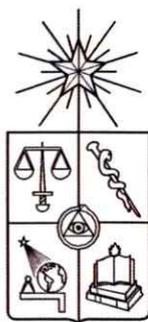


VCH-FC  
MAG-B  
E 742  
C-1



**EFFECTOS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN  
SISTEMAS SIMPLES DE MEMBRANA DUAL  
GENERADO POR UN CAMPO ELÉCTRICO EXTERNO  
CONSTANTE**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad de Ciencias

por

**Yerko Ignacio Escalona Balboa**



Julio, 2016

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo

Co-Director de Tesis: Dr. Tomás Pérez Acle

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**Yerko Ignacio Escalona Balboa**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de Mayo del 2016.

Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio Opazo



Co-Director de Tesis:

Dr. Tomás Pérez Aclé

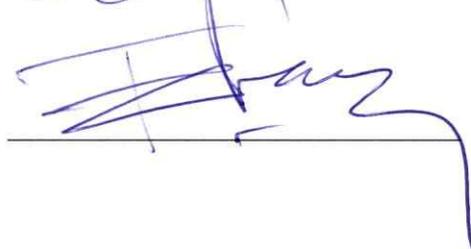


Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Ricardo Cabrera



Dr. Francisco Chavez



## RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací el 28 de Julio del 1986. Mis padres, Patricia Balboa y Miguel Escalona, me inculcaron la curiosidad por la vida, y me ayudaron a tener a mi alcance todas las herramientas que sustentaron esta curiosidad. Pasé mi enseñanza básica en el Liceo Carolina Llona de Maipú, y gracias al estudio pude ingresar al Instituto Nacional General José Miguel Carrera en donde completé la educación media. Ingresé a la Universidad de Chile el año 2005 y me licencié de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2009, año en el cual ingresé al laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), en donde aprendí programación y bioinformática estructural bajo la supervisión del Dr. José Jaime Arbildua y del Dr. Octavio Monasterio. Estudié las interacción entre las proteínas  $\gamma$ -tubulina y la chaperonina CCT bajo la supervisión del Dr. Octavio Monasterio y el Dr. Luis Pouchucq. Trabajo que me permitió titularme el año 2015. En el transcurso, me integré al programa de Magíster en Ciencias Biológicas a mediados del año 2012 e ingresé al Laboratorio de Biología Computacional (DLab), lugar que me permitió aprender acerca de las simulaciones de dinámica molecular bajo la supervisión del Dr. Tomás Pérez-Acle, del Dr. Raúl Araya y del Dr. José Antonio Gárate. El estudio relacionado con unas proteínas llamadas Conexinas, me permitió hacer esta tesis y obtener el grado de Magíster en Ciencias Biológicas bajo la supervisión de Tomás Pérez-Acle y Octavio Monasterio.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han apoyado en el proceso de esta tesis. Agradezco al Dr. Tomás Pérez-Acle por darme la oportunidad de trabajar en el área de dinámica molecular del laboratorio. Su motivación es contagiosa y me ha llevado a desempeñarme en la investigación científica. Agradezco al Dr. Octavio Monasterio por su apoyo, enseñanza y vocación académica tanto en pregrado como en postgrado. Agradezco al Dr. José Antonio Gárate por ser prácticamente otro director de tesis. Me ha incentivado a estudiar las bases de la dinámica molecular, evitando caer en el tecnicismo y la imagen superficial de la técnica. Agradezco al Dr. Raúl Araya por incentivar y motivarme en el estudio de las proteínas de membrana. Agradezco al futuro Dr. Sebastián Gutiérrez por su apoyo y compañía, sobretodo en los momentos de stress en las cuales me tuve que exponer frente a un gran número de personas. Agradezco al Dr. Alberto Martín por su apoyo e inspiración debido a su constancia en lograr los objetivos. Agradezco al Dr. Ricardo Cabrera y al Dr. Francisco Chavez por sus correcciones en la tesis. Agradezco a mis compañeros y amigos, con los cuales he tenido gratos momentos en el laboratorio, entre ellos a Felipe Villanelo, Alvaro Bustos, David Inostroza, Claudia Pareja, Sebastián Contreras, Carlos Yañez, Alejandro Bernardin, Ignacio Fuenzalida, Annabella Carvajal, Fernando Abarca, Sebastián Flores y Felipe Nuñez.

Nada pudo ser logrado sin la ayuda de mi familia. Agradezco a mis padres por darme el apoyo, cariño y educación para poder realizar estas tareas. Agradezco a mi madre, Patricia Balboa, por darme la curiosidad que me ha motivado en trabajar en ciencia. Agradezco a mi padre, Miguel Escalona, por darme el soporte que me ha permitido concentrarme en el estudio. A mi polola, Belén Aburto, por compartir la vida y seguir el camino de la ciencias, el cual nos ha entregado mucha gratificación. A mi tíos, en especial a Carlos Balboa y Cesar Balboa, por su constante preocupación y aliento en hacer bien el trabajo. A Luis Muñoz por todas sus enseñanzas para enfrentar la vida y sacar lo mejor de mí. A Nicole Halcartégaray por enseñarme a como presentar y mostrarme el camino para ser un buen expositor. Al idioma japones y las grandes personas que he conocido en su estudio, por enseñarme a sobrellevar la frustración de aprender el idioma. A mis profesoras de música, por enseñarme a tener disciplina, que se aplica en todos los ámbitos de la vida. Y finalmente a todos mi amigos, en especial a mi ex compañero del instituto Orlando Chavez, por toda la buena onda.



Gracias

# ÍNDICE

Acrónimos	IX
Resumen	X
Abstract	XII
1. Introducción	1
2. Hipótesis	6
3. Objetivos generales	6
4. Objetivos específicos	7
5. Materiales y Métodos	8
5.1. Sistemas modelados . . . . .	8
5.2. Simulaciones de dinámica molecular . . . . .	10
5.3. Potencial electrostático . . . . .	11
5.4. Corriente iónica . . . . .	12
5.5. Concentración molar . . . . .	13
5.6. Función de distribución radial (RDF) . . . . .	13
5.7. Cálculos de energía libre . . . . .	14
6. Resultados	16
6.1. Potencial electrostático de los sistemas de membrana dual. . . . .	16
6.2. Potenciales electrostáticos de modelos simplificados de GJC. . . . .	18
6.3. Corriente iónica . . . . .	20
6.4. Densidad iónica . . . . .	22
6.5. Caracterización de la permeación de los iones . . . . .	24
6.5.1. Función de distribución radial . . . . .	24
6.5.2. Potencial de Fuerza Media (PMF) de los cationes a través del canal . . . . .	26
7. Discusión	30
7.1. Potenciales electrostáticos de los sistemas . . . . .	31
7.2. Caracterización del transporte iónico . . . . .	35
7.3. Termodinámica del paso de iones . . . . .	36
8. Conclusiones	40

<b>9. Bibliografía</b>	<b>42</b>
<b>A. Anexo</b>	<b>50</b>
A.1. Resumen Teórico . . . . .	50
A.1.1. Mecánica clásica . . . . .	50
A.1.2. Mecánica estadística . . . . .	51
A.1.3. Dinámica Molecular . . . . .	53
A.1.4. Partículas en malla de Ewald (PME) . . . . .	57
A.1.5. Potencial de membrana . . . . .	58
A.1.6. Procedimiento para graficar los datos en un espacio tridimensional . . . . .	61
A.1.7. Potencial de fuerza media (PMF) . . . . .	63
A.1.8. Metadinámica . . . . .	64
A.1.9. Integración del PMF bidimensional a uno unidimensional y corrección entrópica para la entrada del ion al canal . . . . .	65
A.1.10. Función de distribución radial (RDF) . . . . .	68
A.2. Figuras suplementarias . . . . .	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Potencial electrostático para el modelo 2M. . . . .	17
2. Potencial electrostático promedio para los modelos 2P y C. . . . .	19
3. Potenciales electrostáticos promedio de los sistemas modelos CEC, GJC y $CEC_{inv}$ . . . . .	21
4. Concentración molar promedio de los iones en los sistemas modelo. . . . .	25
5. Función de distribución radial del agua alrededor de los iones. . . . .	27
6. Potenciales de fuerza media del proceso de permeación del ion sodio. . . . .	29
A1. Campo de fuerza general . . . . .	55
A2. Esquema de la metodología para generar una diferencia de potencial mediante la aplicación del campo eléctrico . . . . .	60
A3. Procedimiento para obtener mapas de contornos promedio . . . . .	62
A4. Esquema de las regiones usadas para calcular la energía de transferencia del ion hacia el poro desde la región libre . . . . .	67
A5. Potenciales electrostáticos de los sistemas sin un campo eléctrico aplicado. . . . .	69
A6. Potenciales electrostáticos del sistema de GJC sin una diferencia de potencial. . . . .	70
A7. Concentración molar promedio de los iones en los sistemas sin una diferencia de potencial. . . . .	71
A8. Potenciales de fuerza media del proceso de permeación del ion cloruro. . . . .	73
A9. Potenciales de fuerza media para los modelos sin cargas en la superficie del canal. . . . .	74

## ÍNDICE DE TABLAS

I.	Corriente iónica total para los sistemas modelados . . . . .	23
II.	Energía libre de transferencia. . . . .	28
AI.	Eventos de permeación . . . . .	72

# ACRÓNIMOS

- HC** Hemicanal (del inglés *hemichannel*)
- GJC** Canales de uniones en hendidura (del inglés *Gap Junction Channel*)
- RDF** Función de distribución radial (del inglés *Radial Distribution Function*)
- PMF** Potencial de fuerza media (del inglés *Potential of Mean Force*)
- wtMeta** Metadinámica bien temperada (del inglés *well-Tempered Metadynamics*)
- 2M** Sistema modelo de doble membrana
- 2P** Sistema modelo de doble membrana con poro
- C** Modelo con un canal que atraviesa las dos membranas
- CEC** Modelo de un canal con cargas en la superficie que imita la disposición de cargas de GJC
- CEC<sub>inv</sub>** Modelo de un canal con cargas en la superficie con una disposición inversa
- V<sub>m</sub>** Voltaje transmembrana
- V<sub>j</sub>** Voltaje *transjunctional* o trans unión en hendidura (del inglés *transjunctional voltaje*)
- NTH** Hélice N-Terminal (del inglés *N-terminal Helix*)
- PH** Parahélice (del inglés *Parahelix*)
- PME** Partículas en malla de Ewald (del inglés *Particle Mesh Ewald*)
- VMD** Del inglés *Visual Molecular Dynamics*
- NAMD** Del inglés *NAnoscale Molecular Dynamics*

## RESUMEN

Las conexinas son una familia de proteínas de vertebrados que constituyen los canales de uniones en hendidura o *Gap Junction Channels* (GJC). Estos canales conectan el citoplasma de dos células adyacentes, ya que atraviesan dos membranas celulares permitiendo la comunicación intercelular.

A pesar del vasto conocimiento relacionado con la influencia del voltaje en las propiedades de transporte de estos canales iónicos, existen pocos estudios que describan, a nivel atómico, la modulación del transporte iónico por los GJC bajo la influencia de una diferencia de potencial. Por ello, estudios mediante el uso de dinámica molecular de los efectos del potencial en el transporte iónico y la concentración iónica en un sistema de GJC podrían ser relevantes para explicar este fenómeno.

En la presente tesis se crearon diferentes sistemas simples que contienen aspectos básicos de los GJC. Se observó el efecto de la diferencia de potencial en sistemas de membrana dual (o sistemas con dos membranas). Se estudiaron los diferentes sistemas tomando atención en el comportamiento del potencial electrostático, la densidad iónica, corriente iónica y propiedades termodinámicas de la permeación de los iones. Con esto hemos probado que una distribución de cargas que imita a la de un GJC disminuye la corriente aniónica, favoreciendo la corrientes catiónicas, en concordancia con la evidencia experimental.

A pesar de la simplicidad de nuestro modelo, que no contiene un mecanismo de apertura/cierre (del inglés *gating*) mediado por voltaje, estos modelos simplifi-

cados ofrecen una clara descripción con nivel atómico del complejo fenómeno de transporte iónico en los GJs.

## ABSTRACT

The conductance of ion channels can be modulated by a potential difference across the membrane due to alterations on ion-mobility and also by changes in the pore structure. Despite the vast knowledge regarding the influence of voltage on the transport properties of ion channels, little attention has been paid to describe, with atomic detail, the modulation of the ionic transport properties of gap-junction channels (GJCs) under the influence of the transjunctional voltage. Hence, molecular dynamics simulations were performed to explore simple dual-membrane systems that account for the very basic features of GJCs when an external E-field is applied. In doing so, we have studied the behavior of the electrostatic potential, ion density, ion currents and equilibrium properties of our models. To evaluate our similar model of GJC, which have explicit charges in the channel akin GJCs, we compare the electrostatic potential of this model with an all-atom molecular simulation of the GJC system. We observed that our simple model fairly reproduces the electrostatic potential of a GJC under a transjunctional voltage. Moreover, ionic current and thermodynamics studies allowed us to conclude that charge distribution akin GJCs proved to decrease the anionic currents, favoring cationic currents, in agreement with experimental evidence. Despite of the simplicity of our model, which do not encompass any structural mediated voltage-gating mechanism, these somewhat simplified dual-membrane models offer a clear molecular picture with atomistic detail of more complex phenomena occurring in GJCs.

# INTRODUCCIÓN

Como resultado de permeabilidades específicas de especies iónicas a través de la membrana celular, la concentración iónica es generalmente diferente entre el reservorio citosólico y el extracelular. Esta heterogeneidad de distribución de cargas es producida por la acción de los canales iónicos y las bombas iónicas, que generan un gradiente electroquímico (o diferencia de voltaje) que es crucial en la regulación de muchos procesos biológicos, entre los cuales se encuentran la homeostasis de iones y la conducción del potencial de acción en neuronas (Hille, 2001; Bezanilla, 2008). La modulación del transporte iónico por los GJC bajo la influencia del voltaje es conocida y ha sido extensamente descrita por diferentes autores a un nivel atómico (Groome, 2014; Khalili-Araghi y col., 2013; Villinger y col., 2010; Sotomayor y col., 2007). Esta modulación depende de la disposición de los residuos cargados que reaccionan bajo la influencia de un campo eléctrico, generando un cambio conformacional determinado que permitirá el paso de especies de iones en particular.

Los canales iónicos no solamente permiten la comunicación entre la célula y el exterior. Existen canales que permiten la comunicación entre dos células adyacentes, denominados canales de uniones en hendidura (GJC<sub>1</sub>, del inglés *Gap Junction channel*) (Harris y Locke, 2009; Mese y col., 2008). Los GJC permiten la conexión entre los citoplasmas de dos células adyacentes por medio de un canal que atra-

viesa dos membranas. La superficie hidrofílica del canal permite la difusión pasiva, de agua, iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), pequeños péptidos y pequeñas moléculas como cAMP y  $\text{IP}_3$ . Estructuralmente, los GJC están compuestos por dos hemicanales, cada uno formado por seis monómeros de conexina (Yeager y Gilula, 1992; Yeager, 1998; Saez y col., 2003). En general cada conexina se caracteriza por poseer cuatro hélices transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4), dos *loops* extracelulares (E1 y E2), dos *loops* intracelulares (CL y CT) y una hélice amino-terminal (NTH) en la región transmembrana (Maeda y col., 2009).

Datos experimentales han demostrado que las propiedades de transporte de GJC son moduladas por diferencias de potencial (Ek-Vitorin y Burt, 2013; Oh y Bargiello, 2015), demostrando la existencia de un mecanismo de apertura/cierre mediada por voltaje (del inglés *voltage gating*) (Harris y col., 1981; Spray y col., 1981). Experimentos electrofisiológicos han caracterizado la conductancia de los GJC bajo la presencia de dos tipos de diferencia de voltaje: i) a un voltaje transmembrana  $V_m$ , que ocurre cuando existe una diferencia de voltaje entre el citoplasma y el espacio extracelular de la célula, y ii) a un voltaje *transjunctional* o trans unión en hendidura (del inglés *transjunctional voltage*)  $V_j$ , cuando existe una diferencia de voltaje entre los citoplasmas de las células adyacentes que conforman el canal.

Se han postulado dos diferentes mecanismos de *voltage gating* basados en la conductancia del canal en experimentos de canal único. Las transiciones rápidas en el tiempo con diferentes conductancias se les denominó *fast-gating*, relacionadas posiblemente a los movimientos de la hélice NTH y una región denominada *parahelix*

(PH o TM1/E1), mientras que transiciones desde un estado abierto a completamente cerrado, en el orden de los milisegundos, se les denominó *slow-gating*, las cuales implicarían grandes cambios conformacionales (Oh y Bargiello, 2015). Evidencias a partir de mediciones de corriente sugieren que los residuos que detectan el voltaje son parte del poro; entonces los sensores de voltaje deberían ser una parte integral de la barrera de permeación (Ek-Vitorin y Burt, 2013; Maeda y col., 2009; Bukauskas y Verselis, 2004).

A pesar de la evidencia experimental, permanece desconocido la posición, composición de residuos de aminoácidos y número de sensores de voltaje (Araya-Secchi y col., 2014). Por ello, una descripción sistemática a nivel atomístico de los efectos del voltaje sobre el transporte iónico de GJC, dará luces del rol que juegan los residuos que se encuentran expuestos hacia el poro. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado hacia este objetivo (Kwon y col., 2011). No obstante, aproximaciones con sistemas *all-atom* (Hub y col., 2010; Kutzner y col., 2011) indican que para entender los mecanismos que subyacen al comportamiento de esta estructura compleja, se requiere el desarrollo y estudio de sistemas simples (menos demandantes computacionalmente). Siguiendo esta aproximación, estudios previos han demostrado las características básicas de los efectos del voltaje sobre modelos simples. Estos sistemas permiten hacer una descripción atómica del transporte iónico, voltajes resultantes y termodinámica de los sistemas (Li y col., 2007; Garate y col., 2009a; Garate y col., 2009b; Gumbart y col., 2012; Khalili-Araghi y col., 2013)

En simulaciones de dinámica molecular, el uso de condiciones periódicas de borde

en un sistema compuesto por una membrana rodeada por una solución electrolítica, no permite que exista una diferencia de la composición iónica entre las dos regiones que rodean la membrana. Por lo tanto, sin la presencia de un gradiente iónico, no se puede generar un potencial de membrana. A continuación se describen diferentes métodos que han sido propuestos para resolver este problema.

i) El uso de sistemas de doble-membrana para generar dos volúmenes de agua con los cuales generar la asimetría iónica deseada (Sachs y col., 2004; Delemotte y col., 2008). Por ende, modificaciones manuales de la concentración iónica permiten establecer el voltaje deseado. Sin embargo, ajustes continuos son requeridos para mantener una diferencia de voltaje si las especies iónicas pueden permear a través de la membrana (Delemotte y col., 2008).

ii) Esto puede ser solucionado mediante el intercambio de iones con moléculas de agua empleando un ensamble termodinámico de gran canónico ( $\mu$ PT), que usa el algoritmo de Monte Carlo para mantener el potencial químico ( $\mu$ ) del sistema a través del tiempo (Kutzner y col., 2011);

iii) Recientemente, un método que permite usar sistemas con una sola membrana, consiste en la aplicación de un paso energético no periódico únicamente sobre las especies iónicas en el borde de la caja periódica. De esta forma, mantener una asimetría iónica más realista, la cual puede ser ajustada dinámicamente durante la simulación (Khalili-Araghi y col., 2013).

iv) Finalmente, una forma atractiva y simple de obtener una diferencia de potencial, es mediante la aplicación de un campo eléctrico a lo largo de la dirección

deseada, lo que genera un reordenamiento de los iones en el sistema, generándose un potencial de membrana. Este método ha sido extensamente usado para el estudio del transporte iónico a través de los canales iónicos (Roux, 2008; Gumbart y col., 2012) (Para más información sobre la metodología, ver Sección A.1.5).

En esta tesis, estudiamos modelos reducidos y simplificados de GJC, siguiendo la aproximación usada por Gumbart y col., 2012. Los modelos pueden ser descritos como un canal que atraviesa dos membranas. Vía el método de simulación de dinámica molecular y través de la aplicación de un campo eléctrico externo (Anexo teóricos A.1.3 y A.1.5), se realizó una descripción detallada del voltaje resultante y propiedades iónicas (estructurales y dinámicas). Adicionalmente, el proceso de permeación catiónica al equilibrio fue estudiado mediante su potencial de fuerza media (PMF) (Anexo teórico A.1.7). En general, los resultados nos permitieron racionalizar sobre los efectos de la diferencia de voltaje en un sistema de membrana dual. Por sobretodo, nos permiten demostrar que el modelo que posee una distribución de cargas similar a los GJCs, genera un canal que permite una mayor corriente de cationes mediante la disminución de las corrientes aniónicas. De esta forma, nuestros resultados concuerdan con las características básicas de los GJC, describiendo el rol de las cargas en estos canales como un elemento esencial para comprender el proceso de comunicación intercelular.

## HIPÓTESIS

La diferencia de potencial producida al aplicar un voltaje externo en un sistema de membrana dual modula sus características de transporte iónico y estructuración de solvente.

## OBJETIVOS GENERALES

Demostrar que al aplicar un voltaje externo sobre una membrana dual con un poro se genera una diferencia de potencial que modula las características de transporte iónico y estructuración del solvente en este sistema transmembrana fuera del equilibrio.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los efectos de la aplicación de un voltaje externo sobre el potencial de membrana en un sistema representativo de canales de uniones en hendidura fuera del equilibrio, mediante simulaciones de dinámica molecular.
- Caracterizar la mecánica del transporte iónico producida por la diferencia de potencial en un sistema representativo de canales de uniones en hendidura fuera del equilibrio con programas para el análisis de trayectorias de dinámica molecular.
- Caracterizar la estructuración del solvente generada por una diferencia de potencial en un sistema representativo de canales de uniones en hendidura fuera del equilibrio mediante programas de análisis de trayectorias a partir de dinámica molecular.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 5.1. Sistemas modelados

Se generaron cinco sistemas simples que se caracterizan por representar: i) un sistema de membrana dual (2M), ii) un sistema de membrana dual con poros (2P), iii) un sistema de membrana dual con un canal que atraviesa las membranas (C), iv) un sistema de membrana dual con un canal que posee cargas explícitas en su superficie, imitando la distribución de cargas de los GJC (CEC) y v) un sistema de membrana dual con las cargas explícitas adicionadas con una disposición invertida ( $CEC_{inv}$ ). Los modelos de membrana fueron construidos usando átomos de carbono individuales (SP<sup>2</sup>) ordenados en capas de cubos con un cuerpo centrado con una distancia entre aristas de 4 Å. Cada membrana está compuesta por 6 capas verticales con un espesor total de 24 Å, y se encuentran separadas entre sí por 24 Å. Los sistemas con poros (2P, C, CEC y  $CEC_{inv}$ ) tienen un radio del poro de 10 Å. Los sistemas con canales (C, CEC y  $CEC_{inv}$ ) tienen un canal compuesto por una capa de carbonos individuales. Al modelo CEC se le asignaron cargas a los átomos que conforman el canal, con una distribución que imita la disposición de cargas en GJC. Estos forman dos anillos con carga positiva alrededor del centro del poro y dos anillos con carga negativa en la entrada del canal, cuyos valores son de 0.1 o -0.1 de carga

elemental ( $e$ ), respectivamente. Para el sistema  $CEC_{inv}$  se mantuvo la disposición geométrica de los átomos cargados pero se invirtió el valor de su carga. Todos los sistemas fueron solvatados e ionizados con NaCl a una concentración de 300 mM en una caja periódica de  $48 \times 48 \times 128 \text{ \AA}$ .

En el proceso de ionización, puede ocurrir un desbalance de cargas en los sistemas (C, CEC y  $CEC_{inv}$ ), debido a la presencia de una cavidad entre membranas y el canal con su imagen periódica en estos sistemas. Para evitar esto, se calculó el número de iones que debería estar presente en este volumen según la concentración deseada de 300 mM. Luego con la herramienta *Autoionize* de VMD, el cual posiciona iones en la solución de forma aleatoria, se procedió a iterar el proceso de ionización hasta que el número de iones en este volumen fuese el correcto.

El sistema *all-atom* de GJC fue creado a partir del sistema propuesto por Araya-Secchi y col., 2014. Se obtuvieron las coordenadas de la proteína y lípidos del hemicanal de Cx26 después de 50 ns de equilibrio. Estas coordenadas fueron usadas para construir el GJC, basado en la propuesta estructural de Maeda y col., 2009. Para lograr esto, dos copias del hemicanal más los lípidos fue alineada a los carbonos alfa de la estructura cristalina (PDB, 2zw3). El sistema fue solvatado y neutralizado con 150 mM KCl. La dimensión final de la celda periódica es de  $142 \times 142 \times 215 \text{ \AA}$ , comprendiendo aproximadamente 500 mil átomos.

## 5.2. Simulaciones de dinámica molecular

Todas las simulaciones fueron realizadas con el motor de cálculo NAMD 2.9 (Phillips y col., 2005), el campo de fuerza de CHARMM 22 (MacKerell y col., 1998) y el modelo de agua TIP3P (Jorgensen y col., 1983). El método Particle Mesh Ewald (PME) (Darden y col., 1993) fue usado para el cálculo de interacciones electrostáticas con una tolerancia relativa de  $1 \times 10^{-6}$ , cuyo valor determina la exactitud con la cual es calculada la fuerza (en  $\text{Kcal mol}^{-1} \text{Å}^{-1}$ ) a partir del potencial electrostático en el espacio real. Un punto de corte de 12 Å fue aplicado para las interacciones de Ewald en el espacio real (ver Anexo A.1.4). El mismo valor fue usado para las interacciones de van der Waals (vdW), con una función suavizadora de cambio aplicada entre 10 Å a 12 Å. El paso de tiempo usado fue de 1 *fs*, con evaluaciones de interacciones no enlazante de corto alcance cada 1 *fs* y evaluaciones electrostáticas usando el método r-RESPA (Tuckerman y col., 1992) cada 4 *fs*. Las trayectorias de producción fueron hechas usando un ensamble NVT a una temperatura de 300 K usando el termostato de Langevin (Allen y Tildesley, 1989) con un coeficiente de amortiguación 1 *ps*<sup>-1</sup>. El algoritmo SHAKE (Ryckaert y col., 1977) fue aplicado para restringir el largo de la unión de todos los átomos de hidrógeno y que los átomos de la pseudo-membrana se mantuvieran fijos durante la simulación.

Previo a las simulaciones de producción, y con el fin de evitar el desecamiento de la superficie hidrofóbica. La solvatación del sistema se realizó con una caja de mayor tamaño que el sistema final, con el fin de cubrir por completo los átomos de

carbono. De esta forma, en una simulación con un ensamble NPT, la presión sobre las moléculas de agua permitió solvatar correctamente la superficie hidrofóbica. Después se procedió a remover las aguas sobrantes para dar continuidad a las membranas con su imagen periódica.

Se generaron simulaciones fuera del equilibrio con diferencias de potencial de 0,5 V y 1 V al aplicar un campo eléctrico externo de 0,09 y 0,18 Kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> e<sup>-1</sup> en el eje *z*, respectivamente (Procedimiento explicado en el Anexo A.1.5).

La simulación exploratoria del GJC fue realizada empleando el protocolo usado por Araya-Secchi y col., 2014. Una minimización inicial y un corto equilibrio de 500 *ps* con un paso de tiempo de 0,5 *fs* fue realizado para permitir la relajación y acomodación del sistema. Se corrió 20 *ns* de equilibrio con los mismos parámetros que el hemicanal. Después se corrió por otros 20 *ns* en presencia de un campo eléctrico para generar una diferencia de potencial de 1V. Para esta última simulación, el coeficiente de amortiguación fue asignada a 1 *ps*<sup>-1</sup> para los átomos pesados de los lípidos y cero para los demás átomos, de esta forma se evitó un sobrecalentamiento causado por el campo eléctrico y viscosidad artificial para el movimiento de cargas introducido por el algoritmo de Langevin, como fue sugerido por Sotomayor y col., 2007.

### 5.3. Potencial electrostático

El potencial electrostático fue calculado mediante el algoritmo PME (Darden y col., 1993) usando la herramienta PMEpot (Aksimentiev y Schulten, 2005) de

VMD (Humphrey y col., 1996). Para las simulaciones fuera del equilibrio bajo un campo eléctrico, el potencial final incorpora los valores del potencial de reacción obtenidos mediante PME más el potencial lineal aplicado de la ecuación (A19). Se usaron los módulos numpy (Oliphant, 2007) y matplotlib (Hunter, 2007) del lenguaje de programación Python para graficar los resultados. Más detalles sobre el algoritmo de PME y el método de su visualización, se encuentra en las secciones A.1.4 y A.1.6), respectivamente.

#### 5.4. Corriente iónica

La corriente iónica promedio a través de la celda periódica fue evaluada como la razón entre la carga eléctrica  $Q$  a tiempo  $t$  y el tiempo  $t$  cuando el tiempo tiende al infinito:

$$I_{avg} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{Q(t)}{t} \quad (1)$$

siendo la carga eléctrica calculada mediante la siguiente expresión:

$$Q(t) = \frac{1}{L_z} \sum_{iones} q_i [z_i(t) - z_i(0)] \quad (2)$$

donde  $z_i(t)$  representa la posición continua a través de las imágenes periódicas de cada ion,  $z_i(0)$  representa la posición inicial de cada ion,  $L_z$  el largo de la caja periódica en el eje  $z$  y  $q_i$  corresponde a la carga de cada ion (Gumbart y col., 2012)

Debido a que poseemos un tiempo limitado de cálculo, se usaron los últimos dos

nanosegundos de 10 ns de dinámica para calcular la corriente promedio  $I_{avg}$  (Ec. 1) y la desviación estándar.

## 5.5. Concentración molar

La concentración molar de agua e iones fué calculada usando la herramienta Vol-Map de VMD (Humphrey y col., 1996). Este nos permitió obtener la concentración de los iones a lo largo del eje central de los sistemas. Los resultados fueron graficados usando programas hechos en Python (más detalles en la Sección A.1.6).

## 5.6. Función de distribución radial (RDF)

Para caracterizar las interacciones entre los iones y las aguas tanto dentro del canal (espacio confinado) como fuera del canal (región libre), se calculó el RDF de los oxígenos de las aguas alrededor de los iones (sodio y cloro). Los valores de RDF no consideran la existencia de volúmenes (canal y membranas) que excluyen la presencia de aguas, por lo tanto se necesita una corrección a los valores obtenidos del RDF (Soper, 1997). Una corrección analítica implicaría un complejo cálculo relacionado con el volumen excluido para las aguas por cada posición del ion en el canal. Por lo tanto se usó una corrección empírica basado en el trabajo de Mancinelli y col., 2007 mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$g_{NaO_w}^c(r) = \frac{g_{NaO_w}(r)}{g_u^{emp}(r)} \quad (3)$$

donde  $g_{NaO_w}^c(r)$  es el RDF corregido entre sodio ( $Na$ ) y el oxígeno del agua ( $O_w$ ) en función de la distancia  $r$ , cuyo valor corresponde al cociente entre el RDF sin corrección  $g_{NaO_w}(r)$  y un factor de corrección empírico  $g_u^{emp}(r)$ . Este último corresponde a una función polinomial de orden 6 restringida a pasar por 1, a una distancia de 50 Å y los cocientes obtenidos de la división del RDF del sistema C y un sistema de iones a la misma concentración (300 mM) en agua libre.

## 5.7. Cálculos de energía libre

Se usó el método Metadinámica bien Temperada (del inglés *well-Tempered Metadynamics*) (detalles del método en la Sección A.1.8) para calcular la energía libre asociada al paso de un ion sodio a través del canal. Se generaron sistemas que contienen solo un ion sodio y su contra-ion ubicado en el borde de la caja periódica. El proceso fue proyectado a través de dos coordenadas de reacción ( $\xi(Z)$ ,  $\xi(XY)$ ), que corresponde a la distancia axial y radial respectivamente, desde el origen de la celda periódica y hacia el plano  $x - y$ , respectivamente, comprendiendo  $212 \times 12$  puntos en la grilla. La altura inicial de las “montañas” ( $W_0$ ) fue de 0,1 kcal/mol, con nuevas “montañas” cada 1000 pasos de tiempo (1 ps), y una temperatura sesgo ( $\Delta T$ ) de 1200 K. Más detalles del sistema usado y cálculos de energía libre en la Sección A.1.7. Los gráficos fueron creados a partir de la dinámica molecular cuando la energía libre entre las dos regiones libres fueran iguales, evaluado usando la ecuación A25.

Para calcular la diferencia energética de transferir el ion sodio desde la región libre hacia dentro del canal ( $\Delta A_{b \rightarrow p}^c$ , Ec. A27), se usaron correcciones debido a las restric-

ciones espaciales al movimiento del ion impuesto en la metodología según Doudou y col., 2009.

## RESULTADOS

### 6.1. Potencial electrostático de los sistemas de membrana dual.

Al aplicar un potencial de 0,5 V (Fig. 1) en un sistema de membrana dual simple (modelo 2M), el potencial decae solo a través de las membranas, acompañado por un aumento del potencial generado debido a la ausencia de moléculas de solvente que reaccionen al campo eléctrico, en otras palabras las membranas actúan como unos aisladores. Se observa una caída del potencial en el reservorio libre de agua entre las membranas, con un valor medio al voltaje aplicado ( $\sim 0,25$  V).

La adición de poros al modelo 2M, denominado modelo 2P (Fig. 2A), permite la difusión de agua e iones a través de las membranas. Esta presencia de iones y agua reduce la magnitud de la caída del potencial a través del aislante perforado, con una característica lineal entre cada reservorio (ver Fig. 2B,C), separando el sistema en tres regiones con voltajes diferentes.

En el sistema donde los poros son conectados por un canal (modelo C) (Fig. 2D), se observa un efecto similar al observado en el modelo 2P (ver Fig. 2E,F). Sin embargo, la presencia del canal divide el sistema en dos regiones con una única caída del potencial ubicada en el canal.



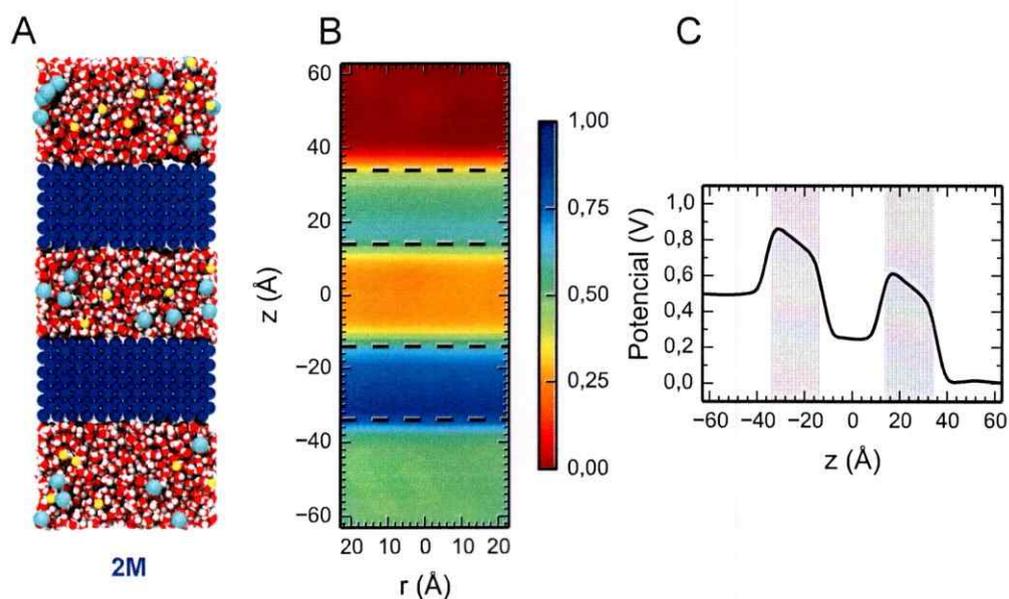


Figura 1: **Potencial electrostático para el modelo 2M.**

(A) Se muestran los átomos en su representación de vdW para el modelo 2M. (B) Potenciales electrostáticos promedio a lo largo del eje  $z$  y distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x - y$ , bajo un campo eléctrico de 0,5V . Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana. (C) Potencial electrostático promedio a lo largo del eje  $z$  bajo una diferencia de potencial de 0,5V. Las sombras grises representan la posición de las membranas en el eje  $z$ .

Como complemento, se calcularon los potenciales electrostáticos de los modelos estudiados bajo condiciones sin campo eléctrico (Fig. A5 A, B y C). Estos muestran que no existe una diferencia de potencial en la solución electrolítica entre las diferentes regiones del sistema.

## 6.2. Potenciales electrostáticos de modelos simplificados de GJC.

Teniendo en cuenta las características de la superficie electrostática del GJC (Fig. 3A), específicamente en su distribución de cargas, se asignaron cargas a los átomos que conforman al canal de nuestro modelo C, imitando la distribución de cargas del GJC, para generar el modelo CEC (Fig. 3B). Al igual que los sistemas previos, se calculó su potencial electrostático (Fig. 3C). De la misma forma se calculó el potencial electrostático del sistema de GJC (Fig. 3E). Este modelo representa algo más cercano a la realidad, puesto que es un modelo *all-atom*. Sin embargo, dado que este sistema requirió una gran capacidad de cómputo para obtener su trayectoria, solo pudimos obtener una dinámica molecular corta ( $\sim 20$ ns), para calcular su potencial electrostático promedio.

Al comparar cualitativamente los resultados del potencial electrostático del sistema modelo C (Fig. 3C,D) y el sistema de GJC (Fig. 3F,G), observamos que el modelo CEC reproduce el potencial electrostático del GJC bajo una diferencia de potencial de 1V. Este muestra una caída rápida del potencial con una forma ex-

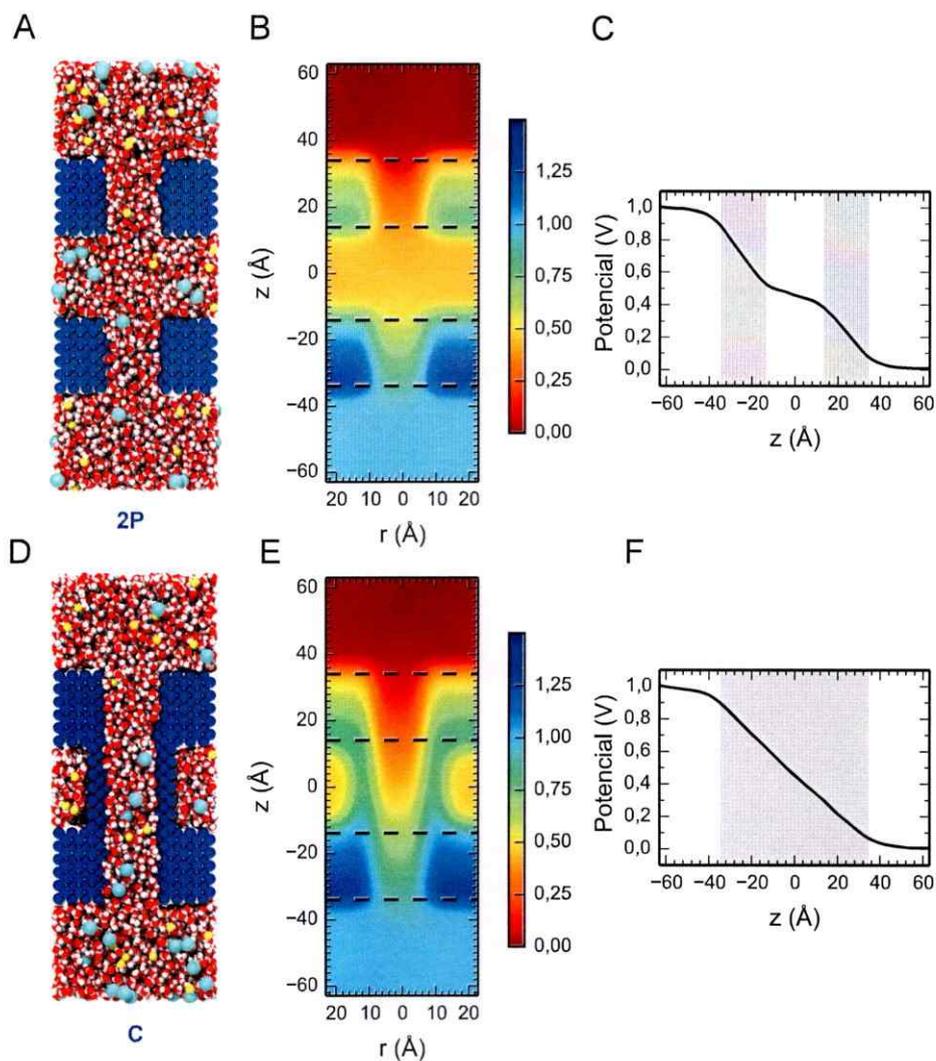


Figura 2: **Potencial electrostático promedio para los modelos 2P y C.**

Se muestran los átomos en su representación de vdW para los modelos 2P y C (A, D, respectivamente). Potenciales electrostáticos promedio a lo largo del eje  $z$  y distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x - y$ , bajo un campo eléctrico de 1V para los modelos 2P y C (B y E, respectivamente). Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana. Potencial electrostático promedio a lo largo del eje  $z$  bajo una diferencia de potencial de 1V para los modelos 2P y C (C y F, respectivamente). Las sombras grises representan los bordes representan la posición de las membranas o el canal en el eje  $z$ .

ponencial cóncava, exhibiendo una curva inclinada hacia potenciales más bajos en comparación al sistema con un canal neutro (modelo C) (ver Figs. 3D y 3G).

Con el fin de explorar como el potencial resultante puede ser afectado por un cambio en la distribución de cargas, se creó un modelo con las cargas invertidas, denominado modelo  $CEC_{inv}$  (Fig. 3H). En este caso, el potencial cae de forma más suave, exhibiendo una forma exponencial convexa que es simétricamente inclinada hacia potenciales más altos en comparación al sistema neutro o modelo C (ver Fig. 3I y 3J).

Los potenciales resultantes de los sistemas sin un campo eléctrico externo (ver Figs. A5 y A6), justifican lo observado en los sistemas con carga: es decir, las cargas al interior del canal modifican el potencial electrostático del sistema.

### 6.3. Corriente iónica

Aunque la caída del potencial no es afectada por los detalles microscópicos de cada celda unitaria, la propiedades de transporte de las especies iónicas bajo un campo eléctrico serán indudablemente perturbadas, modificando la distribución de cargas iónicas de los sistemas simulados. Consecuentemente, calculamos la corriente iónica (ver Tabla I) basado en el desplazamiento de los iones a través de la celda unitaria según el protocolo de Gumbart y col., 2012.

Como esperábamos, bajo condiciones sin un campo eléctrico, las corrientes iónicas tienden a cero, mientras que bajo una diferencia de potencial de 1V se observa el paso de iones y valores de corriente iónica sobre cero. La corriente total para los

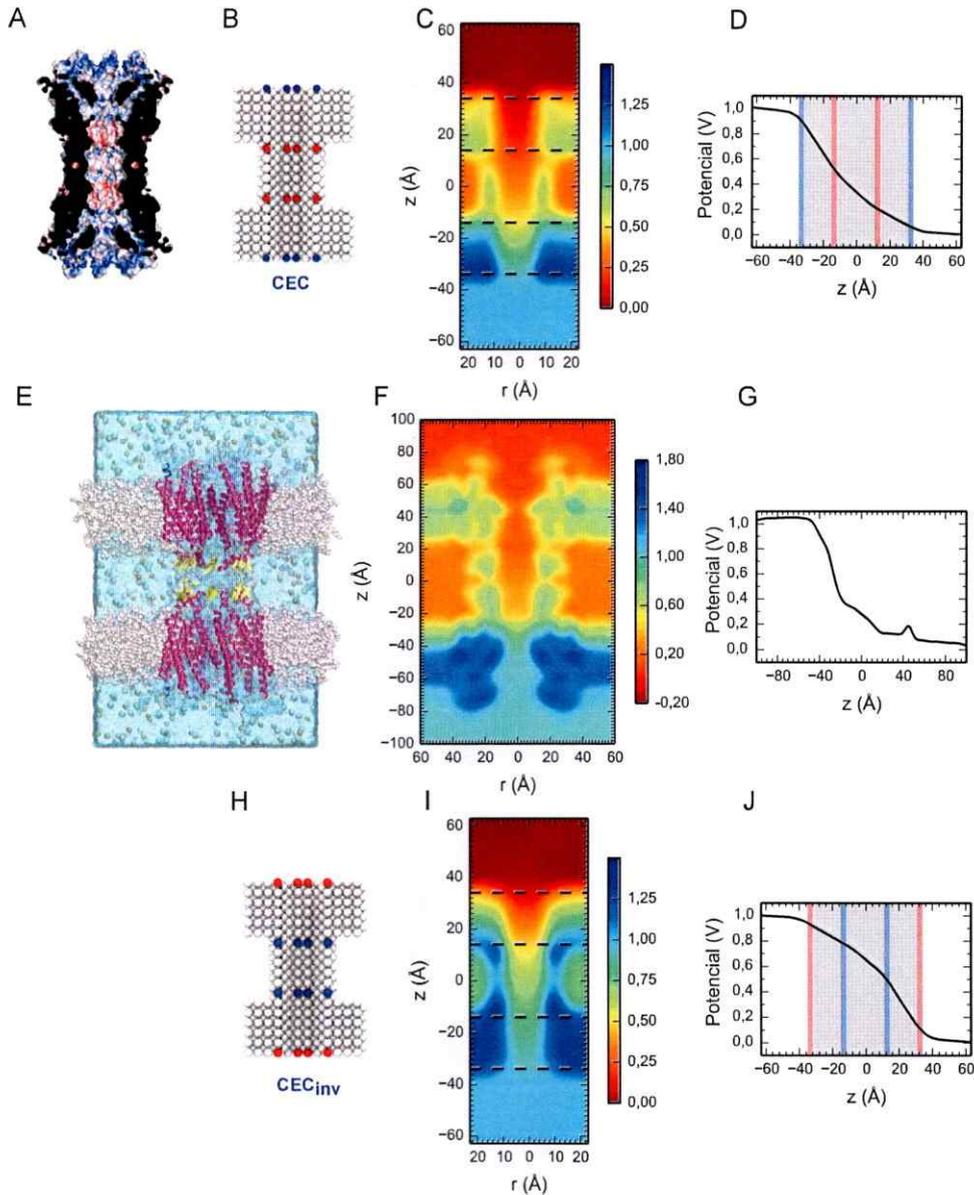


Figura 3: Potenciales electrostáticos promedio de los sistemas modelos CEC, GJC y  $CEC_{inv}$ .

(A) Superficie electrostática de la estructura cristalina de hCx26 (PDB ID, 2zw3) de acuerdo a Maeda y col., 2009 . (B) y (H), representaciones simplificadas de los modelos CEC y  $CEC_{inv}$  mostrados en su representación de VdW, donde solo se observa el canal y en color las cargas asignadas (azul=positivo, rojo=negativo). (E) Modelo *all-atom* del GJC embebido en una membrana de POPC, en una caja de agua con iones. (C, F y I) Potenciales electrostáticos promedio a lo largo del eje  $z$  y distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x - y$  , bajo un campo eléctrico de 1V para los modelos CEC, GJC y  $CEC_{inv}$  respectivamente. Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana. (D, G y J) Potencial electrostático promedio a lo largo del eje  $z$  bajo una diferencia de potencial de 1V para los modelos CEC, GJC y  $CEC_{inv}$  respectivamente. Las sombras grises representan la sección donde se encuentra el canal y dentro de ella en colores la posición de las cargas en el canal en el eje  $z$  (azul=positivo, rojo=negativo).

sistemas 2P y C difieren solamente en un 8 %, indicando que el confinamiento de los iones al entrar al canal del modelo C no juega un rol fundamental. Se observa un mayor valor de las corrientes aniónicas, como se esperaba debido a que el ion cloruro tiene un mayor coeficiente de difusión que el ion sodio en el agua TIP3P (Joung y Cheatham III, 2009).

Cálculos de la corriente iónica (Tabla I), revelan que el modelo CEC exhibe una mayor corriente catiónica. Por lo tanto, la presencia de cargas explícitas, significativamente altera las corrientes iónicas. Específicamente, en el modelo CEC se induce una reducción de un 50 % de la corriente aniónica sin ningún decrecimiento del transporte del ion sodio.

Para evaluar el rol de las cargas como piezas indispensables en la selectividad de los iones, se decidió invertir la disposición de las cargas generando el modelo CEC<sub>inv</sub>. Al calcular la corriente iónica de este sistema se presentó una alta corriente aniónica. De forma similar al modelo CEC, se obtuvo una reducción de la corriente catiónica (ver Tabla I), sin embargo, esta caída corresponde a un 27 %.

#### 6.4. Densidad iónica

Una visión gráfica de los efectos mencionados anteriormente es obtenida al graficar la densidad iónica promedio a lo largo de la celda de simulación (ver Fig. 4). Para los modelos 2P y C se observa una distribución parcialmente homogénea de la concentración molar ( $\sim 0,3$  M) a lo largo de los poros o el canal, respectivamente (ver Fig. 4A y B). En presencia de cargas en la superficie del canal (Fig. 4C y D),

Tabla I: Corriente iónica total para los sistemas modelados

Corriente iónica obtenida a través del movimiento de todos los iones, calculada como carga elemental e por nanosegundo  $ns$ .

Corriente ( $e/ns$ )	Voltaje ( $\Delta V$ )	2P	C	CEC	CEC <sub>inv</sub>
Total	+1	$2,83 \pm 0,036$	$2,63 \pm 0,11$	$1,86 \pm 0,046$	$2,40 \pm 0,033$
Na <sup>+</sup>	+1	$1,05 \pm 0,026$	$1,03 \pm 0,030$	$1,01 \pm 0,036$	$0,75 \pm 0,038$
Cl <sup>-</sup>	+1	$1,78 \pm 0,038$	$1,63 \pm 0,097$	$0,86 \pm 0,020$	$1,65 \pm 0,031$
Total	0	$0,15 \pm 0,054$	$0,096 \pm 0,031$	$0,015 \pm 0,041$	$0,071 \pm 0,046$
Na <sup>+</sup>	0	$0,0052 \pm 0,022$	$0,071 \pm 0,030$	$0,053 \pm 0,050$	$0,091 \pm 0,014$
Cl <sup>-</sup>	0	$0,14 \pm 0,044$	$0,025 \pm 0,021$	$0,027 \pm 0,018$	$-0,020 \pm 0,038$

los perfiles de densidad iónicas sufren cambios substanciales exhibiendo una notoria asimetría, especialmente cerca de la entrada de los poros, donde los iones tienden a aglomerarse. Por un lado, en el modelo CEC (Fig. 4C) se muestra este comportamiento para el cloruro, donde la acción concomitante del campo eléctrico, las cargas positivas en la entrada del poro y las negativas en el centro del canal, forma una acumulación aniónica en la entrada superior (eje  $z$  positivo,  $+z$ ), disminuyendo el transporte de cloruros a lo largo del canal. Una alta concentración de iones sodio se encuentra presente en esta ubicación interactuando con los aniones, sin embargo no existe una reducción de la concentración menor a 0,3 M en el canal. Por otro lado, basado en similares argumentos, en el modelo CEC<sub>inv</sub> (Fig. 4D) se observa un tapón iónico en la entrada inferior de iones sodio ( $-z$ ), con una reducción de la corriente catiónica (ver Tabla I).

## 6.5. Caracterización de la permeación de los iones

### 6.5.1. Función de distribución radial

Con el motivo de observar la estructura del agua en estos sistemas y su implicancia en el paso de iones. Se calculó la función de distribución radial (RDF) de los oxígenos del agua alrededor de los iones. Se observó que los valores del RDF no son influenciados por la presencia de la diferencia de voltaje (resultados no mostrados). Tomando como referencia los datos obtenidos por el modelo C sin un campo eléctrico aplicado, se observó que la integridad de la capa de solvatación por la infiltración

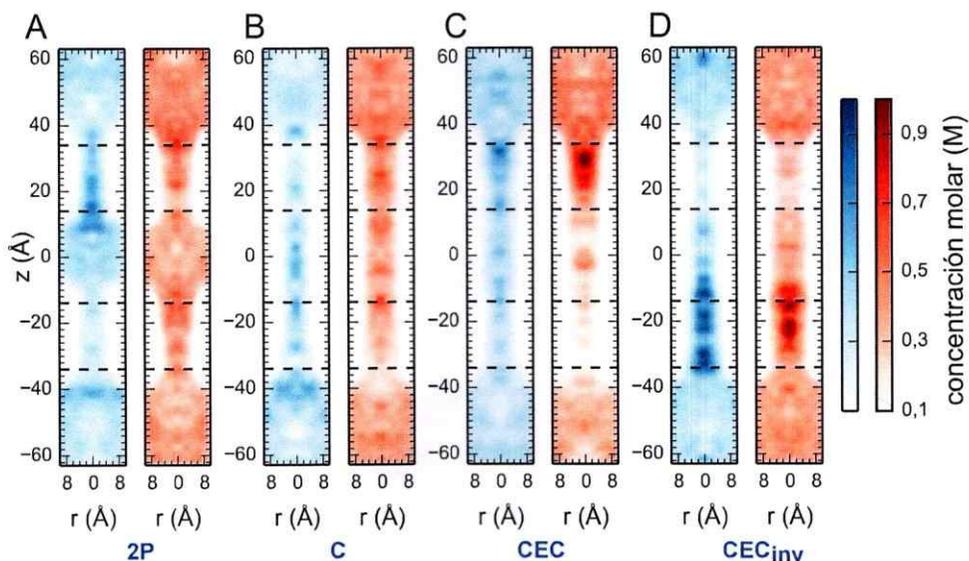


Figura 4: Concentración molar promedio de los iones en los sistemas modelo.

La concentración molar promedio de las especies (azul = ion sodio, rojo = ion cloro) en función de su posición en el eje  $z$  y distancia radial desde el eje central o poro central de el plano  $x - y$  para los modelos 2P (A), C (B), CEC (C) y CEC<sub>inv</sub> (D), respectivamente. Las líneas punteadas representan el contorno de las membranas.

de iones al canal no se pierde en su totalidad, conservando las dos primeras capas de solvatación (ver Fig. 5). Para los iones en la región confinada, se disminuye la probabilidad de encontrar una agua en un radio mayor a 7 Å, esto se debe al impedimento estérico de las paredes del canal, que no permiten la presencia de aguas a estas distancias del ion (Fig. 5)

### 6.5.2. Potencial de Fuerza Media (PMF) de los cationes a través del canal

Para caracterizar el PMF de los cationes en el proceso de transporte, se procedió a calcular el PMF del paso de un catión a través de los modelos CEC y  $CEC_{inv}$  en condiciones sin un campo eléctrico aplicado. Los resultados muestran que para el modelo CEC, se genera un perfil suave con un único mínimo local posicionado en el centro del poro (ver Figs. 6 A y C). Mientras tanto, en el modelo  $CEC_{inv}$  existen mínimos locales hacia las regiones de agua libre. A pesar de las condiciones simétricas, el PMF presenta un perfil rugoso con una barrera notable cercana a las 4 kcal/mol en la vía de permeación. Barrera que explica la dificultad en la cinética del paso de cationes por el paso del canal del modelo  $CEC_{inv}$ .

En el caso del cloruro se comprobó la existencia de una barrera energética en el modelo CEC, mientras que en el modelo  $CEC_{inv}$  se observó un mínimo global (ver Fig. A8).

Se realizaron los mismos cálculos para los modelos 2P y C (Fig. A9), determinándose la existencia de barreras energéticas para el paso del ion a través de las

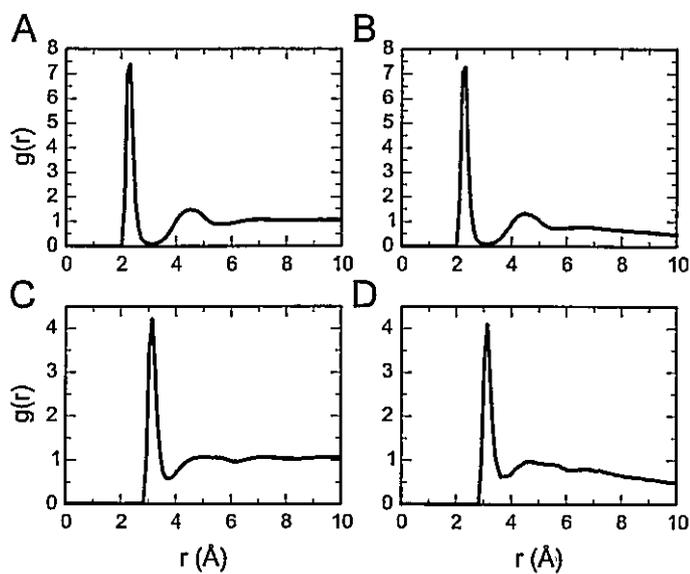


Figura 5: Función de distribución radial del agua alrededor de los iones. Función de distribución radial (RDF) de los oxígenos de las aguas alrededor del ion sodio (A, B) y del ion cloro (C, D). (A, C) corresponde a los RDFs obtenidos en la región libre y (B, D) corresponde a los obtenidos en el espacio confinado.

membranas de aproximadamente 1 kcal/mol, levemente por sobre el ruido térmico o energía térmica ( $k_bT \sim 0,6$  kcal/mol).

Teniendo los resultados de la energía libre del catión a lo largo del eje  $z$ , podemos tomar estos valores para calcular la diferencia de energía libre de transferencia de un ion sodio, desde la región libre hacia dentro del canal ( $\Delta A_{b \rightarrow p}$ ). Estos valores indican que la entrada del catión en el canal es favorable en el caso CEC. Siendo no-favorable en los caso 2P, C y CEC<sub>inv</sub>.

La corrección de estos valores ( $\Delta A_{b \rightarrow p}^c$ , ec. A27) al tomar en cuenta las restricciones espaciales iniciales en el cálculo del PMF (ver Tabla II), muestran que el proceso de entrada no es espontáneo en todos los casos. Por ello toma relevancia el efecto de la diferencia de potencial para que ocurra el paso de los iones a través de los canales.

Tabla II: Energía libre de transferencia.

Sistema	$\Delta A_{b \rightarrow p}^a$ (kcal/mol)	$\Delta A_{b \rightarrow p}^c$ (kcal/mol)
2P	$0,17 \pm 0,04$	$3,54 \pm 0,04$
C	$0,34 \pm 0,04$	$3,71 \pm 0,04$
CEC	$-1,13 \pm 0,03$	$2,23 \pm 0,03$
CEC <sub>inv</sub>	$0,80 \pm 0,08$	$4,17 \pm 0,08$

<sup>a</sup> Energía libre no corregida ( $\Delta A_{b \rightarrow p} = A_p - A_b$ )

<sup>b</sup> Energía libre corregida (ver ecuación A27)

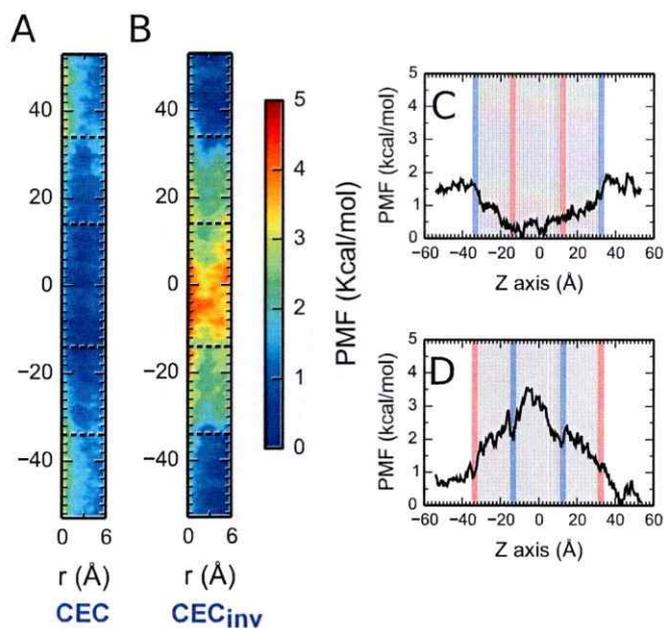


Figura 6: Potenciales de fuerza media del proceso de permeación del ion sodio.

Perfiles bidimensionales del PMF para el proceso de permeación del ion sodio proyectada a lo largo del eje  $z$  y la distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x-y$ , para los modelos CEC (A) y  $CEC_{inv}$  (B). Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana. Perfil unidimensional del PMF para la permeación del ion sodio proyectada a lo largo del eje  $z$  para los modelos CEC (C) y  $CEC_{inv}$  (D). Las sombras grises representan la sección donde se encuentra el canal y dentro de ella en colores la posición de las cargas en el canal en el eje  $z$  (azul=positivo, rojo=negativo).

## DISCUSIÓN

En los canales iónicos dependientes de voltaje, tales como GJC, las corrientes son dependientes de la presencia de una diferencia de potencial a través de la membrana (Ek-Vitorin y Burt, 2013; Oh y Bargiello, 2015; Harris y col., 1981; Spray y col., 1981). Numerosos estudios basados en simulaciones de dinámica molecular, de canales iónicos de membrana simple, han sido caracterizados bajo los efectos de un potencial de transmembrana (Groome, 2014; Khalili-Araghi y col., 2013; Villinger y col., 2010; Sotomayor y col., 2007). Sin embargo, para nuestro conocimiento, no existen estudios que se hayan enfocado en los efectos del voltaje a través de un sistema de membrana dual (o sistemas con dos membranas).

La validación teórica del método al aplicar un campo eléctrico ha sido establecida recientemente (Roux, 2008; Gumbart y col., 2012). En la práctica, al aplicar el campo eléctrico se genera un circuito virtual de dos soluciones acuosas, sometidas a una diferencia de potencial debido a una fuerza electro motriz. Bajo esta condición, una solución salina uniforme reducirá el campo eléctrico neto mediante un reordenamiento interno de los iones en el espacio. Sin embargo para soluciones en presencia de una membrana, la propia organización de los iones en las regiones libres genera una solución no uniforme, generando un campo de reacción opuesto al campo eléctrico aplicado, y cualquier caída de potencial tomará lugar en las regiones con

un bajo valor dieléctrico, en este caso, en la región de la membrana, lo que produce el potencial de membrana (Roux, 2008; Gumbart y col., 2012).

## 7.1. Potenciales electrostáticos de los sistemas

Teniendo en cuenta lo anterior, desarrollamos un conjunto de sistemas compuestos por dos membranas que cuentan con características básicas de los GJC.

Al calcular el potencial electrostático de los sistemas, se observó según lo esperado (Gumbart y col., 2012), que la diferencia de potencial depende solamente del tamaño de la celda periódica y la magnitud del campo eléctrico, siendo insensible a los detalles microscópicos. La diferencia de potencial entre las regiones libres en los extremos de las celda corresponden a los generados mediante el campo eléctrico.

Para el sistema compuesto por dos membranas (modelo 2M), se observó según lo esperado, una caída del potencial localizada dentro de la zona donde no existe un campo de reacción, que constituye regiones bajas dieléctricamente, este decaimiento es acompañado por una alza en el potencial, debido a las propiedades aislantes de las membranas.

La caída del potencial al agregar poros a estas membranas (modelo 2P) exhibe un decaimiento a lo largo del eje  $z$  en la región donde se ubican las membranas. Una tendencia similar es observada cuando un canal conecta ambas membranas en el modelo C. Por lo tanto, la presencia de iones y agua reduce la magnitud de la caída del potencial a través del aislante perforado, siguiendo un régimen lineal según lo esperado (Roux, 2008; Gumbart y col., 2012).

Debido al gran tamaño del modelo atomístico de GJC que implica un sistema de alrededor de 500 mil átomos, cualquier estudio mediante simulación de dinámica molecular, se restringe a un par de cientos de nanosegundos. Reduciendo el estudio de esta proteína de membrana a un intervalo de tiempo que no alcanza a reproducir el transporte de iones a nivel experimental (Bernèche y Roux, 2000; Shrivastava y Sansom, 2000).

Para ejemplificar este hecho, y dado que la conductancia es máxima cuando no existe una diferencia de potencial, para estudiar el transporte iónico a través de estos canales en su estado abierto, se requeriría aplicar una diferencia de potencial cercana a cero. En el caso del GJC formado por la conexina Cx26, cuya conductancia unitaria es de 140 pS (Oh y col., 1999), se debería aplicar una diferencia de potencial que no exceda aproximadamente los 20 mV. A esta diferencia de potencial obtendríamos una corriente de 2.8 pA o  $0.017 e/ns$ . En el mejor de los casos, si asumimos que el canal se comporta como una resistencia y que solo permite transportar una carga a la vez en el sentido de la corriente, entonces la permeación de una carga demoraría 59 ns ( $1 e \div 0.017 e/ns$ ). Por lo tanto, para observar un alto número de eventos de permeación y que el sistema alcance un estado estacionario, se requeriría hacer una simulación de dinámica molecular del orden de los microsegundos. Pero dado que el canal puede albergar en su interior múltiples cargas, lo que implica múltiples interacciones de los iones con el canal y de los iones entre si, se requeriría simular en el orden de los milisegundos, lo que se encuentra por sobre las capacidades de cómputo actuales.

Estudios previos han empleado aproximaciones electrostáticas continuas en combinación con dinámica browniana para solucionar este problema (Kwon y col., 2011). Sin embargo, estas descripciones reducidas ignoran parcial o completamente los detalles microscópicos de las moléculas de solvente, que quizás lleven a artefactos si estos efectos no son incluidos apropiadamente.

Por esta razón, un modelo de membrana dual simplificado que cuenta con la geometría básica y distribución de cargas de GJC, que explícitamente incluye moléculas de solvente, podrían representar un esquema de los GJC. En efecto, siguiendo esta aproximación, nanotubos de carbono con distribuciones de carga modificadas han mostrado ser cualitativamente modelos para el paso de agua a través de canales de acuaporina (Zhu y Schulten, 2003; Garate y col., 2009a; Zuo y col., 2010).

Estudios sobre la permeación de los canales, han demostrado que la mayoría de los canales de GJC tienen una preferencia por la permeación de los cationes por sobre los aniones (Harris y col., 1981; Harris, 2001; Bukauskas y Verselis, 2004). Mientras tanto, estudios de la conductancia unitaria y selectividad de cargas indican que la permeabilidad de los canales de conexina a pequeños iones metálicos es debido a la presencia de fuerzas electrostáticas, con la selectividad catiónica atribuida principalmente a las asimetrías de la distribución de cargas en el canal (Oh y col., 2008). Con la estructura cristalográfica resuelta de GJC, se ha postulado que la presencia de residuos con carga negativa expuestos hacia el poro en el centro del canal, permitirían el incremento local de la concentración de cationes y facilitarían el paso de cationes (Maeda y col., 2009).

Basados en esto y en vías de explorar la repercusión microscópica del transporte iónico de la densidad de carga de los GJC, se generó el modelo CEC, que explícitamente incluye cargas que imitan la distribución de cargas de los GJC (ver Fig. 3B). Evidentemente, la naturaleza de nuestros modelos solo cuenta con la selectividad catiónica, pero también nos permite el uso de voltajes altos (1V) para estudiar los efectos de la configuración de cargas en las corrientes iónicas, aislando su efecto de cualquier rearrreglo conformacional. Con el fin de explorar como el potencial resultante puede ser afectado por un cambio en la distribución de cargas, también se analizó un sistema donde se invirtieron las cargas adicionales que imitan la distribución de cargas de GJC (modelo  $CEC_{inv}$ ).

Se observó en los modelos CEC y GJC una caída drástica del potencial de acuerdo a la naturaleza de las cargas adicionales a los sistemas. La configuración de cargas similar a GJC (modelo CEC) presenta una caída de potencial que sigue un decaimiento exponencial. Al compararse con los resultados obtenidos del modelo *all-atom* de GJC, se observa que la complejidad del modelo de GJC, reduce la suavidad de la caída del potencial con una caída drástica debido a su naturaleza menos aislante entre el canal y el medio entre las membranas. También presenta una leve alza del potencial a valores en el eje  $z$  positivo, debido a una constricción del canal formada durante el corto periodo de simulación. No obstante, el modelo CEC reproduce el potencial electrostático del GJC bajo un potencial *transjunctional* de 1V. Por el contrario, al compararse con el modelo  $CEC_{inv}$ , este presenta una caída de potencial diferente con una forma convexa.

Esto confirma que el modelo CEC reproduce aproximadamente el componente electrostático del GJC, permitiéndonos calcular otras propiedades de los GJC a través de la caracterización del transporte y termodinámica del paso de los iones.

## 7.2. Caracterización del transporte iónico

Aunque la caída del potencial resultante no afecta los detalles microscópicos de cada celda unitaria, las propiedades del transporte iónico de las especies bajo un campo eléctrico indudablemente fueron alterados tanto por la geometría y distribución de cargas de los modelos en los sistemas simulados.

En nuestros sistemas simples, obtenemos un mayor paso de iones cuando aplicamos una diferencia de potencial. No obstante, experimentalmente sabemos que la mayor conductancia de los GJC es obtenida cuando el voltaje *transjunctional* tiende a cero (Harris, 2001). Evidencia que pareciera contradecir nuestros resultados, sin embargo este comportamiento es resultado del fenómeno de cierre del canal mediado por voltaje, que ocurre en uno de los hemicanales que forma el GJC (Oh y col., 2000; Bukauskas y Verselis, 2004). Pero en nuestros modelos simples, este proceso no es posible de capturar debido a la falta de un cambio conformacional asociado a un campo eléctrico.

Las corrientes iónicas resultantes de los modelos CEC y  $CEC_{inv}$ , nos indica que la distribución de cargas intrínseca de los GJC es un elemento clave para la selectividad iónica, así como lo han sugerido Trexler y col., 2000; Xin y col., 2010. El favorecimiento por el paso de cationes en el modelo CEC concuerda con la naturaleza de

los canales de GJC, que son en su mayoría canales catiónicos no específicos (Harris y Locke, 2009). Este favorecimiento por corrientes cationicas ocurre mediante una reducción de la corriente aniónica. Lo cual está relacionado con las cargas negativas en el centro del canal. Lo que concuerda con experimentos electrofisiológicos, que sugiere que las cargas negativas ubicadas en el centro del canal son responsables de la selectividad iónica y median los cambios en la conducción de la corriente (Trexler y col., 2000; Tong y col., 2014). También concuerda con las cargas positivas en la entrada del canal. Se ha propuesto que estas cargas generan una acumulación de aniones, y constituirían un factor importante que dificulta el paso de corriente aniónica. De hecho modificaciones post-traduccionales que neutralizan esta región modifican la corriente iónica (Locke y col., 2009).

En otras palabras, las fuerzas electrostáticas impuestas por la presencia de cargas en el canal, esencialmente contrarresta cualquier influencia de la movilidad intrínseca de los iones.

### **7.3. Termodinámica del paso de iones**

Decidimos enfocarnos en el rol que juegan las cargas ubicadas en el canal sobre los iones. Exploramos el efecto de un campo eléctrico en la corriente iónica, para conocer las barreras energéticas intrínsecas a lo largo del proceso de cruce del canal.

La permeación de iones a través de canales biológicos es controlada por tres factores: el potencial de fuerza media (PMF), el potencial de membrana y la fricción efectiva que actúa sobre los iones (Gumbart y col., 2012; Roux y col., 2004).

Asumiendo esto, en el contexto de nuestras simulaciones, las diferencias de fricción efectivas entre los modelos CEC y CEC<sub>inv</sub> son despreciables, por lo que los componentes principales que determinan la permeación son: el potencial de membrana y el potencial resultante.

El PMF es generado por las contribuciones de los efectos energéticos y entrópicos. Para los iones monovalentes, no existe una contribución rotacional, sin embargo, debido a las cargas superficiales presentes en los modelos CEC y CEC<sub>inv</sub>, la difusión de los iones se verá afectada, por lo tanto se descarta cualquier aumento en la entropía traslacional.

En términos energéticos las interacciones coulómbicas son predominantes dentro del canal, por lo tanto la confinación de los iones (dependiendo el tamaño del poro) podría conllevar a un costo substancial por la posible pérdida de su capa de solvatación. Para explorar esta hipótesis, se calculó la función de distribución radial de los oxígenos de las aguas alrededor de los iones, tanto para los iones posicionados en la región libre como dentro de la región confinada o el canal (ver Fig. 5). Se observó que la capa de solvatación del ion no es afectada, asumiendo que el costo energético debido al confinamiento es despreciable para ambos iones, excepto para radios mayores a 7 Å, donde la influencia de la pared no permite la presencia de aguas.

Con el rol del confinamiento descartado, la termodinámica del proceso de transporte iónico fue explorada en un sistema sin una diferencia de potencial. Los cálculos de PMF fueron realizados en sistemas que contienen un catión y su contra-carga ubicada en el borde de la celda unitaria. De esta forma, evitamos tomar en consideración

todas las múltiples configuraciones de los iones en el espacio a una concentración de 300 mM de NaCl. En otras palabras, se generó un sistema con una solución salina diluida con la cual correr largos tiempos de simulación. Estos resultados deberían converger a resultados similares al sistema con 300 mM de NaCl. En efecto, los perfiles de densidad iónica obtenidos de las simulaciones CEC y  $CEC_{inv}$  sin un campo eléctrico (ver Fig. A7) concuerda con los perfiles obtenidos por los perfiles del PMF (ver Fig. 6).

Específicamente, para el sistema CEC se observó la presencia de un mínimo global, que indicaría que existe un favorecimiento para la entrada de los cationes hacia el canal. Mientras que para el sistema  $CEC_{inv}$ , se observa una barrera energética en el centro de esta región, la que afectaría el paso de cationes a través del canal. Esto explica la reducción de la corriente de cloruro para el modelo CEC bajo la presencia de un campo eléctrico. Por lo tanto, para un sistema real de GJC, podría existir una reducción aun mayor de las corrientes aniónicas, debido a los valores esperados de un PMF más rugoso y voltajes fisiológicos bajos ( $\sim 80$  mV).

Nuestra metodología para calcular el potencial de fuerza media se encuentra sesgado por el hecho de que el catión tiene permitido explorar solo la región central del sistema, la entropía traslacional en la región libre se reduce. Debido a esto, se necesitó hacer una corrección volumétrica, con la que se pudo constatar que el proceso de transferencia de los iones no es espontáneo. Pero ya que el voltaje empleado en este estudio corresponde a 1V, el trabajo realizado por el campo eléctrico ( $> 7$  kcal/mol) sobrepasa los valores de la energía libre (Tabla II) observados como barreras en la

Fig. 6. Esto explica la ocurrencia de eventos de permeación bajo condiciones de un campo eléctrico y la reducción de la corriente catiónica para el modelo  $CEC_{inv}$ . De hecho, no existieron eventos de permeación en condiciones de campo eléctrico cero (0V) (Tabla AI). Concordando también con los resultados obtenidos de la concentración iónica (ver Figs. 4A,B).

Por último, estos modelos de membrana dual ofrecen un esbozo de un fenómeno complejo que ocurre en los GJCs. Ya que a pesar de su simplicidad, pues no contiene una estructura que incluye un mecanismo dependiente de voltaje, estos canales ofrecen ideas para el entendimiento del rol que juega la distribución de cargas dentro de los GJCs y los voltajes resultantes cuando un campo eléctrico es aplicado.

## CONCLUSIONES

- Los sistemas de membrana dual simples contienen características básicas de los sistemas con un GJC, como son la posesión de: dos membranas, un canal que atraviesa las membranas y una distribución de cargas en la superficie del canal similar a GJC. De esta forma, realizamos dinámicas moleculares extensas en estos sistemas simples, que en un sistema de GJC no podríamos obtener.
- Al calcular los perfiles de potencial electrostático, el modelo simple que cuenta con carga en la superficie, que imitan a los GJC (modelo CEC), es capaz de reproducir la caída del potencial en un sistema de GJC. Esto indica que los resultados son extrapolables a un sistema de GJC.
- Los estudios de corriente iónica muestran que la distribución de cargas similar a GJC disminuye la corriente aniónica, favoreciendo la corriente de cationes, lo cual es concordante con la evidencia experimental.
- La caracterización del paso del catión a través del canal mediante estudios del potencial de fuerza media, confirma la importancia de la distribución de cargas en el canal, siendo relevante la presencia de carga negativa en el centro del canal.
- Los modelos simples en la presente tesis nos entregan una clara noción a detalle

atómico de los fenómenos complejos del transporte iónico que ocurren en los canales de uniones en hendidura (GJC).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aksimentiev, A y K Schulten (2005). «Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map.» En: *Biophysical journal* 88.6, págs. 3745-61.
- Allen, M. y D. Tildesley (1989). *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press; New York.
- Araya-Secchi, R, T Perez-Acle, S. Kang, T Huynh, A Bernardin, Y. Escalona, J. Garate, A. Martínez, I. García, J. Sáez y R Zhou (2014). «Characterization of a novel water pocket inside the human cx26 hemichannel structure.» En: *Biophysical journal* 107.3, págs. 599-612.
- Barducci, A, G Bussi y M Parrinello (2008). «Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method». En: *Physical Review Letters* 100.2, pág. 020603.
- Bernèche, S y B Roux (2000). «Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane». En: *Biophys J* 78.6, págs. 2900-2917.
- Bezanilla, F. (2008). «How membrane proteins sense voltage.» En: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9.4, págs. 323-32.
- Bukauskas, F. F. y V. K. Verselis (2004). «Gap junction channel gating.» En: *Biochimica et biophysica acta* 1662.1-2, págs. 42-60.

- Darden, T., D. York y L. Pedersen (1993). «Particle mesh Ewald: An  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems». En: *The Journal of Chemical Physics* 98.12, pág. 10089.
- Delemotte, L., F. Dehez, W. Treptow y M. Tarek (2008). «Modeling membranes under a transmembrane potential.» En: *The journal of physical chemistry. B* 112.18, págs. 5547-50.
- Doudou, S., N. a. Burton y R. H. Henchman (2009). «Standard free energy of binding from a one-dimensional potential of mean force». En: *Journal of Chemical Theory and Computation* 5.4, págs. 909-918.
- Ek-Vitorin, J. F. y J. M. Burt (2013). «Structural basis for the selective permeability of channels made of communicating junction proteins.» En: *Biochimica et biophysica acta* 1828.1, págs. 51-68.
- Fennell, C. J. y J. D. Gezelter (2006). «Is the Ewald summation still necessary? Pairwise alternatives to the accepted standard for long-range electrostatics». En: *The Journal of Chemical Physics* 124.23, pág. 234104.
- Garate, J. A., N. English y J. MacElroy (2009a). «Carbon nanotube assisted water self-diffusion across lipid membranes in the absence and presence of electric fields». En: *Molecular Simulation* 35.1-2, págs. 3-12.
- Garate, J. A., N. J. English y J. M. D. MacElroy (2009b). «Static and alternating electric field and distance-dependent effects on carbon nanotube-assisted water self-diffusion across lipid membranes». En: *Journal of Chemical Physics* 131, pág. 114508.

- Groome, J. R. (2014). «The voltage sensor module in sodium channels.» En: *Handbook of experimental pharmacology* 221, págs. 7-31.
- Gumbart, J., F. Khalili-Araghi, M. Sotomayor y B. Roux (2012). «Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems». En: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818, págs. 294-302.
- Harris, A. L., D. C. Spray y M. V. Bennett (1981). «Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance». En: *J Gen Physiol* 77.1, págs. 95-117.
- Harris, A. L. (2001). «Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap.» En: *Quarterly reviews of biophysics* 34, págs. 325-472.
- Harris, A. L. y D. Locke (2009). *Connexins: A Guide*. Ed. por A. L. Harris y D. Locke. Totowa, NJ: Humana Press, págs. 165-206.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd Editio, pág. 814.
- Hub, J. S., C. Aponte-Santamaría, H. Grubmüller y B. L. De Groot (2010). «Voltage-regulated water flux through aquaporin channels in silico». En: *Biophysical Journal* 99.12, págs. L97 -L99.
- Huber, T., A. E. Torda y W. F. van Gunsteren (1994). «Local elevation: A method for improving the searching properties of molecular dynamics simulation». En: *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 8.6, págs. 695-708.
- Humphrey, W., A. Dalke y K. Schulten (1996). «VMD: Visual molecular dynamics». En: *Journal of Molecular Graphics* 14, págs. 33-38.
- Hunter, J. D. (2007). «Matplotlib: A 2D graphics environment». En: *Computing in Science and Engineering* 9.3, págs. 99-104.

- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey y M. L. Klein (1983). «Comparison of simple potential functions for simulating liquid water». En: *The Journal of Chemical Physics* 79.2, pág. 926.
- Joung, I. S. y T. E. Cheatham III (2009). «Molecular dynamics simulations of the dynamic and energetic properties of alkali and halide ions using water-model-specific ion parameters». En: *J Phys Chem B* 113.40, págs. 13279-13290.
- Khalili-Araghi, F., B. Ziervogel, J. C. Gumbart y B. Roux (2013). «Molecular dynamics simulations of membrane proteins under asymmetric ionic concentrations». En: *The Journal of General Physiology* 142.4, págs. 465-475.
- Kutzner, C., H. Grubmüller, B. L. de Groot y U. Zachariae (2011). «Computational electrophysiology: the molecular dynamics of ion channel permeation and selectivity in atomistic detail.» En: *Biophysical journal* 101.4, págs. 809-17.
- Kwon, T., A. L. Harris, A. Rossi y T. A. Bargiello (2011). «Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: Evaluation of structural models with Brownian dynamics.» En: *The Journal of general physiology* 138.5, págs. 475-493.
- Laio, A. y M. Parrinello (2002). «Escaping free-energy minima.» En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.20, págs. 12562-12566. arXiv: 0208352 [cond-mat].
- Li, J, X Gong, H Lu, D Li, H Fang y R Zhou (2007). «Electrostatic gating of a nanometer water channel». En: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.10, págs. 3687-3692.
- Locke, D., S. Bian, H. Li y A. L. Harris (2009). «Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry». En: *Biochem J* 424.3, págs. 385-398.

- MacKerell, A. D. J., D Bashford, M Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S Fischer, J Gao, H Guo, S Ha, D Joseph-McCarthy, L Kuchnir, K Kuczera, F. T. Lau, C Mattos, S Michnick, T Ngo, D. T. Nguyen, B Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M Schlenkrich, J. C. Smith, R Stote, J Straub, M Watanabe, J Wiórkiewicz-Kuczera, D Yin y M. Karplus (1998). «All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins.» En: *The Journal of Physical Chemistry B* 102.97, págs. 3586-616.
- Maeda, S., S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi y T. Tsukihara (2009). «Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution.» En: *Nature* 458.7238, págs. 597-602.
- Mancinelli, R, a Botti, F Bruni, M. a. Ricci y a. K. Soper (2007). «Perturbation of water structure due to monovalent ions in solution.» En: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 9.23, págs. 2959-2967.
- Mese, G., V. Valiunas, P. R. Brink y T. W. White (2008). «Connexin26 deafness associated mutations show altered permeability to large cationic molecules». En: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 295, págs. C966-C974.
- Oh, S, J. B. Rubin, M. V. Bennett, V. K. Verselis y T. A. Bargiello (1999). «Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32.» En: *The Journal of general physiology* 114.3, págs. 339-64.
- Oh, S, C. K. Abrams, V. K. Verselis y T. A. Bargiello (2000). «Stoichiometry of transjunctional voltage-gating polarity reversal by a negative charge substitu-

- tion in the amino terminus of a connexin32 chimera». En: *J Gen Physiol* 116.1, págs. 13-31.
- Oh, S. y T. A. Bargiello (2015). «Voltage regulation of connexin channel conductance». En: *Yonsei Med J* 56.1, págs. 1-15.
- Oh, S., V. K. Verselis y T. a. Bargiello (2008). «Charges dispersed over the permeation pathway determine the charge selectivity and conductance of a Cx32 chimeric hemichannel.» En: *The Journal of physiology* 586.10, págs. 2445-2461.
- Oliphant, T. E. (2007). «Python for scientific computing». En: *Computing in Science and Engineering* 9.3, págs. 10-20.
- Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé y K. Schulten (2005). *Scalable molecular dynamics with NAMD*.
- Roux, B. (2008). «The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations.» En: *Biophysical journal* 95.9, págs. 4205-16.
- Roux, B., T. Allen, S. Bernche y W. Im (2004). «Theoretical and computational models of biological ion channels». En: *Quarterly Reviews of Biophysics* 37.1, págs. 15-103.
- Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti y H. J. Berendsen (1977). «Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes». En: *Journal of Computational Physics* 23.3, págs. 327-341.

- Sachs, J. N., P. S. Crozier y T. B. Woolf (2004). «Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients.» En: *The Journal of chemical physics* 121.22, págs. 10847-51.
- Saez, J. C., V. M. Berthoud, M. C. Branes, A. D. Martinez y E. C. Beyer (2003). «Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions.» En: *Physiol Rev* 83.4, págs. 1359-1400.
- Shrivastava, I. H. y M. S. Sansom (2000). «Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer.» En: *Biophys J* 78.2, págs. 557-570.
- Soper, A. K. (1997). «The excluded volume effect in confined fluids and liquid mixtures.» En: *Journal of Physics: Condensed Matter* 9.11, págs. 2399-2410.
- Sotomayor, M., V. Vásquez, E. Perozo y K. Schulten (2007). «Ion conduction through MscS as determined by electrophysiology and simulation.» En: *Biophysical journal* 92.3, págs. 886-902.
- Spray, D. C., A. L. Harris y M. V. Bennett (1981). «Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance.» En: *J Gen Physiol* 77.1, págs. 77-93.
- Tong, X., H. Aoyama, T. Tsukihara y D. Bai (2014). «Charge at the 46th residue of connexin 50 is crucial for the gap-junctional unitary conductance and transjunctional voltage-dependent gating.» En: *The Journal of Physiology* 592.23, págs. 5187-5202.

- Trexler, E. B., F. F. Bukauskas, J Kronengold, T. a. Bargiello y V. K. Verselis (2000). «The first extracellular loop domain is a major determinant of charge selectivity in connexin46 channels.» En: *Biophysical journal* 79.6, págs. 3036-51.
- Tuckerman, M, B Berne y G Martyna (1992). «Reversible multiple time scale molecular dynamics». En: *J Chem Phys* 97.3, págs. 1990-2001.
- Villinger, S., R. Briones, K. Giller, U. Zachariae, A. Lange, B. L. de Groot, C. Griesinger, S. Becker y M. Zweckstetter (2010). «Functional dynamics in the voltage-dependent anion channel». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.52, págs. 22546-22551.
- Xin, L., X.-Q. Gong y D. Bai (2010). «The role of amino terminus of mouse Cx50 in determining transjunctional voltage-dependent gating and unitary conductance». En: *Biophys J* 99.7, págs. 2077-2086.
- Yeager, M (1998). «Structure of cardiac gap junction intercellular channels». En: *J Struct Biol* 121.2, págs. 231-245.
- Yeager, M y N. B. Gilula (1992). «Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels». En: *J Mol Biol* 223.4, págs. 929-948.
- Zhu, F. y K. Schulten (2003). «Water and proton conduction through carbon nanotubes as models for biological channels.» En: *Biophysical journal* 85.1, págs. 236-244.
- Zuo, G., R. Shen, S. Ma y W. Guo (2010). «Transport properties of single-file water molecules inside a carbon nanotube biomimicking water channel». En: *ACS Nano* 4.1, págs. 205-210.

# ANEXO

## A.1. Resumen Teórico

### A.1.1. Mecánica clásica

Sir Isacc Newton definió las bases de la mecánica clásica mediante las denominadas leyes de movimiento de Newton. Entre ellas, la ecuación que relaciona la fuerza aplicada  $\mathbf{F}$  con la aceleración  $\mathbf{a}$  de un objeto de masa  $m$ :

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a} \tag{A1}$$

En un principio estas leyes fueron postuladas para estudiar los movimientos de los planetas, estrellas y otros objetos de gran escala. Luego se comenzaron a utilizar para resolver problemas en sistemas microscópicos. Para estudiar este tipo de sistemas, se define las posiciones de cada partícula  $\{\mathbf{r}_1(t), \dots, \mathbf{r}_N(t)\}$  y sus velocidades  $\{\dot{\mathbf{r}}_1(t), \dots, \dot{\mathbf{r}}_N(t)\}$  en el tiempo  $t$ , donde la notación  $\dot{\mathbf{r}}$  significa la derivada en el tiempo.

Lagrange introdujo un concepto denominado Lagrangiano que se define como la diferencia entre la energía cinética ( $K$ ) y la energía potencial ( $U$ ):

$$\mathcal{L}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = K(\dot{\mathbf{r}}_1, \dots, \dot{\mathbf{r}}_N) - U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \tag{A2}$$

Esto permitió elaborar la ecuación de Euler-Lagrange:

$$\frac{d}{dt} \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{\mathbf{r}}_i} - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \mathbf{r}_i} = 0 \quad (\text{A3})$$

Cuya formulación permite obtener las ecuaciones de movimiento de cualquier sistema en coordenadas generalizadas.

El hamiltoniano  $\mathcal{H}$ , el cual se obtiene mediante la transformada de Legendre del Lagrangiano:

$$\mathcal{H}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m_i} + U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (\text{A4})$$

corresponde a la energía total expresada como una función de las posiciones y los momentums ( $\mathbf{p}$ ), definido como la masa por su velocidad ( $m\dot{\mathbf{r}}$ ). Esta ecuación de movimiento permite describir la evolución única de las coordenadas y momentums sujetos a partir de una condición inicial. Definiendo un espacio de fase cuya energía se conserva. Concepto clave en la formulación de la mecánica estadística.

$$\frac{d\mathbf{p}}{dt} = -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{q}}, \quad \frac{d\mathbf{q}}{dt} = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{p}} \quad (\text{A5})$$

### A.1.2. Mecánica estadística

Las leyes de la termodinámica (en la escala macroscópica) y las leyes del movimiento de las partículas (en la escala microscópica) se reconcilian en el campo de la mecánica estadística.

Los macroestados son definidos por un pequeño número de variables termodinámicas como la presión, temperatura y volumen, mientras que los microestados comprenden el estado de cada partícula, la cual se define por las ecuaciones de movimiento.

Un ecuación que relaciona los macroestados y microestados corresponde al promedio del ensamble. Siendo el ensamble el número de configuraciones posibles de estados microscópicos que tienen en su conjunto las mismas propiedades macroscópicas. Por lo tanto, el promedio del ensamble de una propiedad  $\langle X \rangle$  se define como:

$$\langle X \rangle_\rho = \int \int X(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \rho(\mathbf{r}, \mathbf{p}) d\mathbf{r} d\mathbf{p} \quad (\text{A6})$$

que depende de todas las configuraciones posibles  $X(\mathbf{r}, \mathbf{p})$  y las probabilidades de estas  $\rho(\mathbf{r}, \mathbf{p})$  (densidad de probabilidades).

Según la distribución de Boltzmann, en la cual se relaciona la probabilidad de un estado con su estado energético, las probabilidades de los estados corresponde a:

$$\rho(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \frac{\int \int e^{-H(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_B T}}{Q} \quad (\text{A7})$$

en donde los estados energéticos de cada estado es normalizado por la suma sobre todos los estados energéticos posibles, concepto denominado función de partición:

$$Q = \int \int e^{-H(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_B T} d\mathbf{r} d\mathbf{p} \quad (\text{A8})$$

La función de partición es fundamental, puesto que permite establecer una relación con el potencial termodinámico  $\psi$  del sistema a estudiar, usando la ecuación de Boltzmann.

$$\psi = -\ln Q \quad (\text{A9})$$

Para un ensamble canónico (NVT) en donde las propiedades macroscópicas: número de partículas (N), volumen (V) y temperatura (T) se mantienen constantes, podemos obtener la energía libre de Helmholtz ( $A$ ) a partir de la probabilidad de los estados.

$$A = -k_B T \ln Q \quad (\text{A10})$$

en donde  $k_B$  corresponde a la constante de Boltzmann y  $T$  a la temperatura del sistema.

### A.1.3. Dinámica Molecular

La dinámica molecular es una metodología computacional que hace uso de las ecuaciones de movimiento de las partículas. Esta técnica nos permite visualizar trayectorias de los fenómenos que ocurren en una escala microscópica y se rigen por propiedades macroscópicas.

Las partículas en el sistema se rigen por las ecuaciones de movimiento de Newton. Por lo tanto, el movimiento de una partícula de masa  $m$  se obtiene al calcular su

aceleración  $\mathbf{a}$ . Esta aceleración se obtiene a partir del cálculo de las fuerzas que se aplican sobre la partícula, la cual está determinada por el gradiente del potencial energético  $-\nabla U_x(\mathbf{r})$ .

$$m\mathbf{a} = \mathbf{F}(\mathbf{r}) = -\nabla U_x(\mathbf{r}) \quad (\text{A11})$$

La función de energía potencial de la partícula  $U(\mathbf{r})$ , también conocida como campo de fuerza, depende de las coordenadas de las partículas. Esta función puede ser dividida en diferentes términos, los cuales pueden ser agrupados en dos tipos de interacción: i) enlazantes y no enlazantes.

$$U(\mathbf{r}) = \sum U_{\text{enlazante}}(\mathbf{r}) + \sum U_{\text{no enlazante}}(\mathbf{r}) \quad (\text{A12})$$

Las interacciones enlazantes agrupa: enlaces, ángulos y torsiones (ángulos dihedros). Mientras que el potencial de interacciones no enlazantes está compuesto por la interacción de van der Waals (vdW), descrito por la ecuación de Lennard-Jones (LJ) y las interacciones electrostáticas, descritas por la ecuación de Coulomb (ver Fig. A1).

A partir del cálculo de la aceleración, dado las posiciones y velocidades iniciales, se puede obtener las posiciones y velocidades en el futuro. Computacionalmente, este cálculo es realizado vía integración numérica, por ejemplo, mediante el algoritmo de Verlet:

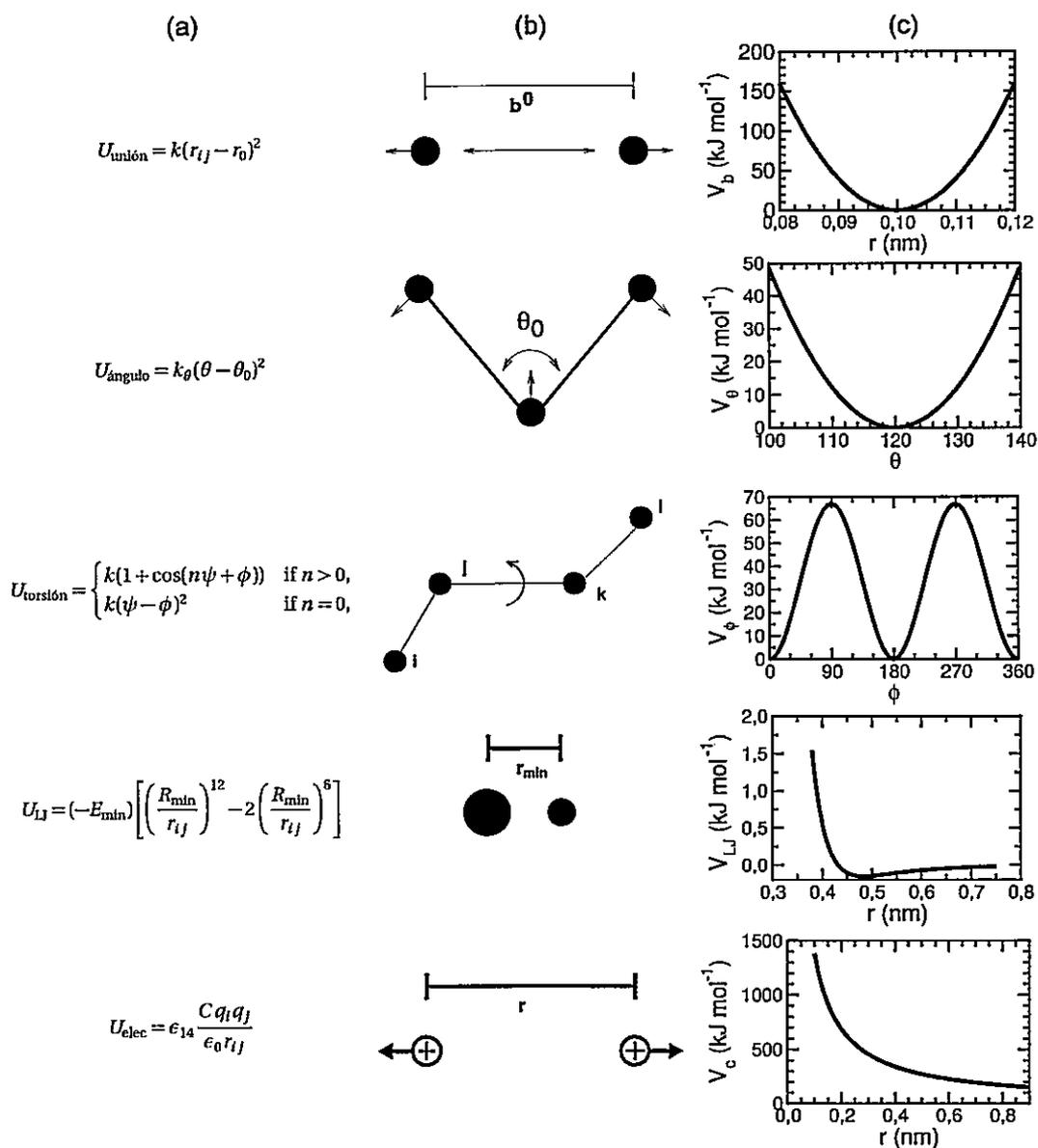


Figura A1: Campo de fuerza general

La columna (a) contiene las funciones matemáticas del campo de fuerza, columna (b) corresponde a la representación de los movimientos (flechas) de las partículas (en esferas) caracterizadas y columna (c), representa los perfiles ideales obtenidos a partir del campo de fuerza.

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \delta t) + \mathbf{r}(t - \delta t)}{2\delta t}, \quad (\text{A13})$$

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \mathbf{a}(t) \delta t^2$$

que calcula la posición y la velocidad en cada paso de tiempo  $\delta t$ .

En dinámica molecular, se asume que las propiedades obtenidas de una simulación representan al promedio del ensamble del sistema en estudio. Esta suposición corresponde a la teoría ergódica.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{X}_t = \langle X \rangle \quad (\text{A14})$$

donde el promedio temporal de un propiedad,  $\bar{X}_t$ , equivale al promedio del ensamble,  $\langle X \rangle$ .

Para mantener la temperatura en un ensamble canónico (NVT), se necesita controlar las velocidades de las partículas en el sistema. Esto se realiza mediante una ecuación de Langevin:

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial U(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}_i} - \gamma \mathbf{p}_i + \sigma \xi_i \hat{\mathbf{s}}_i \quad (\text{A15})$$

donde las velocidades de las partículas son modificadas estocásticamente en cada paso de tiempo, mediante la modificación de la fuerza por dos términos relacionados con la viscosidad de las partículas y una fuerza de forma azarosa obtenidas a partir

de una distribución gaussiana con promedio cero relacionada con la viscosidad.

#### A.1.4. Partículas en malla de Ewald (PME)

Debido a que el cálculo de las interacciones electrostáticas, corresponden al componente de mayor fuerza en la dinámica, esta requiere la consideración de los efectos de todas las cargas tanto de las que se encuentran en la celda de simulación como de las imágenes periódicas. Una aproximación para resolver el problema de la suma de contribuciones electrostáticas, es mediante la suma de Ewald. Este algoritmo divide las contribuciones electrostáticas en dos componentes, uno de corto alcance y el otro de largo alcance.

$$U_{\text{no enlazante}}(r_1, \dots, r_N) = U_{\text{corto}}(r_1, \dots, r_N) + U_{\text{largo}}(r_1, \dots, r_N) \quad (\text{A16})$$

Asumiendo un sistema periódico, las interacciones de corto alcance convergen en el espacio real mientras que las interacciones de largo alcance convergen en un espacio recíproco o espacio de Fourier (Fennell y Gezelter, 2006).

$$\begin{aligned}
 U_{\text{corto}}(r_1, \dots, r_N) &= \sum_S \sum_{i>j \in nb} \frac{q_i q_j \operatorname{erfc}(\alpha r_{i,j} \mathbf{s})}{r_{i,j} \mathbf{s}} \\
 U_{\text{largo}}(r_1, \dots, r_N) &= \sum_S \sum_{i>j \in nb} \frac{q_i q_j \operatorname{erf}(\alpha r_{i,j} \mathbf{s})}{r_{i,j} \mathbf{s}} = \quad (\text{A17}) \\
 \frac{1}{V} \sum_{g \in S} \frac{4\pi}{|g|^2} \exp^{-|g|^2/4\alpha^2} |S(g)|^2 - \sum_{i,j \in \text{intra}} \frac{q_i q_j \operatorname{erf}(\alpha r_{i,j} \mathbf{s})}{r_{i,j} \mathbf{s}} - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2
 \end{aligned}$$

El potencial electrostático ( $U_{largo}$ ) de largo alcance posee tres términos que corresponden al: i) cálculo de los potenciales electrostáticos en el espacio recíproco, ii) menos las interacciones electrostáticas consideradas en los potenciales enlazantes, y iii) menos las interacciones electrostáticas de las cargas consigo misma.

Un método numérico rápido para calcular la suma de Ewald, se denomina partículas en malla de Ewald (PME, del inglés *Particle Mesh Ewald*), donde la suma recíproca es obtenida mediante la transformada de Fourier rápida (FFT) al hacer una aproximación de la posición de las partículas del sistema en una grilla o malla, que optimiza el cálculo relacionado con el espacio recíproco.

Este método es adoptado para poder calcular el potencial electrostático en un espacio real mediante su implementación en VMD llamada PMEpot (Phillips y col., 2005).

#### A.1.5. Potencial de membrana

En la presente tesis, para aplicar una diferencia de potencial en el sistema, se aplicó un campo eléctrico ( $\mathbf{E}_{app}$ ) perpendicular al plano de la membrana, generando una fuerza en todas las cargas dentro de la caja de simulación y la magnitud de esta fuerza depende de la carga de la partícula ( $q_i$ ).

$$\mathbf{F}_i = q_i \mathbf{E}_{app} \quad (\text{A18})$$

Si la membrana se encuentra posicionada en el plano  $x - y$ , entonces el vector

del campo eléctrico es aplicado en el eje  $z$ . Generándose una diferencia de potencial con un voltaje determinado dependiendo del largo de la caja en el eje  $z$  ( $\Delta L_z$ ).

$$E_{app}\Delta L_z = \Delta V \quad (\text{A19})$$

Esto genera una diferencia de potencial  $V_{app}$ , denominado potencial aplicado, que presenta una caída del potencial a través del eje  $z$ . Todas las partículas cargadas  $q_i$ , presentan en el sistema contribuciones con una fuerza de  $q_i\mathbf{E}_{app}$ , reordenándose en el sistema para generar el potencial de reacción. La suma del potencial aplicado y el potencial de reacción produce el potencial resultante usado en este estudio. Este potencial se caracteriza por tener una caída del potencial en la región de la membrana, que constituye el potencial de membrana (ver Fig. A2).

Este método ha sido utilizado en diferentes estudios, como la conducción de iones de canales de membrana, el flujo de agua regulada por voltaje, la translocación de biomoléculas a través de nanoporos y también en la inducción de cambios conformacionales de proteínas de membrana (Gumbart y col., 2012).

En el programa NAMD, la unidad básica de energía corresponde a  $\text{Kcal mol}^{-1}$ , por lo tanto la unidad de fuerza se encuentra en  $\text{Kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-1}$  y el campo eléctrico tiene unidades de  $\text{Kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-1} e^{-1}$ .

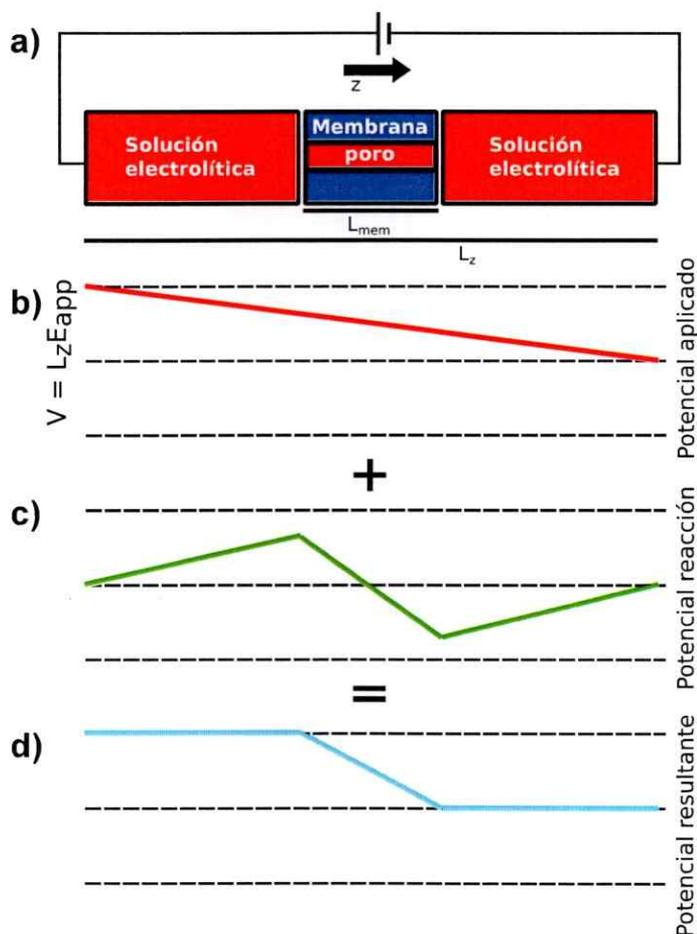
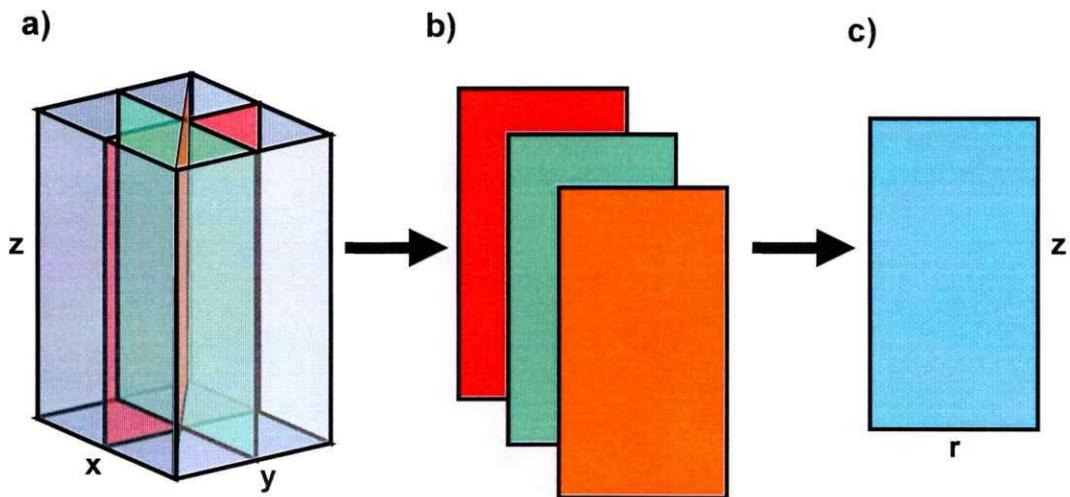


Figura A2: Esquema de la metodología para generar una diferencia de potencial mediante la aplicación del campo eléctrico

La aplicación de un campo eléctrico es como conectar un circuito eléctrico al sistema a estudiar. El esquema muestra un sistema simple de una membrana con un poro en un solución electrolítica al cual se le aplica un campo eléctrico en la dirección  $z$  (a). El potencial aplicado corresponde a una caída lineal del potencial a lo largo del sistema en  $z$  (b). El potencial de reacción que es obtenido por el cálculo de PME sobre el sistema, depende del movimiento de los átomos cargados en la solución (c). La suma de estos dos potenciales corresponde al potencial resultante en el cual se observa una caída del potencial en la membrana, denominado potencial de membrana (d). Esquema basado en Gumbart y col., 2012.

### A.1.6. Procedimiento para graficar los datos en un espacio tridimensional

La información obtenida por los programas que calculan el potencial electrostático y concentración iónica corresponden a valores en el espacio tridimensional del sistema. Cada valor representa al promedio a lo largo de la simulación molecular. Para visualizar y analizar esta información, fue conveniente transformarla a un espacio bidimensional. Para ello se extrajeron valores de diferentes planos que cruzan por el centro del sistema, luego se promediaron estos planos y se graficó en un mapa de colores, lo cual nos permitió capturar un promedio espacial con un eje de simetría en el centro del poro de los datos (ver Fig. A3).



**Figura A3: Procedimiento para obtener mapas de contornos promedio**

(a) Una vez calculado los datos en el espacio volumétrico para las propiedades de interés (densidad o potencial electrostático) se procede a tomar cortes transversales del mismo que pasen por el centro del sistema. Luego los cortes obtenidos (b) son promediados para obtener un mapa de contornos promedio (c) que corresponderá a un promedio sobre la trayectoria y sobre los ejes de simetría considerados (promedio espacial y temporal)

### A.1.7. Potencial de fuerza media (PMF)

En dinámica molecular, si quisiéramos investigar la probabilidad de un suceso, se requeriría obtener la función de partición de la ecuación A7, cuyo cálculo es prácticamente imposible para la mayoría de los sistemas, puesto que comprende calcular la energía libre absoluta de todas las posibles configuraciones del sistema.

No obstante podemos obtener la probabilidad asociada a algún parámetro del sistema, llamado coordenada de reacción, que puede corresponder tanto a una coordenada en el espacio, como también a un valor de ángulo, etc. La probabilidad asociada a una coordenada de reacción  $\xi$  es:

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \frac{\int e^{-H(q)/k_B T} \delta(\xi'(q) - \xi) dq}{\int e^{-H(q)/k_B T} dq} \quad (\text{A20})$$

donde  $\langle \rho(\xi) \rangle$  es la probabilidad promedio de la coordenada de reacción, y  $\xi'(q)$  es la función dependiente de la coordenada de reacción,  $\delta$  es la función delta de Dirac.

Obteniendo las probabilidades de la variable asociada a una coordenada de reacción, podemos obtener su energía libre, o potencial de fuerza media (PMF). El PMF corresponde al potencial con el cual se puede obtener la fuerza promedio que actúa sobre una partícula en un sistema. En un ensamble NVT la energía libre de Helmholtz corresponde a:

$$A(\xi) = -k_B T \ln \langle \rho(\xi) \rangle + C \quad (\text{A21})$$

donde  $A(\xi)$  es la energía asociada a la coordenada  $\xi$ . Aun así, podrían existir problemas si en ciertas regiones, el muestreo de la coordenada de reacción no es favorable. Por ello se ocupan metodologías que fuerzan al sistema a encontrar todas las posibles configuraciones.

### A.1.8. Metadinámica

Para obtener el PMF se usó el método de metadinámica o elevación local (Huber y col., 1994; Laio y Parrinello, 2002). Esta metodología se caracteriza por introducir potenciales sesgos externos que fuerzan al sistema a explorar regiones de alta energía libre. De esta forma se puede explorar de forma rápida y extensa la energía libre de nuestras coordenadas de reacción en comparación a otras metodologías (Barducci y col., 2008). En este trabajo se usó una extensión del algoritmo que calcula metadinámica conocido como *well-tempered Metadynamics* (wtMeta) (Barducci y col., 2008). Esta metodología resuelve algunos problemas relacionados con la convergencia del algoritmo de metadinámica.

El potencial externo de metadinámica sobre las coordenadas de reacción o variables colectivas  $\xi = (\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_{N_{cv}})$  es:

$$\mathcal{V}_{meta}(\xi) = \sum_{t'=\delta t, 2\delta t, \dots}^{t'<t} W_0 \exp\left(-\frac{\mathcal{V}(\xi(q(t')), t')}{k_B \Delta T}\right) \prod_{i=1}^{N_{cv}} \exp\left(-\frac{(\xi - \xi(q(t')))^2}{2\delta_{\xi_i}^2}\right) \quad (\text{A22})$$

donde  $\mathcal{V}_{meta}(\xi)$  es la suma de potenciales externos en cada intervalo de tiempo  $t'$ .

Por cada variable colectiva  $\xi_i$  del total  $N_{cv}$  se aplicó una función de Gauss unidimensional o “montañas” ( $e^{-(\xi-\xi(q(t')))^2/2\delta_{\xi_i}^2}$ ).

La altura de estas “montañas” esta definido por  $W_0 e^{-\nu(\xi(q(t')),t')/k_B\Delta T}$ , donde  $W_0$  corresponde a la altura inicial multiplicado por un factor que ajusta la altura de cada montaña en relación al tiempo. Este factor disminuye con un decaimiento exponencial si la región ya ha sido explorada. Siendo  $\Delta T$  la temperatura sesgo y  $k_B$  la constante de Boltzmann. De esta forma se obtiene una mejor convergencia del potencial total (Barducci y col., 2008).

Se asume que para largos tiempos de simulación el valor  $\mathcal{V}_{meta}(\xi)$  es una buena aproximación para obtener el PMF:

$$A(\xi) \simeq -\frac{T + \Delta T}{\Delta T} \mathcal{V}_{meta}(\xi)_{t \rightarrow \infty} + C \quad (\text{A23})$$

siendo  $C$  un constante arbitraria usualmente definida para definir al menor valor del PMF a cero y  $T$  es la temperatura de simulación, en nuestro caso 300 K.

#### A.1.9. Integración del PMF bidimensional a uno unidimensional y corrección entrópica para la entrada del ion al canal

Los PMF 2D fueron integrados en una dimensión usando la siguiente expresión:

$$PMF(z) = -k_B T \ln \left[ \int_0^R dr \delta(z - z_0) e^{PMF(R,z)/k_B T} \right] \quad (\text{A24})$$

donde  $k_B T$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta.

A partir de los perfiles de energía unidimensionales, se puede obtener la energía libre total de un ion ubicado en la región de agua libre  $A_b$  o en el poro  $A_p$  mediante:

$$A_b = -k_B T \ln \left[ \int_{libre} e^{PMF(z)/k_B T} dz \right] \quad (A25)$$

$$A_p = -k_B T \ln \left[ \int_{poro} e^{PMF(z)/k_B T} dz \right] \quad (A26)$$

donde las ecuaciones (A25) y (A26) son integradas solamente en la regiones libre y del poro, respectivamente. Finalmente la energía de transferencia es calculada como:

$$\Delta A_{b \rightarrow p}^c = A_p - A_b - k_B T \ln L_{zb} \frac{2\pi k_B T / k_{(xy)}}{V_b} \quad (A27)$$

Esta diferencial se le suma un término que corresponde a la razón del volumen no muestreado en la región libre ( $L_{zb} 2\pi k_B T / k_{(xy)}$ ) que usa la restricción armónica  $k_{(xy)}$  aplicada en el plano  $x - y$ , y el total del volumen explorado (Doudou y col., 2009).

$L_{zb}$  es el largo axial del volumen total que comprende la región  $V_b$ .

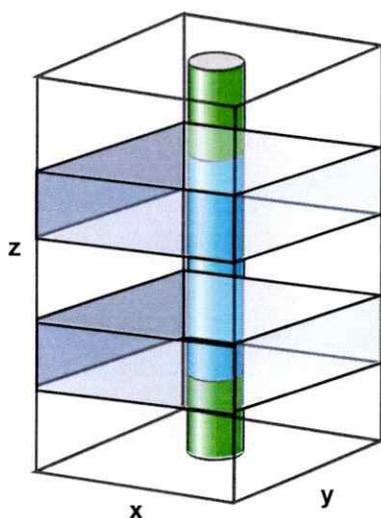


Figura A4: Esquema de las regiones usadas para calcular la energía de transferencia del ion hacia el poro desde la región libre

Esquema del sistema de membrana dual, en color gris, donde se destaca las regiones usadas para calcular la energía libre dentro del poro  $A_p$  como en la región libre  $A_b$ , en colores celeste y verde, respectivamente.

### A.1.10. Función de distribución radial (RDF)

La función de distribución radial (RDF, del inglés *radial distribution function*) es la función que describe la densidad local de una partícula con respecto a otra a una distancia determinada. Este se calcula básicamente como el número de partículas promedio  $\langle n(r) \rangle$  que se encuentra a una distancia  $r$ , el cual es normalizado por factores de densidad y volumen.

$$g(r) = \frac{\langle n(r) \rangle}{4\pi\rho r^2 dr} \quad (\text{A28})$$

donde  $\rho$  es igual a la densidad de las partículas en la solución y  $4\pi\rho r^2 dr$  corresponde al volumen infinitesimal de una capa de una esfera con radio  $r$ .

De esta forma si no existe un ordenamiento de las partículas entre sí, como en el caso de un gas ideal, la función  $g(r)$  debería ser uno, ya que no existe diferencia con la densidad de las partículas en el sistema. Si las partículas estuvieran en un estado sólido, la función  $g(r)$  debería presentar un patrón regular con valores altos y bajos sucesivamente. En cambio en los líquidos, como en el caso de la interacción entre iones y agua, se espera que las aguas que rodean a los iones se encuentren estructuradas, formando capas de solvatación. Por lo tanto en la función  $g(r)$  se espera observar aumentos en los valores de la densidad local (que corresponderían a las capas de solvatación) y a largas distancias, que la densidad local convergiera a uno.

## A.2. Figuras suplementarias

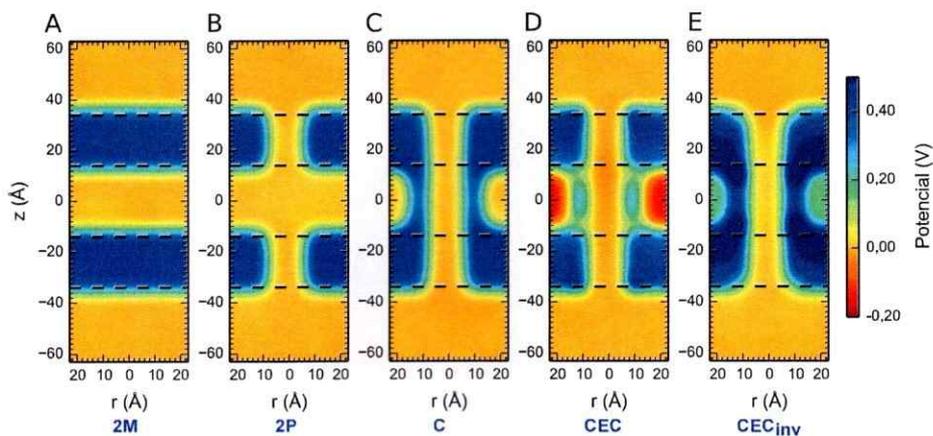


Figura A5: **Potenciales electrostáticos de los sistemas sin un campo eléctrico aplicado.**

Potenciales electrostáticos promedio a lo largo del eje  $z$  y distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x - y$ , sin un campo eléctrico aplicado, para los modelos 2M (A), 2P (B), C (C), CEC (D) y  $CEC_{inv}$  (E). Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana.

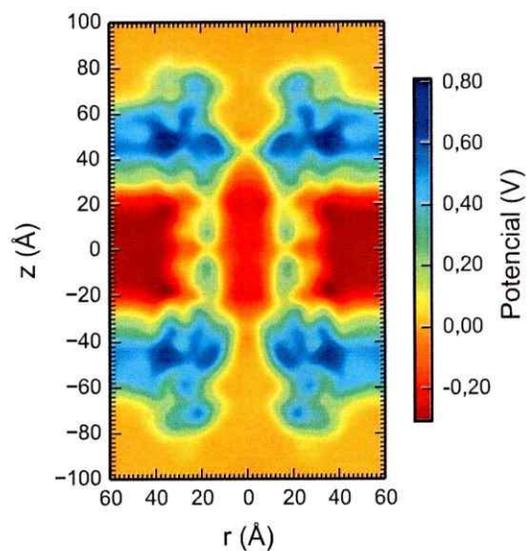


Figura A6: Potenciales electrostáticos del sistema de GJC sin una diferencia de potencial.

Potenciales electrostáticos promedio a lo largo del eje  $z$  y distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x - y$ , sin un campo eléctrico aplicado para el sistema *all-atom* de GJC.

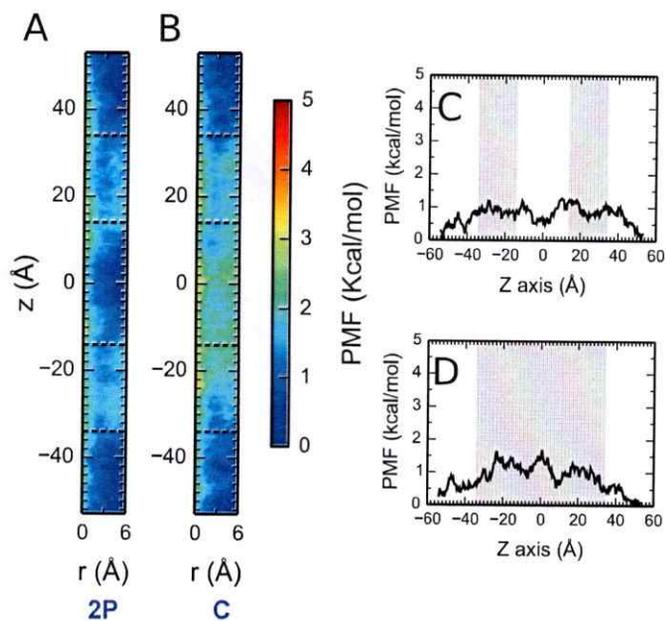


Figura A9: Potenciales de fuerza media para los modelos sin cargas en la superficie del canal.

Perfiles bidimensionales del PMF para el proceso de permeación del ion sodio proyectada a lo largo del eje  $z$  y la distancia radial desde el centro del poro en el plano  $x-y$ , para los modelos 2P (A) y C (B). Las líneas punteadas indican los bordes de la membrana. Perfil unidimensional del PMF para la permeación del ion sodio proyectada a lo largo del eje  $z$  para los modelos 2P (C) y C. Las sombras grises representan la sección donde se encuentra el canal y dentro de ella en colores la posición de las cargas en el canal en el eje  $z$  (azul=positivo, rojo=negativo).