAN -----MAMLP PPGPQSFVHFTK 17
6J8I|Chain MASWSHPQFEKGGGARGGSGGGSWSHQPFEKGFYKDDDDKGTMAMLP PPGPQSFVHFTK 60

4JPZ|Chains ----- 0
7XVF|Chain|Sodium QSLALIEQRIAERKSKEPKKEKKDDDEEAPKSSDLEAGQLFFIYGDIPPGMVSEPLED 111
sp|Q15858|SCN9A_HUMAN QSLALIEQRIAERKSKEPKKEKKDDDEEAPKSSDLEAGQLFFIYGDIPPGMVSEPLED 77
6J8I|Chain QSLALIEQRIAERKSKEPKKEKKDDDEEAPKSSDLEAGQLFFIYGDIPPGMVSEPLED 120

4JPZ|Chains ----- 0
7XVF|Chain|Sodium LDPYYADKKT FIVLNKGKTI FRFNATPALYMLSPFSP LRRISIKILVHSLF SMLIMCTIL 171
sp|Q15858|SCN9A_HUMAN LDPYYADKKT FIVLNKGKTI FRFNATPALYMLSPFSP LRRISIKILVHSLF SMLIMCTIL 137
6J8I|Chain LDPYYADKKT FIVLNKGKTI FRFNATPALYMLSPFSP LRRISIKILVHSLF SMLIMCTIL 180
```

4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	TNCIFMTMNNPPDWTKNVYFTFTGIYTFESLVKILARGFCVGEFTFLRDPWNWLDVIV	231
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	TNCIFMTMNNPPDWTKNVYFTFTGIYTFESLVKILARGFCVGEFTFLRDPWNWLDVIV	197
6J8I Chain	TNCIFMTMNNPPDWTKNVYFTFTGIYTFESLVKILARGFCVGEFTFLRDPWNWLDVIV	240
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	FAYLTFVNLGNVSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLS	291
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	FAYLTFVNLGNVSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLS	257
6J8I Chain	FAYLTFVNLGNVSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLS	300
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	VFALIGLQLFMGNLKHKCFRNSLENNETLESIMNTLESEEDFRKIFYYLEGSKDALLCGF	351
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	VFALIGLQLFMGNLKHKCFRNSLENNETLESIMNTLESEEDFRKIFYYLEGSKDALLCGF	317
6J8I Chain	VFALIGLQLFMGNLKHKCFRNSLENNETLESIMNTLESEEDFRKIFYYLEGSKDALLCGF	360
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	STDSGQCPEGYTCVKIGRNPDIYGYTSFDTFSWAFLALFRLMTQDYWENLYQQTLRAAGKT	411
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	STDSGQCPEGYTCVKIGRNPDIYGYTSFDTFSWAFLALFRLMTQDYWENLYQQTLRAAGKT	377
6J8I Chain	STDSGQCPEGYTCVKIGRNPDIYGYTSFDTFSWAFLALFRLMTQDYWENLYQQTLRAAGKT	420
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	YMIFVVIIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQANIEEAKQKELEFQQMLDRLKKEQEEA	471
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	YMIFVVIIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQANIEEAKQKELEFQQMLDRLKKEQEEA	437
6J8I Chain	YMIFVVIIFLGSFYLINLILAVVAMAYKEQNQANIEEAKQKELEFQQMLDRLKKEQEEA	480
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	EAIAAAAAEYTSIRRSRIMGLSESSSETSKLSSKSAKERRNRKKKNQKKL-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	EAIAAAAAEYTSIRRSRIMGLSESSSETSKLSSKSAKERRNRKKKNQKKLSSGEEKGDA	497
6J8I Chain	EAIAAAAAEYTSIRRSRIMGLSESSSETSKLSSKSAKERRNRKKKNQKKLSSGEEKGDA	540
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	EKLSKSESEDSIRRSFHLGVEGHRRAHEKRLSTPNQSPLSIRGSLFSARRSSRTSLFSF	557
6J8I Chain	EKLSKSESEDSIRRSFHLGVEGHRRAHEKRLSTPNQSPLSIRGSLFSARRSSRTSLFSF	600
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	KGRGRDIGSETEFADDEHSIFGDNESRRGSLFVPHRPQERRSSNISQASRSPMLPVNGK	617
6J8I Chain	KGRGRDIGSETEFADDEHSIFGDNESRRGSLFVPHRPQERRSSNISQASRSPMLPVNGK	660

4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	MHSAVDCNGVVSLVDGRSALMLPNGQLLEPEVIIDKATSDDSGTTNQHKKRRCSSYLLSE	677
6J8I Chain	MHSAVDCNGVVSLVDGRSALMLPNGQLLEPEVIIDKATSDDSGTTNQHKKRRCSSYLLSE	720
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	DMLNDPNLRQRAMSRASILTNTVVEELEESRQKCPPWWYRFAHKFLIWNCSFYWIKFKKCI	737
6J8I Chain	DMLNDPNLRQRAMSRASILTNTVVEELEESRQKCPPWWYRFAHKFLIWNCSFYWIKFKKCI	780
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	YFIVMDPFVDLAITICIVLNTLTFMAMEHHPMTEEFKNVLAIGNLVFTGIFAAEMVLKLI	797
6J8I Chain	YFIVMDPFVDLAITICIVLNTLTFMAMEHHPMTEEFKNVLAIGNLVFTGIFAAEMVLKLI	840
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	MDPYEYFQVGWNI FDSLIVTSLVLEFLADVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIK	857
6J8I Chain	MDPYEYFQVGWNI FDSLIVTSLVLEFLADVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNMLIK	900
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	IIGNSVGALGNLTLVLAIIIVFIFAVVGMQLFGKSYKECVCKINDDCTLPRWHMNDFFHSF	917
6J8I Chain	IIGNSVGALGNLTLVLAIIIVFIFAVVGMQLFGKSYKECVCKINDDCTLPRWHMNDFFHSF	960
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLIVYMMVMVIGNLVVNLFLALLLSSFSSDNLT	977
6J8I Chain	LIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLIVYMMVMVIGNLVVNLFLALLLSSFSSDNLT	1020
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	AIEEDPDANNLQI AVTRIKKGINYVKQTLREFILKAFSKKPKISREIRQAEDLNTKKENY	1037
6J8I Chain	AIEEDPDANNLQI AVTRIKKGINYVKQTLREFILKAFSKKPKISREIRQAEDLNTKKENY	1080
4JPZ Chains	-----	0

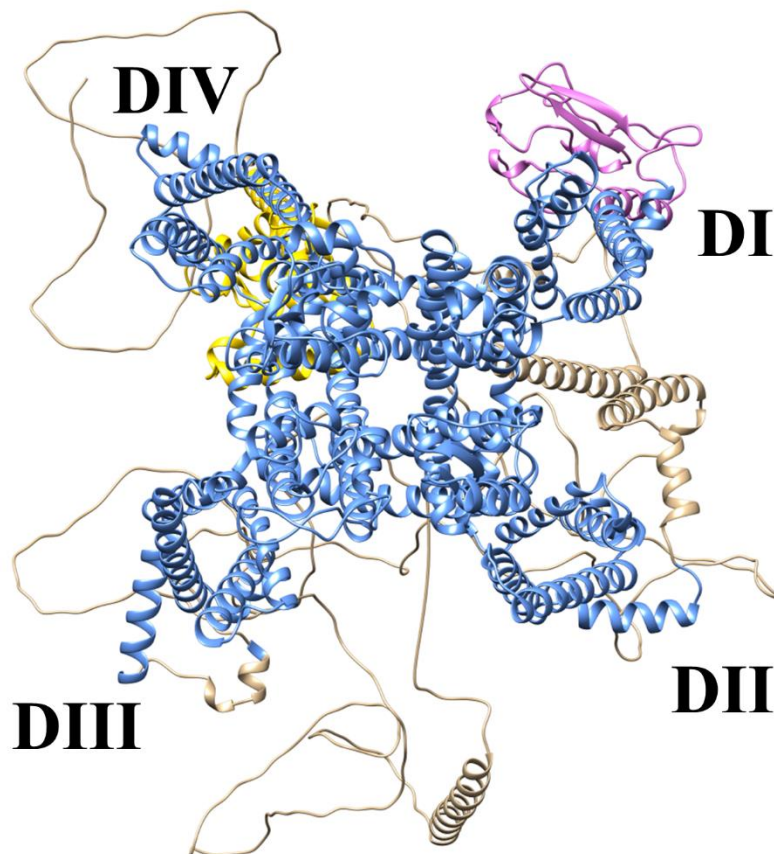
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	ISNHTLAEMSKGHNFLKEKDKISGFGSSVDKHLMEDSDGQSF IHNPSLTVTVPIAPGESD	1097
6J8I Chain	ISNHTLAEMSKGHNFLKEKDKISGFGSSVDKHLMEDSDGQSF IHNPSLTVTVPIAPGESD	1140
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	LENMNAEELSSDSDSEYSKVRNLNRSSESSECVTDNPLPGEGEEAEAPMNSDEPEACFTD	1157
6J8I Chain	LENMNAEELSSDSDSEYSKVRNLNRSSESSECVTDNPLPGEGEEAEAPMNSDEPEACFTD	1200
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	GCVWRFSCCQVNIESGKGIWWNIRKTCYKIVEHSWFESFIVLMILLSSGALAFEDIYIE	1217
6J8I Chain	GCVWRFSCCQVNIESGKGIWWNIRKTCYKIVEHSWFESFIVLMILLSSGALAFEDIYIE	1260
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	RKKTIKIILEYADKIFTYIFILEMLLKWIAYGYKTYFTNAWCWLDLFLIVDVS LVTLVANT	1277
6J8I Chain	RKKTIKIILEYADKIFTYIFILEMLLKWIAYGYKTYFTNAWCWLDLFLIVDVS LVTLVANT	1320
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	LGYSDLGPIKSLRTLRLALRPLRALS RFEGMRVVVNALIGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSI	1337
6J8I Chain	LGYSDLGPIKSLRTLRLALRPLRALS RFEGMRVVVNALIGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSI	1380
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	MGVNLFAGK FYECINTTDGSRFPASQV PNRSECFALMNVSQNVRWKNLKVNF DNVGLGYL	1397
6J8I Chain	MGVNLFAGK FYECINTTDGSRFPASQV PNRSECFALMNVSQNVRWKNLKVNF DNVGLGYL	1440
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	SLLQVATFKGWTIIMYAAVDSVNVDKQPKYEYS LMYIYFVVFIIFGSFFTLNLFIVGII	1457
6J8I Chain	SLLQVATFKGWTIIMYAAVDSVNVDKQPKYEYS LMYIYFVVFIIFGSFFTLNLFIVGII	1500
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	DNFNQKKKLGQQDIFMTEEQKKYYNAMK KLGSKKPQKPIPRPGNKIQGCIFDLVTNQAF	1517
6J8I Chain	DNFNQKKKLGQQDIFMTEEQKKYYNAMK KLGSKKPQKPIPRPGNKIQGCIFDLVTNQAF	1560

4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	DISIMVLICLNMTMMVEKEGQSQHMTVEVLYWINVVFIILFTGECVLKLIISLRHYFTVG	1577
6J8I Chain	DISIMVLICLNMTMMVEKEGQSQHMTVEVLYWINVVFIILFTGECVLKLIISLRHYFTVG	1620
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	WNIFDFVVVIISIVGMFLADLIETYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLVKGAKGIRTLFFAL	1637
6J8I Chain	WNIFDFVVVIISIVGMFLADLIETYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLVKGAKGIRTLFFAL	1680
4JPZ Chains	-----	0
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	MMSLPALFNI GLLFLVMFIYAI FGMSNFAYVKKEDGINDMFNFETFGNSMICLFQITTS	1697
6J8I Chain	MMSLPALFNI GLLFLVMFIYAI FGMSNFAYVKKEDGINDMFNFETFGNSMICLFQITTS	1740
4JPZ Chains	-----MGSSHHHHHSSGLVPRGSH	20
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	AGWDGLLAPI LNSKPPDCDPKKVHPGSSVEGDCGNPSVGIFYFVSYIIISFLVVVNMYIA	1757
6J8I Chain	AGWDGLLAPI LNSKPPDCDPKKVHPGSSVEGDCGNPSVGIFYFVSYIIISFLVVVNMYIA	1800
4JPZ Chains	MASENFSVATEESAEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFIEFAKLSDFADALDPPLLI AK	80
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	VILENFSVATEESTEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFIEFSKLSDFAAALDPPLLI AK	1817
6J8I Chain	VILENFSVATEESTEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFIEFSKLSDFAAALDPPLLI AK	1860
4JPZ Chains	PNKVQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEERFMSANPSKVS Y	140
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	PNKVQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVS Y	1877
6J8I Chain	PNKVQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDSLRSQMEERFMSANPSKVS Y	1920
4JPZ Chains	EPITTTLKRKQEEVSAIIIQRAYRRYLLKQKVKVSSIIYKKDKG-----	184
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	EPITTTLKRKQEDVSATVIQRAYRRYRLRQNVKNISSIIYIKDGRDDDLLNKKDMAFDNV	1937
6J8I Chain	EPITTTLKRKQEDVSATVIQRAYRRYRLRQNVKNISSIIYIKDGRDDDLLNKKDMAFDNV	1980

4JPZ Chains	-----	184
7XVF Chain Sodium	-----	522
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	NENSSPEKTDATSSSTTSPPSYDSVTKPKDKEKYEQDRTEKEDKGGKDSKESKK	1988
6J8I Chain	NENSSPEKTDATSSSTTSPPSYDSVTKPKDKEKYEQDRTEKEDKGGKDSKESKK	2031

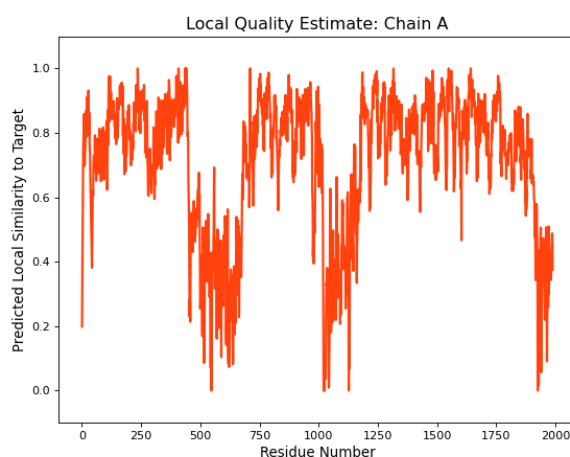
**Figura 5.** Alineamiento múltiple de secuencias (MSA) entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  obtenida de UniProt y las estructuras cristalográficas a usar para su modelado por homología.

Al ensamblar todas estas estructuras se obtiene la subunidad  $\alpha$  del hNa<sub>v</sub>1.7 (véase **Figura 6**).



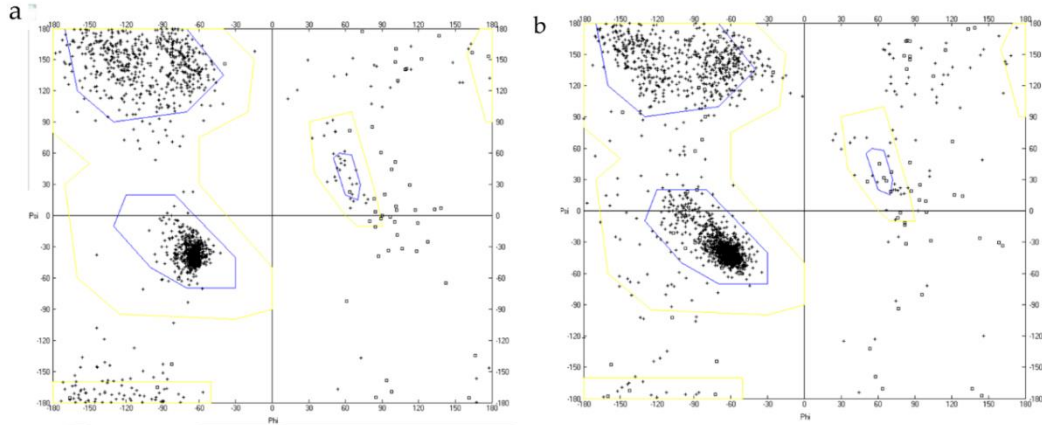
**Figura 6.** Modelo por homología 3D de la subunidad  $\alpha$  del hNa<sub>v</sub>1.7. Aquí se muestran las partes de las que se encuentra ensamblado: 1) Modelo del dominio N-terminal usando como andamio 7XVF (color *orchid*); 2) Modelo de los segmentos transmembranales y ectodominio usando como estructura de referencia a 6J8I (color *cornflower*); 3) Modelo de las estructuras y asas intracelulares usando como *template* a la estructura de *AlphaFold* (color *tan*); y 4) para el modelo del dominio C-terminal tomando como cristal a 4JPZ (color *oro*).

La verificación del modelo de la subunidad  $\alpha$  se realiza mediante el valor QMEAN que arroja la herramienta de *Expasy*, esta herramienta verifica la posición de los aminoácidos.<sup>97,98</sup> El resultado muestra que los valores que encuentra en las zonas 1) dominio N-terminal; 2) zonas transmembranales y 3) dominio C-terminal son de alta calidad ya que los valores de validación en estas zonas se encuentran entre 0.6 a 1 (siendo cero = baja calidad y 1 = alta calidad); y de forma contraria, las zonas con menor calidad son las asas intracelulares ya que presentan una gran movilidad (véase **Figura 7**).



**Figura 7.** Gráfica de validación del modelo 3D de la subunidad  $\alpha$  del canal hNav1.7 usando los valores QMEAN. Esto verifica cada posición que se encuentra en la estructura, muestra valores mayores a 0.6 en zonas como el dominio N-terminal, transmembranal y el dominio C-terminal, en zonas de asas intracelulares presenta valores menores a 0.5.

Al realizar revisión de la estructura mediante un cuadro de Ramachandran se obtiene un resultado en el que muestra que los aminoácidos se encuentran empaquetados mostrando tensión en los ángulos Phi y Psi en las zonas de las hélices (véase **Figura 8a**), debido a esto, se observa que los aminoácidos se encuentran en zonas bien definidas para  $\alpha$  hélices. Para disminuir esta tensión y buscando que se eliminen los contactos que pueden existir debido al modelado por homología en subunidad  $\alpha$ , se realiza la minimización energética permitiendo que los ángulos Phi y Psi tengan mayor libertad (véase **Figura 8b**); debido a esto, se observa mayor dispersión en las zonas conformadas por las  $\alpha$  hélices.



**Figura 8.** Cuadro de Ramachandran mostrando las posiciones que toman los ángulos Phi y Psi de la subunidad  $\alpha$  del canal hNav1.7. (a) Gráfico antes de la minimización que muestra como los aminoácidos se encuentran en zonas específicas para  $\alpha$  hélices con una corta distancia entre puntos de aminoácidos. (b) Gráfico posterior a la minimización que muestra como los aminoácidos se encuentran en zonas para la formación de  $\alpha$  hélices con una distancia mayor entre puntos de aminoácidos, esta distancia siendo el resultado de la minimización.

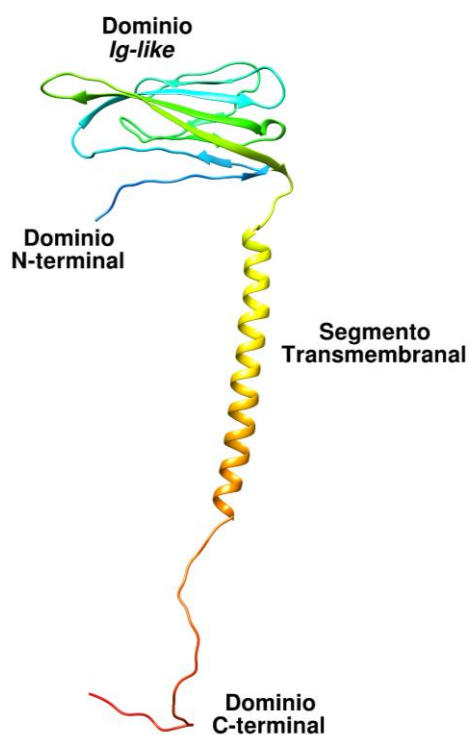
## 9.2 GENERACIÓN DEL MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA SUBUNIDAD $\beta$ 3

El modelo por homología de la subunidad  $\beta$ 3 se realiza usando al dominio extracelular “*Ig-like*” de la estructura 4L1D y el segmento transmembranal de la subunidad  $\beta$ 1 que se encuentra en complejo en la estructura cristalográfica 6J8I. Para realizar el modelo de la zona transmembranal se realiza un MSA para conocer el porcentaje de identidad de las estructuras cristalizadas al momento de iniciar este estudio, la subunidad  $\beta$ 1 es usada debido a que presenta un porcentaje de identidad del 50 % con la subunidad  $\beta$ 3, en lugar de usar las otras subunidades  $\beta$  cristalizadas (véase **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Porcentaje de identidad entre subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 3$  que provienen de distintas estructuras cristalográficas. Para esto, se agrega la subunidad  $\beta 3$  del cristal 7TJ8 que se cristalizó años después.

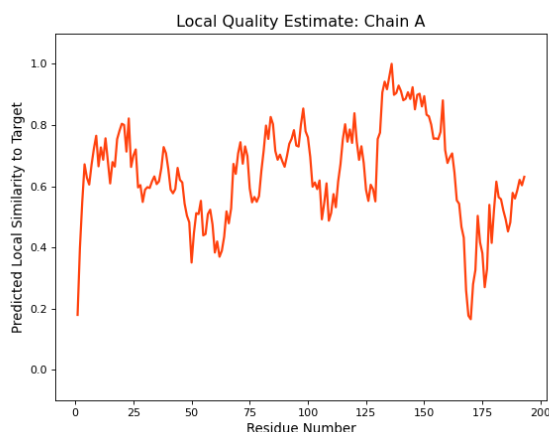
	Eel $\beta 1$ [código de PDB 5XSY]	Human $\beta 1$ [código de PDB 6J8I]	Human $\beta 2$ [código de PDB 6J8I]	Human $\beta 3$ [código de PDB 7TJ8]
Eel $\beta 1$	100	46	20	42
h $\beta 1$	46	100	21	50
h $\beta 2$	20	21	100	23
h $\beta 3$	42	50	23	100

De esta manera, al modelar y ensamblar/unir mediante un enlace peptídico al dominio N-terminal y la zona transmembranal en PyMol, genera un modelo completo de la subunidad  $\beta 3$  (véase **Figura 9**).



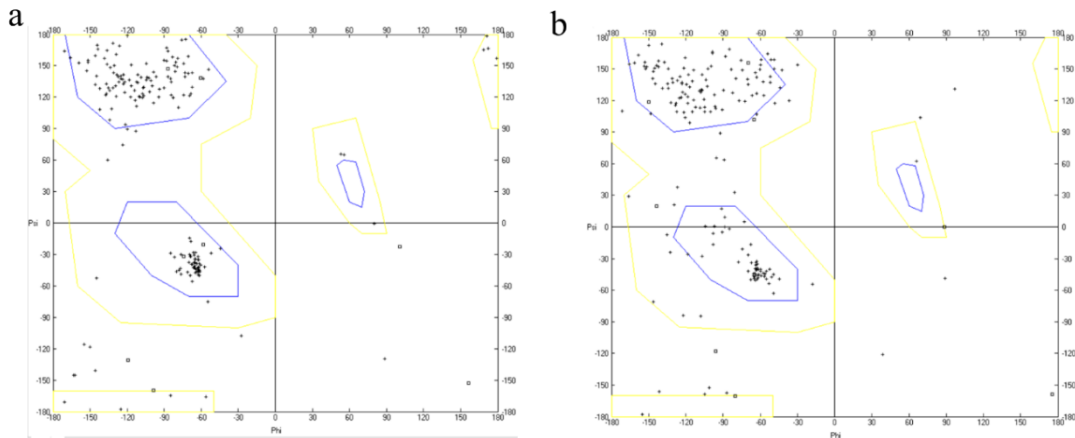
**Figura 9.** Modelo por homología de la subunidad  $\beta 3$ .

La verificación del modelo de la subunidad  $\beta 3$  se realiza mediante el valor QMEAN que arroja la herramienta de Expasy, esta herramienta verifica la posición de los aminoácidos.<sup>97,98</sup> El resultado muestra que los valores que encuentra en las zonas 1) dominio N-terminal; 2) zonas transmembranales son de alta calidad ya que los valores de validación en estas zonas se encuentran entre 0.6 a 1; y de forma contraria, las zonas con menor calidad son las asas ya que presentan una gran movilidad (véase **Figura 10**).



**Figura 10.** Gráfica de validación del modelo 3D de la subunidad  $\beta 3$  usando los valores QMEAN. Esto verifica cada posición que se encuentra en la estructura, muestra valores mayores a 0.6 en zonas como las hojas  $\beta$  del dominio N-terminal y zona transmembranal, en zonas de asas presenta valores menores a 0.5.

Al realizar revisión de la estructura de la subunidad  $\beta 3$  mediante un cuadro de Ramachandran se obtienen un resultado en el que muestra que los aminoácidos se encuentran empaquetados mostrando tensión en los ángulos Phi y Psi en las zonas de las hélices (véase **Figura 11a**), debido a esto, se observa que los aminoácidos se encuentran en zonas bien definidas para  $\alpha$  hélices. Para disminuir esta tensión y buscando que se eliminen los contactos que pueden existir debido al modelado por homología en subunidad  $\alpha$ , se realiza la minimización energética permitiendo que los ángulos Phi y Psi tengan mayor libertad (véase **Figura 11b**); debido a esto, se observa mayor dispersión en las zonas conformadas por las  $\alpha$  hélices.



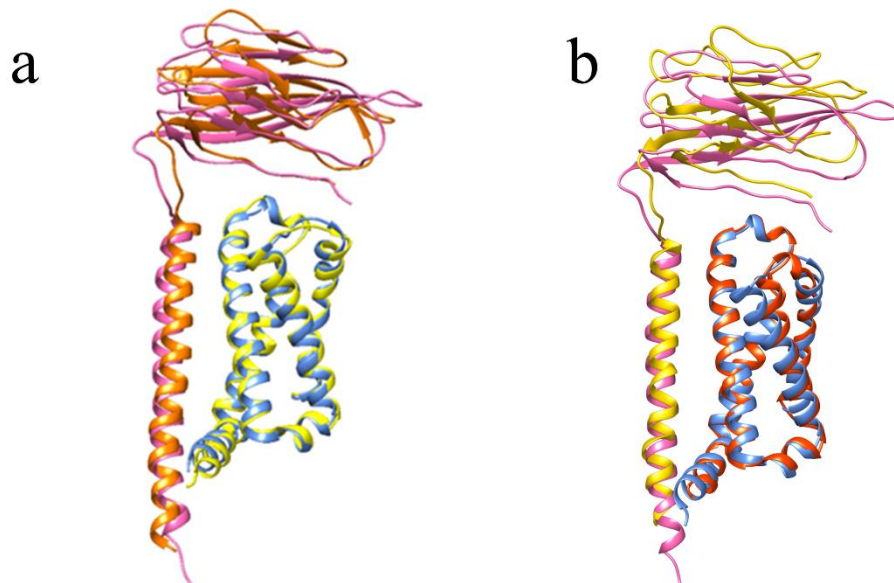
**Figura 11.** Cuadro de Ramachandran mostrando las posiciones que toman los ángulos Phi y Psi de la subunidad  $\beta 3$ . (a) Gráfico antes de la minimización que muestra como los aminoácidos se encuentran en zonas específicas para  $\alpha$  hélices con una corta distancia entre puntos de aminoácidos. (b) Gráfico posterior a la minimización que muestra como los aminoácidos se encuentran en zonas para la formación de  $\alpha$  hélices con una distancia mayor entre puntos de aminoácidos, esta distancia siendo el resultado de la minimización.

Con la llegada de la entrada 7TJ8 del PDB en 2022, fue posible validar nuestra interfaz  $\alpha/\beta 3$  predicha, ya que por primera vez se dilucidó un complejo  $\alpha/\beta 3$  mediante técnicas de criomicroscopía electrónica (EM). Su cadena marcada como A constituye una subunidad  $\alpha$ , pero no constituye nuestro canal objetivo hNa<sub>v</sub>1.7, sino una clase de canal de sodio independiente del voltaje hasta ahora desconocida, denominada NaX o Na<sub>x</sub>. Su cadena B, sin embargo, presenta la subunidad  $\beta 3$  completa de nuestro canal de sodio dependiente de voltaje, con sus dominios extracelular y transmembrana.

En 2019, la entrada 6J8I del PDB se recuperó como plantilla 3D a escala atómica, aunque aún no presentaba una coincidencia perfecta, ya que es un complejo con  $\beta 1$  y no es completamente idéntico a  $\beta 3$ , el cual se estudia aquí, concretamente el canal de sodio dependiente de voltaje humano hNa<sub>v</sub>1.7, con su PPI entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 3$ . Así, se continuó con el modelo PPI hasta 2024.

Como resultado directo, la referencia confirmó nuestro complejo  $\alpha/\beta 3$  calculado con la misma orientación y PPI entre  $\beta 3$  y DIII de la subunidad  $\alpha$  (véase **Figura 12a** y **Figura 12b**).

Finalmente, se compararon los datos estructurales entre la referencia y el objetivo (véase **Tabla 7**).



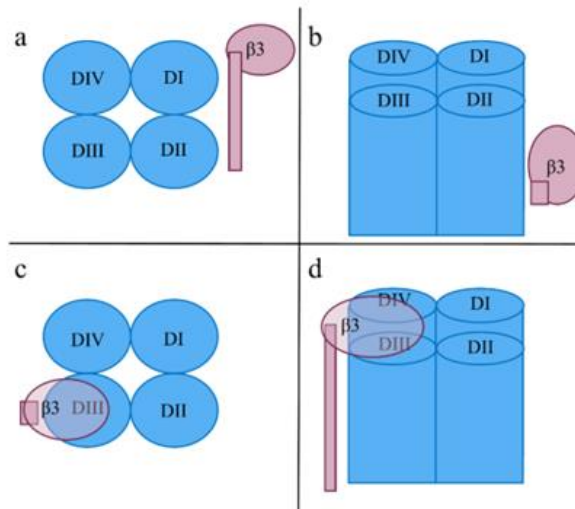
**Figura 12.** Superposiciones de los resultados con el canal  $\text{Na}_x$  y con el  $\text{Na}_v1.7$ . (a) Estructura observada experimentalmente ( $\alpha/\beta$  de  $\text{hNa}_x$ ) y modelo  $\alpha/\beta$  predicho en superposición. Código de color para las cintas de la estructura principal de la proteína: modelo  $\alpha$  azul; modelo  $\beta$  rosa;  $\alpha$  de 7TJ8 rojo anaranjado y  $\beta$  de 7TJ8 dorado. La interfaz  $\alpha/\beta$  se encuentra en el dominio DIII. (b) Estructura observada experimentalmente y modelo predicho en superposición. La alineación 3D revela que los modelos  $\beta$  y  $\beta$ 1 de PDB presentan grandes diferencias geométricas debido a sus distintas secuencias primarias. Sin embargo, la subunidad  $\alpha$  del modelo 3D predicho se ajusta mucho mejor que la  $\beta$ 3 al complejo crio-EM  $\alpha/\beta$ 1 de  $\text{hNa}_v1.7$  (entrada 6J8I de PDB), ya que ambas subunidades  $\alpha$  son idénticas. De hecho, se extrajo la subunidad  $\alpha$  de crio-EM para crear la subunidad  $\alpha$  del modelo. Código de color: modelo  $\alpha$  azul claro; modelo  $\beta$ 3 rosa;  $\alpha$  o  $\beta$ 1 de la entrada 6J8I de PDB = amarillo o naranja, respectivamente. La interfaz  $\alpha/\beta$  se encuentra en el dominio DIII.

**Tabla 7.** El RMSD de la estructura crio-EM y el modelo de predicción de sitio de unión tridimensional entre la subunidad  $\alpha$  y  $\beta 3$ .

Estructura de Referencia	Modelo Realizado	Bases de comparación	RMSD [Å]
Estructura cristalina 7TJ8 con subunidades $\alpha$ y $\beta 3$	hNav1.7 con todo el complejo $\alpha/\beta 3$	Los 1078 pares de átomos	3
Modelado por Homología	hNav1.7 con una parte del complejo $\alpha/\beta 3$	Subconjunto de 692 pares de átomos centrados en el PPI	1
Modelado por Homología	hNav1.7 con solo DIII del complejo $\alpha/\beta 3$	Los 122 pares de átomos	2
Modelado por Homología	hNav1.7 con solo DIII del complejo $\alpha/\beta 3$	Subconjunto de 107 pares de átomos centrados en el PPI	1

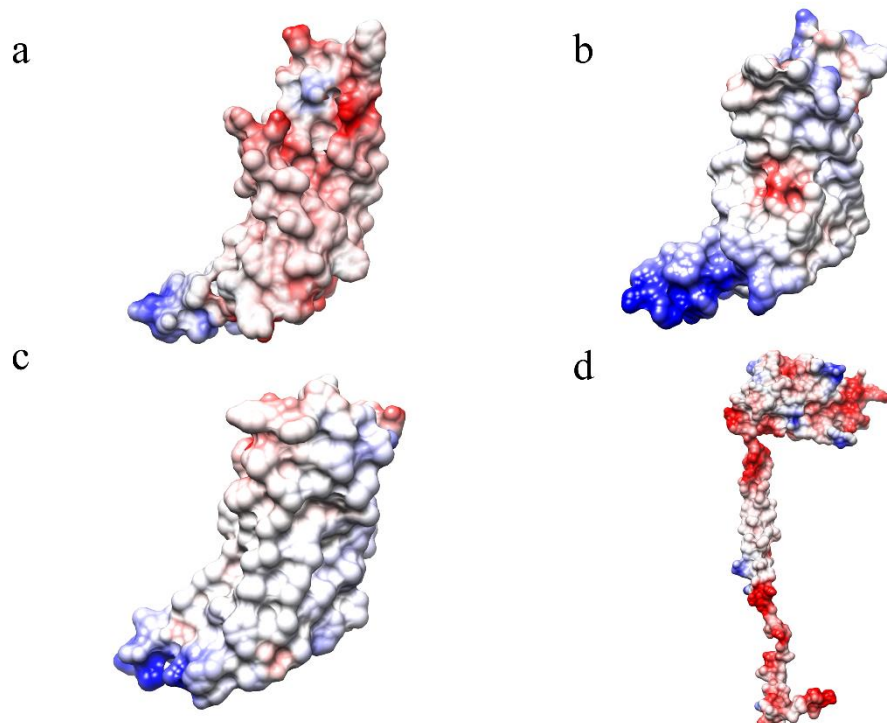
### 9.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ Y LA SUBUNIDAD $\beta 3$

Para realizar el acoplamiento molecular (*molecular docking*) se realiza la búsqueda de literatura para encontrar una posible zona de interacción entre ambas subunidades. Zhu y colaboradores en el 2017;<sup>114</sup> y Barro-Soria y colaboradores<sup>62</sup> mostraron efectos que presenta la subunidad  $\beta 3$  sobre el dominio DII, DIII y/o DIV del Nav1.5, esto permitiendo realizar la búsqueda en el hNav1.7 ya que presenta una elevada homología con el hNav1.5. Debido a que directamente no se conoce un dominio exacto para lograr describir la interacción entre estas dos subunidades, se realiza el acoplamiento molecular “ciego”. Este *docking* se ejecuta colocando a la subunidad  $\beta 3$  en una posición aleatoria respecto a la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 (véase **Figura 13**).



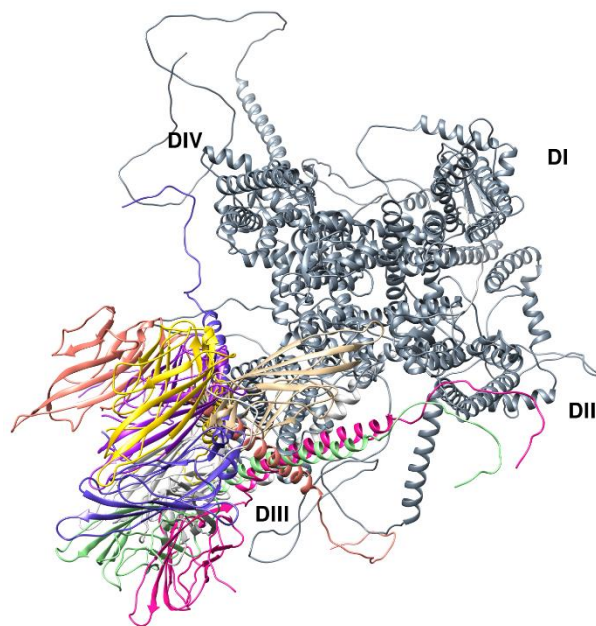
**Figura 13.** Representación de la posición aleatoria en la que se colocó a la subunidad  $\beta 3$  respecto a la subunidad  $\alpha$  para realizar los acoplamientos moleculares. (a) y (b) Representación con vista superior y lateral de la posición de la subunidad  $\beta 3$  respecto a la subunidad  $\alpha$  para realizar el acoplamiento. (c) y (d) Representación con vista superior y lateral de la posición que toma la subunidad  $\beta 3$  en la subunidad  $\alpha$  después del acoplamiento.

Para poder conocer la posible interacción entre estas dos subunidades, se describen las características coulombicas mediante iso-superficies que presentan estos tres dominios (DII-**Figura 14a**, DIII-**Figura 14b** y DIV-**Figura 14c**) de la subunidad  $\alpha$  con la subunidad  $\beta 3$  (véase **Figura 14d**). La coloración de las iso-superficies muestra que existe una mayor reciprocidad de cargas entre el dominio DIII y la subunidad  $\beta 3$ , en comparación con el dominio DII y DIV que presentan más cargas neutras debido a sus aminoácidos. Esto permite conocer que en el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  y el segmento transmembranal de la subunidad  $\beta 3$  haya una complementariedad electrostática debido a la presencia de aminoácidos cargados como: ác. glutámico, lisina que pueden formar un puente salino; tirosina e histidina que pueden formar un puente de hidrógeno en zonas como en la porción o cara hacia la parte extracelular e intracelular. Y de igual manera, en el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  y el segmento transmembranal de la subunidad  $\beta 3$  existe complementariedad estérica debido a la presencia de aminoácidos hidrófobos como: isoleucina, fenilalanina, triptófano que pueden formar bolsillos hidrófobos en la zona transmembranal o media que está en contacto con la membrana lipídica.



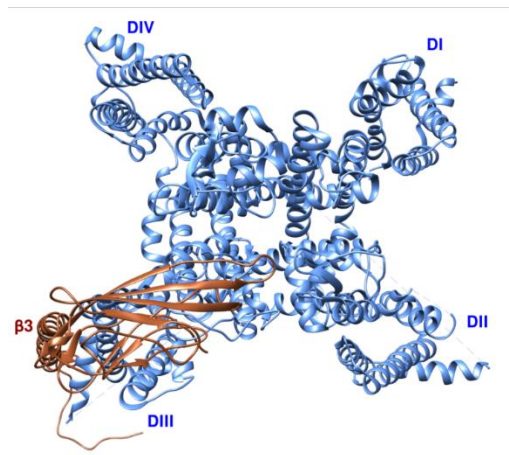
**Figura 14.** Superficies Coulómbicas de los dominios DII, DIII, DIV y de la subunidad  $\beta 3$ . (a) Superficie coulómbica del dominio DII del hNav1.7 mostrando mayor constitución por aminoácidos con carga negativa; (b) Superficie coulómbica del dominio DIII del hNav1.7 mostrando mayor cantidad de residuos con carga positiva; (c) Superficie coulómbica del dominio DIV del hNav1.7 mostrando mayor cantidad de residuos con carga neutra; (d) Superficie coulómbica de la subunidad  $\beta 3$  que presenta una mayor constitución de residuos negativos. Con estas superficies coulómbicas permite conocer la zona de mayor afinidad que tiene la subunidad  $\beta 3$  por el dominio DIII.

El resultado del *docking* proteína-proteína entre ambas subunidades usando el programa en línea HDOCK<sup>84,103</sup> arroja que la subunidad  $\beta 3$  se une al dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 (véase **Figura 15**). Dentro de los resultados, el algoritmo de cálculo arroja posiciones con ángulos de  $90^\circ$  (acostadas),  $75^\circ$  (inclinadas) y hasta  $180^\circ$  (invertidas) respecto a la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7. De la misma manera, el resultado del *docking* proteína-proteína entre las dos subunidades utilizando el programa en línea HADDOCK 2.4<sup>85,104</sup> muestra posiciones más aleatorias, colocando mayor cantidad de resultados en el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7.



**Figura 15.** Resultados del *docking* proteína-proteína entre la subunidad  $\beta 3$  y la subunidad  $\alpha$  del hNav<sub>v</sub>1.7. Los resultados que se obtiene de HDOCK, todas las posiciones las coloca sobre el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNav<sub>v</sub>1.7.

El resultado del *docking* con HDOCK en el dominio DIII arroja un valor de -231.26 que se transforma en un valor de confianza del 0.83 (véase **Figura 16**). Los aminoácidos que se encuentran en la interfaz interaccionando en la subunidad  $\beta 3$  tenemos: T154, S158, L165, L166, L169, W172, E176, M177, E180, Y181, V184 and E186; y en el dominio DIII son: I1177, N1180, I1181, K1183, T1184, K1187, I1188, I1191, W1193, F1194, F1197, E1217, R1218, K1220, T1221, I1224, I1225, Y1228, I1232, I1236. Esta posición es verificada por la estructura cristalizada 6J8I que tiene a la subunidad  $\beta 1$  y de la misma manera la posición esta verificada mediante la estructura cristalizada 7TJ8 que tiene a la subunidad  $\beta 3$ . Esto se realiza ya que las estructuras cristalizadas son una fiel referencia a lo que se tiene en la parte biológica.

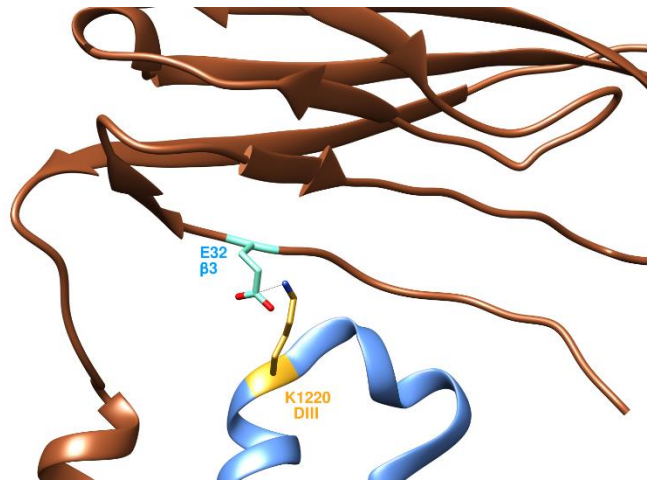


**Figura 16.** Posición final del resultado de HDOCK de la subunidad  $\beta 3$  (ligando) que se encuentra en el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7.

El resultado del *docking* con HADDOCK 2.4 en el dominio DIII arroja un valor de -39 kcal/mol. Los aminoácidos que se encuentran en la interfaz interaccionando en la subunidad  $\beta 3$  tenemos: T154, L165, L166, L169, W172, E176, M177, E180, Y181, V184 and E186; y en el dominio DIII son: I1177, N1180, I1181, K1183, T1184, K1187, I1188, I1191, W1193, F1194, F1197, E1217, R1218, K1220, T1221, I1224, I1225, Y1228, I1232, I1236. Esta posición es verificada por la estructura cristalizada 6J8I que tiene a la subunidad  $\beta 1$  y de la misma manera la posición está verificada mediante la estructura cristalizada 7TJ8 que tiene a la subunidad  $\beta 3$ .

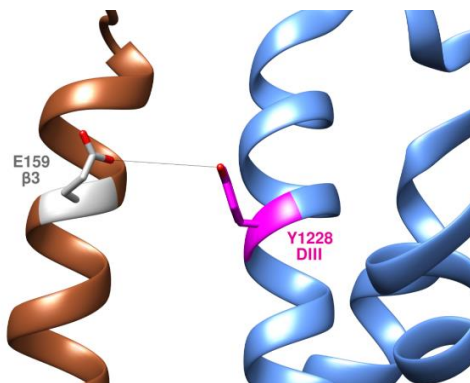
La mayoría de las interacciones identificadas en ambas interacciones se pueden resumir en tres grupos (i-iii):

- (i) E32-K1220 forman un puente salino que está localizado a 5 Å de distancia (véase **Figura 17**).



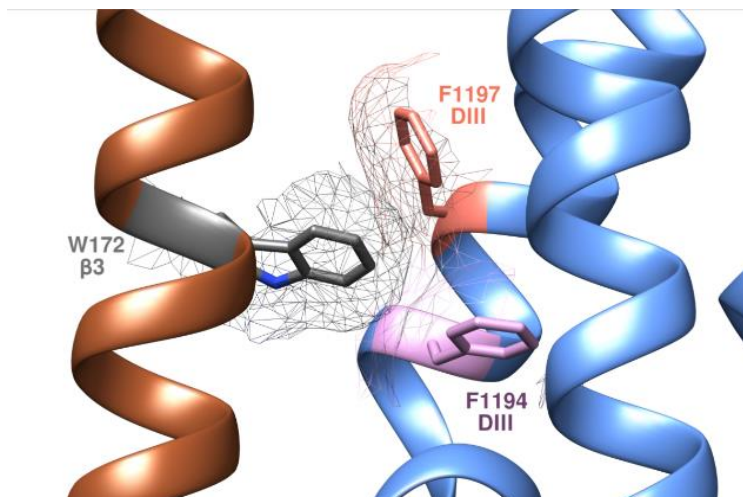
**Figura 17.** Interacción entre E52 de la subunidad  $\beta 3$  con K1220 del dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$ . Esta interacción presenta un Puente salino que tiene una distancia de 5 Å.

- (ii) La interacción entre 159 (gris) – Y1228 (magenta) forman un Puente de hidrógeno estando a una distancia de 3 Å (véase **Figura 18**).



**Figura 18.** Interacción entre el grupo carboxílico de E159 de la subunidad  $\beta 3$  con el grupo -OH de Y1228 del dominio DIII. Esta interacción permite la formación de un Puente de hidrógeno.

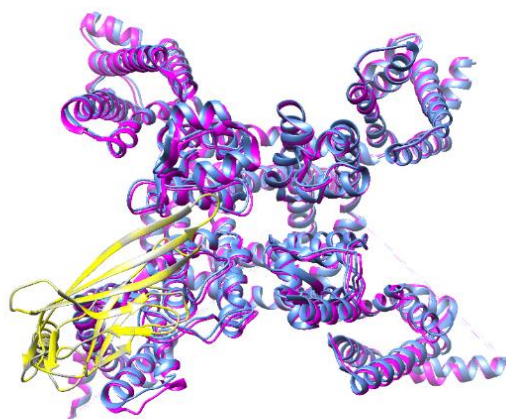
- (iii) Un bolsillo hidrófobo formado entre W172 (gris) + F1194 (rosa) + F1197 (salmón), esta interacción se lleva a cabo entre el residuo de triptófano formando interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* y *T-shape*, esto último debido al movimiento de los anillos aromáticos. La localización de esta interacción se encuentra en la zona transmembranal de la subunidad  $\beta 3$  y de la subunidad  $\alpha$  (véase **Figura 19**).



**Figura 19.** Interacción entre los residuos W172 de la subunidad  $\beta 3$  con los residuos aromáticos F1194 y F1197 del dominio DIII. La interacción da a la formación de un bolsillo hidrofóbico rico en electrones  $\pi$

Para validar esta metodología y los resultados del *docking*, se realiza un acoplamiento molecular reversa (*back docking*) usando las estructuras cristalizadas:

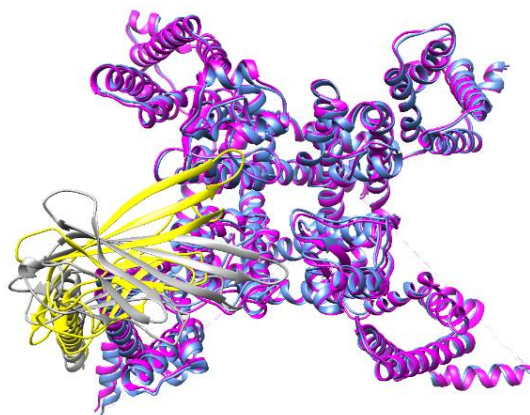
i) en HDOCK muestra un resultado que la subunidad  $\beta 1$  se coloca encima de su posición cristalográfica con una desviación cuadrática media de 0.6 Å (véase **Figura 20**) y un valor de -240.53 con un valor de confianza de 0.86.



**Figura 20.** Posición final del *back docking* realizado con la herramienta en línea HDOCK, el resultado del cálculo se realiza usando a la subunidad  $\beta 1$  (gris - ligando) con la subunidad (azul - receptor). Esta

interacción se compara con la estructura cristalográfica (amarillo - ligando y magenta - receptor) mostrando un RMSD de 0.6 Å.

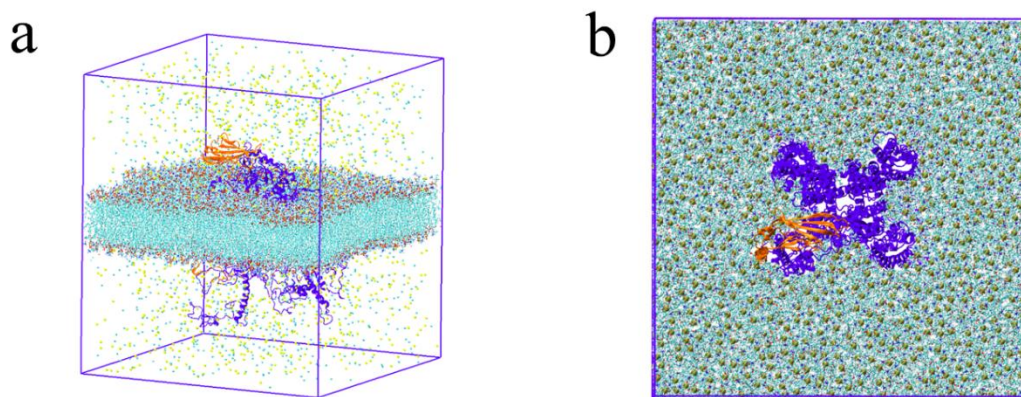
ii) En HADDOCK 2.4 el sitio de unión obtenido también es en el dominio DIII del hNav<sub>v</sub>1.7 con una energía de interacción de -43 kcal/mol, mostrando la misma posición en el segmento transmembranal; pero con diferencias de orientación del dominio *Ig-like* orientándose hacia los segmentos S5 y S6 del dominio DIV de la subunidad  $\alpha$  (véase **Figura 21**). Al compararse con el cristal, muestra un RMSD de 5 Å respecto a la posición que toma la subunidad  $\beta$ 1 en la estructura cristalográfica.



**Figura 21.** Posición final del *back docking* realizado en HADDOCK 2.4 usando como ligando a la subunidad  $\beta$ 1 (listón gris) y como receptor a la subunidad  $\alpha$  (listo azul). Al comparar la interacción con la estructura cristalográfica (ligando listón amarillo y receptor listón magenta) muestra un RMSD de 5 Å.

#### 9.4 DINÁMICA MOLECULAR ENTRE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL hNa<sub>v</sub>1.7 Y LA SUBUNIDAD $\beta$ 3

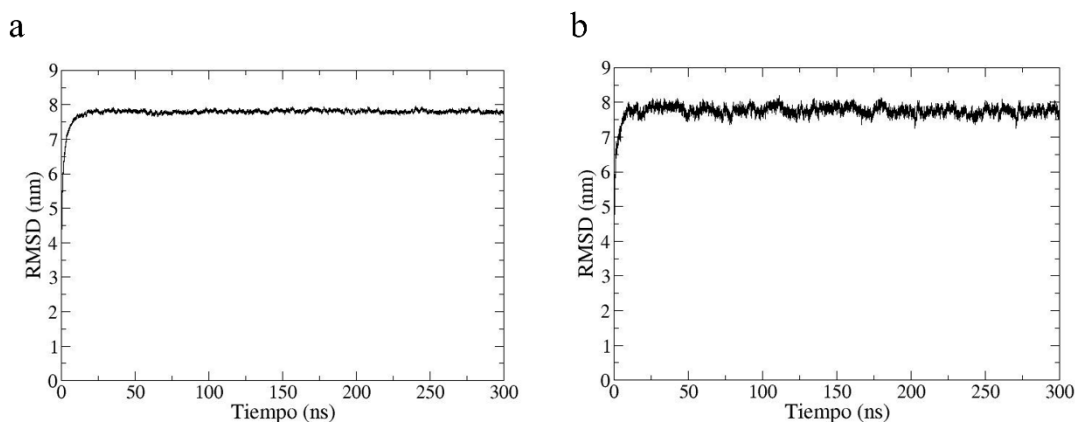
El sistema para dinámica molecular está conformado por: i) la subunidad  $\alpha$ , ii) subunidad  $\beta$ 3; iii) membrana lipídica; iv) agua en el modelo TIP3P y v) una concentración 0.15 M de NaCl (véase **Figura 22**), esto permite conocer la estabilidad de unión entre estas dos subunidades.



**Figura 22.** Sistema para generar una dinámica molecular conformado por i) subunidad  $\alpha$  (listón azul); ii) subunidad  $\beta$ 3 (superficie anaranjado); iii) membrana lipídica de POPC (líneas en azul y puntos rojos), (a) Sistema desde una vista lateral y los iones sodio se encuentran en puntos de color amarillo y los iones cloruro se encuentran en puntos, las moléculas de agua se han omitido; (b) sistema desde una vista desde la parte superior o extracelular, en la que los iones fueron El modelo de agua y el cloruro de sodio es omitido en esta representación.

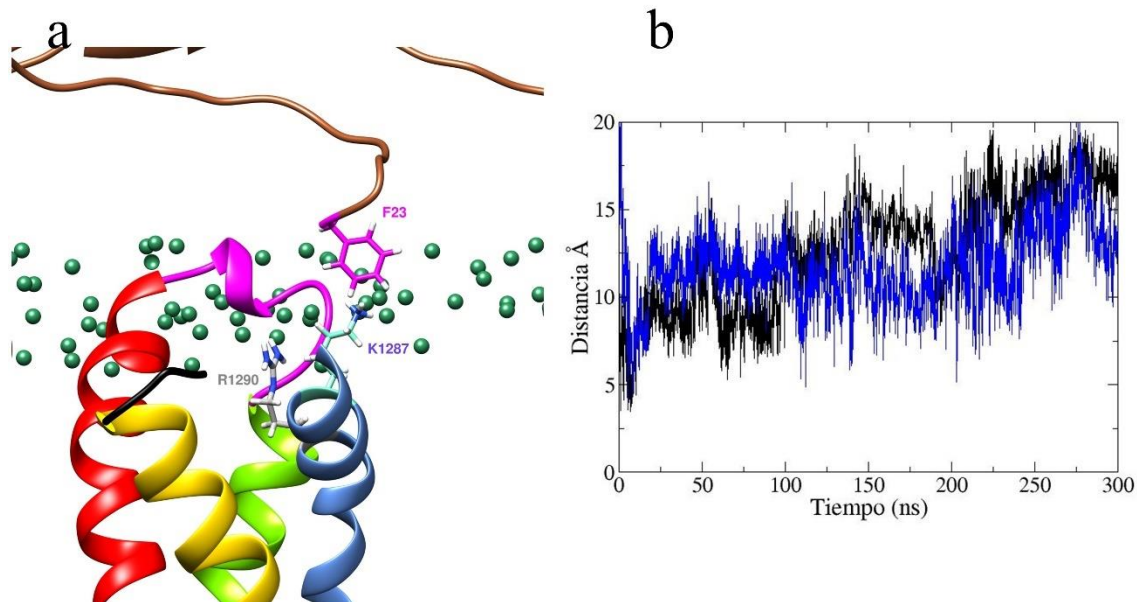
Conociendo las interacciones entre proteína-proteína (PPI - subunidades  $\alpha/\beta$ 3) debido al *docking*. Para conocer los valores que reflejan el movimiento de las proteínas se realiza el cálculo de un RMSD global de la subunidad  $\alpha$  y subunidad  $\beta$ 3 durante los 300 ns de dinámica. Los resultados reflejan cambios elevados durante los primeros 10 ns de cálculo debido a la gran movilidad que presentan las asas intracelulares contenidas en la subunidad  $\alpha$ ; posterior a los 10 ns antes mencionados, los pequeños cambios en el RMSD son mayoritariamente el reflejo de los movimientos que se presentan en las asas que conforman el ectodominio (véase **Figura 23a**). De igual forma, subunidad  $\beta$ 3 presenta el mismo esquema de movimiento debido a que el dominio C-terminal forma interacciones con zonas de la subunidad  $\alpha$  estabilizando su movimiento; por otra parte, los pequeños cambios de RMSD posterior a los

10 ns antes mencionados son generados por la presencia de asas en el dominio *Ig-like* denominadas “CDR’s” (véase **Figura 23b**). La estabilidad bajo las condiciones de MD entre las dos subunidades es elevada.



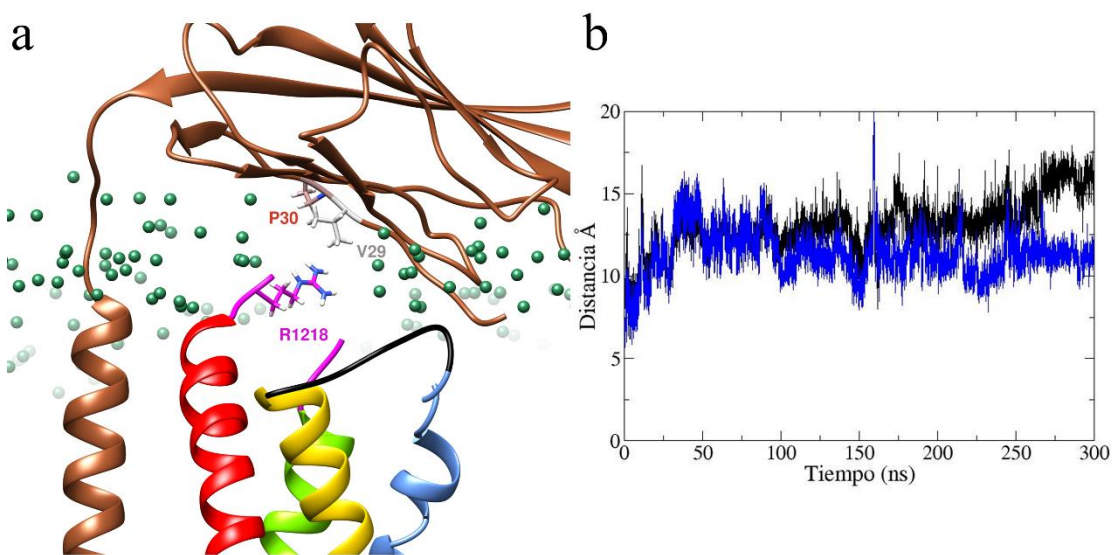
**Figura 23.** Gráficas de RMSD de la subunidad  $\alpha$  y de la subunidad  $\beta 3$  del canal hNav1.7 durante 300 ns. (a) Gráfica de RMSD de la subunidad  $\alpha$ ; y (b) Gráfica RMSD de la subunidad  $\beta 3$ .

La posición que toma la subunidad  $\beta 3$  al interactuar con el dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  permite que se presenten interacciones entre el asa conformada por los primeros aminoácidos de la subunidad  $\beta 3$ . Dentro de las primeras interacciones se encuentra la interacción entre F23 con K1287 y R1290 del dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 (véase **Figura 24a**) que genera un movimiento del segmento S4 del dominio DIII y esto se ve reflejado en el aumento de distancia entre estos tres aminoácidos que va desde 4.5 - 15 Å para F23-K1287 y desde los 5 – 13 Å para F23-R1290 (véase **Figura 24b**).



**Figura 24.** Representación de la interacción entre F23 – K1287 and F23 – R1290. (a) Interacción entre F23 (fucsia) – K1287 (azul acuamarina) y F23 (fucsia) – R1290 (gris) a los 10 ns. (b) Gráfica de distancia mostrando la formación de interacciones catión- $\pi$  entre F23 – K1287 (línea negra) y F23 – R1290 (línea azul) durante los 300 ns, las esferas en color verde son los grupos fosfato del modelo lipídico POPC.

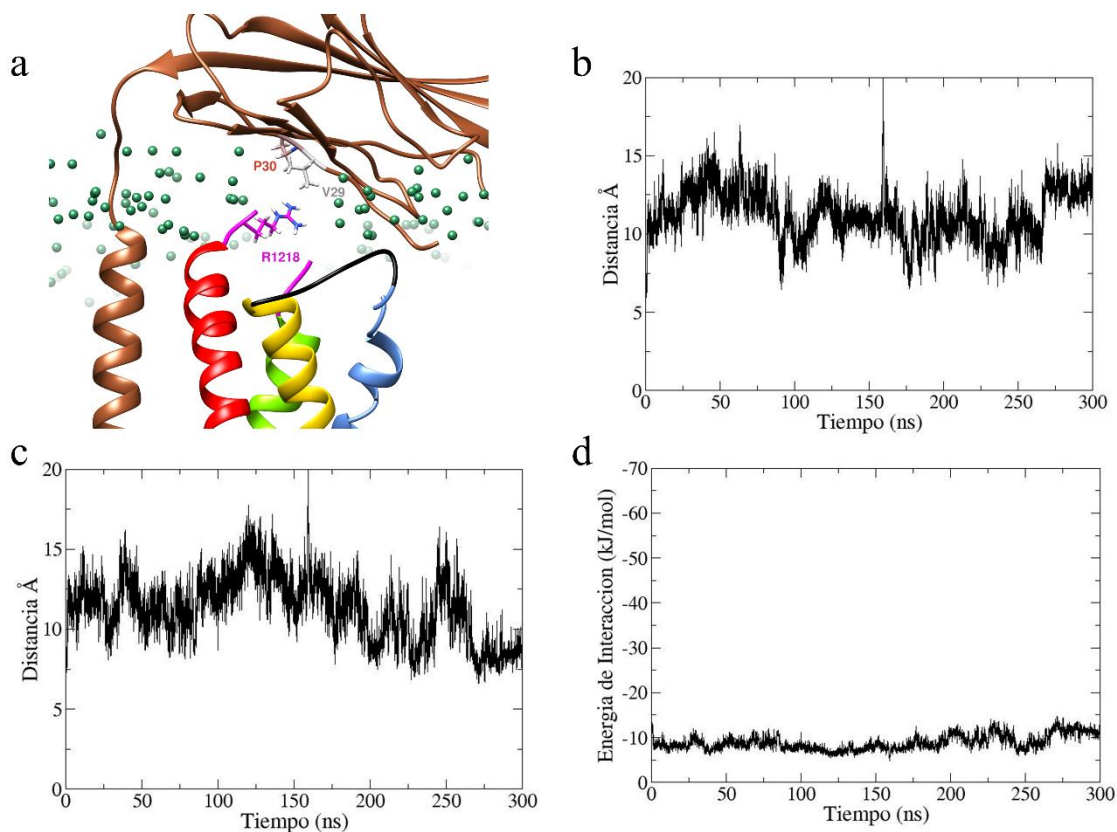
Otra de las interacciones que estabiliza la posición que toma la subunidad  $\beta 3$  con la subunidad  $\alpha$  durante los 300 ns de MD se lleva a cabo entre V29, P30 y R1218 (véase **Figura 25a**), este acercamiento presenta interacciones de tipo de van der Waals ya que interaccionan con las cadenas laterales de los aminoácidos. La posición de estos aminoácidos y a que presentan una interacción débil, permite que el asa en la que se encuentran V29 y P30 se mueve haciendo que la distancia entre estos aminoácidos aumente desde los 6 hasta 15 Å de distancia (véase **Figura 25b**).



**Figura 25.** Representación gráfica de la interacción entre V29, P30 con R1218. (a) La interacción de van der Waals se lleva a cabo mediante la cadena lateral de R1218 con las cadenas laterales de V29, P30, las esferas en color verde son los grupos fosfato del lípido POPC. (b) Gráfica de la distancia entre los aminoácidos V29-R1218 (línea negra) P30-R1218 (línea azul); la distancia cambia desde 5 – 15 Å debido al movimiento del asa en la que se encuentran.

De igual manera, los aminoácidos P30 y E32 de la subunidad  $\beta 3$  interactúan con K1220 de la subunidad  $\alpha$ , esta interacción permite que el asa que se encuentra entre el segmento S1 y S2 del dominio DIII se mantenga estable y no presente un alto movimiento (véase **Figura 26a**). La distancia de interacción entre las cadenas laterales de P30 y los carbonos que conforman la cadena lateral de K1220 presentando interacciones de van der Waals que van desde los 5-15 Å de distancia (véase **Figura 26b**). La interacción entre E32-K1220 permite la formación de un puente salino, ésta siendo una interacción de tipo fuerte por esto se mantiene durante los 300 ns de MD desde una distancia 4-10 Å (véase **Figura 26c**). La fuerza de interacción que se presenta en el puente salino entre E32-K1220 oscila a lo largo de la dinámica molecular debido a la distancia y al proceso de solvatación de ambos aminoácidos; de esta manera la fuerza promedio del puente salino se encuentra en -9 kJ/mol (-2.15 kcal/mol), comparándolo con los cálculos realizados mediante CCSD(T)/6-311+G(d,p)<sup>115</sup> siendo los cálculos de CCSD(T) realizados mediante métodos de química cuántica y que

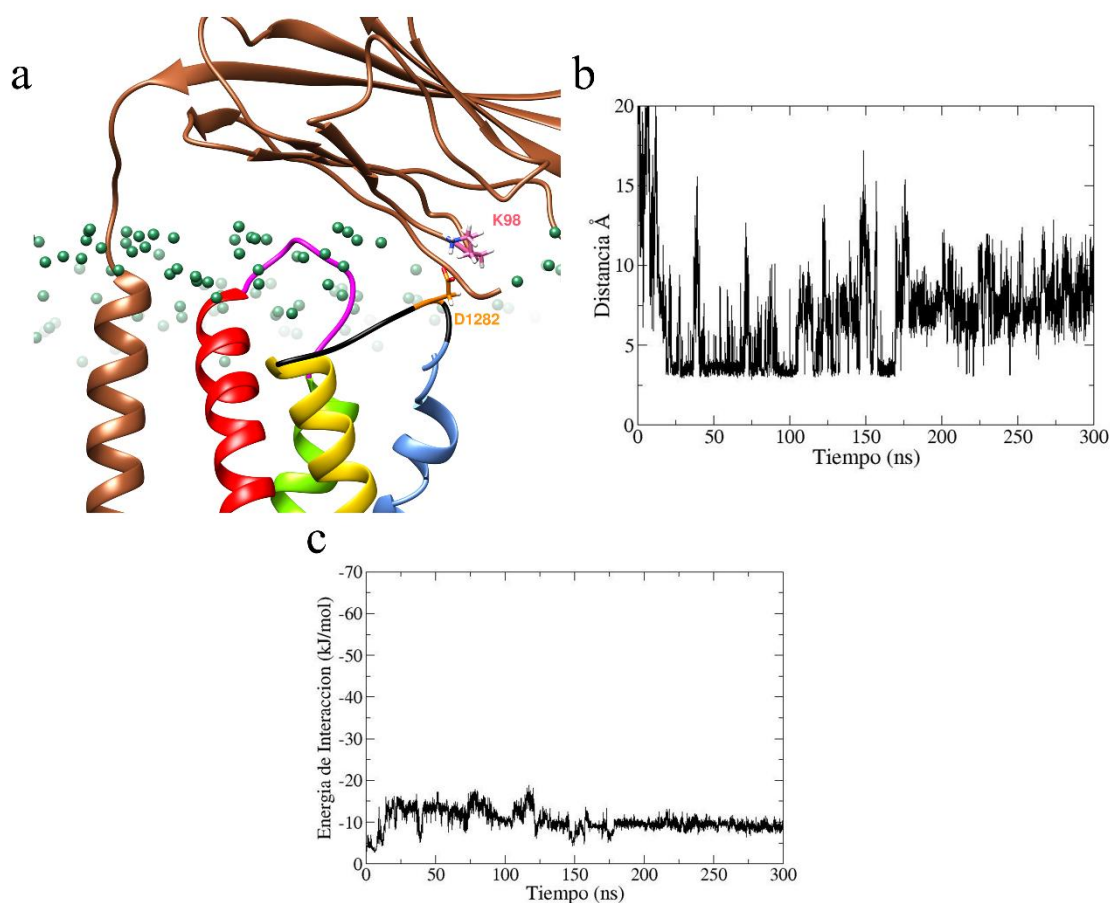
específicamente este es el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces. (véase **Figura 26d**).



**Figura 26.** Representación gráfica de la interacción entre P30-K1220, E32-K1220. (a) La interacción entre P30-K1220 solo ocurre al comienzo de la dinámica molecular debido a la interacción débil que presentan. En cambio, la interacción entre E32-K1220 ocurre de manera subsecuente para la formación de un puente salino, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia de interacción entre P30 – K1220 (línea negra) mostrando que debido a la interacción débil que presenta, la distancia entre estos aminoácidos aumenta. (c) E32-K1220 presenta la formación de un puente salino y distancia oscila entre los 4 a 10 Å. (d) La fuerza de la interacción que se presenta entre E32-K1220 se encuentra oscilando debido a la distancia que se encuentra entre estos dos residuos permitiendo tener una fuerza media de -9 kJ/mol.

Debido al gran movimiento que presenta el segmento *Ig-like* de la subunidad  $\beta 3$  presenta entre K98 con D1282 de la subunidad  $\alpha$  (véase **Figura 27a**). Esta interacción se mantiene

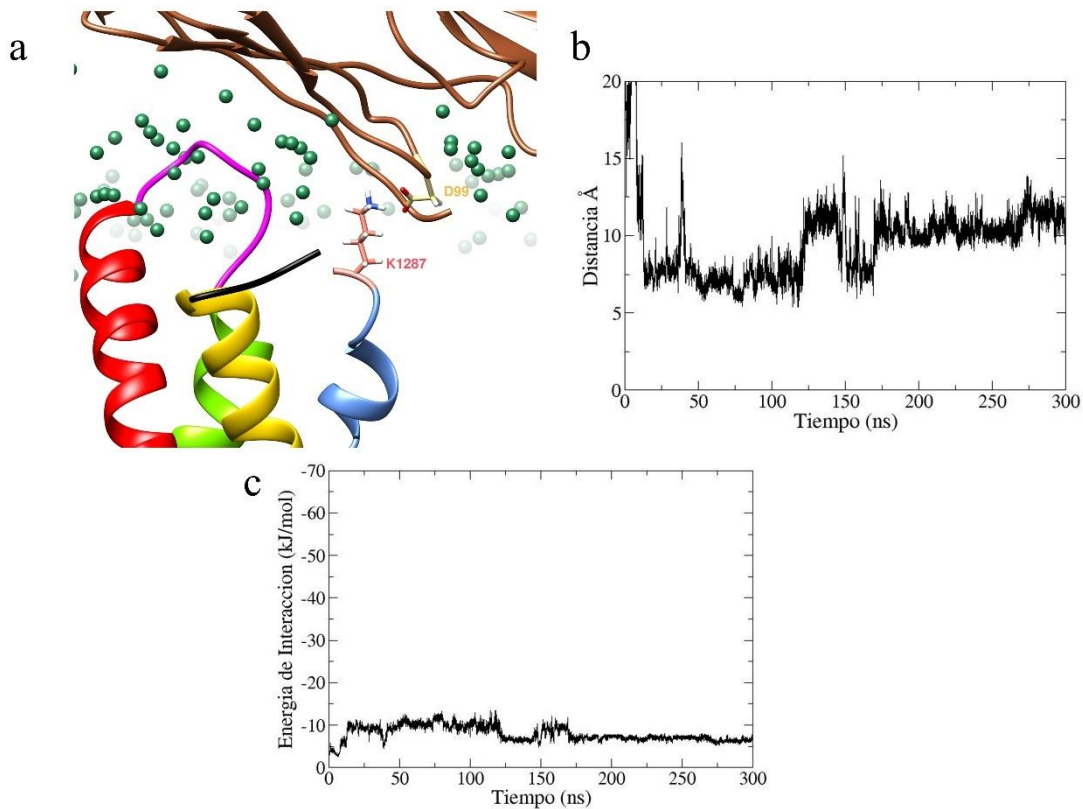
entre 3.5 a 4 Å de distancia durante los primeros nanosegundos de simulación, posteriormente aumenta la distancia entre ellos debido a la gran movilidad de las zonas en las que se encuentran (véase **Figura 27b**). La fuerza de interacción que se presenta en el puente salino entre K98-D1282, disminuye conforme pasa el tiempo ya que la distancia entre ambos residuos aumenta, la solvatación de ambos aminoácidos también ayuda a que ambos residuos se vayan separando y de esta manera la fuerza promedio del puente salino se encuentra en -10 kJ/mol (-2.39 kcal/mol), comparándolo con los cálculos realizados mediante CCSD(T)/6-311+G(d,p)<sup>115</sup> (véase **Figura 27c**), siendo los cálculos de CCSD(T) cálculos realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este siendo el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 27.** Representación gráfica de la interacción entre K98-D1282. (a) La formación de un Puente salino entre el grupo  $-NH_3^+$  de K98 y grupo  $-COO^-$  de D1282, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia de interacción entre estos dos aminoácidos

manteniendo una distancia mínima de 3.5 Å y llegando hasta los 10 Å a los 300 ns. (c) La fuerza de la interacción que se presenta entre K98-D1282 se encuentra oscilando debido a la distancia que se encuentra entre estos dos residuos permitiendo tener una fuerza media de -10 kJ/mol.

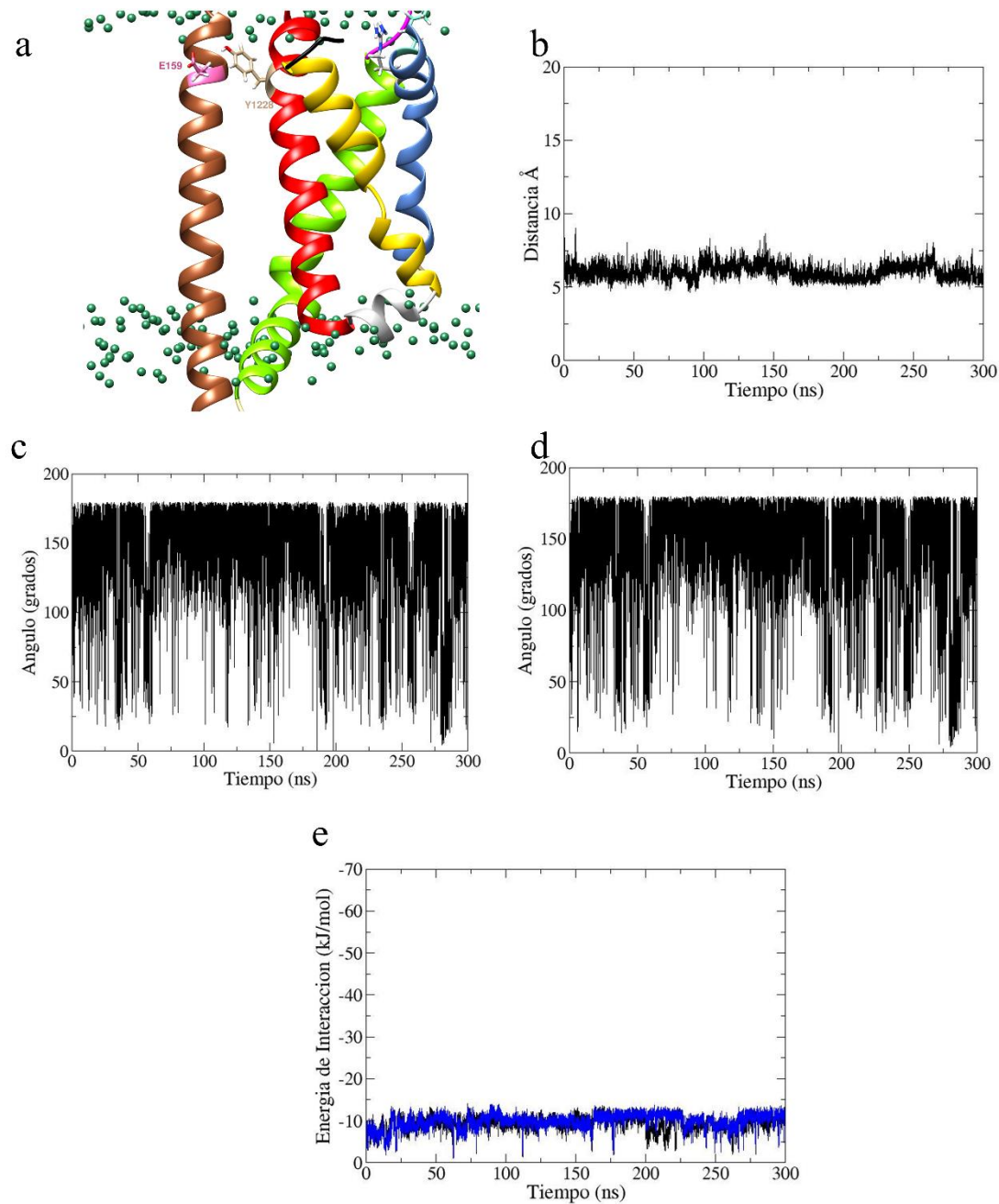
La movilidad que presenta el dominio *Ig-like* de la subunidad  $\beta 3$  permite que asas interaccionen con los residuos del dominio DIII mediante la formación de puentes salinos. En caso directo, la interacción entre D99 (café) y K1287 (anaranjado) al comienzo de la simulación permite la formación de un puente salino (véase **Figura 28a**); pero debido al elevado movimiento de las asas que conforman a la subunidad  $\beta 3$ , el puente salino se rompe debido a la distancia de 6-10 Å, estabilizando su interacción mediante fuerzas electrostáticas (véase **Figura 28b**). La fuerza de interacción que se presenta en el puente salino entre D99-K1287 al disminuye conforme pasa el tiempo ya que la distancia entre ambos residuos aumenta, la solvatación y el sitio en el que se encuentran ambos aminoácidos también ayuda a que ambos residuos se vayan separando y de esta manera la fuerza promedio del puente salino se encuentra en -9 kJ/mol (-2.15 kcal/mol), con los cálculos realizados mediante CCSD(T)/6-311+G(d,p)<sup>115</sup> (véase **Figura 28c**), siendo los cálculos de CCSD(T) realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este es el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 28.** Representación gráfica de la interacción entre D99 y K1287. (a) Durante los primeros 100 ns de simulación la formación del puente salino se mantiene; debido a la gran movilidad de las asas, la distancia aumenta rompiendo la interacción, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia de interacción entre el grupo  $\text{-COO-}$  de D99 y el grupo  $\text{-NH}_3^+$  de K1287 se mantiene a una distancia de  $3.5 \text{ \AA}$  al comienzo de la dinámica y posterior a este tiempo, la distancia aumenta hasta  $10 \text{ \AA}$  a los 300 ns. (c) La fuerza de la interacción que se presenta entre D99-K1287 se encuentra oscilando debido a la distancia que se encuentra entre estos dos residuos permitiendo tener una fuerza media de  $-9 \text{ kJ/mol}$ .

Dentro de la zona transmembrana, los movimientos de algunos aminoácidos se ve restringida debido a sus características polares. Por esta razón, las interacciones que se llevan a cabo entre E159 de la subunidad  $\beta_3$  y Y1228 de la subunidad  $\alpha$  del  $\text{hNa}_v1.7$  perduran en la dinámica molecular (véase **Figura 29a**). El rango de distancia que se presenta entre estos dos aminoácidos va desde los  $2.7$  hasta  $8 \text{ \AA}$  (véase **Figura 29b**). La fuerza del puente de hidrógeno que se presenta entre los oxígenos OE1 y OE2 del grupo carboxilo ( $\text{-COO}^-$ ) de

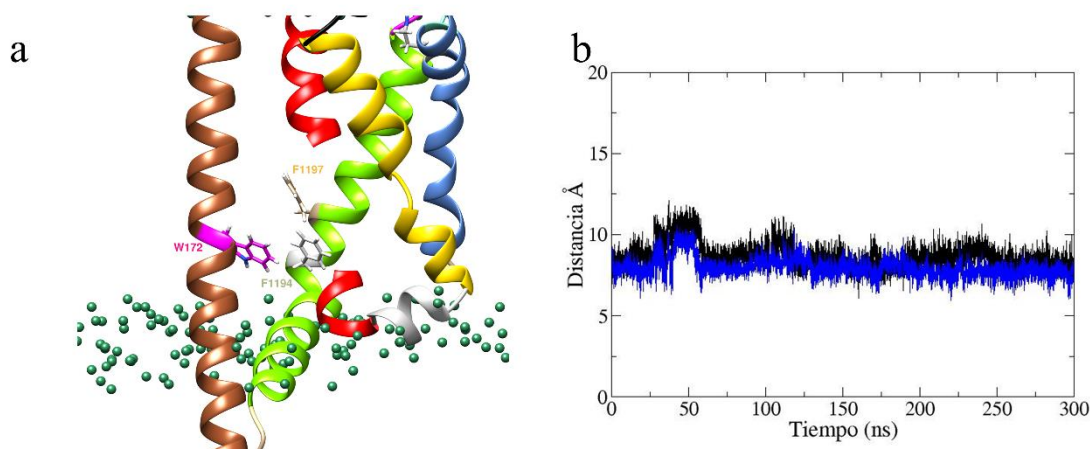
E159 y el grupo hidroxilo (-OH) de Y1228 (véase **Figura 29e**) permite que por momentos la fuerza del puente de hidrógeno se mantenga entre los -10 kJ/mol (-2.39 kcal/mol) y con un ángulo promedio de enlace de  $160^\circ$  para OE1; y -10 kJ/mol (-2.39 kcal/mol) con un ángulo promedio de enlace de  $-160^\circ$  para OE2 (véase **Figura 29d** para la fuerza del puente de hidrógeno y **Figura 29c** para ángulos formados entre el oxígeno OE1 y OE2 de E159 y el grupo hidroxilo de Y1228). Esto permite conocer que en la mayor parte de la dinámica molecular el puente de hidrógeno se rompe debido a la distancia para que esta interacción se realice se encuentra en un rango de  $2.4^{116}$ - $3.5^{117}$  Å de distancia, arrojando un valor del 50% comparándolo con el valor reportado de  $-20$  kJ/mol.<sup>115</sup>



**Figura 29.** Representación gráfica entre E159 y Y1228. (a) En esta interacción se lleva la formación de un puente de hidrógeno, que al paso del tiempo se rompe solo interaccionando de manera electrostática. Esta interacción promoviendo la estabilidad del segmento transmembranal, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) El puente de hidrógeno existe durante la mayor parte del tiempo de la simulación; el puente se forma desde los 0 – 80 ns; 160-230 ns; y finalmente desde los 270-300 ns; la distancia. La menor distancia de interacción es de 2.5 Å manteniéndose durante la mayor parte

del tiempo de simulación. (c) Representación de la interacción entre OE1 y OE2 de E159 y el grupo hidroxilo de Y1228. (d) La formación del puente de hidrogeno oscila debido la distancia entre los grupos involucrados mostrando una fuerza de -10 kJ/mol; y (c) el ángulo formado entre el grupo donador y aceptor formando un ángulo de 160° grados.

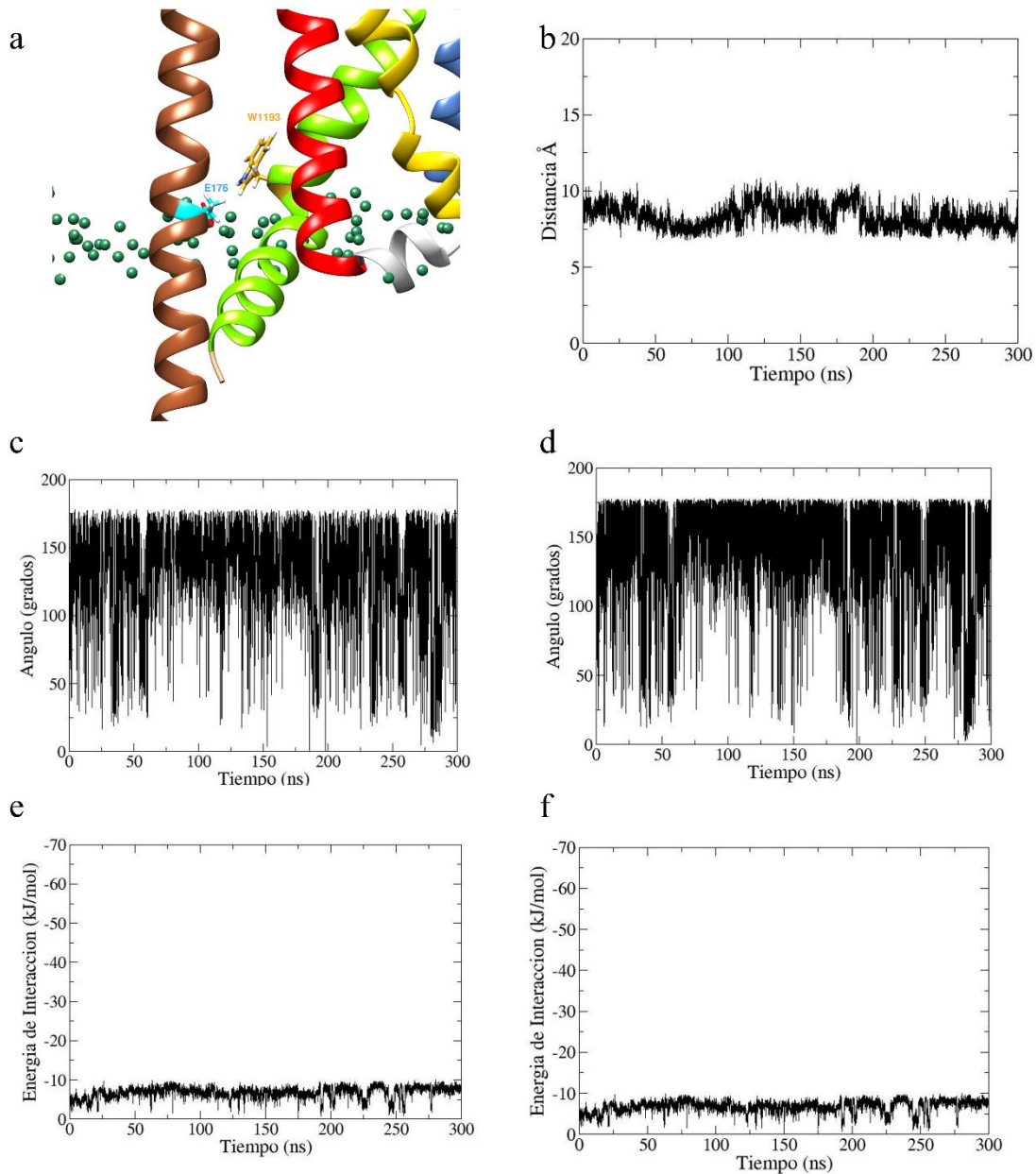
Uno de los sitios que proporcionan estabilidad a la posición que toma la subunidad  $\beta 3$  con la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 es un sitio hidrófobo conformado por los residuos W172-F1194-F1197 (véase **Figura 30a**) que muestra interacciones de tipo hidrófobas ya que para presentar interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  debe de encontrarse a 3.5-3.8 Å de distancia<sup>118</sup> (véase **Figura 30b**)



**Figura 30.** Representación gráfica de la interacción entre W172 – F1194 – F1197. (a) Este acercamiento se lleva en un bolsillo hidrofóbico en el que las nubes de electrones  $\pi$  se orientan para formar un sitio hidrófobo, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) La distancia entre estos dos aminoácidos se mantiene durante la mayor parte del tiempo de simulación, oscilando entre 6-13 Å de distancia.

Las interacciones que se llevan a cabo entre E176 de la subunidad  $\beta 3$  y W1193 de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 perduran en la dinámica molecular (véase **Figura 31a**). El rango de distancia que se presenta entre estos dos aminoácidos va desde los 9 hasta 4.7 Å (véase **Figura 31b**). La fuerza del puente de hidrógeno que se presenta entre los oxígenos OE1 y OE2 el grupo carboxilo (-COO<sup>-</sup>) de E176 y el grupo amino (-NH) de W1193 (véase **Figura 31c**) permite que por momentos la fuerza del puente de hidrógeno se mantenga entre desde

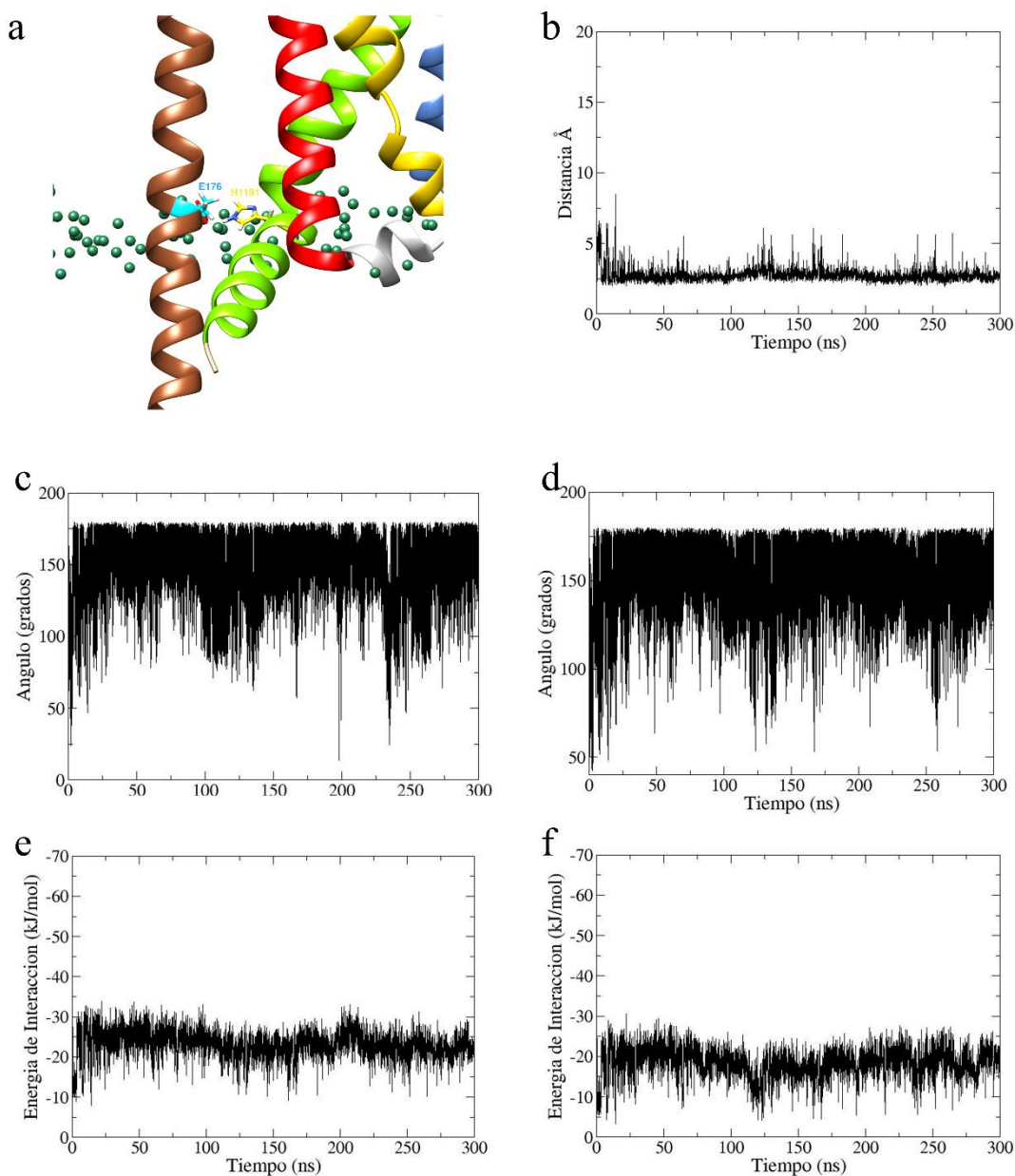
los  $-8$  kJ/mol ( $-1.91$  kcal/mol) y con un ángulo de enlace de  $164^\circ$  para OE1; y  $-9$  kJ/mol ( $-2.15$  kcal/mol) con un ángulo de enlace de  $156^\circ$  para OE2 (véase **Figura 31d** para la fuerza del puente de hidrógeno y **Figura 31c** para ángulos formados entre el oxígeno OE1 y OE2 de E159 y el grupo amino de W1193). Esto permite conocer que en la mayor parte de la dinámica molecular el puente de hidrógeno se rompe debido a la distancia para que esta interacción se realice se encuentra en un rango de  $2.4$ - $3.5$  Å de distancia, arrojando un valor del 42% comparándolo con el valor reportado de  $-20$  kJ/mol<sup>115</sup> ( $-5$  kcal/mol).



**Figura 31.** Representación gráfica de la interacción entre E176-W1193. (a) Esta interacción orienta el grupo carbonilo de E176 hacia la cadena lateral de W1193; de tal manera que, en algunos momentos presente la formación de un puente de hidrógeno, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) La distancia de interacción se encuentra a 2.5 Å a los 95 ns, permitiendo la formación del puente de hidrógeno y hasta los 7 Å para solo mostrar interacciones electrostáticas. La menor distancia de interacción es de 2.5 Å a los 102 ns. (c) el ángulo promedio formado entre OE1 y el -NH es de 164°. (d) el ángulo promedio formado entre OE2 y el -NH es de 156°. (e) la fuerza de enlace se

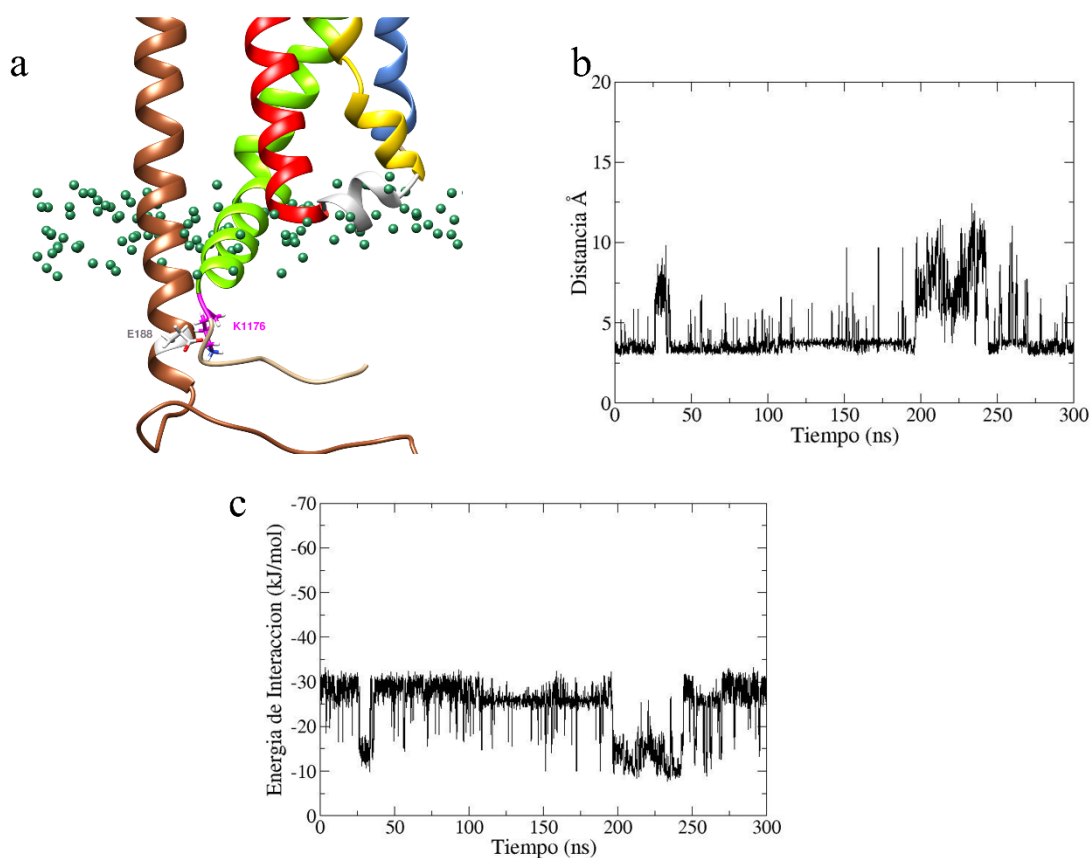
presenta entre OE1 y el grupo -NH es de -8 kJ/mol. (e) la fuerza de enlace que se presenta entre OE2 y el grupo -NH es de -9 kJ/mol.

La formación del puente de hidrógeno hacia el fondo de la zona transmembranal las interacciones que se llevan a cabo entre E176 de la subunidad  $\beta 3$  y H1191 de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7 perduran en la dinámica molecular (véase **Figura 32a**). El rango de distancia que se presenta entre estos dos aminoácidos va desde los 2.7 hasta 8 Å (véase **Figura 32b**). La fuerza del puente de hidrógeno que se presenta entre los oxígenos OE1 y OE2 el grupo carboxilo (-COO<sup>-</sup>) de E176 y el grupo amino (-NH) de H1191 (véase **Figura 32c**) permite que por momentos la fuerza del puente de hidrógeno se mantenga entre los -23 kJ/mol (-6.78 kcal/mol) y con un ángulo promedio de enlace de 170° para OE1; y -20 kJ/mol (-5 kcal/mol) con un ángulo promedio de enlace de 165° para OE2 (véase **Figura 32d** para la fuerza del puente de hidrógeno y **Figura 32c** para ángulos formados entre el oxígeno OE1 y OE2 de E176 y el grupo amino de H1191). Esto permite conocer que en la mayor parte de la dinámica molecular el puente de hidrógeno se rompe debido a la distancia para que esta interacción se realice se encuentra en un rango de 2.4-3.5 Å de distancia, arrojando un valor del 100% comparándolo con el valor reportado de -20 kJ/mol.



**Figura 32.** Representación de la interacción entre E176-H1191. (a) La interacción entre E176 (cyan) - H1191 (amarillo) a 10ns, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia del puente de hidrógeno entre E176 y H1191 de la subunidad  $\alpha$  del canal hNav<sub>1.7</sub> durante 300 ns. La menor distancia de interacción se presenta a 2.3 Å a los 5 ns. (c) El ángulo de enlace entre el grupo OE1 y el -NH de H1191 es de 170° promedio. (d) el ángulo de enlace entre el grupo OE2 y el -NH de H1191 es de 165° promedio. (e) la fuerza promedio del puente de hidrógeno entre OE1 y el grupo -NH es de -23 kJ/mol. (f) la fuerza promedio del puente de hidrógeno entre OE2 y el grupo -NH es de -20 kJ/mol.

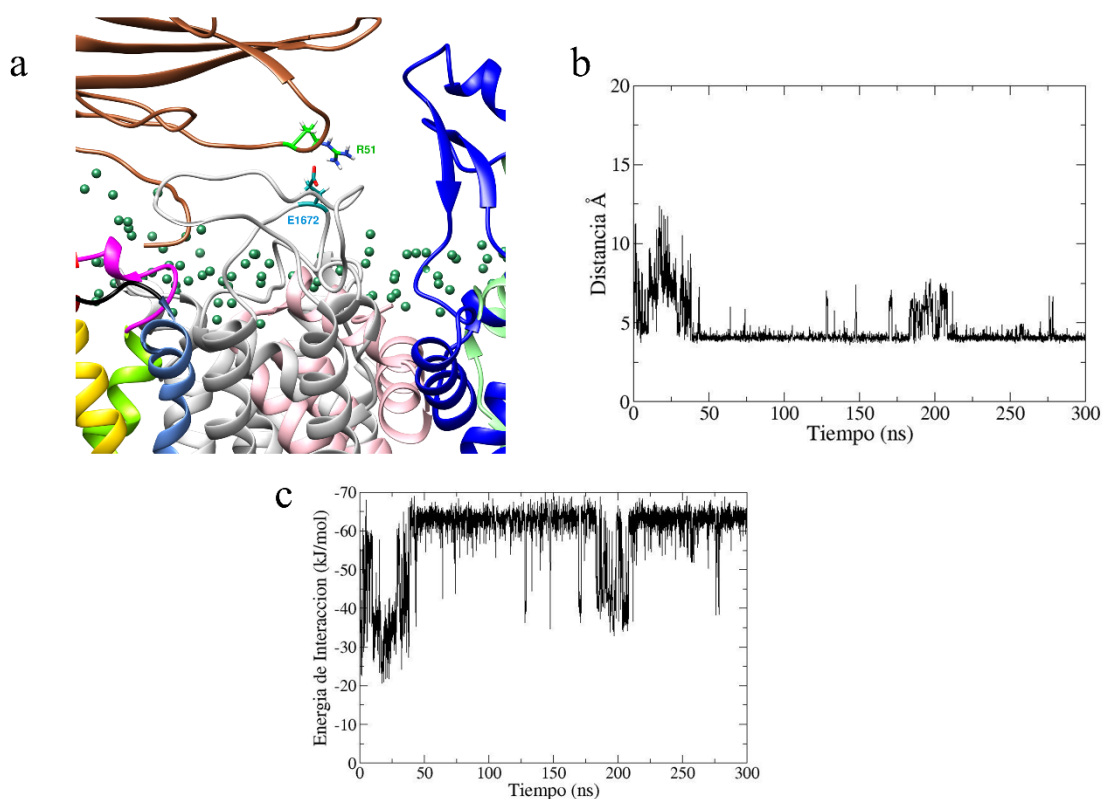
La formación del puente salino en la zona intracelular formado entre E188 y K1176 (véase **Figura 33a**) presenta una distancia de interacción de 3.5 Å (véase **Figura 33b**). La fuerza promedio de la interacción es de -25 kJ/mol (-7.59 kcal/mol) comparándola con los -33.17 kJ/mol arrojado mediante cálculos de CCSD(t) (véase **Figura 32c**), siendo los cálculos de CCSD(T) son realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este siendo el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 33.** Representación de la interacción entre E188 y K1176. (a) La interacción entre E188 (gris) - K1176 (rosa) a 10ns, colocándose a una distancia de 4 Å, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia de formación del puente salino entre E188 y K1176 durante 300 ns, el aumento de distancia que se encuentra a los 200 ns es debido a que la localización de K1176 es al comienzo de un asa intracelular. La menor distancia de interacción es a 3.5 Å a los 2 ns. (c)

La formación del puente de hidrogeno oscila debido la distancia entre los grupos involucrados mostrando una fuerza de -25 kJ/mol.

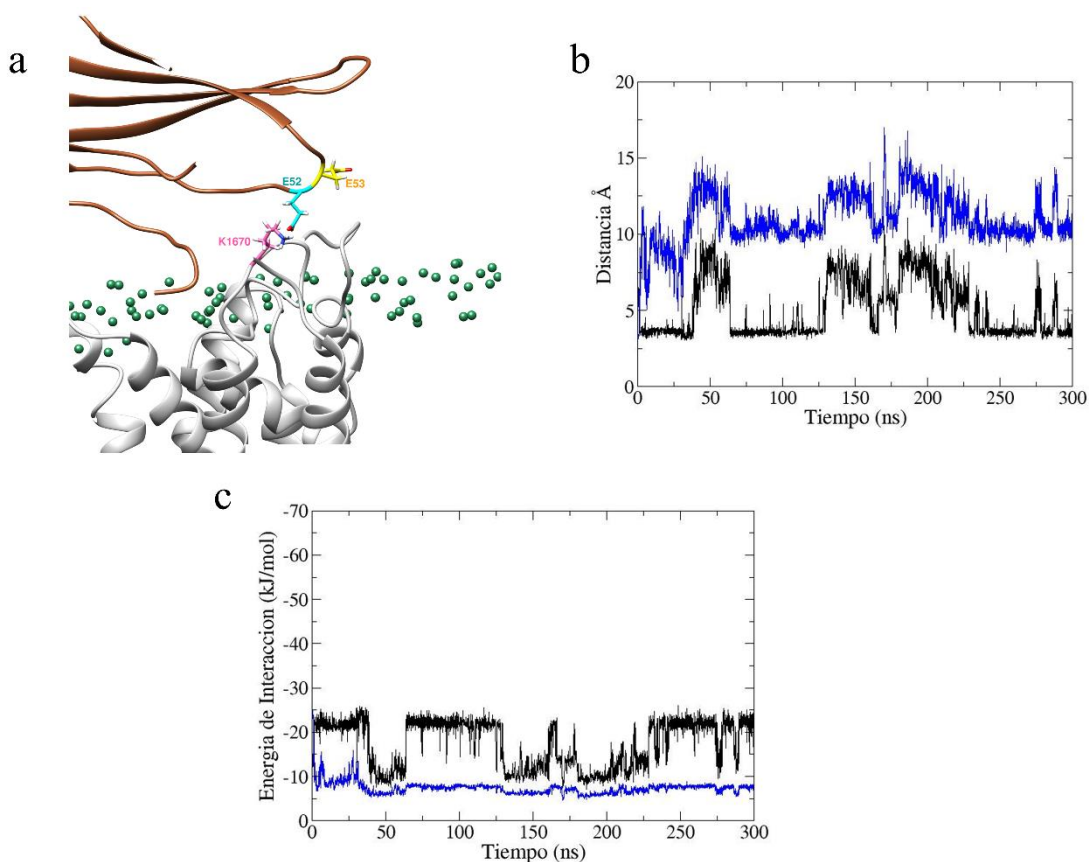
En la zona extracelular, las asas que conforman los CDR's interaccionan con R51-E1672 (véase **Figura 34a**) en la que interaccionan mediante la formación de un puente salino y la distancia entre estos aminoácidos se mantiene a los 5 Å durante la mayor parte de la simulación (véase **Figura 34b**). La fuerza de enlace promedio calculada debido a esta interacción es de -62 kJ/mol (-16.63 kcal/mol), esto comparándolo con el valor de -71.45 calculado mediante CCSD(t); los cálculos de CCSD(T) son realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este siendo el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 34.** Representación de la interacción entre R51-E1672. (a) Interacción entre R51 (verde)-E1672 (azul claro) a los 10 ns, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia en la formación de un Puente salino entre R51 y E1672 durante 300 ns. La distancia

más baja se encuentra desde los 50 ns en adelante, con una distancia a 5 Å. (c) La energía promedio del puente salino en esta interacción es de -62 kJ/mol.

La interacción entre E51 y E52 con K1670 presenta similares patrones de movimiento e interaccionan formando un puente salino conformado entre E52-K1670 (véase **Figura 35a**) manteniéndose gran parte del tiempo de simulación a una distancia de 4.5 Å (véase línea negra en **Figura 35b**). Por otro lado, la interacción entre E53 y K1670 (línea azul) se rompe debido al aumento de la movilidad (véase **Figura 35b**). La energía del puente salino también se ve afectado y entre E52-K1670 presenta una fuerza de interacción de -18 kJ/mol (-4.3 kcal/mol) y entre E53-K1670 una fuerza de interacción de -10 kJ/mol (-2.39 kcal/mol).

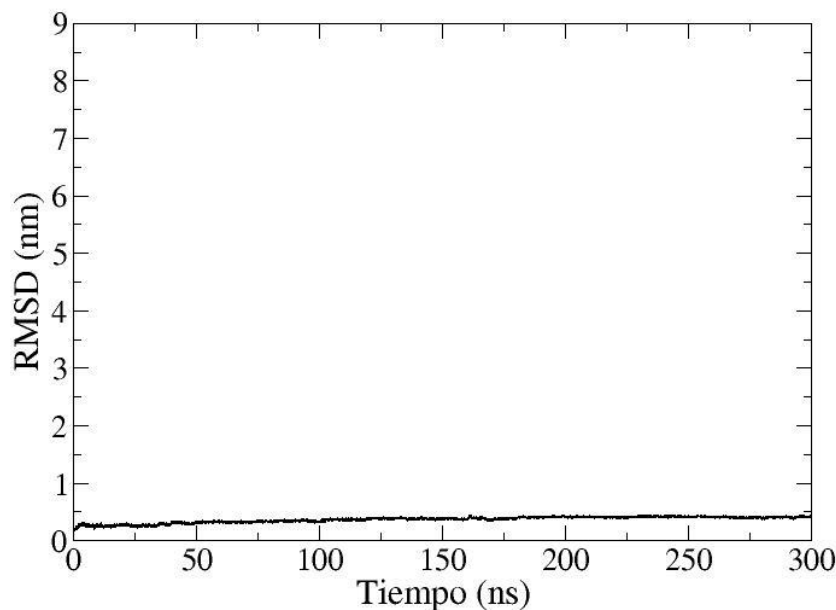


**Figura 35.** Representación de la interacción entre E52/E53 – K1670. (a) Interacción entre E52 (azul) – K1670 (rosa) y E53 (amarillo) - - K1370 (rosa) a 10ns, las esferas en color verde son los grupos fosfato

de la membrana de POPC. (b) Gráfica de la distancia en la formación de un puente salino entre E52 – K1670 (línea negra) y entre E53 – K1670 (línea azul) durante los 300 ns. La menor distancia de interacción entre E52 -K1670 es de 3 Å durante la mayor parte de la simulación; la menor distancia de interacción entre E53-K1670 es de 3 Å a los 40 ns. (c) La fuerza de interacción promedio entre E52-K1670 es de -18 kJ/mol (línea negra) y entre E53-K1670 es de -10 kJ/mol (línea azul).

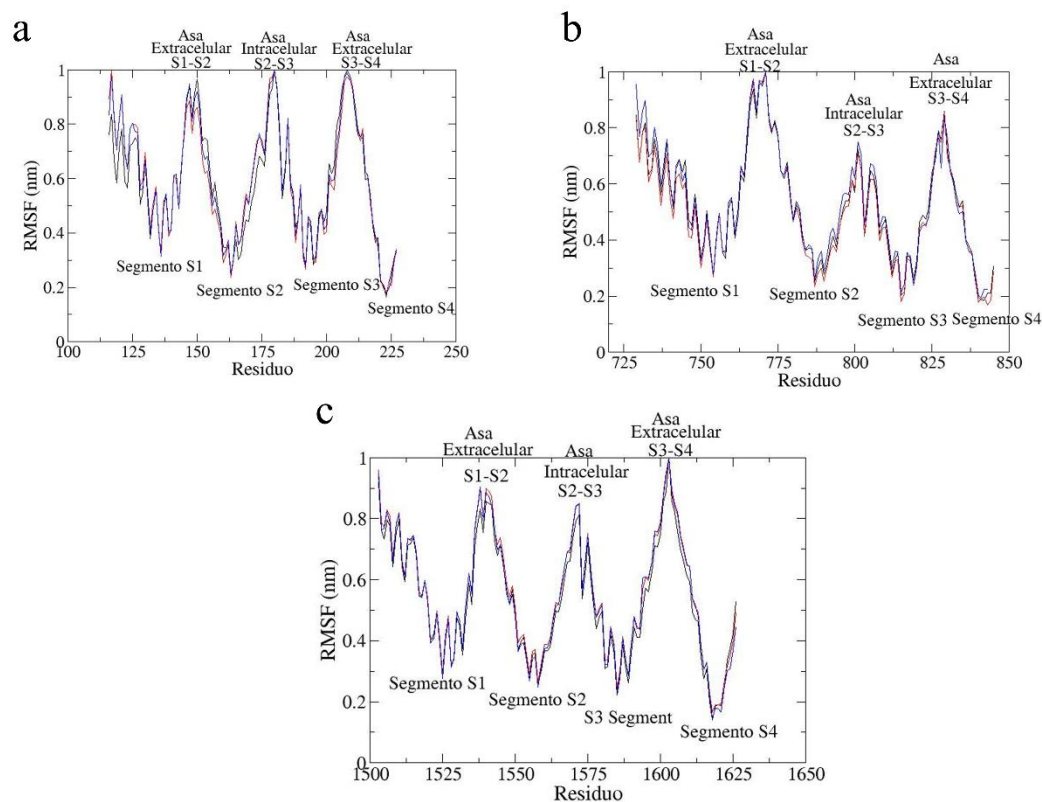
#### 9.4.1 ANÁLISIS DE MOVIMIENTO DEL SEGMENTO S4 DEL DOMINIO DIII DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL CANAL hNav1.7.

Para aseverar la estabilidad de la subunidad  $\alpha$ , se analiza de forma directa el dominio DIII durante los 300 ns de MD. El RMSD que refleja los movimientos de los carbonos alfa ( $C_{\alpha}$ ) de los aminoácidos oscila entre 0.1 – 0.2 nm (véase **Figura 36**). En este movimiento, los cambios en los valores son debido al movimiento del segmento S4 de este dominio. De igual manera, se realiza el análisis de este dominio debido a que es el dominio de interacción entre ambas subunidades y cabría la posibilidad de un aumento en el movimiento de este dominio.



**Figura 36.** Gráfica de RMSD del dominio VSD<sub>DIII</sub> durante los 300 ns de MD. Los valores de RMSD reflejan a cambios de los átomos del segmento S4.

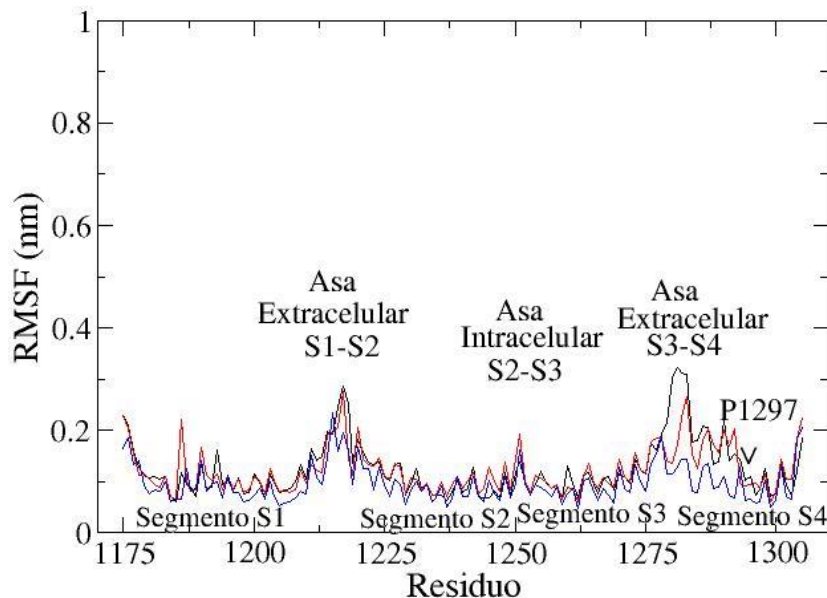
Analizando los otros dominios sensor de voltaje que tiene el hNa<sub>v</sub>1.7 VSD<sub>DI</sub>, VSD<sub>DII</sub> y VSD<sub>DIV</sub>, muestran que presentan mayor movimiento comparándolo con el VSD<sub>DIII</sub> y esto es debido a que a este último dominio (VSD<sub>DIII</sub>) presenta la interacción con la subunidad β3 proporcionando estabilidad a este último dominio (véase **Figura 37a**, **Figura 37b** y **Figura 37c**).



**Figura 37.** Gráfica de RMSF del VSD<sub>DI</sub>, VSD<sub>DII</sub> y VSD<sub>DIV</sub> de la subunidad α en los 300 ns de tiempo registrado. (a) Gráfica de RMSF del VSD<sub>DI</sub>. La elevada movilidad de los aminoácidos muestra la elevación de los valores de RMSF; El primer pico está conformado por aminoácidos del pico que conforma aminoácidos del asa extracelular S1-S2. El segundo pico se encuentra conformado por aminoácidos que forman el asa intracelular del asa S3-S3 que son residuos que van desde 205 al 210. Las líneas muestran el movimiento del VSD<sub>DI</sub> dentro de los 300ns; línea negra = 0 – 100 ns. Línea roja = 100 – 200 ns. Línea azul = 200 - 300 ns. (b) Gráfica de RMSF del VSD<sub>DII</sub>. La elevada movilidad de los aminoácidos muestra la elevación de los valores de RMSF; El primer pico está conformado por aminoácidos del pico que

conforma aminoácidos del asa extracelular S1-S2. El segundo pico se encuentra conformado por aminoácidos que forman el asa intracelular del asa S3-S3 que son residuos que van del residuo 760 al 785. Las líneas muestran el movimiento del VSD<sub>DII</sub> dentro de los 300ns; línea negra = 0 – 100 ns. Línea roja = 100 – 200 ns. Línea azul = 200 - 300 ns. (c) Gráfica de RMSF del VSD<sub>DIV</sub>. La elevada movilidad de los aminoácidos muestra la elevación de los valores de RMSF; El primer pico está conformado por aminoácidos del pico que conforma aminoácidos del asa extracelular S1-S2. El segundo pico se encuentra conformado por aminoácidos que forman el asa intracelular del asa S3-S3 que son residuos que van del residuo 1535 al 1545. Las líneas muestran el movimiento del VSD<sub>DIV</sub> dentro de los 300ns; línea negra = 0 – 100 ns. Línea roja = 100 – 200 ns. Línea azul = 200 - 300 ns.

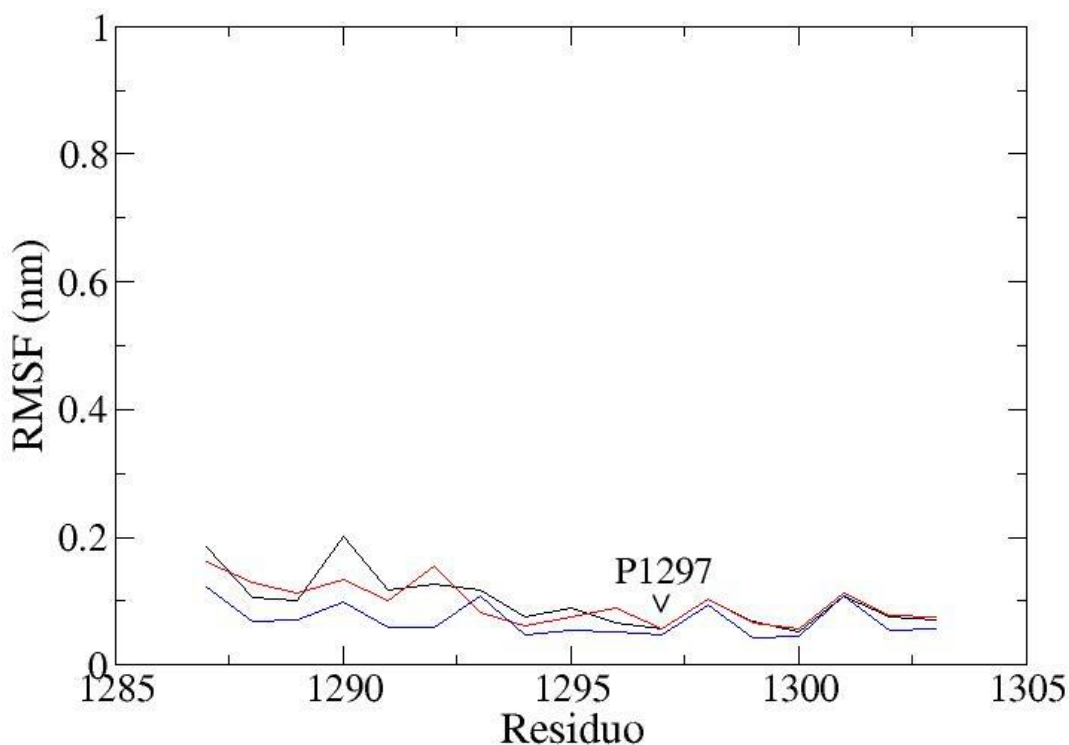
En las interacciones que se presentan dentro del dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNa<sub>v</sub>1.7 se presenta un fenómeno causado por efectos de los mismos aminoácidos denominado *neighbouring effect*. Para esto, se analiza mediante la fluctuación cuadrática media (RMSF por sus siglas en inglés). El RMSF refleja el movimiento de los residuos aminoacídicos durante los 300 ns. El gráfico muestra que existe un movimiento marcado en zonas como las asas intra- y extracelulares; aunque, se encuentra una zona que muestra un elevado movimiento (véase **Figura 38**). Esta zona de movimiento está conformada por residuos del 1287-1290, haciendo referencia los primeros aminoácidos del segmento S4 del dominio DIII de la subunidad  $\alpha$  del hNa<sub>v</sub>1.7.



**Figura 38.** Gráfica de RMSF del dominio sensor de voltaje VSD<sub>DIII</sub> de la subunidad  $\alpha$  durante los 300 ns de simulación. La elevada movilidad de los aminoácidos muestra una elevación del RMS: el primer pico está formado por aminoácidos del asa extracelular S1-S2. El segundo pico está compuesto por aminoácidos que conforman el asa intracelular S2-S3. El tercer pico está conformado por aminoácidos del asa extracelular S3-S4. La ampliación de ese pico de alta movilidad está conformada por los primeros aminoácidos del segmento S4 identificados del 1287 - 1297. Las líneas que muestran el movimiento a través de los 300 ns; línea Negra = 0 – 100 ns. Línea roja = 100 – 200ns. Línea azul = 200 – 300 ns.

Para conocer a detalle el movimiento del segmento S4 durante la simulación, se analiza de forma más exhaustiva mediante el RMSF. Esta gráfica muestra que los aminoácidos del 1287-1296 son los que se mueven más, esto debido a que existe una prolina en la posición 1297 (P1297), esta P1297 genera un efecto de que en algunos sitios del  $\alpha$  hélice tenga mayor movimiento, esto contrario a cuando no se encuentra una prolina (véase **Figura 39**). Este fenómeno es denominado *proline kink*.<sup>119-121</sup> Este fenómeno permite que al comienzo del  $\alpha$  se presente una gran movilidad y esta vaya disminuyendo conforme se llega al final de ésta.

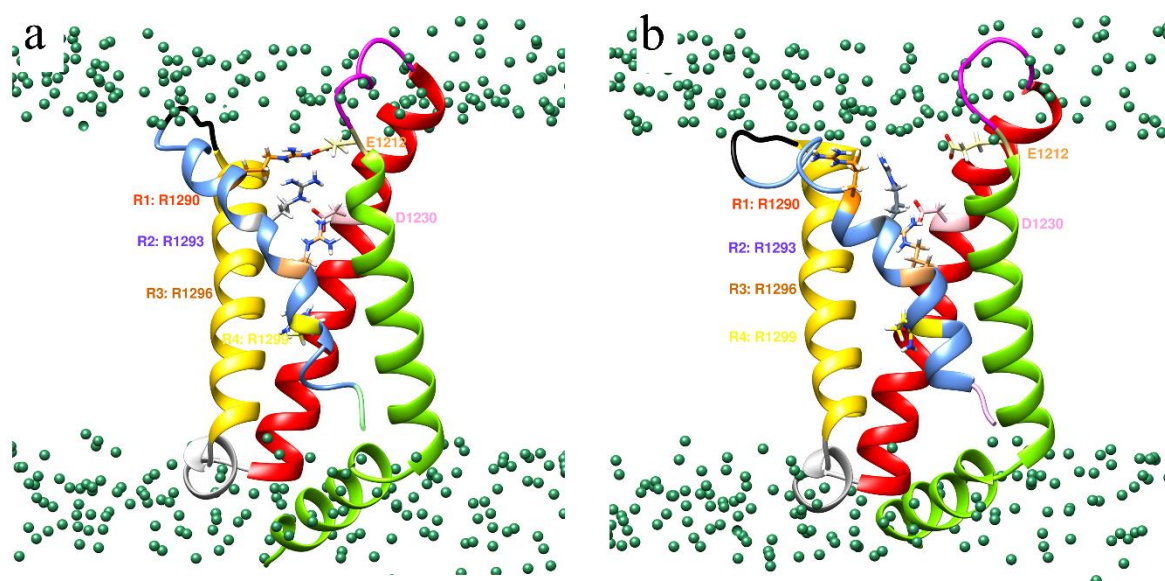
Debido a la interacción entre F23 de la subunidad  $\beta 3$  con K1287 y R1290, junto con la presencia de P1287 permite que se realice el movimiento clásico “sacacorchos” generando sus efectos sobre la inactivación-activación que observan en la electrofisiología.<sup>122-124</sup>



**Figura 39.** Gráfica del RMSF del segmento S4 del VSD<sub>DIII</sub> de la subunidad  $\alpha$ . El aminoácido de prolina 1297 (P1297) permite un amplio movimiento sobre residuos anteriores a esta; y una restricción sobre aminoácidos que se encuentran posterior a esta. Las líneas muestran el movimiento del segmento S4 en la simulación de 300 ns. Línea Negra = 0-100 ns; línea roja = 100 – 200 ns; y línea azul = 200 – 300 ns.

Conociendo que el segmento S4 es de relevancia electrofisiológica debido a que es el causante de los cambios estructurales de la subunidad  $\alpha$  del hNav1.7. La interacción de la subunidad  $\beta 3$  genera que los primeros aminoácidos del segmento S4 se muevan hacia la parte extracelular. Esta interacción genera que la interacción que se presenta entre R1290 - E1212 (véase **Figura 40a**); color anaranjado, color tan, respectivamente) se rompa haciendo

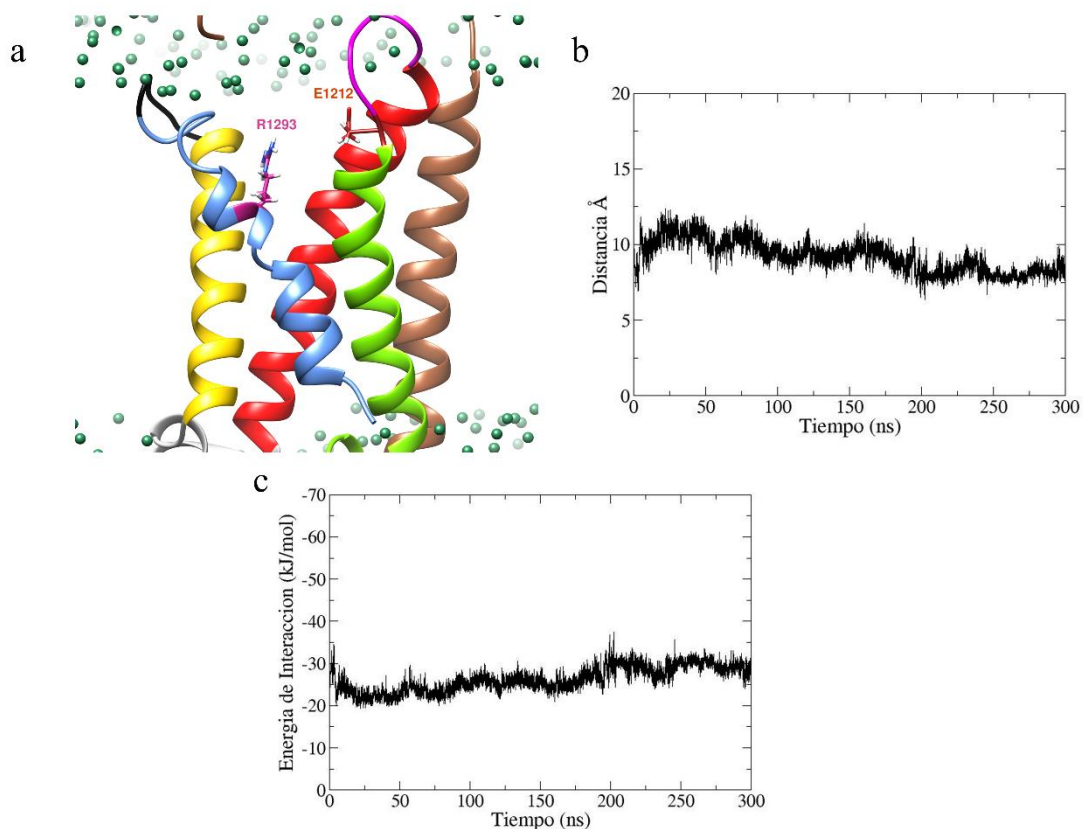
interacciones intermitentes con R1293 (color azul); de esta manera, E1212 se coloca dentro de estos dos aminoácidos (R1290 y R1293). Posterior a la interacción de estos aminoácidos con F23, R1290 se mueve hacia la parte extracelular junto con R1293, haciendo que el segmento S4 gire ligeramente sobre su eje, se flexione y se mueva hacia la parte extracelular (véase **Figura 40b**).



**Figura 40.** Representaciones estructurales de los cambios de conformación del segmento S4 del canal de sodio. Los paneles (a) y (b) son dos representaciones estructurales tomados de la simulación (10 y 80 ns, respectivamente), las esferas en color verde son la representación del grupo fosfato de la membrana de POPC. (a) El segmento S4 mostrado en color plata muestra las posiciones en estado inactivado en el que se está formando una atracción mediante interacciones electrostáticas entre R1293 (anaranjado) y E1212 (tan); R1293 (gris) se coloca debajo de R1290 para interactuar con E1212 (tan), las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) El segmento S4 mostrado en color plata se muestra en posición activada; la posición R1290 (anaranjado) se mueve hacia la parte extracelular haciendo que E1212 (tan) interactúe con R1293 (gris) y R1296 (sandy brown).

El movimiento que del segmento S4 causa que la distancia entre R1293 (morado) y E1212 (tan) se acorta debido al movimiento de saca corcho del segmento S4 (véase **Figura 41a**). Esto permitiendo la formación del puente salino y la estabilización del segmento S4 en conformación activada, la distancia se estabiliza a unos 10 Å de distancia (véase **Figura 41b**). La fuerza de interacción promedio en este puente salino es de -27 kJ/mol (-6.45 kcal/mol)

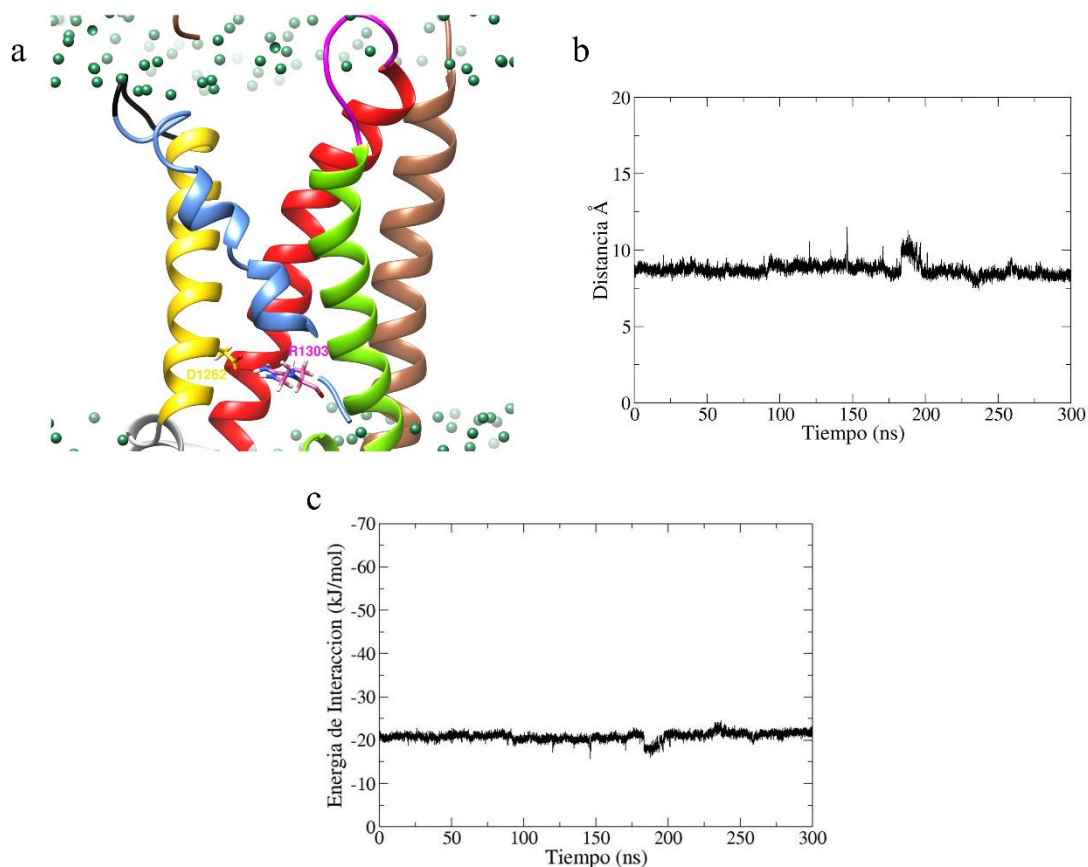
(véase **Figura 41c**), también viéndose afectada esta energía de interacción por el proceso de solvatación que sufren estos aminoácidos y teniendo su referencia de  $-71$  kJ/mol ( $-16.96$  kcal/mol) calculado mediante CCSD(t)<sup>115</sup>; siendo los cálculos de CCSD(T) realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este es el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 41.** Representación gráfica de la interacción entre R1293 (morado) –E1212 (tan). (a) Esta interacción se forma para estabiliza la posición del segmento S4, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) Esta interacción fluctúa hasta encontrar la estabilización del segmento S4 del VSD en estado activado. La menor distancia de interacción es de 4 Å a los 5 y 200 ns. (c) La energía promedio del puente salino es de  $-27$  kJ/mol.

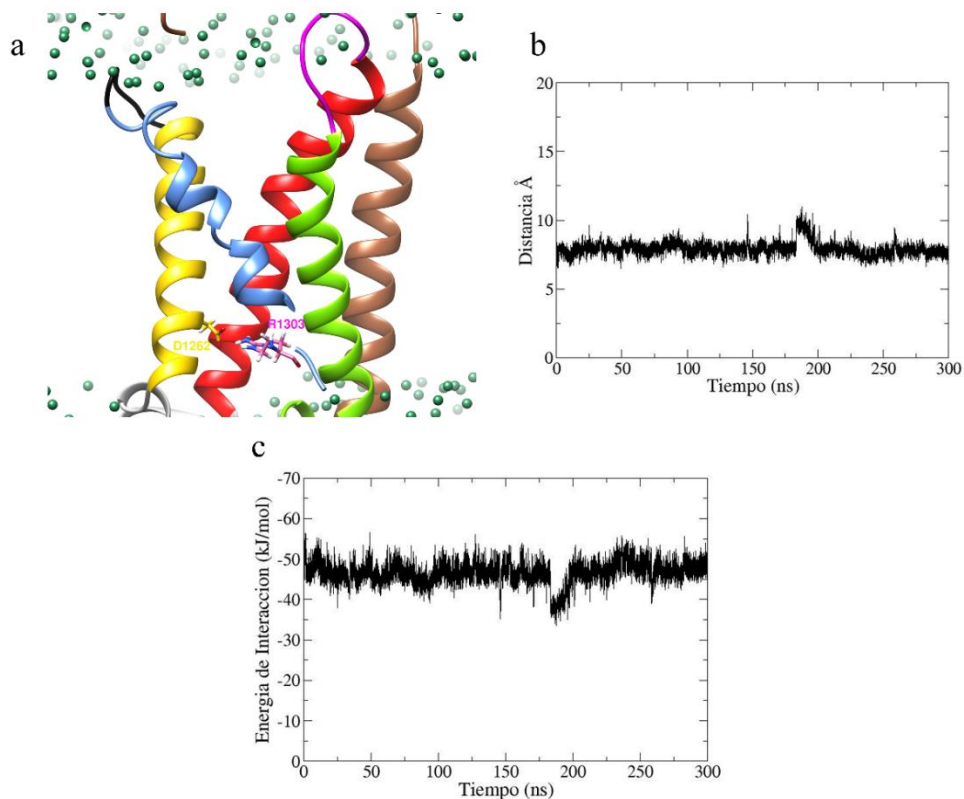
La distancia de interacción entre R1303 (beige) con E1240 (amarillo) se mantiene constante debido a que se encuentra al final de los segmentos transmembranales (véase **Figura 42a**), esta posición permite que el efecto de P1297 se vea marcado debido a que existe el movimiento de la parte superior sin perturbar a la parte inferior del segmento S4; este se

mantiene constante durante todo el tiempo de simulación (véase **Figura 42b**). La fuerza de unión promedio calculada arroja un valor de  $-20$  kJ/mol ( $-5$  kcal/mol), este valor se ve afectado ya que toman encuentra los procesos de solvatación de ambos residuos (véase **Figura 42c**) y comparándolo con la energía de interacción de  $-70$  kJ/mol ( $-16.73$  kcal/mol).



**Figura 42.** Representación gráfica de la interacción entre E1240 (amarillo) – R1303 (beige). (a) Esta interacción al llevarse a cabo al final de los segmentos transmembranales, estabiliza al segmento S4 haciendo que el efecto de “*proline kink*” se refleje para generar el movimiento de este segmento, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) Esta interacción se mantiene durante los 300 ns, mostrando una menor distancia de 7 Å a los 240 ns. (c) La energía promedio de interacción arroja un valor de  $-20$  kJ/mol durante el 90 % de la dinámica molecular.

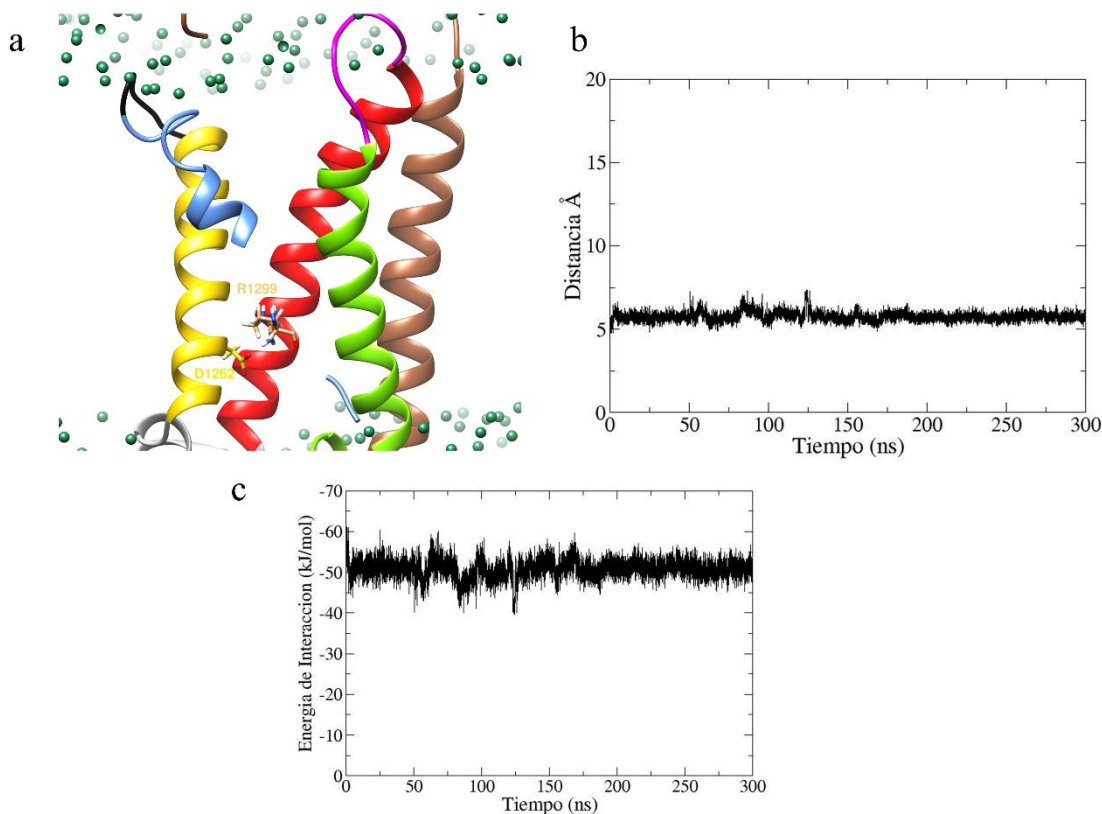
La distancia de interacción entre R1303 (fucsia) con D1262 (plata) se mantiene constante mostrando una interacción electrostática, encontrándose al final de los segmentos transmembranales (véase **Figura 43a**), esta posición permite que el efecto de P1297 se vea marcado debido a que existe el movimiento de la parte superior sin perturbar y estabilizando a la parte inferior del segmento S4; este se mantiene constante durante todo el tiempo de simulación (véase **Figura 43b**). La fuerza promedio del puente salino calculada con APBS que se forma entre estos dos aminoácidos es de  $-50$  kJ/mol ( $-11.95$  kcal/mol), y se compara con el valor de  $-70$  kJ/mol ( $-16.73$  kcal/mol) (véase **Figura 43c**) calculado mediante cálculos de química cuántica de CCSD(t); siendo los cálculos de CCSD(T) realizados mediante métodos de química cuántica y que específicamente este es el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces.



**Figura 43.** Representación gráfica de la interacción entre R1303 (fucsia) y D1262 (amarillo). (a) Esta interacción al llevarse a cabo al final de los segmentos transmembranales, estabiliza al segmento S4

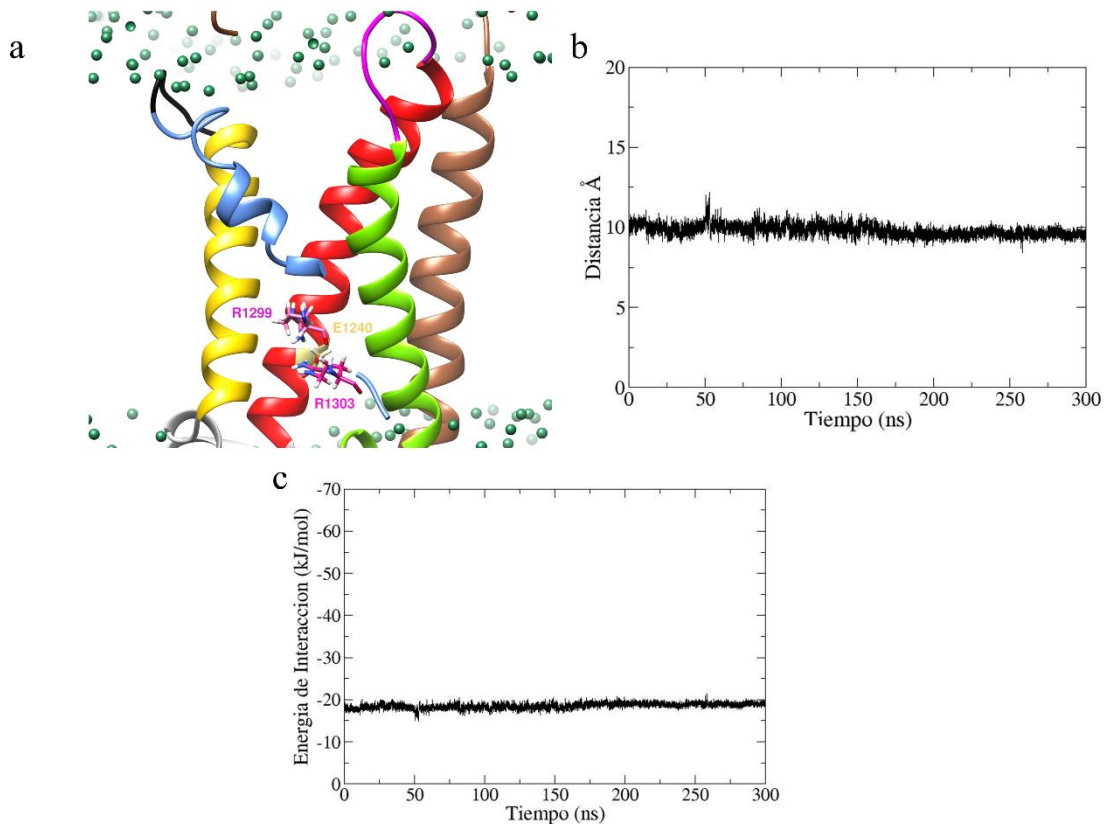
haciendo que el efecto de “*proline kink*” se refleje para generar el movimiento de este segmento, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) Esta interacción se mantiene durante los 300 ns, mostrando una menor distancia de 7 Å a los 50 ns. (c) La fuerza promedio de la energía de interacción entre ambos aminoácidos es de -50 kJ/mol.

Así mismo, la distancia de interacción entre R1299 (anaranjado) con D1262 (amarillo) interaccionan mediante energías electrostáticas; esta interacción se mantiene imperturbable debido a que se encuentra al final de los segmentos transmembranales (véase **Figura 44a**), esta posición permite que el efecto de P1297, ya que está exactamente 2 aminoácidos después y de esta manera, se ve marcada la estabilización de la parte inferior del segmento S4; este se mantiene constante durante todo el tiempo de simulación (véase **Figura 44b**). La energía promedio del puente salino en estos casos es de -50 kJ/mol (-11.95 kcal/mol) (véase **Figura 44c**), de esta manera permite que se establezca la interacción pero que sea posible el movimiento libre de los aminoácidos, este valor se puede comparar con el valor de -70 kJ/mol (-16.73 kcal/mol) calculado mediante química cuántica.<sup>115</sup>



**Figura 44.** Representación gráfica de la interacción entre D1262 – R1299. (a) Esta interacción está mostrando que interaccionan mediante un puente salino durante toda la simulación, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) La formación del puente salino se mantiene durante los 300 ns de simulación. La menor distancia de interacción es de 6 Å. (c) El puente salino tiene una fuerza de interacción promedio de -50 kJ/mol.

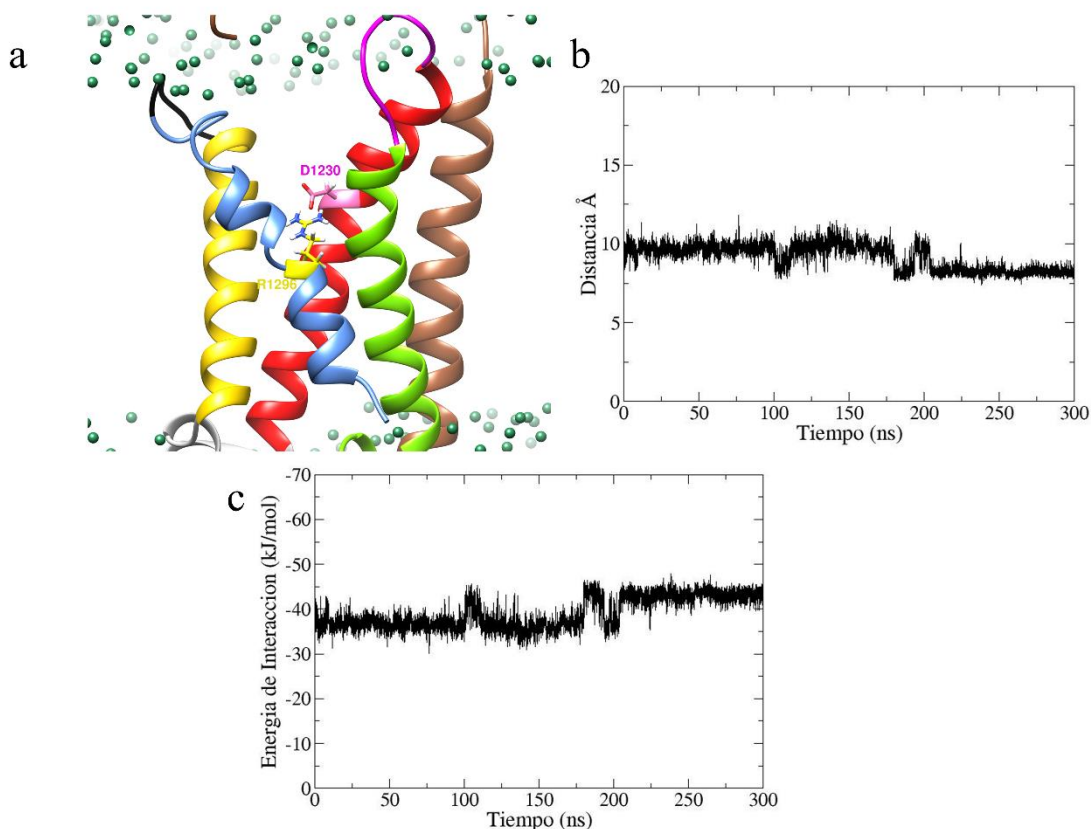
La interacción entre la distancia de interacción entre R1299 (melón) con E1240 (arena) interaccionan mediante energías electrostáticas; esta interacción también genera que por repulsión electrostática las cadenas laterales de R1293 y R1290 se muevan hacia el exterior (véase **Figura 45a**), esta posición muestra el efecto de P1297, ya que está exactamente 2 aminoácidos después y de esta manera, se ve marcada la estabilización de la parte inferior del segmento S4; este se mantiene constante durante todo el tiempo de simulación (véase **Figura 45b**). Al calcular la fuerza del puente salino, arroja un valor promedio de -18 kJ/mol (-4.3 kcal/mol) (véase **Figura 45c**) comparándose con un valor de -71 kJ/mol (-16.96 kcal/mol) calculado mediante métodos de química cuántica<sup>115</sup>.



**Figura 45.** Representación gráfica de la interacción entre E1240 (arena) – R1299 (fucsia). (a) Esta interacción se mantiene debido a fuerzas electrostáticas y permite que la cadena lateral de R1293 se mueva hacia la parte extracelular, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) La distancia de interacción se mantiene durante los primeros 150 ns de simulación; aunque posterior a este tiempo, la variación en distancias disminuye y se estabiliza esta zona. La menor distancia de interacción es a 9 Å a los 255 ns. (c) La energía promedio del puente salino que se mantiene durante toda la dinámica molecular es de -18 kJ/mol.

La interacción entre R1296 (amarillo) – D1230 (magenta) del segmento S4 demuestra el movimiento que tiene el segmento S4 hacia la parte extracelular. Debido a los movimientos que tiene los aminoácidos presenta una mayor distancia de interacción al comienzo de la simulación (véase **Figura 46a**), la estabilidad llega hasta los 200 ns (véase **Figura 46b**) de

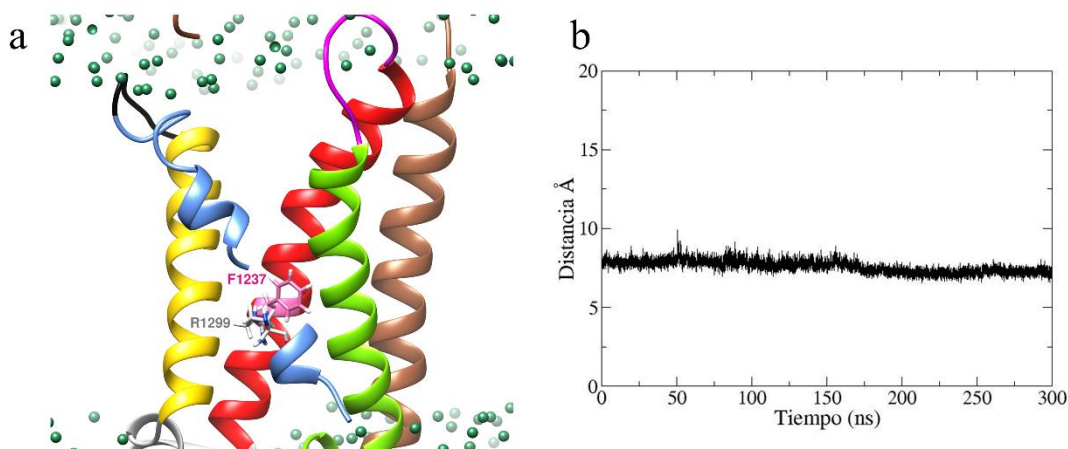
simulación debido a que existe menor repulsiones electrostáticas ya que las cadenas de R1290 y R1293 ya están estabilizadas en la parte extracelular (véase **Figura 46c**). La energía promedio de interacción para el puente salino es de  $-40$  kJ/mol ( $-9.56$  kcal/mol) en comparación con el valor de  $-50$  kJ/mol ( $-11.95$  kcal/mol) calculado mediante CCSD(T).<sup>115</sup>



**Figura 46.** Representación gráfica de la interacción entre D1230 (amarillo) – R1296 (magenta). (a) La interacción es mediante fuerzas electrostáticas es hasta la formación del puente salino debido a la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) La amplia distancia entre estos dos aminoácidos es debido a que D1230 se encuentra localizado hacia la porción extracelular. La menor distancia de interacción es de  $4$  Å a los  $180$  ns. (c) El valor de la fuerza que se presenta en el puente salino es de  $-40$  kJ/mol.

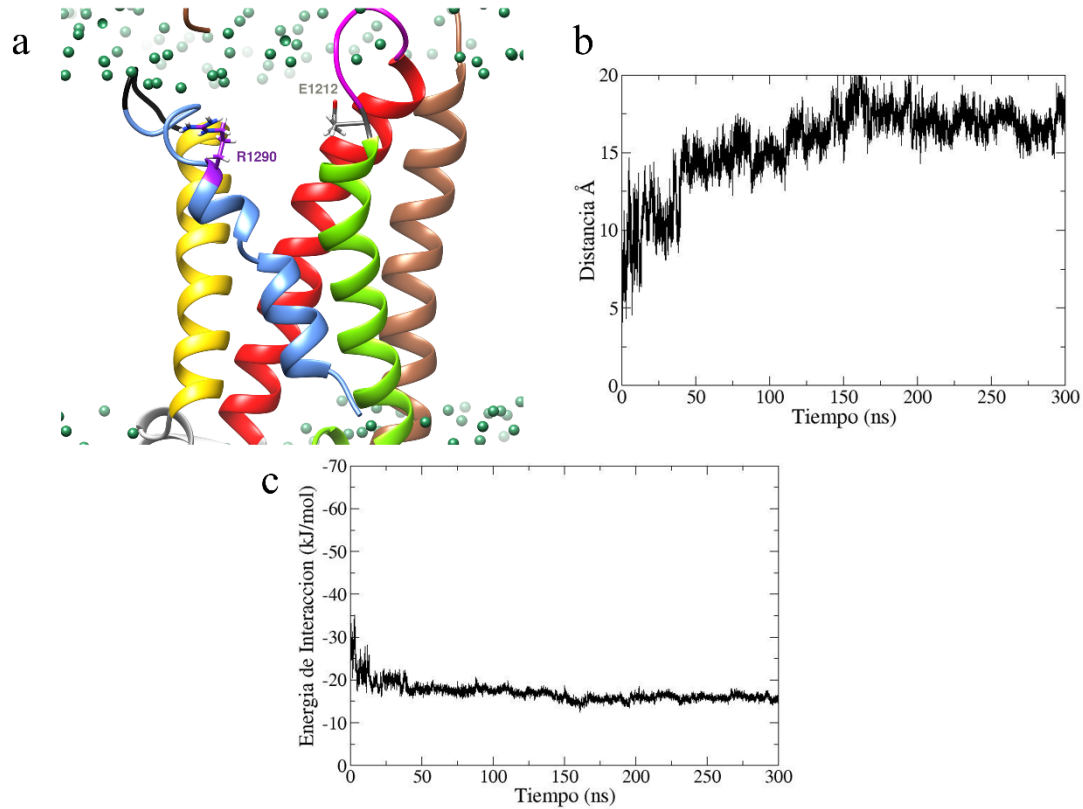
La estabilización del segmento DIII VSD presenta interacciones de tipo catión- $\pi$  de tipo *T-shape* entre aminoácidos como F1237 y R1299 (véase **Figura 47a**). Esta interacción

estabiliza la parte inferior del segmento S4 ya que en toda la simulación la distancia se mantiene a 5 Å de distancia viéndose relacionado con el efecto de “*proline-kink*” (véase **Figura 47b**).



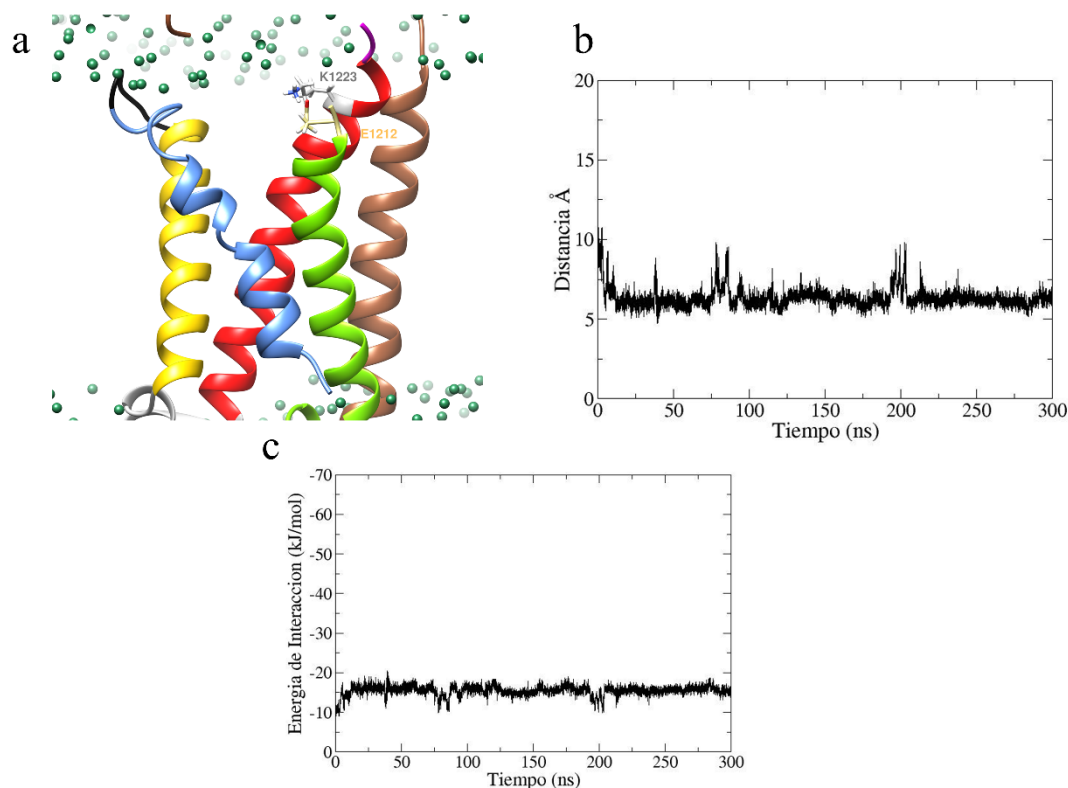
**Figura 47.** Representación gráfica de la interacción entre F1237 (magenta) – R1299 (blanco). (a) Esta interacción permite la estabilización a una distancia 5 Å; Esto es debido a que F1237 se encuentra localizado hacia la parte central del dominio DIII permitiendo la interacción con R1299, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) La distancia de interacción se mantiene en un rango de 4.5 - 5.5 Å. La menor distancia de interacción se mantiene en los 4 Å a los 200 ns.

La interacción entre R1290 (lila) – E1212 (gris oscuro) estabiliza la posición del segmento S4 en la posición inactivada, esta posición se encuentra solo al comienzo de la simulación (véase **Figura 48a**). Conforme pasa la simulación y debido a la interacción con F23 de la subunidad  $\beta 3$ , la distancia aumenta hasta perder las interacciones electrostáticas (véase **Figura 48b**). La energía electrostática promedio de interacción para este caso es de -19 kJ/mol (-4.54 kcal/mol) (véase **Figura 48c**), explicando porque en algunos momentos se estabiliza la interacción y en otros momentos se rompe para que se lleve a cabo la activación del canal.



**Figura 48.** Representación gráfica de la interacción entre E1212 (gris oscuro) -R1290 (magenta). (a) Esta interacción se rompe debido a que la cadena lateral de R1290 se mueve hacia la parte extracelular debido a la interacción con la subunidad  $\beta 3$ , las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) Cuando interacciona, permite que R1290 se mueva y aleje de E1212 hasta llegar a una distancia de 16 Å a los 300 ns. La menor distancia de interacción fue es de 7 Å situándose entre 0 - 5 ns. (c) La energía electrostática promedio de interacción es de -19 kJ/mol.

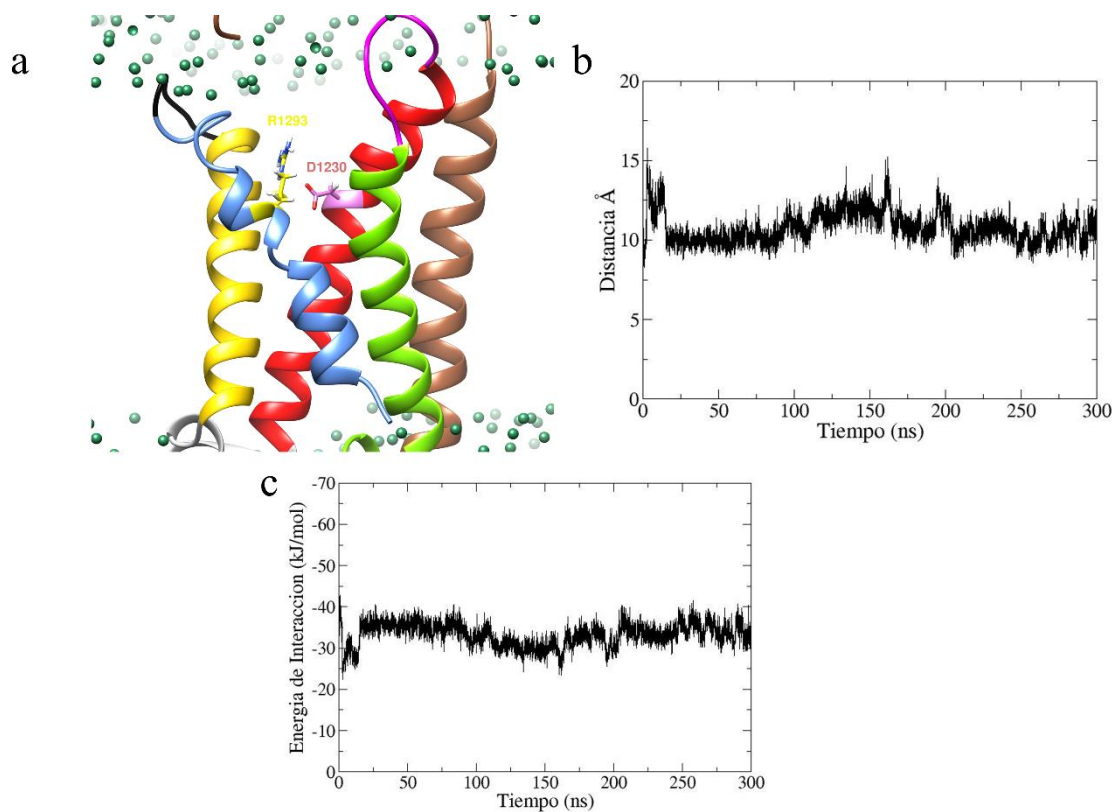
La interacción entre K1223 (gris) y E1212 (arena) permite conocer el movimiento de los segmentos S1 y S2 (véase **Figura 49a**). Las cadenas laterales al estar orientadas hacia el centro del dominio DIII y al bajo movimiento de estos segmentos transmembranales la distancia entre estos residuos se mantiene a 6 Å de distancia durante toda la simulación (véase **Figura 49b**). La energía promedio del puente salino en este caso es de -19 kJ/mol (-4.54 kcal/mol) (véase **Figura 49c**) comparándolo con su valor reportado de -38 kJ/mol (-9.08 kcal/mol).



**Figura 49.** Representación gráfica de la interacción entre E1212 (arena) – K1223 (gris oscuro). (a) Esta interacción se lleva a cabo mediante un puente salino estabilizando los segmentos S1 y S2, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) Los aumentos de distancia son causados a que K1223 se aleja por leves momentos para orientarse hacia la parte extracelular. La menor energía de interacción se es de 5 Å a los 30 (ns). (c) La energía promedio del puente salino en este caso es de -19 kJ/mol.

La interacción entre R1293 (amarillo) – D1230 (rosa) se lleva a cabo debido al movimiento del segmento S4 (véase **Figura 50a**). La distancia muestra que el aminoácido R1293 se acerca a D1230 permitiendo una interacción mediante fuerzas electrostáticas estabilizando la posición del segmento S4 en conformación activada. El elevado movimiento de la cadena lateral de R1293 al moverse hacia la porción extracelular, se solvata y se orienta hacia el residuo E1212 manteniendo una distancia de 10 Å de distancia (véase **Figura 50b**). La energía electrostática promedio de interacción es de -31 kJ/mol (-7.4 kcal/mol), comparada con el valor de -70 kJ/mol (-16.73 kcal/mol) (véase **Figura 50c**), reportada de cálculos realizados mediante CCSD(t); siendo los cálculos de CCSD(T) realizados mediante métodos

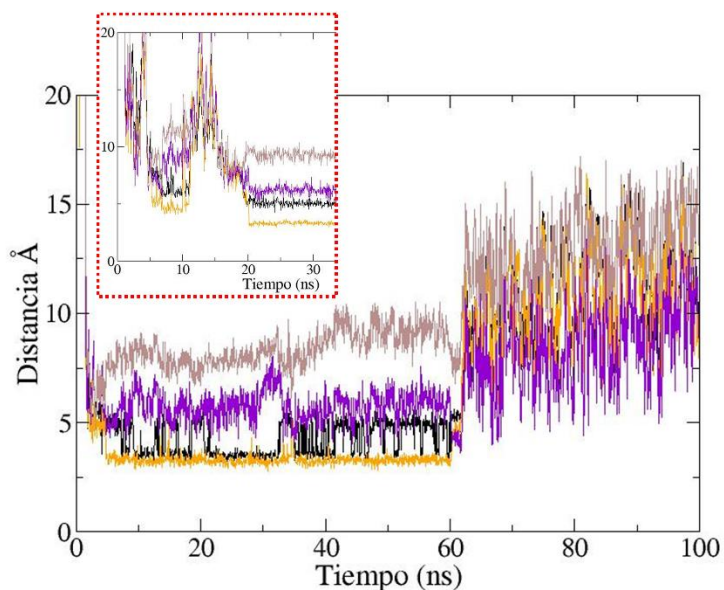
de química cuántica y que específicamente este es el método de referencia ya que permite obtener valores muy veraces. Esta zona permite que haya bastante movimiento en estas zonas de interacción.



**Figura 50.** Representación gráfica de la interacción entre D1230 (rosa) – R1293 (amarillo). (a) Esta interacción estabiliza la posición del segmento S4 en posición activada, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC. (b) La interacción es estable ya que toma una distancia durante 30-180 ns y después del movimiento de R1290 junto con la solvatación del residuo, genera que se mueva hacia la parte extracelular. La distancia es de 6 en el eje x a los 20 ns. (c) La energía electrostática promedio de interacción es de -31 kJ/mol.

La comparación de la simulación de dinámica molecular sin la subunidad  $\beta 3$  (véase **Figura 51a**) y con la subunidad  $\beta 3$  (véase **Figura 51b**) bajo las mismas condiciones, permite evidenciar el rol electrofisiológico de la subunidad  $\beta 3$  (véase **Figura 52a**). En 2013, Leadermann y colaboradores mostraron que la presencia de la subunidad  $\beta 3$  aumenta

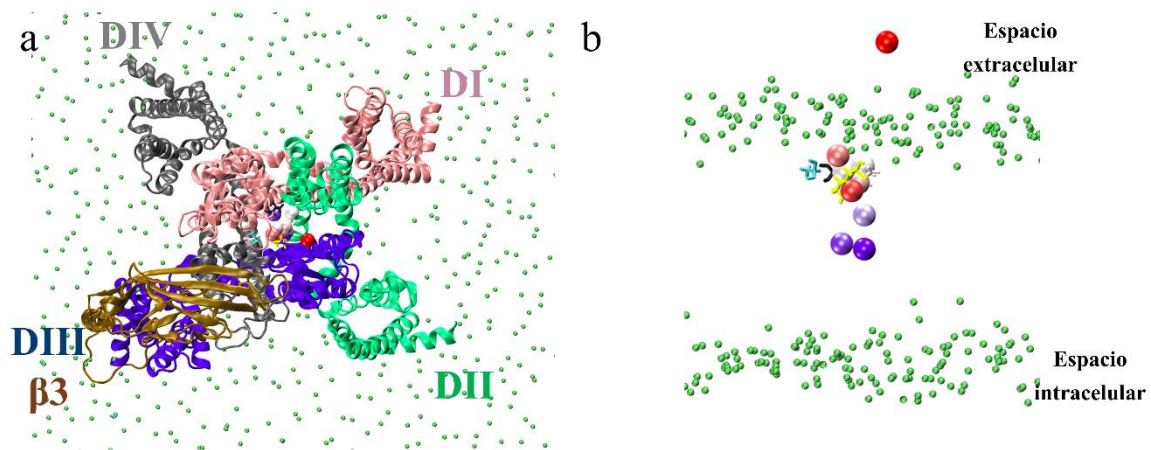
ligeramente la intensidad de corriente,<sup>12</sup> traduciéndose en un incremento en la cantidad de iones sodio acercándose al filtro de selectividad DEKA; y al paso de iones Na<sup>+</sup> a la parte interna del canal. En la simulación de dinámica molecular, se pudo observar como el ion sodio se acerca al filtro de selectividad más rápido en presencia de la subunidad  $\beta 3$  debido a que interacciona con asas de la parte extracelular, esta interacción previene que la vía del movimiento del ion sodio se vea perturbada; de esta manera, al ion sodio le toma alrededor de 30 ns el interaccionar con el aminoácido de lisina que conforma al DEKA y posteriormente pasando a la parte interna del canal. De manera contraria, cuando se realiza la simulación sin la presencia de la subunidad  $\beta 3$ , el ion sodio le toma alrededor de 20 ns el acercarse al filtro de selectividad, pero aun con 50 ns el catión sodio no alcanza a pasar por el filtro de selectividad al interior del canal. El Na<sup>+</sup> puede pasar directamente por el filtro externo debido a que su movimiento se ve restringido por la interacción con la subunidad  $\beta 3$ , permitiendo que pueda interaccionar rápidamente con el filtro de selectividad y pasar a la parte interna del canal (véase **Figura 52b**).



**Figura 51.** Gráfica de distancia del paso del catión sodio con los aminoácidos que conforman el filtro de selectividad DEKA. La gráfica muestra el tiempo de latencia para que el catión sodio se acerque y pase al interior del vestíbulo. En el cuadro rojo se muestra el movimiento del catión sodio cuando no está presente la subunidad  $\beta 3$ , aquí se muestra el movimiento de forma aleatoria ya que le toma hasta 20 ns

para poder acercarse y estabilizar su unión con el filtro de selectividad DEKA. Fuera del recuadro rojo se muestra el movimiento del catión sodio cuando se encuentra presente la subunidad  $\beta 3$ , el movimiento es más directo para acercarse y estabilizar su unión con el filtro de selectividad DEKA. La gráfica entre el catión sodio y ácido aspártico está en color café; entre el catión sodio y ácido glutámico está en color negro; entre el catión sodio y lisina está en color morado; y entre el catión sodio y alanina está en color café.

El movimiento característico del catión sodio permite el acomodo clásico de iones  $\text{Na}^+$  para pasar por el filtro de selectividad (véase **Figura 52a**). De esta manera, el sodio puede acercarse y realizar movimientos de “*flip-flop*” con la lisina que conforma el filtro de selectividad (véase **Figura 52b** a los 30 ns, el movimiento que tiene la línea morada, causada por el paso del catión  $\text{Na}^+$ , hacia adentro del vestíbulo del canal).



**Figura 52.** Representación de la trayectoria del ion  $\text{Na}^+$  en el  $\text{hNav}_v1.7$ . (a) siete posiciones se muestran, de tal manera que el ion sodio pasa por el filtro de selectividad (DEKA). (b) muestran el movimiento del ion sodio por el filtro de selectividad, los colores del ion sodio depende de la posición y tiempo en la dinámica. Mostrándose de color rojo a 0 ns hasta los 40 ns en color azul oscuro. La primera posición se encuentra a 30 Å del filtro de selectividad, se muestran los aminoácidos del DEKA (representación de *stick*: D negro, E gris, K amarillo y A cyan, las esferas en color verde son los grupos fosfato de la membrana lipídica POPC).

La subunidad  $\beta 3$  interactúa con el segmento S4 del VSD<sub>DIII</sub>. La unión no covalente en la zona transmembrana fue principalmente hidrófoba, mientras que las fuerzas que estabilizaron el sitio de unión de la subunidad  $\beta 3$  con respecto a la subunidad  $\alpha$  fueron atracciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

Curiosamente, Glass y colaboradores atribuyeron una estabilización de PPI al residuo E176 en 2020<sup>125</sup> por la formación de dos puentes de hidrógeno con H1191 y W1176 y que también se observan en la dinámica molecular. Este residuo se encuentra hacia el interior de la membrana. En este sitio, la unión se debe principalmente a enlaces de hidrógeno, además de atracciones electrostáticas, como describieron Vascon et al. también en 2020 y por su parte Janin en 1998.<sup>126,127</sup> Esta interacción impide el movimiento de la hélice transmembrana interna. Además, observamos movilidad de S4 en el dominio VSD<sub>DIII</sub> con la participación de dos pares de residuos K1287 (en  $\alpha$ ) con F23 (en  $\beta 3$ ) así como R1290 (en  $\alpha$ ) con F23 (en  $\beta 3$ ), estas interacciones muestran que el segmento S4 tiene dos partes: i) una flexible antes de P1297 y ii) una rígida después de P1297. Esta movilidad de S4 refleja la observación de Sokolov et al. en 2018 de que la subunidad  $\beta 3$  permite una recuperación más rápida del estado inactivado.<sup>11</sup> La interacción entre K1287  $\alpha$ /F23, R1290  $\alpha$ /F23 y con los CDR: K1670 en  $\alpha$ /E52 en  $\beta 3$ ; K1670 en  $\alpha$ /E53 en  $\beta 3$ ; E1672 en  $\alpha$ /R51 en  $\beta 3$ ; y W1354 en  $\alpha$ /E129 en  $\beta 3$  describe a nivel molecular el hallazgo del proceso de modulación relativo a la activación del canal de sodio, según lo informado por Laedermann et al. en 2013.<sup>50</sup> Observaron un aumento en la densidad de corriente, además de un desplazamiento de la tasa de activación hacia potenciales más hiperpolarizados de aproximadamente 3,7 mV y un desplazamiento de la velocidad media de inactivación (inactivación  $V^{1/2}$ ) hacia potenciales más despolarizados de aproximadamente 1,5 mV.<sup>50</sup>

En el contexto de la evolución de proteínas, los aminoácidos vecinos en el PPI se reconocen entre sí y confieren especificidad de unión<sup>123</sup>. Gracias a los segmentos CDR de  $\beta 3$ , la presencia de la subunidad  $\beta 3$  tiene un efecto favorable en la función de la subunidad  $\alpha$  con el poro central del canal de sodio. Por lo tanto, no es descabellado suponer que cuanto mayor sea la afinidad de los segmentos CDR por la subunidad  $\alpha$  en el PPI, mayor será el efecto electrofisiológico del canal.

Nuestro estudio aporta información sobre las interacciones entre proteínas de membrana y nuestros hallazgos contribuyen a la investigación interatómica PPI.<sup>127,128</sup> Se han realizado esfuerzos de desarrollo de fármacos en el campo de los canales de sodio dependientes de voltaje humanos, por ejemplo, con bloqueadores de canales para la isoforma Na<sub>v</sub>1.4 del músculo esquelético. Se pueden encontrar detalles de la investigación reciente sobre fármacos relacionados con el canal en una revisión fundamental.

## 10. CONCLUSIONES

Dado que el complejo  $\text{Na}_v1.7$  humano entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 3$  no se ha descrito experimentalmente a escala atómica, su modelo 3D se generó por homología a partir de tres plantillas PDB. La interfaz  $\alpha/\beta 3$  resultante, similar a la estructura cristalina, fue estudiada en detalle por MD.

Como hallazgo directo, observamos que la subunidad  $\beta 3$  interactuaba con segmentos proteicos que modulan el canal de sodio dependiente de voltaje. Se documentaron las tres interacciones más relevantes: (i) Cooperatividad global del dominio en la interfaz  $\alpha/\beta 3$ : en el área transmembrana, las interacciones presentadas proporcionan estabilidad a la interacción entre ambas proteínas. (ii) Interacción de carga con VSD en el dominio DIII: K1287 en  $\alpha/F23$  de  $\beta 3$  y R1290 en  $\alpha/F23$  de  $\beta 3$  constituyen dos pares de interacción favorable entre un segmento variable de la subunidad  $\beta 3$  similar a Ig con residuos pertenecientes al segmento S4 de la subunidad  $\alpha$ , las interacciones que debido a la zona en la que se encuentra, permite que el ion sodio pueda pasar más rápido por el filtro de selectividad. Esta perspectiva mecanicista explica cómo se mueve este segmento para permitir la modulación del canal. Como consecuencia directa, la función del canal se modifica en cuanto a la cinética (tiempo) de apertura y cierre del canal. (iii) Interacciones con regiones determinantes de complementariedad (CDR): el segmento similar a Ig interactúa a través de puentes salinos CDR1 con los aminoácidos del filtro EEDD: K1670 en  $\alpha/E52$  de  $\beta 3$ ; K1670 en  $\alpha/E53$  y E52 de  $\beta 3$ ; E1672 en  $\alpha/R51$  de  $\beta 3$ . Mientras que la interacción a través de CDR3 se produce mediante la formación de un enlace de hidrógeno entre E129 y W1354, que también pertenece al filtro EEDD en la entrada del poro. Y como último hallazgo, debido a esta interacción entre ambas subunidades, se simuló el paso del catión sodio a través del poro del canal desde la entrada extracelular hasta el vestíbulo interno, en presencia o ausencia de la proteína auxiliar  $\beta 3$ . Las diferencias calculadas concordaron perfectamente con los datos electrofisiológicos publicados. Además, se simuló el paso del catión sodio a través del poro del canal, desde la entrada extracelular hasta el vestíbulo interno, en presencia o ausencia de la proteína auxiliar  $\beta 3$ . Las diferencias calculadas coincidieron perfectamente con los datos electrofisiológicos publicados.

Nuestro estudio contribuye al campo emergente de la ciencia computacional molecular para el estudio de la PPI por MD. Para complementar nuestro estudio en estado inactivado, estudios futuros podrían simular el paso del ion sodio en estado abierto del canal.

## 11. PERSPECTIVAS

El presente estudio presenta el sitio de unión y fenómenos que surgen cuando la subunidad  $\beta 3$  se une a la subunidad  $\alpha$  del  $hNa_v1.7$ . De los cálculos prospectivos que se requiere generar posterior a este trabajo es: i) la generación de estudios de electrofisiología computacional para poder compararlo con parte de los resultados que se encuentran publicados. Este estudio permitirá conocer el voltaje que de activación/inactivación del canal y compararlo con los estudios experimentales existentes.

Para esto es necesario generar ambos sistemas: i) subunidad  $\alpha$  + membrana; y ii) subunidad  $\alpha$  + subunidad  $\beta 3$  + membrana. De esta manera se podrán comparar los dos voltajes con la parte experimental.

De la misma forma, es necesario revisar/analizar la interacción con los aminoácidos mediante la realización de mutaciones sitio dirigidas para proponer cuáles son los aminoácidos cruciales que al ser mutados posiblemente evite la unión y estabilización de la unión entre ambas subunidades.

Si buscamos más efectos que tiene este canal de sodio y a pesar de la gran cantidad de información que sobre el  $hNa_v1.7$ , aún quedan varias áreas desconocidas que necesitan de una comprensión; destacando, sus mecanismos exactos en la percepción del dolor y cambios debido a estados patológicos.

Así mismo, distinguir funciones específicas de esta isoforma: si bien  $hNa_v1.7$  se distingue de otras isoformas de los canales de sodio en tanto a su contribución al dolor, aún no se comprende completamente cómo interactúan las diferentes isoformas (que se encuentran en sistema nervioso periférico, por ejemplo,  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ , etc.) entre sí. Aún queda mucho por explorar sobre cómo opera  $hNa_v1.7$  a nivel celular y molecular en las vías del dolor.

De igual manera, al conocer la fisiopatología que se genera cuando el  $hNa_v1.7$  presenta mutaciones, la generación de inhibidores como posibles terapias: Dado que esta subunidad desempeña un papel tan importante en la sensación de dolor, sería de interés la búsqueda de inhibidores selectivos de este canal como posibles tratamientos para el dolor crónico. Sin embargo, esto requiere de una comprensión profunda de cómo funciona esta isoforma del canal, sus características específicas y su papel en varias vías del dolor. Los desafíos de la

focalización terapéutica: si bien  $Na_v1.7$  se ha convertido en un objetivo para las terapias contra el dolor crónico, el desafío radica en diseñar inhibidores específicos que no afecten a otros canales de sodio en el cuerpo, ya que esto podría provocar efectos secundarios. La mayoría de los medicamentos existentes no discriminan entre las diferentes isoformas del canal de sodio, lo que los hace menos selectivos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed.; Sinauer: Sunderland, Mass, 2001.
- (2) Goldin, A. L. Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *868*, 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11272.x>.
- (3) Goldin, A. L. Evolution of Voltage-Gated Na(+) Channels. *J. Exp. Biol.* **2002**, *205* (Pt 5), 575–584.
- (4) Ahuja, S.; Mukund, S.; Deng, L.; Khakh, K.; Chang, E.; Ho, H.; Shriver, S.; Young, C.; Lin, S.; Johnson, J. P.; Wu, P.; Li, J.; Coons, M.; Tam, C.; Brillantes, B.; Sampang, H.; Mortara, K.; Bowman, K. K.; Clark, K. R.; Estevez, A.; Xie, Z.; Verschoof, H.; Grimwood, M.; Dehnhardt, C.; Andrez, J.-C.; Focken, T.; Sutherlin, D. P.; Safina, B. S.; Starovasnik, M. A.; Ortwine, D. F.; Franke, Y.; Cohen, C. J.; Hackos, D. H.; Koth, C. M.; Payandeh, J. Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by an Isoform-Selective Small-Molecule Antagonist. *Science* **2015**, *350* (6267), aac5464. <https://doi.org/10.1126/science.aac5464>.
- (5) Catterall, W. A. Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium and Calcium Channels. *Braz J Med Biol Res* **1988**, *21* (6), 1129–1144.
- (6) Catterall, W. A. Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution: Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. *Experimental Physiology* **2014**, *99* (1), 35–51. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969>.
- (7) Patton, D. E.; West, J. W.; Catterall, W. A.; Goldin, A. L. Amino Acid Residues Required for Fast Na(+)-Channel Inactivation: Charge Neutralizations and Deletions in the III-IV Linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89* (22), 10905–10909. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10905>.
- (8) Keynes, R. D. The Kinetics of Voltage-Gated Ion Channels. *Quart. Rev. Biophys.* **1994**, *27* (4), 339–434. <https://doi.org/10.1017/S0033583500003097>.
- (9) Tao, E.; Corry, B. Characterizing Fenestration Size in Sodium Channel Subtypes and Their Accessibility to Inhibitors. *Biophysical Journal* **2022**, *121* (2), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.12.025>.
- (10) Gamal El-Din, T. M.; Lenaeus, M. J.; Zheng, N.; Catterall, W. A. Fenestrations Control Resting-State Block of a Voltage-Gated Sodium Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115* (51), 13111–13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814928115>.
- (11) Gamal El-Din, T. M.; Lenaeus, M. J. Fenestropathy of Voltage-Gated Sodium Channels. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 842645. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842645>.
- (12) Wisedchaisri, G.; Tonggu, L.; Gamal El-Din, T. M.; McCord, E.; Zheng, N.; Catterall, W. A. Structural Basis for High-Affinity Trapping of the NaV1.7 Channel in Its Resting State by Tarantula Toxin. *Mol Cell* **2021**, *81* (1), 38–48.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.039>.
- (13) Goldin, A. L.; Barchi, R. L.; Caldwell, J. H.; Hofmann, F.; Howe, J. R.; Hunter, J. C.; Kallen, R. G.; Mandel, G.; Meisler, M. H.; Netter, Y. B.; Noda, M.; Tamkun, M. M.; Waxman, S. G.; Wood, J. N.; Catterall, W. A. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* **2000**, *28* (2), 365–368. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00116-1).
- (14) Goldin, A. L. Accessory Subunits and Sodium Channel Inactivation. *Curr Opin Neurobiol* **1993**, *3* (3), 272–277. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(93\)90117-h](https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90117-h).

- (15) Catterall, W. A.; Goldin, A. L.; Waxman, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* **2005**, *57* (4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>.
- (16) Klugbauer, N.; Lacinova, L.; Flockerzi, V.; Hofmann, F. Structure and Functional Expression of a New Member of the Tetrodotoxin-Sensitive Voltage-Activated Sodium Channel Family from Human Neuroendocrine Cells. *The EMBO Journal* **1995**, *14* (6), 1084–1090. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07091.x>.
- (17) Walker, J. R.; Novick, P. A.; Parsons, W. H.; McGregor, M.; Zablocki, J.; Pande, V. S.; Du Bois, J. Marked Difference in Saxitoxin and Tetrodotoxin Affinity for the Human Nociceptive Voltage-Gated Sodium Channel (Nav1.7) [Corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (44), 18102–18107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206952109>.
- (18) Drenth, J. P. H.; Waxman, S. G. Mutations in Sodium-Channel Gene SCN9A Cause a Spectrum of Human Genetic Pain Disorders. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (12), 3603–3609. <https://doi.org/10.1172/JCI33297>.
- (19) Fertleman, C. R.; Baker, M. D.; Parker, K. A.; Moffatt, S.; Elmslie, F. V.; Abrahamsen, B.; Ostman, J.; Klugbauer, N.; Wood, J. N.; Gardiner, R. M.; Rees, M. SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes. *Neuron* **2006**, *52* (5), 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.006>.
- (20) Körner, J.; Meents, J.; Machtens, J.; Lampert, A. B1 Subunit Stabilises Sodium Channel Nav1.7 against Mechanical Stress. *The Journal of Physiology* **2018**, *596* (12), 2433–2445. <https://doi.org/10.1113/JP275905>.
- (21) Peters, C. H.; Ruben, P. C. Introduction to Sodium Channels. In *Voltage Gated Sodium Channels*; Ruben, P. C., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; Vol. 221, pp 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_1).
- (22) Farmer, C.; Cox, J. J.; Fletcher, E. V.; Woods, C. G.; Wood, J. N.; Schorge, S. Splice Variants of Nav1.7 Sodium Channels Have Distinct  $\beta$  Subunit-Dependent Biophysical Properties. *PLoS ONE* **2012**, *7* (7), e41750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041750>.
- (23) Ghovanloo, M.-R.; Peters, C. H.; Ruben, P. C. Effects of Acidosis on Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels: Nav1.1 and Nav1.3. *Channels* **2018**, *12* (1), 367–377. <https://doi.org/10.1080/19336950.2018.1539611>.
- (24) Goldin, A. L. Resurgence of Sodium Channel Research. *Annu. Rev. Physiol.* **2001**, *63* (1), 871–894. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.871>.
- (25) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (26) Emery, E. C.; Luiz, A. P.; Wood, J. N. Nav 1.7 and Other Voltage-Gated Sodium Channels as Drug Targets for Pain Relief. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2016**, *20* (8), 975–983. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1162295>.
- (27) Cummins, T. R. Electrophysiological Properties of Mutant Nav1.7 Sodium Channels in a Painful Inherited Neuropathy. *Journal of Neuroscience* **2004**, *24* (38), 8232–8236. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2695-04.2004>.
- (28) Cox, J. J.; Reimann, F.; Nicholas, A. K.; Thornton, G.; Roberts, E.; Springell, K.; Karbani, G.; Jafri, H.; Mannan, J.; Raashid, Y.; Al-Gazali, L.; Hamamy, H.; Valente, E. M.; Gorman, S.; Williams, R.; McHale, D. P.; Wood, J. N.; Gribble, F. M.; Woods, C.

- G. An SCN9A Channelopathy Causes Congenital Inability to Experience Pain. *Nature* **2006**, *444* (7121), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>.
- (29) Minett, M. S.; Falk, S.; Santana-Varela, S.; Bogdanov, Y. D.; Nassar, M. A.; Heegaard, A.-M.; Wood, J. N. Pain without Nociceptors? Nav1.7-Independent Pain Mechanisms. *Cell Reports* **2014**, *6* (2), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.033>.
- (30) Han, C.; Dib-Hajj, S. D.; Lin, Z.; Li, Y.; Eastman, E. M.; Tyrrell, L.; Cao, X.; Yang, Y.; Waxman, S. G. Early- and Late-Onset Inherited Erythromelalgia: Genotype–Phenotype Correlation. *Brain* **2009**, *132* (7), 1711–1722. <https://doi.org/10.1093/brain/awp078>.
- (31) Choi, J.-S.; Dib-Hajj, S. D.; Waxman, S. G. Inherited Erythromelalgia: Limb Pain from an S4 Charge-Neutral Na Channelopathy. *Neurology* **2006**, *67* (9), 1563–1567. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000231514.33603.1e>.
- (32) Eberhardt, M.; Nakajima, J.; Klinger, A. B.; Neacsu, C.; Hühne, K.; O’Reilly, A. O.; Kist, A. M.; Lampe, A. K.; Fischer, K.; Gibson, J.; Nau, C.; Winterpacht, A.; Lampert, A. Inherited Pain. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (4), 1971–1980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502211>.
- (33) Hameed, S. Nav 1.7 and Nav 1.8: Role in the Pathophysiology of Pain. *Mol Pain* **2019**, *15*, 1744806919858801. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>.
- (34) Singh, N. A.; Pappas, C.; Dahle, E. J.; Claes, L. R. F.; Pruess, T. H.; De Jonghe, P.; Thompson, J.; Dixon, M.; Gurnett, C.; Peiffer, A.; White, H. S.; Filloux, F.; Leppert, M. F. A Role of SCN9A in Human Epilepsies, As a Cause of Febrile Seizures and As a Potential Modifier of Dravet Syndrome. *PLoS Genet* **2009**, *5* (9), e1000649. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000649>.
- (35) Fasham, J.; Leslie, J. S.; Harrison, J. W.; Deline, J.; Williams, K. B.; Kuhl, A.; Scott Schwoerer, J.; Cross, H. E.; Crosby, A. H.; Baple, E. L. No Association between SCN9A and Monogenic Human Epilepsy Disorders. *PLoS Genet* **2020**, *16* (11), e1009161. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009161>.
- (36) Blass, B. E. Inhibitors of Nav 1.7 for the Treatment of Pain. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (4), 532–533. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00088>.
- (37) Abdel-Magid, A. F. Nav1.7 Inhibitors: Potential Effective Therapy for the Treatment of Chronic Pain. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (9), 956–957. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00312>.
- (38) McKerrall, S. J.; Sutherlin, D. P. Nav1.7 Inhibitors for the Treatment of Chronic Pain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28* (19), 3141–3149. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.08.007>.
- (39) Drenth, J. P. H.; Te Morsche, R. H. M.; Guillet, G.; Taieb, A.; Lee Kirby, R.; Jansen, J. B. M. J. SCN9A Mutations Define Primary Erythromelalgia as a Neuropathic Disorder of Voltage Gated Sodium Channels. *Journal of Investigative Dermatology* **2005**, *124* (6), 1333–1338. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23737.x>.
- (40) Michiels, J. J.; Te Morsche, R. H. M.; Jansen, J. B. M. J.; Drenth, J. P. H. Autosomal Dominant Erythromelalgia Associated With a Novel Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel  $\alpha$  Subunit Nav1.7. *Arch Neurol* **2005**, *62* (10). <https://doi.org/10.1001/archneur.62.10.1587>.
- (41) Yang, Y. Mutations in SCN9A, Encoding a Sodium Channel Alpha Subunit, in Patients with Primary Erythromelalgia. *Journal of Medical Genetics* **2004**, *41* (3), 171–174. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012153>.

- (42) Cummins, T. R.; Dib-Hajj, S. D.; Waxman, S. G. Electrophysiological Properties of Mutant Nav<sub>v</sub> 1.7 Sodium Channels in a Painful Inherited Neuropathy. *J. Neurosci.* **2004**, *24* (38), 8232–8236. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2695-04.2004>.
- (43) Harty, T. P.; Dib-Hajj, S. D.; Tyrrell, L.; Blackman, R.; Hisama, F. M.; Rose, J. B.; Waxman, S. G. Nav<sub>v</sub> 1.7 Mutant A863P in Erythromelalgia: Effects of Altered Activation and Steady-State Inactivation on Excitability of Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurosci.* **2006**, *26* (48), 12566–12575. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3424-06.2006>.
- (44) Dib-Hajj, S. D.; Cummins, T. R.; Black, J. A.; Waxman, S. G. From Genes to Pain: Nav<sub>v</sub> 1.7 and Human Pain Disorders. *Trends Neurosci* **2007**, *30* (11), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.004>.
- (45) Dib-Hajj, S. D.; Rush, A. M.; Cummins, T. R.; Hisama, F. M.; Novella, S.; Tyrrell, L.; Marshall, L.; Waxman, S. G. Gain-of-Function Mutation in Nav1.7 in Familial Erythromelalgia Induces Bursting of Sensory Neurons. *Brain* **2005**, *128* (8), 1847–1854. <https://doi.org/10.1093/brain/awh514>.
- (46) Suter, M. R.; Bhuiyan, Z. A.; Laedermann, C. J.; Kuntzer, T.; Schaller, M.; Stauffacher, M. W.; Roulet, E.; Abriel, H.; Decosterd, I.; Wider, C. P.L1612P, a Novel Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Mutation Inducing a Cold Sensitive Paroxysmal Extreme Pain Disorder. *Anesthesiology* **2015**, *122* (2), 414–423. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000476>.
- (47) Estacion, M.; Dib-Hajj, S. D.; Benke, P. J.; Te Morsche, R. H. M.; Eastman, E. M.; Macala, L. J.; Drenth, J. P. H.; Waxman, S. G. Nav<sub>v</sub> 1.7 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.* **2008**, *28* (43), 11079–11088. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3443-08.2008>.
- (48) Isom, L. Auxiliary Subunits of Voltage-Gated Ion Channels. *Neuron* **1994**, *12* (6), 1183–1194. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90436-7).
- (49) Shen, H.; Liu, D.; Wu, K.; Lei, J.; Yan, N. Structures of Human Nav<sub>v</sub> 1.7 Channel in Complex with Auxiliary Subunits and Animal Toxins. *Science* **2019**, *363* (6433), 1303–1308. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2493>.
- (50) Laedermann, C. J.; Syam, N.; Pertin, M.; Decosterd, I.; Abriel, H. B1- and B3- Voltage-Gated Sodium Channel Subunits Modulate Cell Surface Expression and Glycosylation of Nav1.7 in HEK293 Cells. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00137>.
- (51) Tan, Z.-Y.; Priest, B. T.; Krajewski, J. L.; Knopp, K. L.; Nisenbaum, E. S.; Cummins, T. R. Protein Kinase C Enhances Human Sodium Channel hNav1.7 Resurgent Currents via a Serine Residue in the Domain III-IV Linker. *FEBS Letters* **2014**, *588* (21), 3964–3969. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.011>.
- (52) Wright, K. M.; Jiang, H.; Xia, W.; Murphy, M. B.; Boronina, T. N.; Nwafor, J. N.; Kim, H.; Iheanacho, A. M.; Azurmendi, P. A.; Cole, R. N.; Cole, P. A.; Gabelli, S. B. The C-Terminal of Nav 1.7 Is Ubiquitinated by NEDD4L. *ACS Bio Med Chem Au* **2023**, *3* (6), 516–527. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.3c00031>.
- (53) Brackenbury, W. J.; Isom, L. L. Na<sup>+</sup> Channel ? Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00053>.

- (54) Brackenbury, W. J.; Isom, L. L. Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels: Potential for Beta Subunits as Therapeutic Targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, *12* (9), 1191–1203. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.9.1191>.
- (55) Kruger, L. C.; Isom, L. L. Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels: Not Just for Conduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8* (6), a029264. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029264>.
- (56) Namadurai, S.; Balasuriya, D.; Rajappa, R.; Wiemhöfer, M.; Stott, K.; Klingauf, J.; Edwardson, J. M.; Chirgadze, D. Y.; Jackson, A. P. Crystal Structure and Molecular Imaging of the Na<sub>v</sub> Channel B3 Subunit Indicates a Trimeric Assembly. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (15), 10797–10811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527994>.
- (57) Brändén, C.-I.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed.; Garland Pub: New York, 1999.
- (58) Bouza, A. A.; Isom, L. L. Voltage-Gated Sodium Channel  $\beta$  Subunits and Their Related Diseases. In *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies*; Chahine, M., Ed.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 246, pp 423–450. [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_48](https://doi.org/10.1007/164_2017_48).
- (59) Patel, F.; Brackenbury, W. J. Dual Roles of Voltage-Gated Sodium Channels in Development and Cancer. *Int. J. Dev. Biol.* **2015**, *59* (7–8–9), 357–366. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150171wb>.
- (60) Wang, P.; Yang, Q.; Wu, X.; Yang, Y.; Shi, L.; Wang, C.; Wu, G.; Xia, Y.; Yang, B.; Zhang, R.; Xu, C.; Cheng, X.; Li, S.; Zhao, Y.; Fu, F.; Liao, Y.; Fang, F.; Chen, Q.; Tu, X.; Wang, Q. K. Functional Dominant-Negative Mutation of Sodium Channel Subunit Gene SCN3B Associated with Atrial Fibrillation in a Chinese GeneID Population. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *398* (1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.042>.
- (61) Olesen, M. S.; Jespersen, T.; Nielsen, J. B.; Liang, B.; Møller, D. V.; Hedley, P.; Christiansen, M.; Varró, A.; Olesen, S.-P.; Haunsø, S.; Schmitt, N.; Svendsen, J. H. Mutations in Sodium Channel  $\beta$ -Subunit SCN3B Are Associated with Early-Onset Lone Atrial Fibrillation. *Cardiovascular Research* **2011**, *89* (4), 786–793. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq348>.
- (62) Barro-Soria, R.; Liin, S. I.; Larsson, H. P. Using Fluorescence to Understand  $\beta$  Subunit–NaV Channel Interactions. *Journal of General Physiology* **2017**, *149* (8), 757–762. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711843>.
- (63) Sokolov, M. V.; Henrich-Noack, P.; Raynoschek, C.; Franzén, B.; Larsson, O.; Main, M.; Dabrowski, M. Co-Expression of  $\beta$  Subunits with the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.7: The Importance of Subunit Association and Phosphorylation and Their Effects on Channel Pharmacology and Biophysics. *J Mol Neurosci* **2018**, *65* (2), 154–166. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1082-6>.
- (64) Debanne, D.; Mylonaki, K.; Musella, M. L.; Russier, M. Voltage-Gated Ion Channels in Epilepsies: Circuit Dysfunctions and Treatments. *Trends in Pharmacological Sciences* **2024**, *45* (11), 1018–1032. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2024.09.004>.
- (65) Hu, D.; Barajas-Martinez, H.; Burashnikov, E.; Springer, M.; Wu, Y.; Varro, A.; Pfeiffer, R.; Koopmann, T. T.; Cordeiro, J. M.; Guerchicoff, A.; Pollevick, G. D.; Antzelevitch, C. A Mutation in the B3 Subunit of the Cardiac Sodium Channel Associated With Brugada ECG Phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* **2009**, *2* (3), 270–278. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.829192>.

- (66) Catterall, W. A. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. *Neuron* **2000**, *26* (1), 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2).
- (67) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- (68) Sievers, F.; Higgins, D. G. Clustal Omega. *CP in Bioinformatics* **2014**, *48* (1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>.
- (69) Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- (70) Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J. T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment 1 Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *302* (1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
- (71) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **2011**, *7* (1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- (72) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23* (21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- (73) Grossi, R.; Iliopoulos, C. S.; Mercas, R.; Pisanti, N.; Pissis, S. P.; Retha, A.; Vayani, F. Circular Sequence Comparison: Algorithms and Applications. *Algorithms Mol Biol* **2016**, *11* (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13015-016-0076-6>.
- (74) Wang, C.; Lefkowitz, E. J. Genomic Multiple Sequence Alignments: Refinement Using a Genetic Algorithm. *BMC Bioinformatics* **2005**, *6* (1), 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-200>.
- (75) Washburn, A. J.; Wheeler, W. C. Efficient Implied Alignment. *BMC Bioinformatics* **2020**, *21* (1), 296. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03595-2>.
- (76) Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.-Y.; Pieper, U.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* **2006**, *Chapter* 5, Unit-5.6. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15>.
- (77) Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* **2016**, *54*, 5.6.1–5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- (78) Fiser, A.; Do, R. K.; Sali, A. Modeling of Loops in Protein Structures. *Protein Sci.* **2000**, *9* (9), 1753–1773. <https://doi.org/10.1110/ps.9.9.1753>.
- (79) Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- (80) Waterhouse, A. M.; Studer, G.; Robin, X.; Bienert, S.; Tauriello, G.; Schwede, T. The Structure Assessment Web Server: For Proteins, Complexes and More. *Nucleic Acids Res* **2024**, *52* (W1), W318–W323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae270>.
- (81) Alford, R. F.; Leaver-Fay, A.; Jeliazkov, J. R.; O’Meara, M. J.; DiMaio, F. P.; Park, H.; Shapovalov, M. V.; Renfrew, P. D.; Mulligan, V. K.; Kappel, K.; Labonte, J. W.; Pacella,

- M. S.; Bonneau, R.; Bradley, P.; Dunbrack, R. L.; Das, R.; Baker, D.; Kuhlman, B.; Kortemme, T.; Gray, J. J. The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. *J Chem Theory Comput* **2017**, *13* (6), 3031–3048. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00125>.
- (82) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem* **2010**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (83) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.;Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (84) Yan, Y.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B.; Huang, S.-Y. HDOCK: A Web Server for Protein–Protein and Protein–DNA/RNA Docking Based on a Hybrid Strategy. *Nucleic Acids Research* **2017**, *45* (W1), W365–W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>.
- (85) Honorato RV; Trellet ME; Jiménez-García B; Schaarschmidt JJ; Giulini M; Reys V; Koukos PI; Rodrigues JPGLM; Karaka E; van Zundert GCP; Roel-Touris J; van Noort CW; Jandavá Z; Melquiond ASJ; Bovin AMJJ. The HADDOCK2.4 Web Server: A Leap Forward in Integrative Modelling of Biomolecular Complexes. *Nature Prot* **2024**, In Press.
- (86) McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins. *Nature* **1977**, *267* (5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>.
- (87) Pierce, B. G.; Wiehe, K.; Hwang, H.; Kim, B.-H.; Vreven, T.; Weng, Z. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. *Bioinformatics* **2014**, *30* (12), 1771–1773. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>.
- (88) Meller, J. Molecular Dynamics. In *Encyclopedia of Life Sciences*; Wiley, 2001. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003048>.
- (89) Lozano-Aponte, J.; Scior, T. ¿Qué Sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [En Línea]* **2014**, *45* (1), 88–86.
- (90) Lindahl; Abraham; Hess; Spoel, V. D. GROMACS 2021.4 Source Code, 2021. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5636567>.
- (91) Sievers, F.; Higgins, D. G. Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences. *Protein Science* **2018**, *27* (1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- (92) Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA – An Open Platform to Develop Chemo-Bio-Informatics Applications, Using Plug-in Architecture and Script Programming. *J Comput Aided Mol Des* **2004**, *18* (3), 167–173. <https://doi.org/10.1023/B:JCAM.0000035186.90683.f2>.
- (93) Huang, G.; Wu, Q.; Li, Z.; Jin, X.; Huang, X.; Wu, T.; Pan, X.; Yan, N. Unwinding and Spiral Sliding of S4 and Domain Rotation of VSD during the Electromechanical Coupling in Na<sub>v</sub> 1.7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (33), e2209164119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209164119>.
- (94) Wang, C.; Chung, B. C.; Yan, H.; Wang, H.-G.; Lee, S.-Y.; Pitt, G. S. Structural Analyses of Ca<sup>2+</sup>/CaM Interaction with NaV Channel C-Termini Reveal Mechanisms of Calcium-Dependent Regulation. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 4896. <https://doi.org/10.1038/ncomms5896>.

- (95) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (96) The PyMOL Molecular Graphics System. <http://pymol.sourceforge.net/faq.html#:~:text=How%20does%20one%20cite%20PyMOL,1.2r3pre%2C%20Schrödinger%2C%20LLC>.
- (97) Studer, G.; Rempfer, C.; Waterhouse, A. M.; Gumienny, R.; Haas, J.; Schwede, T. QMEANDisCo—Distance Constraints Applied on Model Quality Estimation. *Bioinformatics* **2020**, *36* (6), 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>.
- (98) Studer, G.; Biasini, M.; Schwede, T. Assessing the Local Structural Quality of Transmembrane Protein Models Using Statistical Potentials (QMEANBrane). *Bioinformatics* **2014**, *30* (17), i505-511. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu457>.
- (99) Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models. *Bioinformatics* **2011**, *27* (3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.
- (100) Lindahl; Abraham; Hess; Spoel, V. D. GROMACS 2021.4 Manual. **2021**. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5636522>.
- (101) Johansson, M. U.; Zoete, V.; Michielin, O.; Guex, N. Defining and Searching for Structural Motifs Using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13* (1), 173. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-173>.
- (102) Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An Environment for Comparative Protein Modeling. *Electrophoresis* **1997**, *18* (15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.
- (103) Yan Y; Zhang D; Wang X; Huang SY. Addressing recent docking challenges: A hybrid strategy to integrate template-based and free protein-protein docking. *Proteins* **85**, 497–512.
- (104) Honorato RV; Koukos PI; Jiménez-García B; Tsaregorodtsev A; Verlatto M; Giachetti A; Rosato ASJ; Bovin AMJJ. Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Frontiers Mol Biosci* **2021**, *8*.
- (105) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem* **2009**, *30* (10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- (106) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (107) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD,

- GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- (108) Lomize, M. A.; Pogozheva, I. D.; Joo, H.; Mosberg, H. I.; Lomize, A. L. OPM Database and PPM Web Server: Resources for Positioning of Proteins in Membranes. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40* (D1), D370–D376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr703>.
- (109) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14* (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- (110) Turner PJ. XMGRACE, Version 5.1.19, 2005.
- (111) Arnittali, M.; Rissanou, A. N.; Harmandaris, V. Structure Of Biomolecules Through Molecular Dynamics Simulations. *Procedia Computer Science* **2019**, *156*, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.08.181>.
- (112) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson-Boltzmann Electrostatics Calculations. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32* (Web Server), W665–W667. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>.
- (113) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. Electrostatics of Nanosystems: Application to Microtubules and the Ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>.
- (114) Zhu, W.; Voelker, T. L.; Varga, Z.; Schubert, A. R.; Nerbonne, J. M.; Silva, J. R. Mechanisms of Noncovalent  $\beta$  Subunit Regulation of NaV Channel Gating. *Journal of General Physiology* **2017**, *149* (8), 813–831. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711802>.
- (115) Xie, N.-Z.; Du, Q.-S.; Li, J.-X.; Huang, R.-B. Exploring Strong Interactions in Proteins with Quantum Chemistry and Examples of Their Applications in Drug Design. *PLoS ONE* **2015**, *10* (9), e0137113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137113>.
- (116) Herschlag, D.; Pinney, M. M. Hydrogen Bonds: Simple after All? *Biochemistry* **2018**, *57* (24), 3338–3352. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00217>.
- (117) Guerra, F.; Siemers, M.; Mielack, C.; Bondar, A.-N. Dynamics of Long-Distance Hydrogen-Bond Networks in Photosystem II. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (17), 4625–4641. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00649>.
- (118) Deng, J.-H.; Luo, J.; Mao, Y.-L.; Lai, S.; Gong, Y.-N.; Zhong, D.-C.; Lu, T.-B.  $\pi$ - $\pi$  Stacking Interactions: Non-Negligible Forces for Stabilizing Porous Supramolecular Frameworks. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (2), eaax9976. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax9976>.
- (119) Visiers, I.; Braunheim, B. B.; Weinstein, H. Prokink: A Protocol for Numerical Evaluation of Helix Distortions by Proline. *Protein Engineering, Design and Selection* **2000**, *13* (9), 603–606. <https://doi.org/10.1093/protein/13.9.603>.
- (120) Wilman, H. R.; Shi, J.; Deane, C. M. Helix Kinks Are Equally Prevalent in Soluble and Membrane Proteins. *Proteins* **2014**, *82* (9), 1960–1970. <https://doi.org/10.1002/prot.24550>.
- (121) Jacob, J.; Duchlohier, H.; Cafiso, D. S. The Role of Proline and Glycine in Determining the Backbone Flexibility of a Channel-Forming Peptide. *Biophysical Journal* **1999**, *76* (3), 1367–1376. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77298-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77298-X).
- (122) Ghadimi, M.; Khalifeh, K.; Heshmati, E. Neighbor Effect and Local Conformation in Protein Structures. *Amino Acids* **2017**, *49* (9), 1641–1646. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2463-9>.

- (123) Xia, X.; Xie, Z. Protein Structure, Neighbor Effect, and a New Index of Amino Acid Dissimilarities. *Molecular Biology and Evolution* **2002**, *19* (1), 58–67. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003982>.
- (124) Schmidt, T.; Situ, A. J.; Ulmer, T. S. Structural and Thermodynamic Basis of Proline-Induced Transmembrane Complex Stabilization. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 29809. <https://doi.org/10.1038/srep29809>.
- (125) Glass, W. G.; Duncan, A. L.; Biggin, P. C. Computational Investigation of Voltage-Gated Sodium Channel B3 Subunit Dynamics. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 40. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00040>.
- (126) Vascon, F.; Gasparotto, M.; Giacomello, M.; Cendron, L.; Bergantino, E.; Filippini, F.; Righetto, I. Protein Electrostatics: From Computational and Structural Analysis to Discovery of Functional Fingerprints and Biotechnological Design. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2020**, *18*, 1774–1789. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.029>.
- (127) Janin, J.; Miller, S.; Chothia, C. Surface, Subunit Interfaces and Interior of Oligomeric Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1988**, *204* (1), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90606-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90606-7).
- (128) Chakrabarti, P.; Janin, J. Dissecting Protein–Protein Recognition Sites. *Proteins* **2002**, *47* (3), 334–343. <https://doi.org/10.1002/prot.10085>.

## 13. PUBLICACIÓN

<https://doi.org/10.1007/s00894-025-06378-9>

Journal of Molecular Modeling (2025) 31:168  
<https://doi.org/10.1007/s00894-025-06378-9>

ORIGINAL PAPER



### The $\alpha/\beta$ complex of human voltage-gated sodium channel hNa<sub>v</sub>1.7 to study mechanistic differences in presence and absence of auxiliary subunit $\beta$ 3

Jordan Edilberto Ruiz-Castelan<sup>1</sup> · Fernando Villa-Díaz<sup>2</sup> · María Eugenia Castro<sup>3</sup> · Francisco J. Melendez<sup>4</sup> · Thomas Scior<sup>1</sup>

Received: 3 December 2024 / Accepted: 25 April 2025 / Published online: 21 May 2025  
© The Author(s) 2025

#### Abstract

**Context** In the context of structural interactomics, we generated a 3D model between  $\alpha$  and  $\beta$ 3 subunits for the hitherto unknown human voltage-gated sodium channel complex (hNa<sub>v</sub>1.7 $\alpha/\beta$ 3). We embedded our 3D model in a membrane lipid bilayer for molecular dynamics (MD) simulations of the sodium cation passage from the outer vestibule through the inner pore segment of our hNa<sub>v</sub>1.7 complex in presence and absence of auxiliary subunit  $\beta$ 3 with remarkable changes close to electrophysiological study results. A complete passage could not be expected due to because the inactivated state of the underlying 3D template. A complete sodium ion passage would require an open state of the channel. The computed observations concerning side chain rearrangements for favorable cooperativity under evolutionary neighborhood conditions, favorable and unfavorable amino acid interactions, proline kink, loop, and helix displacements were all found in excellent keeping with the extant literature without any exception nor contradiction. Complex-stabilizing pairs of interacting amino acids with evolutionary neighborhood complementary were identified.

**Methods** The following tools were used: sequence search and alignment by FASTA and Clustal Omega; 3D model visualization and homology modeling by Vega ZZ, SPDBV, Chimera and Modeller, respectively; missing sections (loops) by AlphaFold; geometry optimization prior to MD runs by GROMACS 2021.4 under the CHARMM 36 force field; local healing of bad contacts by SPDBV based on its Ramachandran plots; protein-protein docking by HDOCK 2.4; membrane insertion assisted by OPM; Berendsen V-rescaling for NVT; Parrinello-Rahman and Nose-Hoover for MPPT; MD analyses by VMD and XMGRACE

**Keywords** Sodium channel hNa<sub>v</sub>1.7 · Molecular dynamics simulations · Molecular docking · Three-dimensional model · Protein–protein interfaces

#### Introduction

The human voltage-gated sodium channel (hNa<sub>v</sub>) is subdivided into nine channel subtypes by their alpha ( $\alpha$ ) subunit (hNa<sub>v</sub> 1.1 to 1.9). In the case of our target channel hNa<sub>v</sub>1.7, small organic compounds have been reported which modify its gating kinetics [1]. The channel constitutes a multi-subunit complex, and its presence in the cell membrane is required for vital electrophysiological Na<sup>+</sup> influx and depolarization processes [2–4]. While the central membrane-spanning  $\alpha$  subunit comprises the pore, the beta ( $\beta$ ) subunit behaves also as a channel activity modulator. The central unit is formed by four domains (DI–DIV) and each domain is made up of six transmembrane segments (S1–S6). The manner of distribution/folding allows the VSD voltage-sensing domains to form and be made up of the S1–S4 segments

✉ Francisco J. Melendez  
francisco.melendez@correo.buap.mx

✉ Thomas Scior  
thomas.scior@correo.buap.mx

<sup>1</sup> Laboratory of Computational Molecular Simulations, Faculty of Chemical Sciences, BUAP, C.P. 72570 Puebla, Mexico

<sup>2</sup> Laboratory of Basical Science, Tecnológico Nacional de México, Campus Guaymas, C.P. 85480 Sonora, Mexico

<sup>3</sup> Center of Chemistry, Sciences Institute, BUAP, C.P. 72570 Puebla, Mexico

<sup>4</sup> Laboratory of Theoretical Chemistry, Faculty of Chemical Sciences, BUAP, C.P. 72570 Puebla, Mexico