



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Química-Instituto de Ciencias**



Posgrado en Ciencias Químicas

**Investigación del canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1:
implicaciones en trastornos neurológicos**

Tesis presentada para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
EN EL ÁREA DE FISICOQUÍMICA**

**PRESENTA:
Q.C. DAVID GARCÍA GÓMEZ**

Dirección:

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dra. Norma A. Caballero Concha

H. Puebla de Zaragoza a Junio 2023.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con el número de becario No. (CVU): 1107336, para la realización de la Maestría en Ciencias Químicas durante el periodo Enero 2021-Diciembre 2022.



Así mismo agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por los apoyos otorgados.



Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México por los servicios de supercómputo que permitió el desarrollo de este proyecto.



También deseo expresar mi completo agradecimiento al Dr. José Manuel Pérez Aguilar, y la Dra. Norma Angelica Caballero Concha, directores de este proyecto, por sus aportaciones a mi formación académica, así como los demás integrantes del comité tutorial: Dr. Francisco Javier Meléndez, Dra. María Eugenia Castro Sánchez, Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán. Y el Dr. Julián Yunes. Finamente agradezco al Dr. Ulises Meza por la información relacionada con las mutaciones en el canal de calcio.

OFICIO DE APROBACION DE LA COMISION REVISORA



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. María Eugenia Castro Sánchez, Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante, Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán y el Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada “**Investigación del canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1: implicaciones en trastornos neurológicos**”, que presenta el alumno **David García Gómez** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los treinta días del mes de mayo del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas

Dedicatoria

A mis padres, maestros, amigos y todos aquellos que estuvieron en el proceso.

Gracias.

RESUMEN

En la actualidad los trastornos neurológicos, en específico las enfermedades neuromusculares son un problema de salud mundial debido a la discapacidad motriz que ocasiona. Algunos de estas enfermedades están ligadas a alteraciones en los canales iónicos, quienes son responsables de procesos fisiológicos importantes como la homeostasis celular, la contractibilidad, excitabilidad neuronal entre otros. Las canalopatías son estas alteraciones genéticas o adquiridas que modifican la función normal de estos canales iónicos provocando una ganancia o disminución sus funciones biológicas.

En particular, las canalopatías del canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1 son producto de mutaciones de uno o varios residuos de aminoácidos, dando como resultado a pacientes con migraña hemipléjica familiar tipo I, ataxia episódica tipo II y ataxia espinocerebelosa tipo VI. Para este proyecto de investigación se estudia al canal de calcio Cav2.1 implicados en trastornos neurológicos desde un enfoque fisicoquímico y con apoyo de herramientas computacionales que nos permita entender las diferencias estructurales y las interacciones moleculares que ocurren en el Cav2.1 silvestre y el Cav2.1 que presenta mutaciones implicadas en estos trastornos neurológicos. Por lo anterior, se ha obtenido la estructura terciaria del canal y se ha equilibrado estructuralmente en un ambiente fisiológico a través de la técnica de simulaciones de dinámica molecular.

Palabras clave: Canal de calcio, Cav2.1, Mutaciones, Ataxia, Dinámica molecular.

Índice General

Lista de figuras		XII
Lista de tablas		XIII
Capítulo I. Marco teórico		1
1.1 Canales de calcio dependientes de voltaje		2
1.2 Estructura de los Ca _v		5
1.3 Canal de calcio tipo P/Q: Ca _v 2.1		7
1.4 Importancia clínica: Canalopatías del Ca _v 2.1		8
1.4.1 Migraña hemipléjica familiar tipo I		9
1.4.2 Ataxia episódica tipo II		10
1.4.3 Ataxia espinocerebelosa tipo VI		11
1.5 Fundamentos teóricos de las simulaciones de dinámica molecular		12
1.5.1 Simulaciones de dinámica molecular		13
1.5.2 Algoritmo de la dinámica molecular		13
Hipótesis		17
Objetivos.		18
Capítulo II. Metodología.		19
2.1 Preparación del sistema		19
2.2 Simulaciones de dinámica molecular		20
2.3 Mutaciones puntuales en el canal Ca _v 2.1		21
2.4 Análisis de datos		21
Capítulo III. Discusión de resultados		22
Capítulo IV. Conclusión		31
Bibliografía		33

Lista de Figuras

1	Estructura de la membrana plasmática.	1
2	Representación estructural de los canales de calcio dependientes de voltaje. A) Se muestra la posición de las subunidades. En la subunidad $\alpha 2$ se ilustra sus IV dominios con sus segmentos (S1-S6). B) Representación de la organización de los cuatro dominios de los Ca_v para formar el poro.	6
3	A) Representación de la estructura de una neurona y su sinapsis. B) Gráfica e ilustración del potencial de acción.	8
4	Representación de las interacciones moleculares en un campo de fuerza. A) Interacciones de enlace. B) Interacciones de no enlace.	15
5	Diagrama de flujo de los pasos en una simulación de dinámica molecular.	16
6	Representación del sistema $Ca_v 2.1$ de Homo sapiens. La estructura tridimensional del canal de calcio $Ca_v 2.1$ es mostrada utilizando un gradiente de colores que va del segmento N-terminal (azul) al C-terminal (rojo) como se indica. En el panel izquierdo se muestra una vista lateral del canal mientras que en el derecho una vista extracelular. En esta última vista se puede observar tanto la locación del poro del canal en la parte central como la posición de los 4 dominios.	22
7	Contenido de la estructura secundaria del canal de calcio $Ca_v 2$. Además de mostrar la estructura secundaria del canal, también se muestran los segmentos donde se localizan los puentes de disulfuro en la región extracelular.	23
8	Estructura inicial del sistema $Ca_v 2.1$, en un medio fisiológico. Vista lateral del sistema donde se observa la bicapa lipídica (café) hidratada con moléculas de agua. Por claridad, no se muestran los iones de cloro y sodio que están presentes.	25
9	Gráfica RMSD del sistema de $Ca_v 2.1$ a lo largo de la simulación de dinámica molecular.	26
10	Posiciones en el $Ca_v 2.1$ donde existen mutaciones que alteran la función del canal. Tres posiciones en la estructura del canal son indicadas, V176 (dominio I), I1338 (dominio III) y R1672 (dominio IV). En ciertos trastornos neurológicos, mutaciones en dichas posiciones se han caracterizado y asociado con alteraciones en la función normal del canal $Ca_v 2.1$.	27
11	Posición de las tres mutaciones en el canal $Ca_v 2.1$. Se introdujeron tres mutaciones en el sistema $Ca_v 2.1$ para ser evaluadas utilizando métodos computacionales. El residuo original es mostrado como esferas mientras que la mutación es mostrada en representación de “sticks”.	28
12	Resultados parciales del comportamiento cualitativo de las mutaciones V176M, I1338T y R1672C.	29

Lista de Tablas

1	Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.	4
2	Clasificación de las 10 isoformas de la subunidad α_1 .	5
3	Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Migraña hemipléjica familiar tipo I.	10
4	Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Ataxia episódica tipo II.	11
5	Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Ataxia espinocerebelosa tipo VI.	12

Marco teórico.

La membrana celular funciona como una barrera semipermeable altamente selectiva entre el espacio externo de la célula y el citoplasma. Esta barrera biológica está compuesta en su mayoría por lípidos y proteínas cuya relación porcentual lípidos-proteínas es relativa según su papel fisiológico (ver **Figura 1**). Los lípidos que conforman la membrana celular, fosfolípidos y glucolípidos, son anfipáticos. Esto implica que las partes hidrofóbicas interactúan entre ellas mismas y las regiones hidrofílicas interactúa con las moléculas de agua presentes en el líquido extracelular y el citosol, por lo que el empalme consecutivo y organizado de estos lípidos crean la bicapa lipídica. Por otra parte, existen 3 tipos de proteínas de membrana dependiendo de la función que realizan: proteínas periféricas, proteínas anfitrópicas y proteínas integrales de membrana, también llamadas proteínas de transmembrana, que son dentro de las que se engloban a los canales iónicos (Kalappurakkal and Mayor 2020; Krahn 2020).

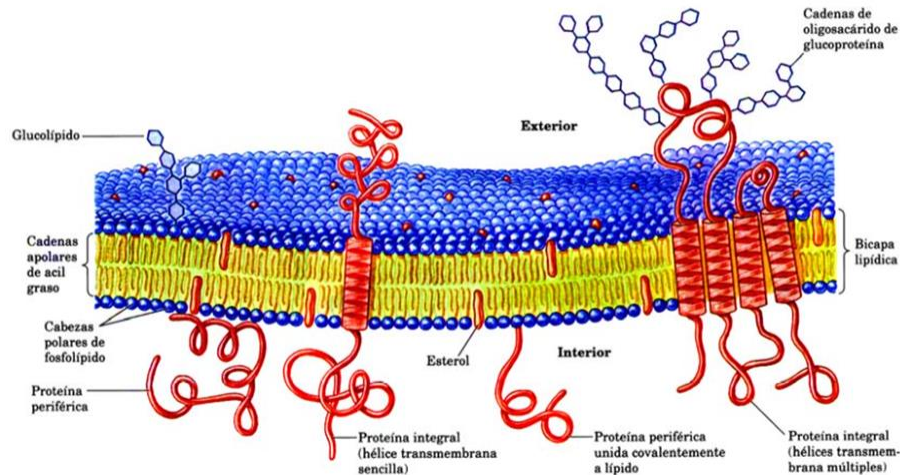


Figura 1. Estructura de la membrana plasmática.

Los canales iónicos son un conjunto de complejas proteínas que forman un poro que atraviesa toda la bicapa lipídica permitiendo el flujo de iones selectivos del medio extracelular al citosol y viceversa, mecanismo necesario para regular la mayoría de los procesos fisiológicos. (Renard and Byrne 2021; Tarun et al. 2019).

Existen distintos tipos de canales iónicos, por lo que se han propuesto diferentes formas de clasificarlos. Por ejemplo, se pueden clasificar en relación con la selectividad del transporte iónico y así tener: canales de sodio, potasio, calcio y cloro. Otra clasificación es en función de su tipo de compuerta, en otras palabras, la forma en que son activados. De esta manera se tienen: (I) Canales activados por receptores (ROC), donde la apertura de estos canales se realiza gracias a la unión específica de receptor-ligando, por ejemplo, los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y los receptores de rianodina (RYR); (II) Canales iónicos activados por un receptor potencial transitorio (TRP) los cuales responden a estímulos físicos (modificación en la temperatura y dimensiones de la membrana) y químicos (ósmosis, pH, hormonas); por último, (III) Canales activados por voltaje, donde cambios en la polarización de la membrana permiten el flujo de iones selectivos (Strickland et al. 2019; Shi et al. 2020).

En cualquier caso, los canales iónicos en estado basal permanecen cerrados, impidiendo el flujo de iones a través del poro, su activación de estos canales es bajo ciertos estímulos particulares propios de cada canal iónico, generando cambios conformacionales que le permite abrir paso y posibilitar el transporte de iones.

1.1 Canales de calcio dependientes de voltaje.

Dentro de los canales de iones, los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) son proteínas de transmembrana presentes en células excitables funcionando como un segundo mensajero universal, que actúan a partir del cambio del potencial de membrana desencadenando diversas funciones fisiológicas como la liberación hormonal, la transcripción genética, transmisión sináptica, la contracción celular y muscular, las funciones sensoriales, liberación de neurotransmisores y la apoptosis (Andrade et al. 2019; Hering et al. 2018).

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav), se encuentra conformado por tres subfamilias los $Cav1$, $Cav2$ y $Cav3$. Los $Cav1$ son denominados canales de calcio tipo L, los $Cav2$ tienen 4 tipos de canales de calcio, de tipo P/Q, N y R, ambas subfamilias $Cav1$ y $Cav2$ pertenecen a los canales de calcio activados por alto voltaje. La subfamilia $Cav3$ es de tipo T, estos tipos de canales de calcio son activados por bajo voltaje (ver Tabla 1), (Carbone and Mori 2020).

Los canales de calcio tipo L (LTCC) comprende 4 isoformas del canal de calcio Cav1, nombradas como Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4 diferenciadas según su distribución en el cuerpo humano y sus actividades fisiológicas, como la secreción hormonal, regulación genética y contracción muscular. Este tipo de canales requiere una fuerte despolarización para su activación manteniéndose activadas por mayor tiempo en comparación con otro tipo de Cav. Las secuencias de aminoácidos de los LTCC muestran un 80% de similitud entre ellos (Kalyaanamoorthy 2018).

La subfamilia Cav2 también requiere una fuerte despolarización de la membrana para su activación, pero su inactivación es rápida. El Cav2 está conformada por 4 tipo de canales de calcio, el Cav tipo P/Q y N pertenece a las isoformas Cav2.1 y Cav2.2 respectivamente, expresándose exclusivamente en neuronas centrales y periféricas quien cumple funciones en la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), (Dong et al. 2021; Jurkovicova-tarabova and Lacinova 2019). El Cav tipo R pertenece a la isoforma Cav2.3 el cual se expresa en el SNC y SNP, el sistema endocrino y cardiovascular. Dentro de sus funciones, el Cav2.3 participa en la plasticidad presináptica, liberación de neurotransmisores, mielogénesis y control del dolor (Wormuth et al. 2016; Schneider et al. 2020).

Los canales de calcio tipo T (TTCC) son canales activados por bajo voltaje (alrededor de -60 mV) capaces de desactivarse en cuestión de milisegundos. Los TTCC se encuentra formado por 3 isoformas diferentes: Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3, localizadas en regiones específicas del sistema nervioso, neuroendocrino y cardiovascular (Leresche and Lambert 2017; Weiss and Zamponi 2019; Rangel-Galván et al. 2021).

Tabla 1. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Proteína	Tipo de canal	Nombre del Gen / Cromosoma humano	Tejidos primarios.	Función fisiológica.
Ca _v 1.1	L (Activados por alto voltaje)	CACNA1S 1q31-32	Musculo esquelético.	Excitación y contracción en musculo esquelético. Regulación de transcripción
Ca _v 1.2		CACNA1C 12p13.3	Cerebro, musculo liso, hipófisis, islotes pancreáticos, medula suprarrenal, ganglios simpáticos y sensoriales y sistema cardiaco.	Excitación y contracción en musculo cardiaco y liso. Regulación de transcripción. Secreción endocrina. Regulación en actividad enzimática.
Ca _v 1.3		CACNA1D 3p14.3	Corazón, islotes pancreáticos, retina, riñón, ovario, cóclea y cerebro.	Marcapasos cardiaco. Secreción endocrina. Transducción auditiva.
Ca _v 1.4		CACNA1F Xp11.23	Retina (fotoreceptores).	transducción visual.
Ca _v 2.1	P/Q (Activados por alto voltaje)	CACNA1A 19p13	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	Liberación de neurotransmisores.
Ca _v 2.2	N (Activados por alto voltaje)	CACNA1B 9q34	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	Liberación de neurotransmisores.
Ca _v 2.3	R (Activados por alto voltaje)	CACNA1E 1q25-31	Cerebro, hipófisis, páncreas, testículos, sistema gastrointestinal y corazón.	Liberación de neurotransmisores.
Ca _v 3.1	T (Activados por bajo voltaje)	CACNA1G 17q22	Cerebro, corazón, sistema inmunológico, huesos, páncreas, ovarios y testículos.	Marcapasos y disparos repetitivos.
Ca _v 3.2		CACNA1H 16p13.3	Cerebro, corazón, riñón e hígado.	Marcapasos y disparos repetitivos.
Ca _v 3.3		CACNA1I 22q12.3-13-2	Cerebro, glándula suprarrenal, bazo, tiroides e intestino delgado.	Marcapasos y disparos repetitivos.

1.2 Estructura de los Cav.

La familia Cav comparte la misma estructura general, constituida por 4 subunidades: α_1 , β , $\alpha_2\delta$ y γ (ver **Figura 2**). La subunidad α_1 es una glicoproteína con masa molecular de 212 kilodalton (kDa), que se conforma por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno con seis hélices transmembranales (S1-S6). La región que forma el poro está dada por los segmentos S5-S6 de cada dominio, mientras que la activación dependiente de voltaje está regulada por los segmentos S4 de cada dominio. El segmento S4 tiene cargas positivas altamente conservadas con la capacidad de responder a cambios en el potencial de membrana. La subunidad α_1 tiene 10 isoformas diferentes que caracterizan a cada miembro de la familia Cav (Ver Tabla 2). (Catterall and Swanson 2015; Lozano Jiménez and Sánchez Mora 2020).

Tabla 2. Clasificación de las 10 isoformas de la subunidad α_1 .

Canal de calcio	Isoformas de la subunidad α_1
Ca _v 1.1	α_1S
Ca _v 1.2	α_1C
Ca _v 1.3	α_1D
Ca _v 1.4	α_1F
Ca _v 2.1	α_1A
Ca _v 2.2	α_1B
Ca _v 2.3	α_1E
Ca _v 3.1	α_1G
Ca _v 3.2	α_1H
Ca _v 3.3	α_1I

A pesar de que las subunidades auxiliares (β , $\alpha_2\delta$ y γ) de los Cav no juegan un papel directo en la formación del poro selectivo de Ca, actúan para aumentar la expresión de los canales funcionales en la membrana plasmática y para influir en la biofísica y en propiedades de modulación dependientes del mensajero (Tyson and Snutch 2013).

Las diversas subunidades β (β_1 - β_4), son proteínas de naturaleza hidrofóbica de 50-78 kDa. A esta subunidad se le atribuyen las propiedades cinéticas relacionadas a la activación y desactivación de la compuerta del canal, aunque su mecanismo de interacción con α_1 para regular este proceso, aún no es bien conocido. Se conoce que la interacción de estas dos subunidades muestra alta afinidad, interactuando el loop intracelular entre los dominios I-II de

los Ca_v1 y Ca_v2 de la subunidad α_1 (Dolphin 2016; Lozano Jiménez and Sánchez Mora 2020; Buraei and Yang 2010).

La subunidad $\alpha_2\delta$ es una glicoproteína transmembranal constituida por la subunidad α_2 de 143 kDa y δ de 27 kDa. α_2 y δ se encuentran unidas por puentes disulfuro formados por varias cisteínas de ambas proteínas. La subunidad $\alpha_2\delta$ puede ser importante para la estimulación del canal en la activación y desactivación dependientes del cambio de voltaje y en la modulación de la cinética de inactivación (Klugbauer, Marais, and Hofmann 2003; Buraei and Yang 2010; Davies et al. 2010).

La subunidad γ ($\gamma1$ $\gamma8$) es una glicoproteína de 30 kDa que posee 4 segmentos transmembrana. Algunas subunidades γ se relacionan con propiedades biofísicas y con la modulación en el tráfico de los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA), un tipo de receptor ionotrópico de glutamato localizados en la membrana postsináptica y en la membrana dendrítica, que permite la transmisión sináptica química rápida entre neuronas. Esta subunidad puede ser sólo relevante para algunos miembros de la familia Ca_v dependiendo completamente de la célula (Tyson and Snutch 2013; Caicoya 2016).

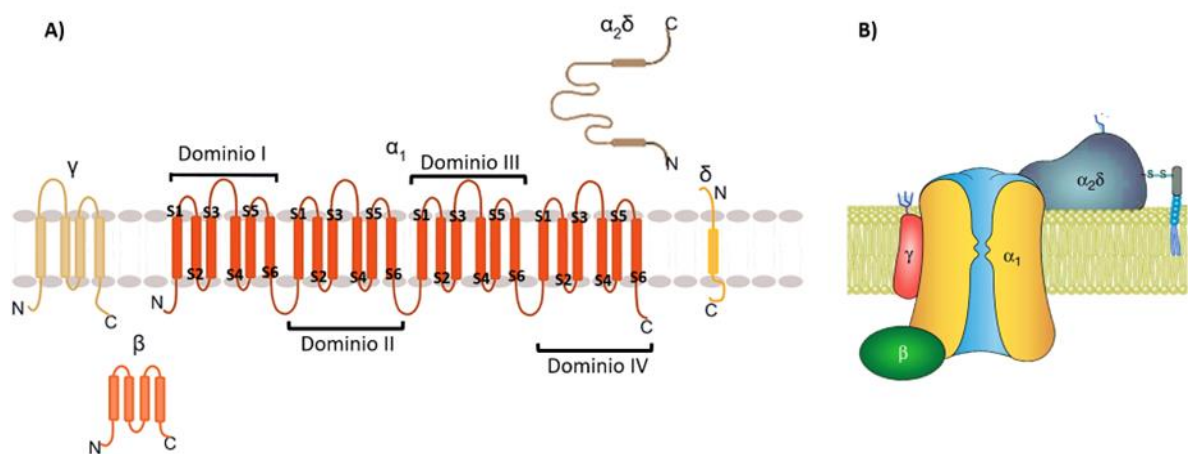


Figura 2. Representación estructural de los canales de calcio dependientes de voltaje. A) Se muestra la posición de las subunidades. En la subunidad α_2 se ilustra sus IV dominios con sus segmentos (S1-S6). B) Representación de la organización de los cuatro dominios de los Ca_v para formar el poro.

1.3 Canal de calcio tipo P/Q: Cav2.1

Desde el punto de vista de la histología, la corteza estructural del cerebelo está dividida por 3 regiones (de la región más externa a la más profunda): zona molecular, zona de células de Purkinje y la zona de células granulares. Específicamente en las terminales presinápticas y membranas somatodendríticas de estas dos últimas células neuronales, células de Purkinje y células granulares, se encuentran presentes los canales de calcio de tipo P/Q (Cav 2.1) (Popa, Streng, and Ebner 2019; Oda et al. 2010).

El Ca^{2+} neuronal esta estrictamente regulado por la subfamilia Ca_v 2, sin embargo, el Ca_v 2.1 es el canal de calcio que se encuentra con mayor porcentaje y el más competente para desencadenar la liberación sincrónica a partir del potencial de acción en la mayoría de las sinapsis centrales (Goral et al. 2019). El potencial de acción neuronal permite codificar y transmitir información desde el soma (cuerpo celular) hasta la terminal presináptica por medio del axón. Este potencial es una secuencia rápida de cambios a partir del potencial de membrana. El potencial de membrana se origina en la neurona postsináptica, para que su voltaje se modifique se abren varios canales iónicos regulados o activados por receptores, que permiten que fluyan a favor de su gradiente electroquímico. El potencial de membrana es de intensidad variable, por lo tanto; debe ser lo suficientemente fuerte para poder activar los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) localizados en la parte posterior del segmento inicial del axón (Stojilkovic and Bertram 2010).

Existen tres etapas fundamentales en la activación del potencial de acción: despolarización, repolarización e hiperpolarización. La despolarización es el cambio en el potencial de membrana (de -60 mV a 30 mV), este paso dura aproximadamente 1 ms, tiempo suficiente para que los Na_v localizados en el axón se abran produciendo una mayor despolarización de la membrana. La repolarización es un retorno al potencial de reposo, comienza cuando se abren los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) para permitir la salida de los iones de potasio fuera de la célula. Los K_v tienen una cinética lenta y permanecen abiertos un poco más para que la célula vuelva al voltaje de membrana en reposo. La breve caída del potencial de membrana por debajo del voltaje de reposo normal se denomina hiperpolarización, con la finalidad de obtener un

ligero rebasamiento de la repolarización. (ver **Figura 3**), (Emmenegger et al. 2019; Scarnati et al. 2020; Iosub et al. 2015).

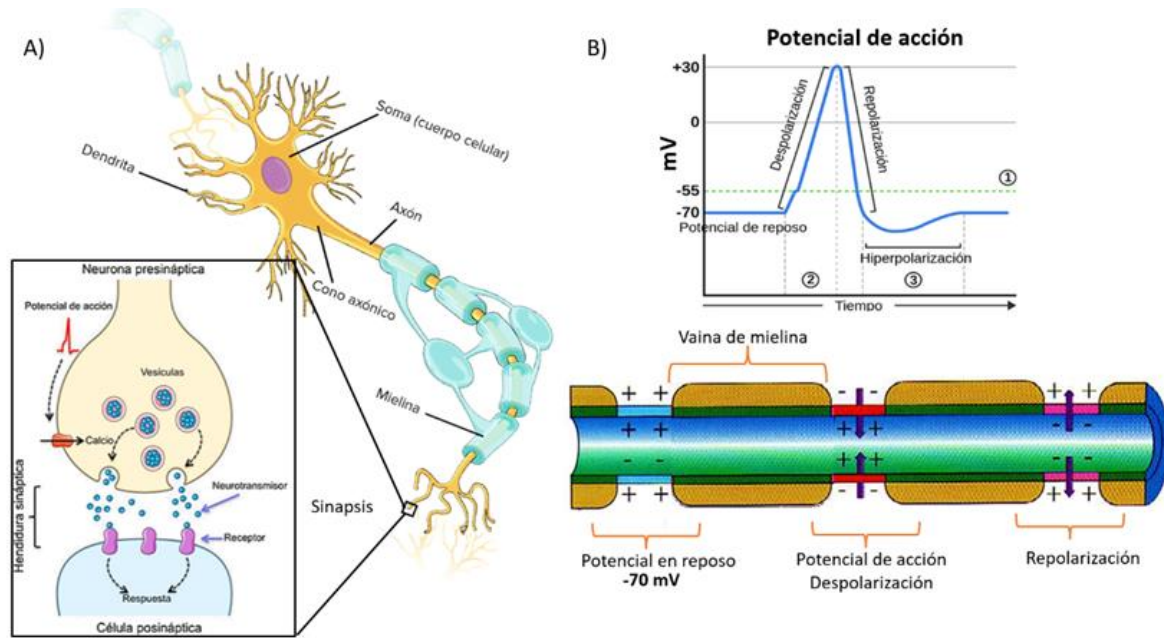


Figura 3. A) Representación de la estructura de una neurona y su sinapsis. Se observa la estructura y partes de una neurona, así como el proceso de sinapsis (cuadro inferior izquierdo). En la sinapsis, el potencial de acción llega a la neurona presináptica, el cambio de voltaje permite activar a los $Ca_v2.1$, el ingreso de Ca^{2+} modula la liberación de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores en la hendidura sináptica que serán captadas por receptores de la célula postsináptica. B) Gráfica e ilustración del potencial de acción. Se observa la gráfica del potencial de acción y sus distintas fases, además, se señala: 1) el umbral de excitación, 2) el aumento de Na^+ intracelular y 3) el aumento del K^+ extracelular.

1.4 Importancia clínica: Canalopatías del $Ca_v2.1$.

Las canalopatías son enfermedades producto de alteraciones anormales en los canales iónicos ya sea de tipo adquirido o genético, siendo este último el más frecuente. Actualmente se conocen más de 30 trastornos provocados por canalopatías, que pueden ser clasificadas dependiendo el canal iónico (canales de calcio, sodio, potasio, y cloruro) o por el órgano afectado (canalopatías del músculo esquelético y las canalopatías del sistema nervioso central). (Jarzembowski 2014; Bernard and Shevell 2008).

Los canales de calcio dependientes de voltaje son importantes en distintos procesos fisiológicos como la contracción muscular, liberación de neurotransmisores, regulación de la expresión genética y de ciertas enzimas. Por lo anterior, mutaciones que ocurren en los genes de los Ca_v alteran la activación y/o su función de estos canales, que conducen en consecuencia a varios estados patológicos llamados canalopatías de calcio, afectando cualquier tejido excitable, incluyendo neuronas, músculo esquelético y cardíaco (Jarzembowski 2014; Andrade et al. 2019).

En particular, las canalopatías del $Ca_v2.1$ son mutaciones en la subunidad α_1A donde ocurren ciertas mutaciones que alteran la función normal del canal, si la mutación genera una ganancia en la función de estos canales se presentan pacientes con migraña hemipléjica familiar tipo I, en contraste; una pérdida en su función se observan pacientes con ataxia episódica tipo II y ataxia epinocerebelosa tipo VI (Gupta, Gupta, and Gupta 2013).

1.4.1 Migraña hemipléjica familiar tipo I

Los canales $Ca_v2.1$ se expresan en todas las estructuras cerebrales implicadas en la patogenia de la migraña, incluida la corteza cerebral, los ganglios del trigémino y los núcleos del tronco encefálico involucrados en el control central de la nocicepción (Inchauspe et al. 2015).

La migraña hemipléjica familiar tipo I (FHM-I, por sus siglas en inglés) es un subtipo de migraña autosómica dominante. La FHM es resultado de mutaciones (ver **Tabla 3**) en el gen *CACNA1A* que codifica la subunidad α_1 del $Ca_v2.1$. Se caracteriza por un aura de hemiplejía y al menos otro síntoma de aura como hemianopsia (pérdida parcial o total del campo visual), déficit de procesamiento sensorial y afasia (Adams et al. 2009; Terpollili et al. 2022).

La gravedad de los síntomas está relacionada con los residuos aminoacídicos mutados, por ejemplo, en pacientes que portan mutaciones R192-Q192 solo presentan migraña hemipléjica, por otra parte; pacientes con mutaciones en S218-L218 poseen síntomas adicionales como ataxia cerebelosa y convulsiones (Terpollili et al. 2022).

Tabla 3. Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Migraña hemipléjica familiar tipo I.

Posición	Nativo	Mutación
192	R	Q
195	R	K
218	S	L
582	R	Q
665	T	M
713	V	A
714	D	E
1334	K	E
1345	R	Q
1383	Y	C
1455	V	L
1666	R	W
1682	W	R

1.4.2 Ataxia episódica tipo II

La ataxia episódica tipo II (EA-2, por sus siglas en inglés) es un trastorno neurológico hereditario autosómico recesivo, causada por mutaciones en CACNA1A en la subunidad formadora del poro del Ca_v2.1 en el cromosoma 19p13 (ver Tabla 4). La EA-2 es el subtipo más común de ataxias episódicas, en la mayoría de los casos su inicio suele presentarse durante la segunda década de vida, caracterizada por ataques paroxísticos de ataxia y disfunción cerebelosa progresiva en etapas avanzadas. Dentro de los síntomas más comunes de la EA-2 se encuentran episodios de ataxia, vértigo, nistagmo, vómito, migraña y náuseas con duración de minutos, horas o hasta de 2 a 3 días. Algunos factores que desencadenan estos episodios suelen ser el estrés emocional, el esfuerzo, la cafeína y el alcohol (Nachbauer et al. 2014; Strupp, Zwergal, and Brandt 2007).

Tabla 4. Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Ataxia episódica tipo II.

Posición	Nativo	Mutación
248	Y	C
253	H	Y
256	C	R
287	C	Y
293	G	R
389	L	F
500	T	M
637	G	D
665	T	M
797	M	T
896	P	R
1402	F	C
1481	G	R
1489	F	S
1660	R	H
1678	R	C
1735	H	L
1868	C	R
2134	R	C

1.4.3 Ataxia espinocerebelosa tipo VI

La ataxia espinocerebelosa (SCA, por sus siglas en inglés) es autosómica dominante que genera trastornos neurodegenerativos caracterizados por falta de coordinación motora progresiva, y en algunos casos con ataxia. La ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6) es un tipo de ataxia cerebelosa pura, resultado de mutaciones (ver Tabla 5) y la repetición del trinucleótido CAG el axón 47 de gen CACNA1A que codifica la subunidad α_1A ($Ca_v2.1$) (Solodkin and Gomez 2012; Teaford 2020).

La SCA6 es considerada un trastorno de inicio tardío (a partir de la cuarta y quinta década). El inicio de los síntomas son inestabilidad en la marcha, tropiezos y desequilibrio en aproximadamente el 90% de los casos. Los pacientes pueden notar primero el problema al bajar escaleras, andar en terrenos irregulares o en la oscuridad, correr o realizar otras actividades que

requieran un mayor equilibrio. SCA6 es un trastorno neurodegenerativo progresivo con presencia de disartria, desequilibrio, ataxia de la marcha e incoordinación de miembros superiores. Estudios neuropatológicos han reportado que el avance de este trastorno ocasiona pérdida de las células de Purkinje en el cerebelo y atrofia cortico-cerebelosa (Solodkin and Gomez 2012; Teaford 2020; Al-Shaikh et al. 2020).

Tabla 5. Residuos aminoacídicos mutados del canal de calcio tipo P/Q que causan Ataxia espinocerebelosa tipo 6.

Posición	Nativo	Mutación
293	G	R
405	A	T
582	R	Q
1337	D	Y
1663	R	Q

1.5 Fundamentos teóricos de las simulaciones de dinámica molecular.

Durante las últimas décadas se han estudiado los cambios conformacionales y el plegamiento de proteínas estructurales asociadas a múltiples enfermedades incluidas el cáncer, alteraciones metabólicas como la diabetes, así como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Por lo anterior, el uso de métodos computacionales clásicos en sistemas biológicos ha permitido investigar sistemas dinámicos de diferente complejidad y a diversas escalas, convirtiéndose en una importante herramienta en la investigación y tomando mayor interés en diversas disciplinas como la química, bioquímica, ciencia de materiales, nanociencia, entre otras (Krylov et al. 2018; Jeanquartier et al. 2016).

Estas técnicas computacionales proporcionan información sobre interacciones y mecanismos subyacentes que a menudo son inalcanzables experimentalmente. Además, permiten realizar predicciones, racionalizar los resultados experimentales, probar modelos físicos y comprender las diversas propiedades del sistema de estudio (Wan et al. 2020).

Los métodos computacionales en sistemas biológicos tienen dos objetivos en particular, el primero es el descubrimiento de conocimiento, a partir de la gran cantidad de datos experimentales permitiendo formar hipótesis; y el segundo, es el análisis basado en simulación,

que prueba hipótesis con experimentos *in silico*, proporcionando predicciones para que en un futuro puedan ser probadas por estudios *in vitro* e *in vivo* (Kitano 2002).

1.5.1 Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) en proteínas son un método que permite estudiar aspectos de la dinámica y función de las proteínas. Para su uso se necesita una estructura inicial, muchas de estas estructuras ya fueron determinadas experimentalmente a través de métodos como la cristalografía de rayos X. Las estructuras ya determinadas son depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés). Sin embargo, cuando aún no ha sido posible la obtención de la estructura experimentalmente, es necesario predecir la estructura de la proteína a partir de su secuencia de aminoácidos (Geng et al. 2019).

El método más utilizado para la predicción estructural terciaria de las proteínas es el modelado basado en plantillas, donde se incluye el modelado por homología. Este método se basa en obtener la estructura de una proteína (llamada objetivo) mediante la alineación de una o varias plantillas disponibles homólogas en el PDB. La eficacia de la predicción recae en las características de las proteínas y con ello en la selección de las estructuras resueltas con alto porcentaje de similitud con el objetivo. Sea cualquiera de los casos para la obtención de la estructura terciaria de la proteína (su estructura resulta o por modelado basado en plantillas), la estructura obtenida es una estructura estática en su estado más bajo de energía libre, por lo que se recurre a la dinámica molecular para encontrar una conformación adecuada con relación a las condiciones fisiológicas establecidas (Wu and Xu 2021; Zhang and Shen 2020).

1.5.2 Algoritmos de la dinámica molecular.

El algoritmo que existe detrás de las simulaciones de dinámica molecular está dado por las leyes del movimiento de Newton para predecir la posición de cada átomo en función del tiempo (Ecuación 1). En otras palabras, se calculan repetidamente las fuerzas de cada átomo a través del tiempo y luego se usan esas fuerzas para actualizar la posición y velocidad de cada átomo.

$$m_{\alpha} \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{total}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N), \alpha = 1, 2, \dots, N \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde m_α es la masa del átomo α , \mathbf{r}_α es su posición, y U_{total} es la energía potencial total que depende de todas las posiciones atómicas \mathbf{r}_i y, por lo tanto, acopla el movimiento de los átomos.

Las fuerzas en una simulación dinámica molecular se calculan utilizando un modelo conocido como campo de fuerza de mecánica molecular, como por ejemplo AMBER, CHARMM y GROMOS, entre otros. Dicho campo de fuerza es fundamental para la confiabilidad de la simulación de dinámica molecular ya que posee la energía potencial en términos de interacciones enlazantes como no enlazadas (Ecuación 2). La energía potencial, representada a través del campo de fuerza en la dinámica molecular, es la parte más crucial de la simulación, ya que debe representar fielmente la interacción entre los átomos y, al mismo tiempo, presentarse en forma de una función matemática simple que se pueda calcular rápidamente (Phillips et al. 2016; Scott A. Hollingsworth and Ron O. Dror 2018; Duan et al. 2019).

$$U_{total} = U_{enlace} + U_{ángulo} + U_{diedro} + U_{vdW} + U_{Coulomb} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde los primeros tres términos son las interacciones enlazadas y las dos últimas son las interacciones no enlazadas del sistema. Por una parte, en las interacciones enlazadas, la U_{enlace} hace referencia a los enlaces covalentes, la $U_{ángulo}$ son los ángulos entre cada par de enlace covalente que comparten un solo átomo en el vértice y la U_{diedro} describe los pares de átomos separados exactamente por tres enlaces covalentes, el enlace central presenta el ángulo de torsión. Por último, en las interacciones no enlazadas la U_{vdW} y la $U_{coulumb}$ corresponden a las fuerzas de van de Waal y las interacciones electrostáticas (**Figura 4**).

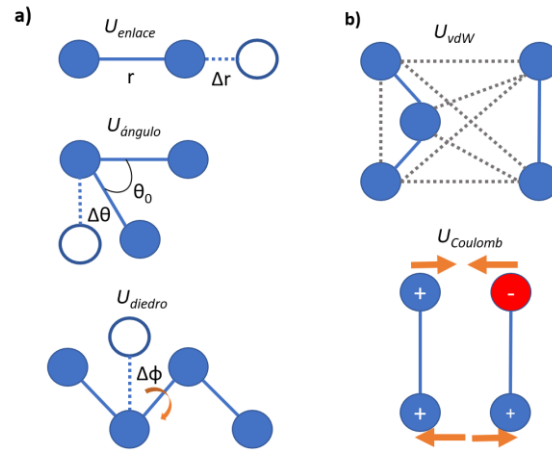


Figura 4. Representación de las interacciones moleculares en un campo de fuerza. A) Interacciones de enlace asociadas a movimientos de tensión, flexión y torsión de los enlaces químicos. B) Interacciones de no enlace, reflejan interacciones a larga distancia como los enlaces de Van de Waals e interacciones electrostáticas.

La ecuación 2 puede desarrollarse en cada uno de sus términos, obteniendo la ecuación 3:

$$\begin{aligned}
 U_{total} = & \sum_{enlace} k_i^{enlace} (r_i - r_{0i})^2 + \sum_{ángulo} k_i^{ángulo} (\theta_i - \theta_{0i})^2 + \sum_{diedro} k_i^{diedro} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)] \\
 & + \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 3}$$

En la simulación de dinámica molecular los pasos de tiempo deben ser cortos, normalmente de unos pocos femtosegundos (1×10^{-15} segundos) por cada paso. Cuando se estudian cambios estructurales funcionalmente importantes en las proteínas llegan a una escala de tiempo de nanosegundo.s. Por lo tanto, una simulación típica implica millones o miles de millones de pasos de tiempo (**Figura 5**). Este hecho, combinado con los millones de interacciones interatómicas que normalmente se evalúan durante un solo paso de tiempo, hace que las simulaciones sean muy exigentes desde el punto de vista computacional (Scott A. Hollingsworth and Ron O. Dror 2018).

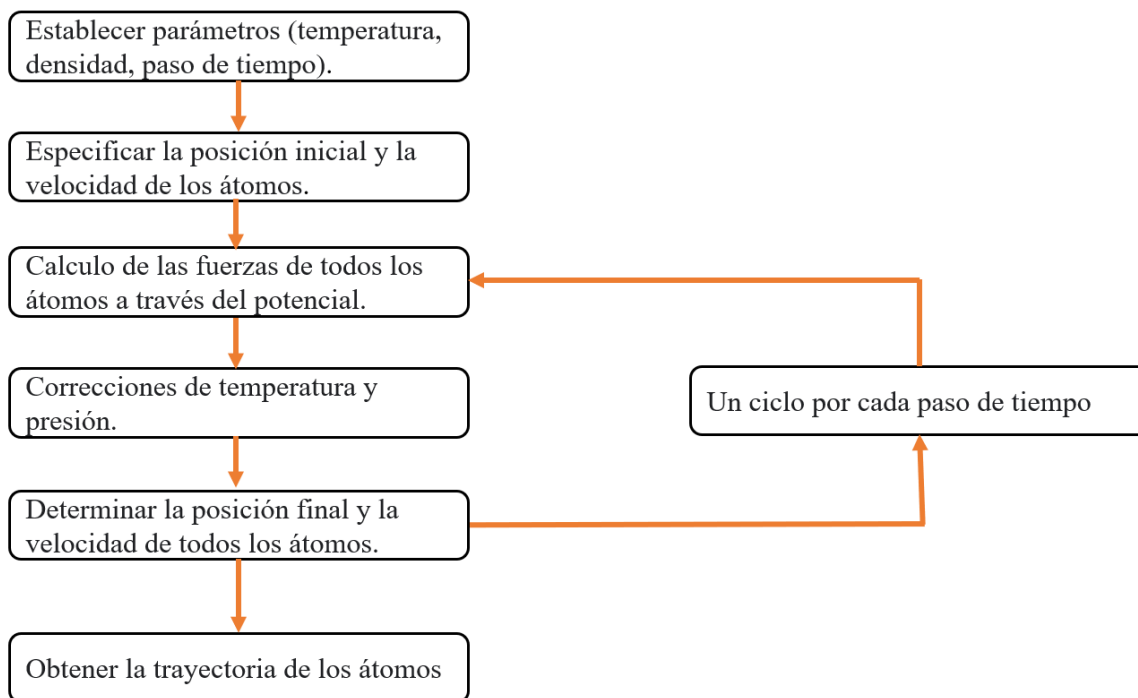


Figura 5. Diagrama de flujo de los pasos en una simulación de dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular son instrumentos valiosos, no solo porque capturan la posición y el movimiento de cada átomo en cada momento, lo cual es muy difícil con cualquier técnica experimental; sino también, las condiciones de simulación se conocen con precisión y se pueden controlar cuidadosamente, como la conformación inicial de una proteína, qué ligandos están unidos a ella, si tiene mutaciones o modificaciones postraduccionales, qué otras moléculas están presentes en su entorno, su estado de protonación, la temperatura, el voltaje a través de una membrana, entre otros parámetros.

Hipótesis.

Los métodos computacionales basados en diversas teorías de la fisicoquímica son adecuados para investigar la función del canal del calcio dependiente de voltaje $Ca_v2.1$ en humanos, la cual se ve afectada por cambios estructurales y de interacciones moleculares debidas a las siguientes mutaciones: V176M, I1342T y R1673C

Objetivos.

General.

- Utilizando métodos *in silico* basados en técnicas de la fisicoquímica, investigar la función del canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1 en humano, así como su implicación en canalopatías debidas a mutaciones puntuales.

Particulares.

- Ante la ausencia de información experimental, obtener un modelo de la estructura tridimensional del Cav2.1 de humano mediante modelado por homología o metodologías basadas únicamente en información de la estructura primaria.
- Encontrar un equilibrio estructural del Cav2.1 en sistema fisiológico.
- Identificar la localización y realizar la correspondiente mutación de los sitios V176M, I1342T y R1673C en el Cav2.1
- Analizar y comparar los cambios estructurales y de interacciones locales del canal Cav2.1 nativo y de los sistemas con las mutaciones puntuales.

Metodología.

La estructura del Cav2.1 se obtuvo a partir de la plataforma de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), un programa que utiliza inteligencia artificial para predecir la estructura tridimensional de proteínas, a partir únicamente de la secuencia de aminoácidos. Dicho programa ha tenido aceptación general debido a su alta precisión al compararse con resultados experimentales y otras técnicas de predicción de la estructura terciaria de proteínas.

2.1 Preparación del sistema.

Para la preparación del sistema se utiliza el programa de Dinámica Molecular Visual (VMD, por sus siglas en inglés), el cual permite modelar, visualizar y analizar la trayectoria de una simulación de dinámica molecular. Brevemente, como parte del protocolo utilizado (Dávila et al. 2022; Rebolledo-Bustillo et al. 2023) tenemos:

- Se analiza visualmente la estructura del Cav2.1 obtenida del programa *AlphaFold* y se eliminan ciertos segmentos, decisión tomada a partir de compararla con una estructura obtenida experimentalmente y que pertenece a la misma subfamilia, el Cav2.2 (PDB: 7MIX). En particular, se eliminaron segmentos muy extensos que conectaban los diferentes dominios y que no tenían una estructura secundaria definida.
- Se genera el archivo de la topología de la estructura de proteínas (denominado PSF) a partir del archivo PDB de nuestro modelo del Cav2.1. El archivo PSF posee no solamente la conectividad de todos los átomos del sistema. Sino también sus cargas parciales.
- Se incorpora una membrana de bicapa lipídica utilizando el fosfolípido 1-palmitol-2-oleoilfosfatidilconlina (POPC) previamente construida que cuenta con la topología del campo de fuerza CHARMM36, un campo de fuerza ampliamente utilizado en la caracterización de biomoléculas, incluidas proteínas y lípidos. Detalles de dicho

protocolo pueden ser encontrados en publicaciones de nuestro grupo de investigación (Dávila et al. 2022; Rebolledo-Bustillo et al. 2023).

- Se eliminan de la membrana de fosfolípidos toda molécula de agua antes de incorporarla al Cav2.1.
- Remover los lípidos que se encuentran a 5 Å de distancia de la proteína con la finalidad de generar un espacio en la membrana capaz de incorporar al canal Cav2.1 humano y evitar posible traslapes de las estructuras.
- Hidratar el sistema con moléculas de agua (modelo TIP3). Durante este paso se delimita el tamaño de nuestro “caja de agua” al mismo modo que se delimita el tamaño de nuestro sistema utilizando las condiciones periódicas a la frontera.
- El sistema debe estar eléctricamente neutro, por lo que en este paso se incorporan iones de cloro y sodio hasta neutralizar al sistema al mismo tiempo que se genera una concentración fisiológica de 0.15 M.
- Centrar la proteína y realizar restricciones armónicas en átomos pesados de la proteína como parte de los pasos de preequilibrio.

2.2 Simulaciones de dinámica molecular.

Las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) permiten el estudio de biomoléculas en procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos. En las simulaciones de dinámica molecular es necesario la aplicación de un campo de fuerza CHARMM36, el cual es un campo de fuerza clásico que está constituido por términos de interacciones tanto enlazantes como no enlazantes.

La simulación inicia especificando información del sistema con las condiciones periódicas a la frontera, asignando coordenadas y velocidades para todos los átomos. Los cálculos se realizan a una temperatura de 310.15 K y 1 atm de presión.

Para llevar a cabo este proceso, se cuenta con el acceso a 2 laboratorios de supercómputo:

- Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) CHOLLOLAN, perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).
- Laboratorio nacional de Cómputo de Alto Rendimiento (LANCAD), Clúster híbrido de supercómputo XIUHCOATL del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).
-
- **Mutaciones puntuales en el canal Cav2.1.**

La información sobre la identidad de las tres mutaciones (V176M, I1338T y R1672C) que fueron identificadas capaces de desregular la función del Cav2.1 y que se asocian a un trastorno neuropatológicos, fue provista por el grupo del Dr. Ulises Meza de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (resultados aun sin publicar). Las mutaciones se realizaron en la estructura del Cav2.1 nativo obtenida en las simulaciones de dinámica molecular del canal cuando la estructura transmembranal ha alcanzado un equilibrio estructural (~84 ns). Las mutaciones se realizaron mediante el programa computacional VMD manteniendo un sistema eléctricamente neutro. Al finalizar las mutaciones, los nuevos sistemas del Cav2.1 mutados fueron llevados a simulación de dinámica molecular por 120 ns.

2.3 Análisis de datos.

El análisis de los datos obtenidos a partir de las trayectorias de cada átomo del sistema a lo largo del tiempo de las simulaciones fue realizado utilizando el programa VMD. Entre los análisis estructurales, se incluye el cálculo de la Desviación de la Raíz Cuadrática Media (RMSD por sus siglas en inglés). En dicho análisis, se compara la estructura tridimensional inicial del sistema con las estructuras que se obtienen durante la simulación. El cálculo de RMSD nos permite identificar cambios estructurales globales del sistema.

Además, es posible analizar las diferentes interacciones que estabilizan ciertos dominios del sistema a lo largo del tiempo a través del cálculo de distancias de residuos en particular. Identificar los residuos de aminoácidos que se ven modificados cuando existe una ganancia o pérdida de la función normal del Cav2.1.

Discusión de resultados.

Detalles de la estructura tridimensional del canal del calcio Cav2.1.

Se obtuvo un modelo tridimensional del Cav2.1 humano que contiene principalmente la parte transmembranal. En la **figura 6** se muestra el modelo del canal de calcio que inicia en el la parte N-terminal en el residuo S82 (localizado en la parte extracelular) y que termina en la parte C-terminal en el residuo P1944 (localizado en la parte intracelular). El canal Cav_{2.1} está dividido en 4 dominios denominados DI a DIV, cada uno formado por seis helices transmembranales. Las cuatro primeras helices, S1-S4, forman el sensor de voltaje mientras que las helices S5-S6 contribuyen a la estructura del poro del canal de calcio (ver **Figura 6**).

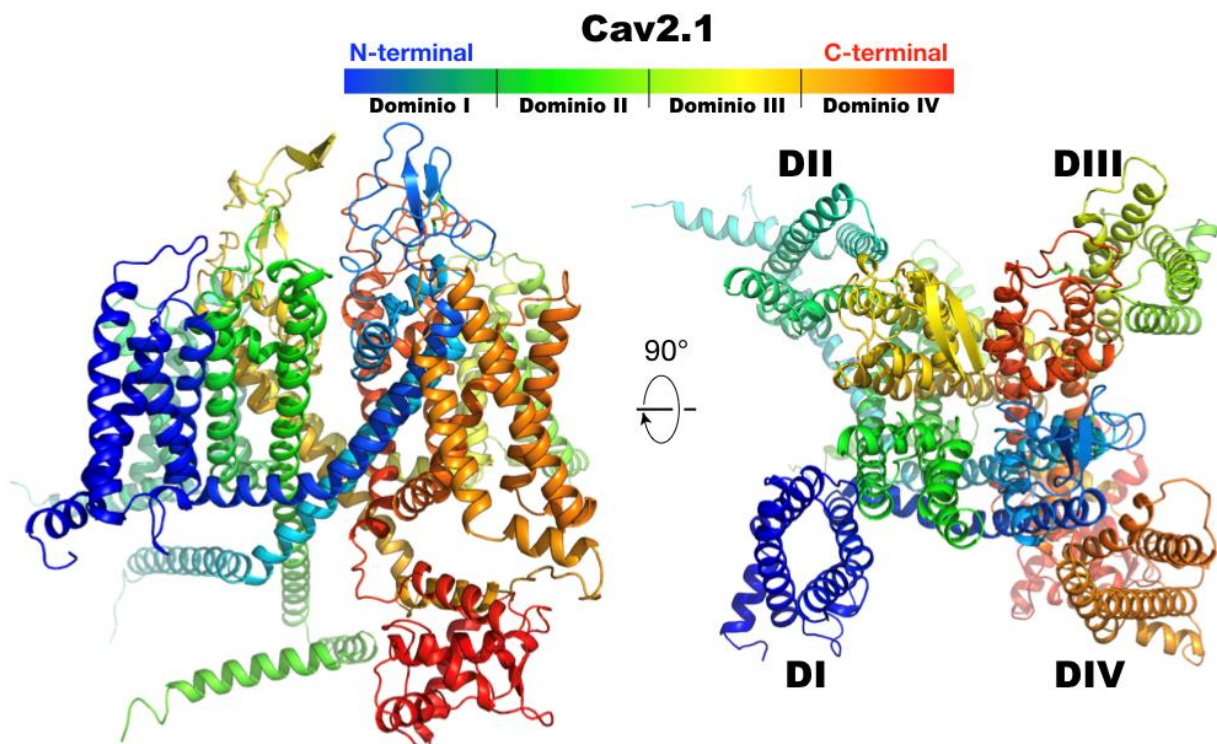


Figura 6. Representación del sistema Cav2.1 de *Homo sapiens*. La estructura tridimensional del canal de calcio Cav2.1 es mostrada utilizando un gradiente de colores que va del segmento N-terminal (azul) al C-terminal (rojo) como se indica. En el panel izquierdo se muestra una vista lateral del canal mientras que en el derecho una vista extracelular. En esta última vista se puede observar tanto la locación del poro del canal en la parte central como la posición de los 4 dominios.

La **figura 7** muestra la estructura secundaria de las diferentes partes del canal de calcio Cav2.1, donde las estructuras helicoidales se muestran en cian, las hojas beta en magenta, mientras que los segmentos sin estructura secundaria se muestran en salmón. Como se puede observar, las regiones transmembranales de la estructura muestran exclusivamente segmentos helicoidales.

De manera interesante, existen cuatro puentes de disulfuro localizado en la parte extracelular del canal de calcio. Los puentes de disulfuro están formados por las parejas C256-C281, C272-C287, C1416-C1405 y C1781-C1770. Como es sabido, la presencia de estos motivos estructurales estabiliza las regiones donde se localizan por lo que una ruptura de estos enlaces puede ocasionar la desconformación estructural nativa y la pérdida de sus funciones biológicas. (ver **Figura 7**).

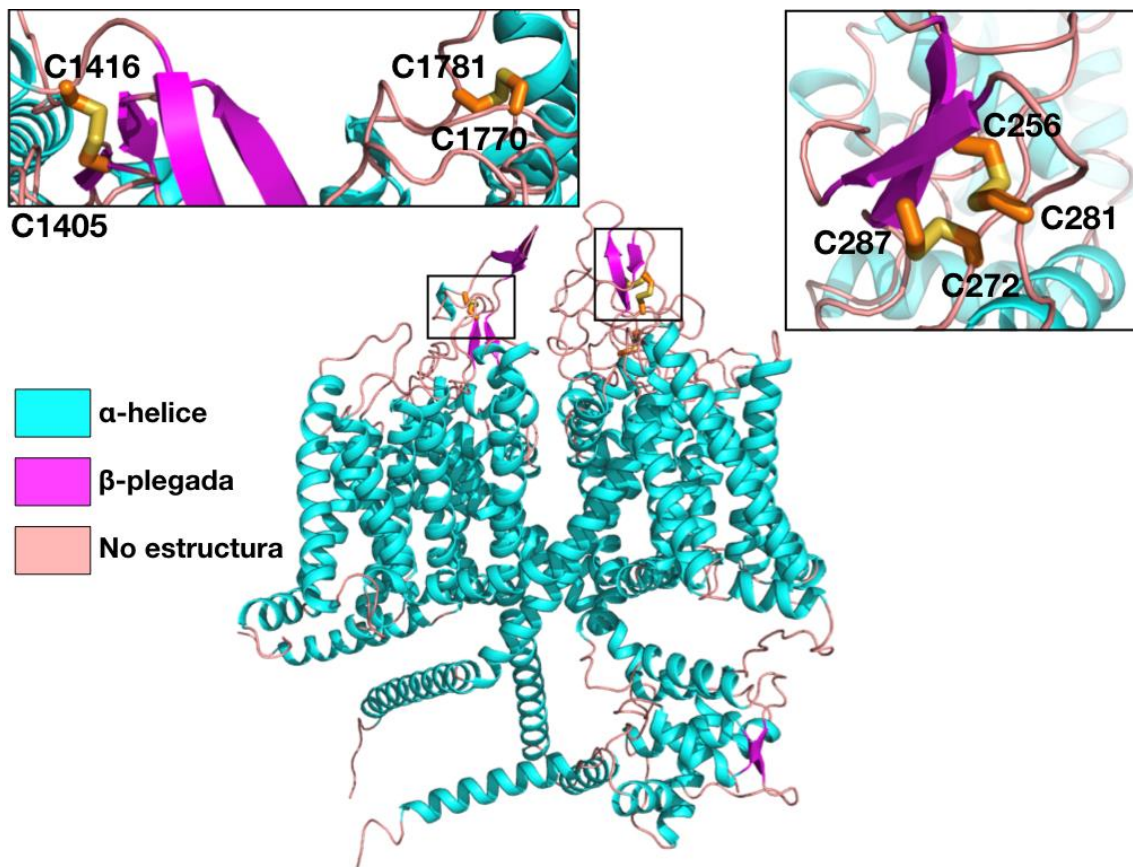


Figura 7. Contenido de la estructura secundaria del canal de calcio Cav2. Además de mostrar la estructura secundaria del canal, también se muestran los segmentos donde se localizan los puentes de disulfuro en la región extracelular.

Simulaciones de dinámica molecular del sistema Cav2.1.

El canal de calcio fue incorporado a una membrana lipídica hidratada con la finalidad de estudiarlo en condiciones fisiológicas de temperatura, presión y concentración salina. En la **Figura 8**, se presenta el sistema inicial que fue preparado utilizando el programa VMD. El sistema consiste en la estructura del canal de calcio Cav2.1 embebida en una bicapa lipídica del fosfolípido POPC hidratada con moléculas de agua. El sistema fue neutralizado con 106 iones de sodio y 97 iones de cloro para obtener una concentración salina de 0.15 M; los iones no se muestran en las figuras 1 y 2 por claridad. El sistema completo está constituido por ~180,000 átomos (ver **Figura 8**). El sistema fue evaluado utilizando la técnica computacional de simulaciones atomísticas de dinámica molecular, donde se usó el programa NAMD y el campo de fuerza CHARMM36. Durante la simulación tanto los valores de la temperatura (37 °C) como la presión (1 atmósfera) fueron mantenidos constantes. Las simulaciones se realizaron en la infraestructura del Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) y del Clúster híbrido de supercómputo XIUHCOATL (LANCAD; CINVESTAV).

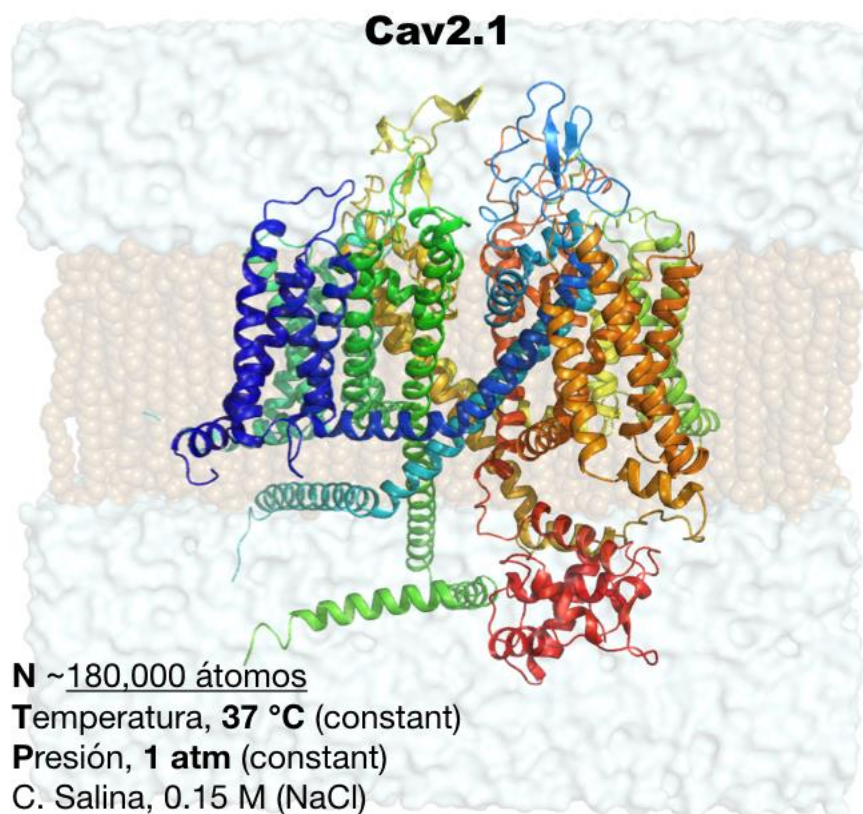


Figura 8. Estructura inicial del sistema Cav2.1, en un medio fisiológico. Vista lateral del sistema donde se observa la bicapa lipídica (café)hidratada con moléculas de agua. Por claridad, no se muestran los iones de cloro y sodio que están presentes.

Análisis.

La primera parte de la simulación de dinámica molecular reveló que el sistema Cav2.1 humano en ausencia de ligantes, alcanza un equilibrio estructural un poco antes de los 100 ns de simulación. En otras palabras, después de este tiempo, la estructura transmembranal del Cav2.1 alcanza conformaciones estables bajo las condiciones fisiológicas establecidas. Lo anterior, se confirma con el análisis de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD), el cual permite comparar la estructura inicial con las estructuras que se van obteniendo durante la simulación. Dicho análisis permite evaluar los cambios estructurales globales del sistema a lo largo del tiempo. En la **Figura 9**, se observa la gráfica RMSD del Cav2.1, que involucra solamente a los átomos de carbonos alfa de la cadena principal de las 24 helices transmembranales que constituyen al canal de calcio Cav2.1. La figura sugiere que aproximadamente después de los 50 ns, el sistema encuentra su equilibrio estructural y su estructura continúa fluctuando

alrededor de una meseta correspondiente al valor de $\sim 2 \text{ \AA}$ (relativo de la estructura inicial); ver **Figura 9**. Los cambios que se siguen observando se deben a que la proteína encontró su equilibrio estructural global, pero sigue experimentando diferentes estados conformacionales de acuerdo con las condiciones de presión y temperatura del sistema. Tales valores de RMSD son típicos de proteínas de la membrana.

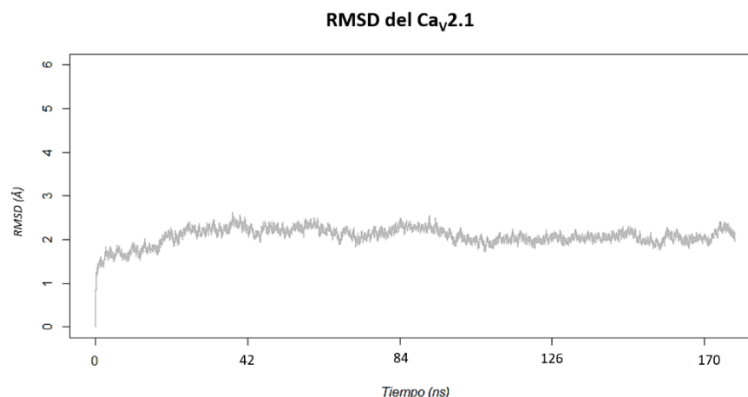


Figura 9. Gráfica RMSD del sistema de Cav2.1 a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

Tres posiciones relevantes.

Tres mutaciones del canal Cav2.1 humano en las posiciones V176, I1338 y R1672, han sido recientemente caracterizadas como capaces de alterar la función normal del canal Cav2.1 (ver **Figura 10**). Dichas alteraciones han sido asociadas a un trastorno neurológicos, incluida la epilepsia. El grupo del Dr. Ulises Meza de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí esta caracterizando dichas mutaciones utilizando técnicas electrofisiológicas. En la **figura 10** se ilustran las posiciones y la naturaleza de las tres mutaciones. (i) **V176M** está localizada en la hélice S3 del dominio I y representa un cambio de un residuo hidrofóbico por otro hidrofóbico, pero con una cadena lateral lineal más larga. (ii) **I1338T** se encuentra en la hélice S4 del dominio III y representa un cambio de un residuo grande hidrofóbico por unos relativamente pequeño con carácter hidrofílico. (iii) **R1672C** está localizada en la hélice S4 del dominio IV y representa un cambio de un residuo catiónico por un residuo pequeño neutral.

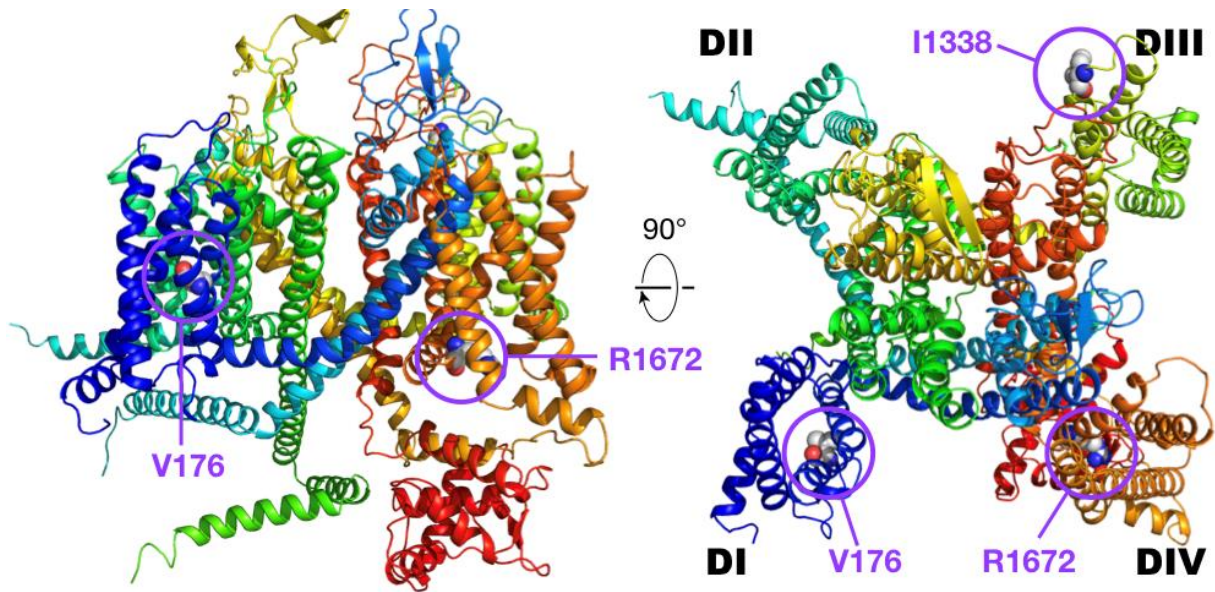


Figura 10. Posiciones en el Cav2.1 donde existen mutaciones que alteran la función del canal. Tres posiciones en la estructura del canal son indicadas, V176 (dominio I), I1338 (dominio III) y R1672 (dominio IV). En ciertos trastornos neurológicos, mutaciones en dichas posiciones se han caracterizado y asociado con alteraciones en la función normal del canal Cav2.1.

A lo largo de la simulación, estas posiciones muestran el siguiente comportamiento:

- (i) **V176** (dominio I). Este residuo hidrofóbico alifático se encuentra en la parte central de la hélice S3 del dominio I, recordando que el sensor del voltaje del canal de calcio está formado por las hélices S1 a S4. En la simulación se observa que V176 establece interacciones hidrofóbicas con el residuo L200 en la hélice S4 del mismo dominio y con la parte alifática de la cadena lateral del residuo R198 localizado en la hélice S4 (ver **Figura 10**).
- (ii) **I1338** (dominio III). Este residuo hidrofóbico alifático se encuentra localizado en la parte terminal extracelular de la helice S4 del dominio III. En esta región altamente expuesta al medio acuoso, ninguna interacción en particular se observa durante el tiempo de simulación (ver **Figura 10**).
- (iii) **R1672** (dominio IV). Este residuo se encuentra en el extremo intracelular de la helice S4 del dominio IV. En la simulación el residuo catiónico interactúa principalmente con los resisuos con carga negativa D1627 y D1633 localizados en las helice S3 del dominio IV. Adicionalmente, el residuo R1672 establece interacciones cation- π con W1629, el cual se

localiza en la misma hélice que los dos residuos ácidos antes mencionados (ver **Figura 10**). Esta región del canal se encuentra bien hidratada por moléculas de agua.

Simulaciones de las tres mutantes de canal Cav2.1 humano.

Una estructura representativa del sistema fue tomada a los 90 ns donde el sistema ha encontrado un equilibrio estructural. Utilizando el programa VMD, se introdujeron las tres mutaciones antes mencionadas, V176M, I1338T y R1672C. En la **figura 11** se muestra la locación y la naturaleza de las tres mutaciones.

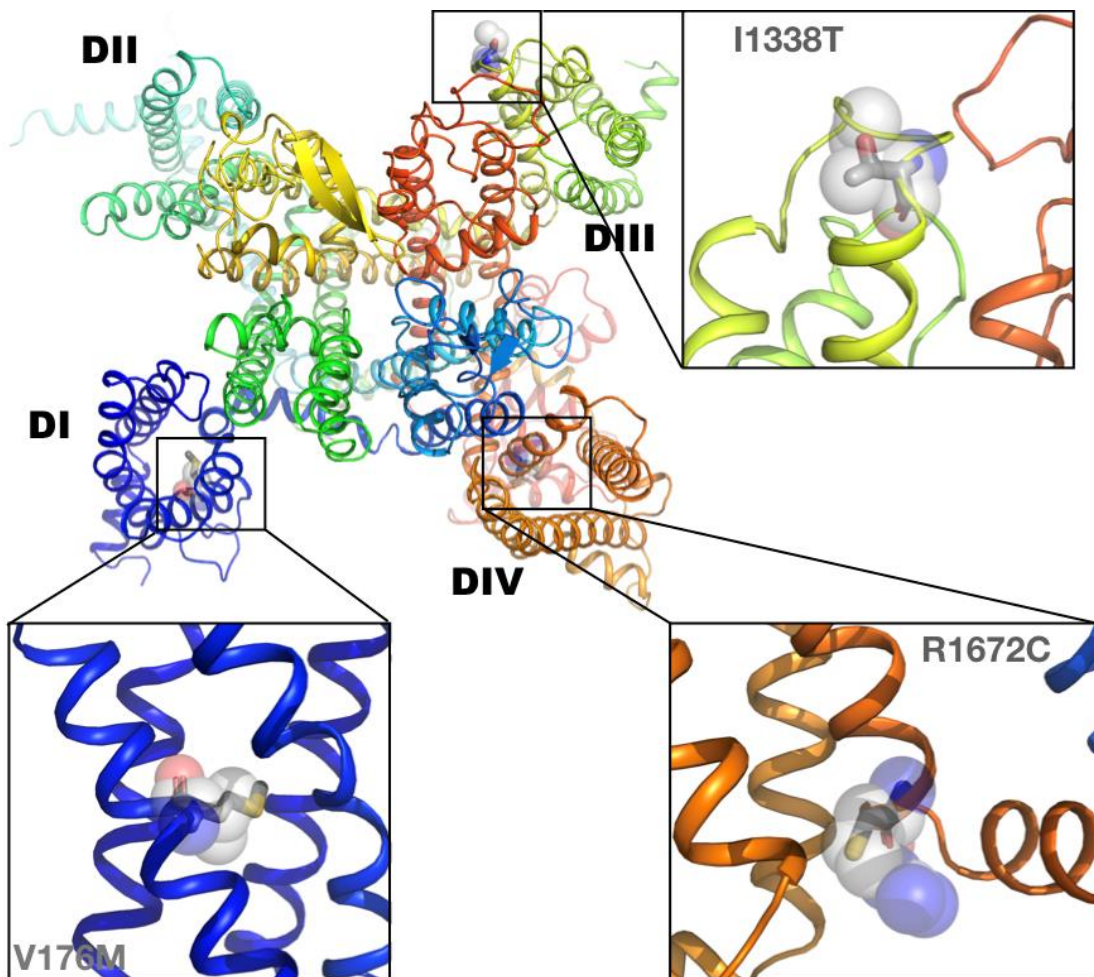


Figura 11. Posición de las tres mutaciones en el canal Cav2.1. Se introdujeron tres mutaciones en el sistema Cav2.1 para ser evaluadas utilizando métodos computacionales. El residuo original es mostrado como esferas mientras que la mutación es mostrada en representación de “sticks”.

A lo largo de la simulación, estas mutaciones muestran el siguiente comportamiento:

(i) V176M (dominio D). Relativo al sistema nativo, la presencia de la metionina en esta posición no parece provocar cambios significativos hasta este momento (ver **Figura 12**).

(ii) I1338T (dominio III). El grupo OH de la cadena lateral del residuo de treonina interactúa de manera polar con el grupo carbonilo de la cadena principal de K1335 que parece restringir el movimiento en esta región que conecta a las hélices S3 y S4 del dominio III en relación a la secuencia nativa del canal (ver **Figura 12**).

(iii) R1672C (dominio IV). En la ausencia de una carga negativa, el residuo de cisteína no parece establecer interacciones importantes. La única interacción que compete a esta posición es la interacción polar entre el grupo carbonilo de la cadena principal y el residuo R1678 localizado en la región helicoidal que conecta a S4 con S5. Adicionalmente, mientras la cadena lateral de arginina apunta hacia el centro de la estructura formada por S1 a S4, la cadena lateral de cisteína apunta hacia afuera de dicha estructura (ver **Figura 12**).

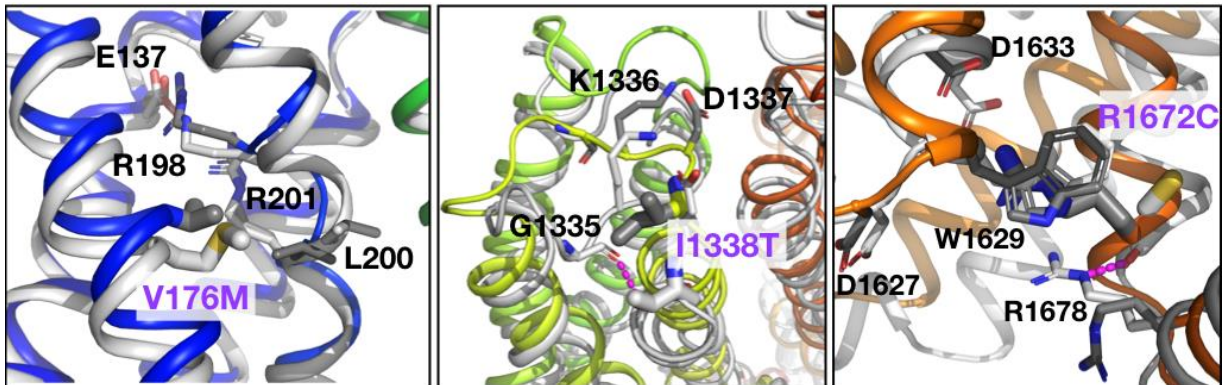


Figura 12. Resultados parciales del comportamiento cualitativo de las mutaciones V176M, I1338T y R1672C. Estructuras representativas de las tres mutaciones (en blanco) caracterizadas en este trabajo son presentadas en el contexto de los residuos nativos (en gris) del canal $Ca_v2.1$ humano.

Perspectivas.

Debido al tamaño del sistema biomolecular (~180,000 átomos; ver **Figura 8**), es necesario extender las simulaciones de los sistemas para tener un mejor muestreo conformacional.

Asimismo, el análisis de las interacciones locales de las mutaciones se asociará a cambios conformacionales del canal canal Cav2.1 humano con la idea de correlacionar los cambios estructurales a posibles patologías.

Conclusión.

Se logró obtener satisfactoriamente la estructura terciaria del Cav2.1 nativo *in silico* utilizando la estructura del programa *AlphaFold* así como información estructural del canal Cav2.2. Utilizando simulaciones atómicas de dinámica molecular se encontró un equilibrio estructural del Cav2.1 en condiciones fisiológicas incorporando una membrana de bicapa lipídica de POPC, a una atmosfera de presión y a 37°C. A partir de la estructura terciaria obtenida del Cav2.1 se identificaron y mutaron los sitios de mutación V176M, I1342T y R1673C.

Este resultado no solo es importante porque proporciona conocimientos sobre la estructura y la dinámica del sistema Cav2.1 nativo humano, sino también, por que nos permitió comparar resultados de mutaciones del canal de calcio involucradas en patologías del sistema nervioso. Nuestros resultados parciales sugieren extender las simulaciones de los sistemas debido al tamaño del sistema biomolecular ~180,000 átomos con la idea de proponer una correlación entre dichas mutaciones y la desregulación de la función del canal Cav2.1 asociadas a patologías en el sistema nervioso.

Publicaciones

Durante mis estudios de maestría, participé activamente como coautor y como primer autor en las siguientes publicaciones en revistas internacionales:

1) Eliud Morales Dávila, Felipe Patricio, Mariana Rebolledo-Bustillo, **David Garcia-Gomez**, Juan Carlos García Hernández, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ilhuicamina Daniel Limón, Jose Manuel Perez-Aguilar*. “Interacting binding insights and conformational consequences of the differential activity of cannabidiol with two endocannabinoid-activated G-protein-coupled receptors”. *Frontiers in Pharmacology* (2022) 945935 (13), 1:13.

2) Mariana Rebolledo-Bustillo†, **David Garcia-Gomez**†, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez, Victor M. Baizabal-Aguirre, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Jose Manuel Perez-Aguilar*. “Structural basis of the binding mode of antineoplastic compound Motixafortide (BL-8040) in the chemokine receptor CXCR4”. *International Journal of Molecular Sciences*. (2023) 24(5), 4393 1:14.

Bibliografía

- Al-Shaikh, Rana Hanna, Anna I. Wernick, Audrey J. Strongosky, Alexandra I. Soto-Beasley, Jay A. Van Gerpen, William P. Cheshire, Ryan J. Uitti, Owen A. Ross, and Zbigniew K. Wszolek. 2020. "Spinocerebellar Ataxia Type 6 Family with Phenotypic Overlap with Multiple System Atrophy." *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 54 (4): 350–55. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2020.0053>.
- Andrade, Arturo, Ashton Brennecke, Shayna Mallat, Julian Brown, Juan Gomez-Rivadeneira, Natalie Czepiel, and Laura Londrigan. 2019. "Genetic Associations between Voltage-Gated Calcium Channels and Psychiatric Disorders." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (14): 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms20143537>.
- Bernard, Genevieve, and Michael I. Shevell. 2008. "Channelopathies: A Review." *Pediatric Neurology* 38 (2): 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.09.007>.
- Buraei, Zafir, and Jian Yang. 2010. "The β Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels." *Physiological Reviews* 90 (4): 1461–1506. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2009>.
- Caicoya, A G. 2016. "Búsqueda de Innovación: Antagonistas Selectivos Del Receptor AMPA." *Neurología* 31 (1): 9–13. <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-busqueda-innovacion-antagonistas-selectivos-del-X0213485316600018> ER.
- Carbone, Emilio, and Yasuo Mori. 2020. "Ion Channelopathies to Bridge Molecular Lesions, Channel Function, and Clinical Therapies." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 472 (7): 733–38. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02424-y>.
- Catterall, William A., and Teresa M. Swanson. 2015. "Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." *Molecular Pharmacology* 88 (1): 141–50. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097659>.
- Davies, Anthony, Ivan Kadurin, Anita Alvarez-Laviada, Leon Douglas, Manuela Nieto-Rostro, Claudia S. Bauer, Wendy S. Pratt, and Annette C. Dolphin. 2010. "The A2 δ Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels Form GPI-Anchored Proteins, a

Posttranslational Modification Essential for Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4): 1654–59.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0908735107>.

Dávila, Eliud Morales, Felipe Patricio, Mariana Rebolledo-Bustillo, David Garcia-Gomez, Juan Carlos Garcia Hernandez, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ilhuicamina Daniel Limón, and Jose Manuel Perez-Aguilar. 2022. “Interacting Binding Insights and Conformational Consequences of the Differential Activity of Cannabidiol with Two Endocannabinoid-Activated G-Protein-Coupled Receptors.” *Frontiers in Pharmacology* 13 (August).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.945935>.

Dolphin, Annette C. 2016. “Voltage-Gated Calcium Channels and Their Auxiliary Subunits: Physiology and Pathophysiology and Pharmacology.” *Journal of Physiology* 594 (19): 5369–90. <https://doi.org/10.1113/JP272262>.

Duan, Lili, Xiaona Guo, Yalong Cong, Guoqiang Feng, Yuchen Li, and John Z.H. Zhang. 2019. “Accelerated Molecular Dynamics Simulation for Helical Proteins Folding in Explicit Water.” *Frontiers in Chemistry* 7 (August): 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00540>.

Emmenegger, Vishalini, Marie Engelen J Obien, Felix Franke, Andreas Hierlemann, U Inserm, and Michael Blake Hoppa. 2019. “Technologies to Study Action Potential Propagation With a Focus on HD-MEAs” 13 (April): 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00159>.

Geng, Hao, Fangfang Chen, Jing Ye, and Fan Jiang. 2019. “Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins.” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17: 1162–70.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.010>.

Goral, R Oliver, Christian Keine, Rachel Satterfield, Naomi Kamasawa, Samuel M Young, R Oliver Goral, Christian Keine, Connon Thomas, Debbie Guerrero-given, and Travis Putzke. 2019. “Regulates Presynaptic Ca V 2 . 1 Abundance and Synaptic Strength at a Central Synapse,” 260–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.028>.

- Gupta, LC, Kusum Gupta, and Abhitabh Gupta. 2013. “Psychiatric Diseases.” *Practical Standard Prescriber* 15 (1): 153–153. https://doi.org/10.5005/jp/books/12045_5.
- Hering, S., E. M. Zangerl-Plessl, S. Beyl, A. Hohaus, S. Andranovits, and E. N. Timin. 2018. “Calcium Channel Gating.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 470 (9): 1291–1309. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2163-7>.
- Iosub, Radu, Daniele Avitabile, Lisa Grant, Krasimira Tsaneva-atanasova, and Helen J Kennedy. 2015. “Article Calcium-Induced Calcium Release during Action Potential Firing in Developing Inner Hair Cells.” *Biophysj* 108 (5): 1003–12. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.3489>.
- Jarzembowski, J. A. 2014. “Channelopathies.” *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* 57 (1): 194–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01516-1>.
- Jeanquartier, Fleur, Claire Jean-Quartier, David Cemernek, and Andreas Holzinger. 2016. “In Silico Modeling for Tumor Growth Visualization.” *BMC Systems Biology* 10 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0318-8>.
- Kalappurakkal, Joseph Mathew, and Satyajit Mayor. 2020. “Toward a New Picture of the Living Plasma Membrane,” no. April: 1355–65. <https://doi.org/10.1002/pro.3874>.
- Kalyaanamoorthy, Subha. 2018. “L-Type Calcium Calcium Channels : Channels : Structure Structure and and Functions Functions Tianhua.” <https://doi.org/10.5772/intechopen.77305>.
- Kitano, Hiroaki. 2002. “Computational Systems Biology.” *Nature* 420 (6912): 206–10. <https://doi.org/10.1038/nature01254>.
- Klugbauer, Norbert, Else Marais, and Franz Hofmann. 2003. “Calcium Channel A2b Subunits Differential Expression Fuction and Drug Binding” 35 (6).
- Krahn, Michael P. 2020. “Phospholipids of the Plasma Membrane – Regulators or Consequence of Cell Polarity ?” 8 (April): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00277>.

- Krylov, Anna, Theresa L. Windus, Taylor Barnes, Eliseo Marin-Rimoldi, Jessica A. Nash, Benjamin Pritchard, Daniel G.A. Smith, et al. 2018. "Perspective: Computational Chemistry Software and Its Advancement as Illustrated through Three Grand Challenge Cases for Molecular Science." *Journal of Chemical Physics* 149 (18).
<https://doi.org/10.1063/1.5052551>.
- Leresche, Nathalie, and Régis C Lambert. 2017. "T-Type Calcium Channels in Synaptic Plasticity T-Type Calcium Channels in Synaptic Plasticity." *Channels* 11 (2): 121–39.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1238992>.
- Lozano Jiménez, Yenny Yolanda, and Ruth Mélida Sánchez Mora. 2020. "Canales de Calcio Como Blanco de Interés Farmacológico." *Nova* 18 (34): 57–76.
<https://doi.org/10.22490/24629448.3926>.
- Nachbauer, Wolfgang, Michael Nocker, Elfriede Karner, Iva Stankovic, Iris Unterberger, Andreas Eigentler, Rainer Schneider, Werner Poewe, Margarete Delazer, and Sylvia Boesch. 2014. "Episodic Ataxia Type 2: Phenotype Characteristics of a Novel CACNA1A Mutation and Review of the Literature." *Journal of Neurology* 261 (5): 983–91. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7310-2>.
- Oda, Sen-Ich, Kea Joo Lee, Tatsuo Arii, Keiji Imoto, Byung-Hwa Hyun, In Sung Park, Hyun Kim, and Im Joo Rhyu. 2010. "Differential Regulation of Purkinje Cell Dendritic Spines in Rolling Mouse Nagoya (Tg Rol / Tg Rol), P/Q Type Calcium Channel (A1 A /Ca v 2.1) Mutant ." *Anatomy & Cell Biology* 43 (3): 211.
<https://doi.org/10.5115/acb.2010.43.3.211>.
- Phillips, James C., Klaus Schulten, Abhinav Bhatele, Chao Mei, Yanhua Sun, Eric J. Bohm, and Laxmikant V. Kale. 2016. "Scalable Molecular Dynamics with NAMD." *Parallel Science and Engineering Applications: The Charm++ Approach* 26 (16): 60–76.
<https://doi.org/10.1201/b16251-15>.
- Popa, Laurentiu S., Martha L. Streng, and Timothy J. Ebner. 2019. "Purkinje Cell Representations of Behavior: Diary of a Busy Neuron." *Neuroscientist* 25 (3): 241–57.
<https://doi.org/10.1177/1073858418785628>.

- Rangel-Galván, Maricruz, Azahel Rangel, Catalina Romero-Méndez, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Meléndez Bustamante, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ulises Meza, and Jose Manuel Perez-Aguilar. 2021. “Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Ca V 3.3 Channel.” *ACS Chemical Neuroscience* 12 (4): 651–59. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00684>.
- Rebolledo-Bustillo, Mariana, David Garcia-Gomez, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez, Victor M. Baizabal-Aguirre, Brenda L. Sanchez-Gaytan, and Jose Manuel Perez-Aguilar. 2023. “Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054393>.
- Renard, Kenta, and Bernadette Byrne. 2021. “Insights into the Role of Membrane Lipids in the Structure, Function and Regulation of Integral Membrane Proteins.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169026>.
- Scarnati, Matthew S, Stephen G Clarke, Zhiping P Pang, Kenneth G Paradiso, and Lu Chen. 2020. “Presynaptic Calcium Channel Open Probability and Changes in Calcium Influx Throughout the Action Potential Determined Using” 12 (April): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00017>.
- Schneider, T., F. Neumaier, J. Hescheler, and S. Alpdogan. 2020. “Cav2.3 R-Type Calcium Channels: From Its Discovery to Pathogenic de Novo CACNA1E Variants: A Historical Perspective.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 472 (7): 811–16. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02395-0>.
- Scott A. Hollingsworth, and Ron O. Dror. 2018. “Molecular Dynamics Simulation for All.” *Neuron* 99(6) (1): 1129–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.Molecular.
- Shi, Jingjing, Huan Wang, Shuqing Shi, Guozhen Yuan, Qiu Lei Jia, Shuai Shi, Xuesong Zhang, and Yuanhui Hu. 2020. “Bibliometric Analysis of Calcium Channel Research (2010–2019).” *Channels* 14 (1): 193–202.

<https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1788903>.

Solodkin, Ana, and Christopher M. Gomez. 2012. *Spinocerebellar Ataxia Type 6. Handbook of Clinical Neurology*. 1st ed. Vol. 103. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51892-7.00029-2>.

Stojilkovic, Stanko S, and Richard Bertram. 2010. “Ion Channels and Signaling in the Pituitary Gland” 31 (December): 845–915. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0005>.

Strickland, Marie, Besma Yacoubi-Loueslati, Balkiss Bouhaouala-Zahar, Sylvia L.F. Pender, and Anis Larbi. 2019. “Relationships between Ion Channels, Mitochondrial Functions and Inflammation in Human Aging.” *Frontiers in Physiology* 10 (MAR): 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00158>.

Strupp, Michael, Andreas Zwergal, and Thomas Brandt. 2007. “Episodic Ataxia Type 2.” *Neurotherapeutics* 4 (2): 267–73. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.01.014>.

Tarun, Orly B., Maksim Yu Eremchev, Aleksandra Radenovic, and Sylvie Roke. 2019. “Spatiotemporal Imaging of Water in Operating Voltage-Gated Ion Channels Reveals the Slow Motion of Interfacial Ions.” *Nano Letters* 19 (11): 7608–13. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02024>.

Teaford, Max. 2020. “Spinocerebellar Ataxia Type 6: A Disorder of Connectivity?” *Journal of Neuroscience* 40 (49): 9344–45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0822-20.2020>.

Terpollili, Nicole A., Reinhard Dolp, Kai Waehner, Susanne M. Schwarzmaier, Elisabeth Rumbler, Boyan Todorov, Michel D. Ferrari, Arn M.J.M. van den Maagdenberg, and Nikolaus Plesnila. 2022. “CaV2.1 Channel Mutations Causing Familial Hemiplegic Migraine Type 1 Increase the Susceptibility for Cortical Spreading Depolarizations and Seizures and Worsen Outcome after Experimental Traumatic Brain Injury.” *ELife* 11: 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.74923>.

Tyson, John R., and Terrance P. Snutch. 2013. “Molecular Nature of Voltage-Gated Calcium Channels: Structure and Species Comparison.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 2 (5): 181–206. <https://doi.org/10.1002/wmts.91>.

- Wan, Shunzhou, Agastya P. Bhati, Stefan J. Zasada, and Peter V. Coveney. 2020. “Rapid, Accurate, Precise and Reproducible Ligand-Protein Binding Free Energy Prediction: Binding Free Energy Prediction.” *Interface Focus* 10 (6).
<https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0007>.
- Weiss, Norbert, and Gerald W Zamponi. 2019. “International Journal of Biochemistry and Cell Biology T-Type Calcium Channels : From Molecule to Therapeutic Opportunities.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 108 (December 2018): 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.008>.
- Wormuth, Carola, Andreas Lundt, Christina Henseler, Ralf Müller, Karl Broich, Anna Papazoglou, and Marco Weiergräber. 2016. “Review: Cav2.3 R-Type Voltage-Gated Ca²⁺ Channels - Functional Implications in Convulsive and Non-Convulsive Seizure Activity.” *The Open Neurology Journal* 10 (1): 99–126.
<https://doi.org/10.2174/1874205x01610010099>.
- Wu, Fandi, and Jinbo Xu. 2021. “Deep Template-Based Protein Structure Prediction.” *PLoS Computational Biology* 17 (5): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008954>.
- Zhang, Haicang, and Yufeng Shen. 2020. “Template-Based Prediction of Protein Structure with Deep Learning.” *BMC Genomics* 21 (Suppl 11): 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-07249-8>.