



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EXPLORACIÓN VÍA SIMULACIONES
DE DINÁMICA MOLECULAR DEL
MECANISMO DE TRANSPORTE DEL
ION CALCIO A TRAVÉS DEL CANAL DE
PANEXINA 1”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

GONZALO IGNACIO POBLETE FLORES

Director de Tesis: ALVARO ARDILES ARAYA

Codirector de Tesis: JOSÉ ANTONIO GÁRATE CHATEAU

MARZO / 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EXPLORACIÓN VÍA SIMULACIONES
DE DINÁMICA MOLECULAR DEL
MECANISMO DE TRANSPORTE DEL
ION CALCIO A TRAVÉS DEL CANAL DE
PANEXINA 1”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

GONZALO IGNACIO POBLETE FLORES

Director de Tesis: ALVARO ARDILES ARAYA

Codirector de Tesis: JOSÉ ANTONIO GÁRATE CHATEAU

FECHA: 01/03/2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Exploración vía simulaciones de dinámica molecular del mecanismo de transporte del ion Calcio a través del canal de Panexina 1”

Alumno

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Alvaro Ardiles Araya en el laboratorio de (nombre del laboratorio e institución) y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. XXXX XXXXX
Presidente Comisión

Dr. XXX XXXXXX
Profesor Informante

Dr. XXXX XXXXXX
Profesor Informante

Dr. XXXX XXXXXX
Director de Tesis

**Ciudad, Chile
2023**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

Panexina 1 (PANX1)

Dominio Carboxi Terminal (DCT)

Dominio Extracelular (DEC)

Dominio Transmembrana (DTM)

Dominio Intracelular (DIC)

Residuos Glicosilados (NAG)

Protein Data Bank (PDB)

Raíz de la desviación cuadrática media (RDCM)

Root-Mean-Square Deviation (RMSD)

Visual Molecular Dynamics (VMD)

Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD)

ÍNDICE

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Descripción de la Panexina 1	10
Simulaciones de Dinámicas Moleculares	11
Preguntas para resolver de este trabajo	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
METODOLOGÍA	15
Generación del Modelo de PANX1	15
Simulación	15
Análisis de resultados	15
RESULTADOS	16
Modelos de PANX1	16
Verificación de los modelos	17
Análisis del poro	17
PANX1 Completa	18
PANX1 Clivada	19
Visualización de la simulación	20
Análisis Estáticos	25
Densidad de Volumen	25
Análisis de Permeabilidad	27
DISCUSIÓN	29
Modelos de PANX1	29

PANX1 Completa	29
PANX1 Clivada	30
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	36

RESUMEN

La Panexina 1 (PANX1) es una proteína de membrana que forma canales que permiten el flujo no selectivo de moléculas. Estudios recientes han reportado la estructura tridimensional de este canal lo que abre la oportunidad de explorar sus propiedades de permeación y las moléculas que podrían fluir a través de este canal. En esta tesis se generaron modelos computacionales y posterior a ellos simulaciones de dinámica molecular para evaluar la termodinámica de permeación del ion Ca^{2+} a través del canal de PANX1. Exploramos el comportamiento molecular de la proteína ante el paso del ion Ca^{2+} en condiciones de baja conductancia de iones con los residuos del dominio carboxi terminal (DCT) intactos y en condiciones de alta conductancia, asociada en general a inflamación, con su DCT removido. Se encontró que el ion de Ca^{2+} no cruza el poro del canal de PANX1 en su configuración completa debido al bloqueo que aportan los anillos de C426 y E414 del DCT. Por otro lado, cuando la PANX1 está clivada, esta sí permite el paso de Ca^{2+} a través de su poro central.

Palabras clave: *Panexina 1, PANX1, permeación de Calcio, Modelos Computacionales, Dinámicas Moleculares.*

INTRODUCCIÓN

Descripción de la Panexina 1

La (PANX1) es una proteína presente en vertebrados (1) involucrada en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos que incluyen la modulación de la plasticidad sináptica y la memoria (2-4), la absorción de la glucosa (5), presión sanguínea (6), inflamación (7,8), muerte celular (7), dolor crónico, la migraña con aura, el ataque cerebrovascular, la epilepsia (8) y enfermedad de Alzheimer (9).

La PANX1 (figura 1) es un canal de membrana formado por 7 unidades (heptámero) que conecta el espacio extracelular con el medio interno de la célula. Cada monómero contiene cuatro hélices transmembrana, con los dominios carboxi terminal (DCT) y amino terminal orientados hacia la cara citoplasmática (10). Su estructura se puede esquematizar en tres dominios, el dominio extracelular (DEC), dominio transmembrana (DTM) y el dominio intracelular (DIC). En algunos casos se ha descrito que un canal de una célula se puede conectar a otra PANX1 para formar un canal intercelular, sin embargo, esto solo ha sido observado en condiciones de sobreexpresión de esta proteína puesto que presenta residuos glicosilados (NAG) en el DEC que impide esta conformación (10-13).

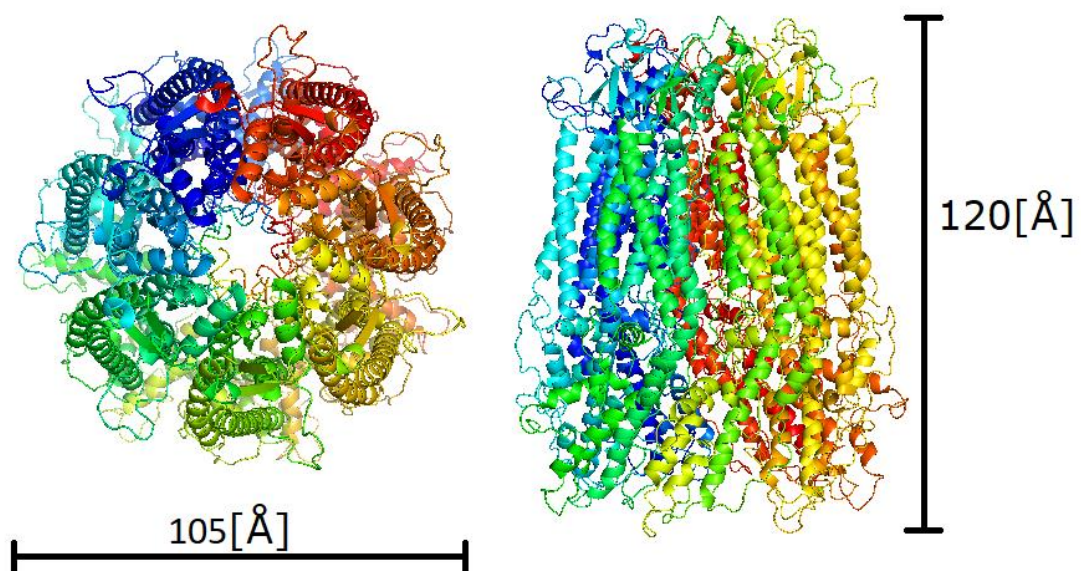


Figura 1: PANX1. Heptámero de 426 aminoácidos que crea un canal intermembranal para ATP y otros iones no selectivos

Los canales de PANX1 exhiben dos estados de actividad, un estado de baja conductancia en condiciones fisiológicas en donde es "auto-inhibida" por su DCT en un mecanismo similar a la "bola y cadena" de los canales iónicos voltaje-dependientes, permeando aniones como NO^{-3} , Cl^{-} y glutamato a través de túneles laterales hacia el poro central (14,15). Además, presenta un estado de alta conductancia, en condiciones tanto fisiológicas como patológicas causando una señalización para la inflamación o muerte celular, en donde la PANX1 permite la liberación de ATP (16) y otras moléculas de gran tamaño. La activación de este canal en condiciones patológicas implica el clivaje irreversible de su DCT mediado por caspasas 1, 3, 7 y 11 (17-19).

Investigaciones en este canal en situaciones de estrés mecánico, sugieren que la proteína puede estar involucrada en la propagación de Ca^{2+} intercelular (20). Otros trabajos no solo apoyan esta teoría, sino que también relacionan a la sobreexpresión de la PANX1 en el retículo endoplasmático, con la liberación e incremento de Ca^{2+} intracelular desde los mismos retículos, sugiriendo que este canal es capaz de servir como puente intermembrana para el ion Ca^{2+} (21).

Si bien estos hallazgos presentan un avance en el entendimiento de la PANX1, también se generan otras dudas, específicamente acerca del mecanismo de transporte del ion Ca^{2+} a través del canal. Paralelo a esto, siempre es aconsejable y necesario tener una corroboración visual de la permeación de Ca^{2+} a través de la PANX1. Sin embargo hasta el momento el microscopio con mayor resolución hasta ahora construido, el microscopio de depleción por emisión estimulada (STED) y tiene una resolución en tejidos vivos de hasta 20[nm] (22), mientras que la PANX1 tiene un largo aproximado de los 12[nm] (10).

Simulaciones de Dinámicas Moleculares

Es por esto por lo que, con la finalidad de aportar más información a los experimentos in vitro, el área experimental "*In Silico*" ha evolucionado una de sus ramas dedicada a dinámicas moleculares. El término "*In Silico*" fue acuñado por primera vez en un taller de aplicaciones de modelos autómatas celulares (modelos matemáticos y computacionales que describen la evolución de un sistema en pasos discretos) (23), por el matemático mexicano Pedro Miramontes en 1989; quien dos años después presentó su tesis doctoral diseñando simulaciones en ácidos nucleicos (24). Sin embargo, la primera aparición del término en artículos literarios fue en el capítulo

"*Physiological Studies in Silico*" escrito por Hasn B. Sieburg, del libro "*1990 Lectures in Complex Systems*" en 1991 (25).

Estos experimentos son aplicados en simulaciones de procesos (ya sean naturales o artificiales) modelados por computador, con el propósito de aportar otra forma de validación y entregar mayor evidencia a los experimentos en sistemas reales estimando una predicción más detallada de las dinámicas en las interacciones de los cuerpos modelados, y a su vez evitar riesgos además de ahorrar en materiales, tiempo y espacio.

En el caso de las dinámicas moleculares, estas técnicas sirven para evaluar interacciones entre átomos o moléculas pequeñas con macromoléculas más complejas. En el ámbito biológico las interacciones pueden ser entre un ligando y un receptor (26–28), o el paso de iones a través de algún canal de interés (29,30) como por ejemplo, la PANX1.

Para generar una simulación, primero se debe contar con una estructura o modelo. Para esto se puede utilizar un cristal de interés entregado por "*The Protein Data Bank*" (PDB) (31,32). En el caso de no contar con un cristal, o de contar con uno sin su sitio de interés o incompleto, se recomienda crear un modelo que satisfaga esta carencia. La generación de este modelo puede ser por diferentes métodos: Modelación "*Ab initio*" o "*De Novo*" (33) que consiste en modelar una estructura paso a paso, en función del comportamiento de fragmentos aminoacídicos ya conocidos. Otra técnica también es por "*Predicción de Estructura Secundaria*" la cual infiere su forma secundaria y terciaria a partir de las torsiones Φ (*phi*) y Ψ (*psi*) que van tomando los carbonos alfa ($C\alpha$) de la cadena peptídica en la secuencia aminoacídica (34). El "*Reconocimiento de Plegado*" es la técnica en la cual se crea la estructura en base a la comparación de fragmentos plegados de la secuencia a modelar, con fragmentos similares pertenecientes a otros cristales (34,35). La técnica utilizada en este trabajo es la de "*Modelado por Homología*" (36) que consiste en realizar una búsqueda del cristal con la secuencia de mayor similitud con la secuencia de interés en la proteína a modelar y crear una estructura a partir de él. Para esto es ideal que la proteína ya exista en la base de datos PDB de manera que su secuencia sea lo más idénticamente posible. En el caso de la PANX1 los cristales existentes datan del año 2020 (37). Sin embargo, hasta la fecha de este trabajo existe solo uno que contiene el DCT además del resto de la secuencia completa, salvo por 12 residuos de la cara externa extracelular, siendo el cristal con mayor detalle cercano a la proteína PANX1 (10).

Las formas de validar un modelo son variadas, de acuerdo con la cantidad de residuos y estructuras que componen a la proteína. La determinación más común es calculando la Raíz de la desviación cuadrática media (RDCM) o "*Root-Mean-Square Deviation (RMSD)*", la cual estima diferencias espaciales y angulares entre residuos equivalentes, ya sea separados en el tiempo o superpuestos en un mismo instante "*t*". Sin embargo, esta función al entregar el mismo peso a todos los residuos de la proteína es propensa a sufrir una mayor sensibilidad a desviaciones locales alterando el resultado de la topología global, sobre todo en multímeros con grandes cantidades de aminoácidos como la PANX1 (38). Otro método de validación es el gráfico o plot de Ramachandran, el cual sirve como un verificador indirecto de la estequiometría y geometría de la proteína (39).

Preguntas para resolver de este trabajo

Debido a lo planteado anteriormente, el primer problema a solucionar es determinar la factibilidad del ion Ca^{2+} de atravesar el canal de PANX1, ya sea en estado de baja conductancia como en el de alta conductancia asociado al corte de su DCT, de ser posible verificar la contribución de la entrada de Ca^{2+} a su transporte, y determinar cuáles son los mecanismos implicados en su tránsito.

El segundo problema es que los medios actuales no permiten observar de manera directa este mecanismo de transporte, debido a las escalas nanométricas en las que ocurre este proceso. Por lo que es necesario incurrir a otros métodos de observación, como son los modelados moleculares vía simulaciones de dinámica molecular. Estos generan una visión virtual de lo que podría ocurrir en este universo nanométrico. Modelando el entorno que rodea al canal de PANX1 y perfiles fisicoquímicos, es posible evaluar si el ion Ca^{2+} transita o no a través de este canal, y de ser así, determinar qué mecanismos utiliza para tal proceso.

El propósito de este trabajo es intentar describir el comportamiento de Ca^{2+} al interactuar con el canal intermembrana PANX1, cuando se encuentran en un estado natural y completo, por lo tanto, de baja conductancia iónica; y cuando se encuentra inflamado con su DCT (ubicada en la cara interna del canal) clivada y por ende en estado de alta conductancia iónica. Para este trabajo se utilizarán análisis de eventos de permeabilidad y de densidad volumétrica a partir de simulaciones de dinámicas moleculares basados en modelos creados desde el repositorio de proteínas proporcionado por banco de datos de proteínas (PDB).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Este trabajo consta de una hipótesis nula y dos alternativas:

H₀: El ion Ca²⁺ no es capaz de transitar a través del canal de PANX1, tanto en estado de baja como en el de alta conductancia.

H₁: El ion Ca²⁺ no es capaz de transitar a través del canal de PANX1 en estado de baja conductancia; sin embargo, es capaz de transitar a través del canal de PANX1 en estado de alta conductancia, es decir, cuando el canal se encuentra clivado.

H₂: El ion Ca²⁺ es capaz de transitar tanto en el canal de PANX1 en estado de baja como de alta conductancia.

Objetivo General

Determinar viabilidad del ingreso del ion Ca²⁺ extracelular a través del canal de PANX1 hacia la célula, mediante de permeabilidad y densidad vía simulaciones de dinámica molecular.

Objetivos Específicos

- Generar modelos simplificados que repliquen el potencial electrostático de superficie de la PANX1 para realizar estudios sistemáticos del tránsito del ion de Ca²⁺ a través de este canal.
- Determinar el mecanismo de transporte y la vía que utiliza. En el caso contrario, determinar que el mecanismo de bloqueo del paso del ion Ca²⁺. Mediante visualización de las posibles rutas de permeación, conteo de eventos de permeabilidad y mapas de densidad volumétrica, obtenidos por simulaciones de dinámica molecular.

METODOLOGÍA

Generación del Modelo de PANX1

Para la creación del modelo se utilizó el cristal 7DWB (10) obtenido de la base de datos PDB (40), al cual se agregaron y ordenaron los residuos faltantes con el servidor PDBFixer (41). El cristal resultante se utilizó como plantilla para los archivos PDB finales, tanto de la proteína PANX1 completa como clivada, usando el software MODELLER (42). Según la puntuación de energía discreta optimizada de la proteína (DOPE) más baja, se seleccionó para la PANX1 clivada al 6to modelo, mientras que para la PANX1 completa, se utilizó el 9no modelo de un total de 10 opciones para cada proteína. Para la validación de los modelos de PANX1 completa y clivada, los modelos se sometieron a un análisis de Ramachandran en el servidor MolProbity (43).

Se utilizó el servidor CHARMM-GUI (44–48) para crear la caja de agua, se agregó una membrana compuesta de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) y se rellenó con 2M de CaCl_2 .

Simulación

Se utilizó el programa VMD-NAMD (49,50) en el servidor proporcionado por el doctorado de Biofísica de la Universidad de Valparaíso; en donde se relajó a la proteína por cerca de 40[ns] y a continuación se aplicó un diferencial de potencial aproximado de -134mV por 1000[ns] (1[μs]), a lo largo del poro, en el eje Z de la caja. Para reducir el tiempo de cálculo se realizó una repartición de masas de hidrógeno (HMR) (51)

Análisis de resultados

Para la visualización del poro en la PANX1 completa y clivada se utilizó el servidor MOLEonline (52). Para el análisis de eventos de permeabilidad se contabilizó el paso de iones de Ca^{2+} , Cl^- y moléculas de H_2O por separado; a través del poro de la PANX1 tanto completa como clivada. Para la visualización de densidad volumétrica de cada partícula Ca^{2+} , Cl^- y H_2O , se utilizó el plugin de densidad volumétrica proporcionado por el programa VMD (49,53).

RESULTADOS

Modelos de PANX1

Ambos modelos obtenidos representan a la proteína conformada de 7 monómeros de similares características a las descritas en la literatura general, los que se encuentran rodeados por una membrana de fosfatidilcolina (POPC) que se encuentra aproximadamente desde los 20[Å] sobre el eje Z, a la altura del residuo A2, hasta los -20[Å] bajo el eje Z, a la altura del residuo L24. Estos monómeros se componen de una sección extracelular (DEC), compuesta por 2 hélices alfa y 3 láminas beta; una sección transmembranal (DTM) compuesta por 5 hélices alfa, de las que una de ellas se conecta hasta la sección intracelular en donde se encuentran de 5 a 6 hélices alfas más, de acuerdo con el estrés o torsión ocurriendo en la sección en aquel momento.

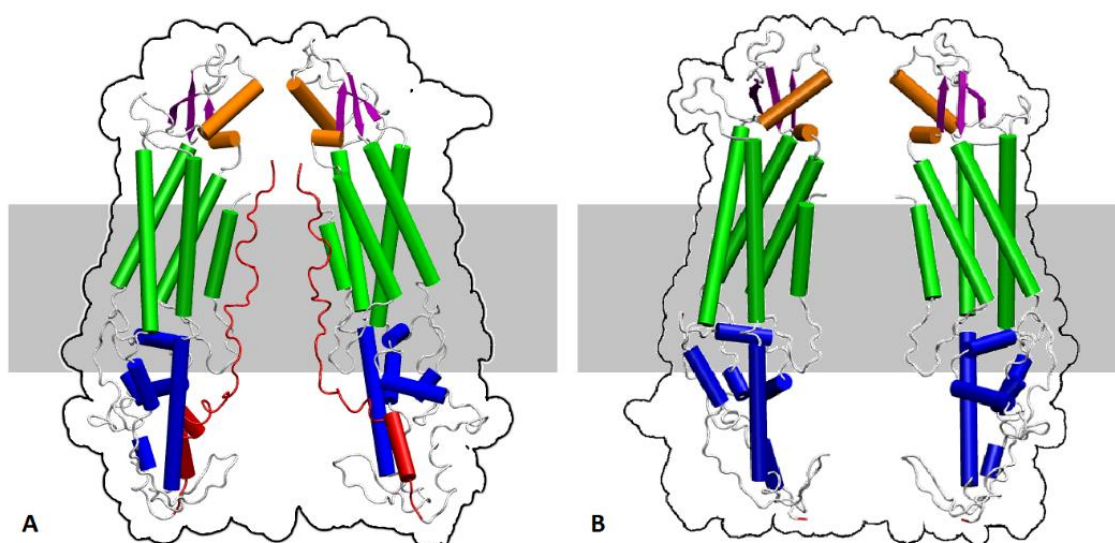


Figura 2: Modelos de PANX1 en estado completo y clivado, compuesta por 2 hélices alfa y 3 láminas beta en la zona extracelular, 5 hélices alfa en la zona transmembranal y 5 a 6 hélices alfa en la zona intracelular. A) PANX1 completa: en rojo, DCT compuesto por 53 residuos, desde el residuo G380 hasta el residuo C426. B) Panx1 clivada: DCT eliminado, ultimo residuo marcado en rojo es el D379.

Para la PANX1 completa, el DCT se encuentra al interior del poro, de color rojo en la figura 2A, siendo el último residuo C426. En la proteína clivada (figura 2B), este dominio desaparece quedando como último residuo D379.

Verificación de los modelos

Se generó un plot de Ramachandran para mostrar la distribución de los ángulos φ (ϕ) y ψ (ψ) de los enlaces peptídicos en los modelos obtenidos. Los ángulos φ corresponden a las rotaciones en torno al enlace entre el grupo amino y el $\text{C}\alpha$, los ángulos ψ corresponden a las rotaciones en torno al enlace entre el $\text{C}\alpha$ y el grupo carboxilo de cada aminoácido. En conjunto estos ángulos definen la orientación de los enlaces peptídicos en una proteína.

Como se observa en las figuras 13 y 14 del anexo, la mayoría de las conformaciones de los enlaces peptídicos se encuentran en las regiones permitidas del plot. Estas regiones se definen por las restricciones estéricas y de energía que limitan los ángulos φ y ψ que pueden adoptar los enlaces peptídicos. Para los que no se encuentran dentro de las regiones permitidas se marcó en rojo aquellos residuos que se encuentran dentro del poro y en naranja a los residuos que se encuentran alrededor de la entrada de este. Los que no se encuentran marcados quiere decir que sus residuos se encuentran en un sector que no tiene contacto directo con la cara interna del poro, ya sea la cara externa o la cara media del canal. En las tablas 3 y 4 del anexo se encuentra un listado de los residuos que se encuentran fuera de las zonas favorecidas, aquellos que cuentan con valores atípicos. A continuación, en la tabla 1 se muestra un resumen de los resultados del análisis de Ramachandran.

	PANX1Completa	PANX1Clivada
Residuos favorecidos	88.0% (2612/2968)	88.2% (2328/2639)
Residuos permitidos	96.5% (2864/2968)	96.8% (2554/2639)
Outliers (atípicos)	3.50% (104/2968)	3.22% (85/2639)
Z score	-1.00 $\pm$ 0.15	-0.47 $\pm$ 0.16

Tabla 1: Resultados del análisis de Ramachandran

Análisis del poro

Tras un análisis con el servidor MOLEOnline (52) se obtuvo resultados de la forma, carga e ionización del poro en el tiempo $t=0[s]$, es decir cuando la proteína se encuentra en estado rígido, uniforme y sin movimiento de iones en su interior. El poro consta de una serie de cuellos de botella compuestos por anillos del mismo residuo, pero de los diferentes monómeros de la proteína. Las mediciones de la posición de los anillos en el eje Z del poro están en función del centro de masa

compuesto por los 7 residuos que componen al anillo. Cabe recordar que el largo espacial que abarca un aminoácido puede llegar entre 3,4 a 4[Å] de largo (54). La medición del radio en los gráficos de carga e ionización están en función de la sonda creada por el servidor, por lo que representa una forma aproximada del poro en $t=0[s]$.

PANX1 Completa

En la figura 3, el primer anillo formado por W74, a aproximadamente 49.3 Å del centro del eje Z, tiene un radio $r \approx 6.67$ Å. Más abajo, a $Z \approx 33.17$ Å, se encuentra el segundo cuello compuesto por un anillo de C426 de $r \approx 4.54$ Å de radio, el cual corresponde al último residuo del DCT. El tercer cuello de botella se forma por un sector con carga iónica positiva con $r \approx 4.68$ Å y con su límite superior en el residuo R420 a $Z \approx 16.5$ Å, y con límite inferior en el residuo K415 a los $Z \approx 7.46$ Å. Esta sección con carga positiva se corta abruptamente por una nueva sección compuesta por una serie de residuos que en su mayoría vienen con carga negativa.

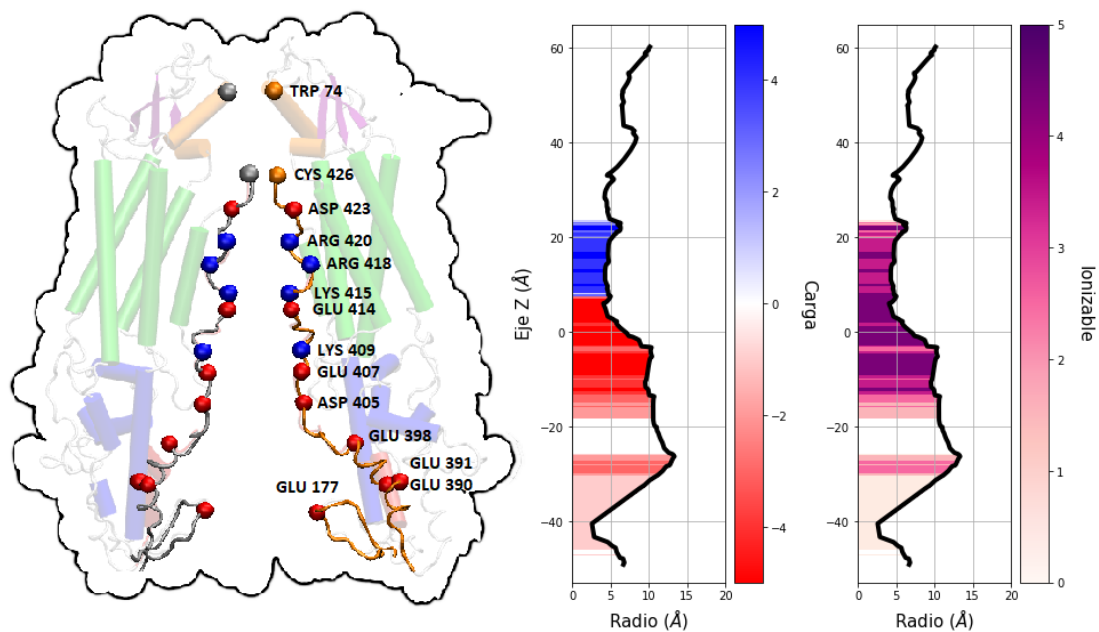


Figura 3: Composición de residuos relevantes del poro en la PANX1 completa con sus gráficos de carga y de ionización. En azul, residuos con carga positiva, en rojo los con carga negativa; en gris y naranja residuos sin carga con el color del monómero al que pertenecen. En el esquemático se muestran los residuos relevantes en la carga e ionización del poro. Los gráficos a la derecha muestran las secciones en las que el poro se encuentra cargado positivamente y negativamente y la capacidad de ionización de dicha sección.

A $Z \approx 2.68 \text{ \AA}$ se encuentra el residuo E414 con un radio $r \approx 5.36 \text{ \AA}$, el cual da el límite superior para esta sección del poro que está cargada negativamente. Esta sección continúa hasta el residuo D405 a $Z \approx -18.64 \text{ \AA}$ con un radio de $\approx 10.59 \text{ \AA}$. Más abajo en el eje Z, a los $\approx -28,29 \text{ \AA}$, está el residuo E398 el cual abre una nueva sección negativa, sin embargo, de un radio más amplio estimado de $12.56 \text{ \AA}$. Para finalizar, a $\approx -42.76 \text{ \AA}$ del eje Z se encuentra el residuo E177 el cual da término a la sonda por lo que su radio se observa con un radio pequeño, cercano a los $2.86 \text{ \AA}$. Sin embargo, el radio real del anillo E177 se encuentra cerca de $\approx 17.02 \text{ \AA}$. En la imagen también se observa el residuo K409 en $Z \approx -4.73 \text{ \AA}$, si bien este residuo tiene carga positiva, se encuentra aislado en el sector negativo del poro por lo que tiende a reducirse la carga negativa y por lo tanto su capacidad de ionización. Los residuos E391 y E390, ubicados a $Z \approx -37,71 \text{ \AA}$, si bien, en la figura se observan alejados del centro, estos se encuentran en un rincón del poro, de tal forma que no presenta relevancia para el radio del poro, pero si para la magnitud de carga negativa del sector.

PANX1 Clivada

Por el otro lado, en la figura 4 tenemos a la PANX1 en estado activado o clivado, el cual carece de su DCT desde el residuo G380. Esto aumenta el radio del poro de acuerdo con lo observado en los análisis de carga y de ionización. Se observa a los $\approx 47.42 \text{ \AA}$ del eje Z al residuo W74 con un radio de $\approx 6.75 \text{ \AA}$. Más abajo a $\approx 28.91 \text{ \AA}$ en el eje Z, se encuentra E57 a una distancia aproximada de $5.94 \text{ \AA}$ del centro del poro. El cuello de botella del poro, con radio $\approx 6.61 \text{ \AA}$ está formado por un anillo de M1 a $Z \approx 21.45 \text{ \AA}$. A la distancia $Z \approx 9.25 \text{ \AA}$ con un radio amplio aproximado de $13.05 \text{ \AA}$ se encuentra el residuo E9 el cual, según la gráfica de carga entregada por el servidor MOLE, explica la existencia de carga negativa en el sector. El residuo E14, que se encuentra en el $\approx 1.2 \text{ \AA}$ en el eje Z y con un radio de $\approx 12.44 \text{ \AA}$, marca un nuevo espacio cargado negativamente que se prolonga hasta el final del poro en el residuo E177 que está en $Z \approx -42.08 \text{ \AA}$, intercalado por la presencia de residuos con carga positiva desde los residuos K148 con $Z \approx -31.06 \text{ \AA}$, y R166 con $z \approx -54.15 \text{ \AA}$. En el gráfico de cargas y de ionización se observa una tendencia a la neutralidad a medida que se acerca al final del poro.

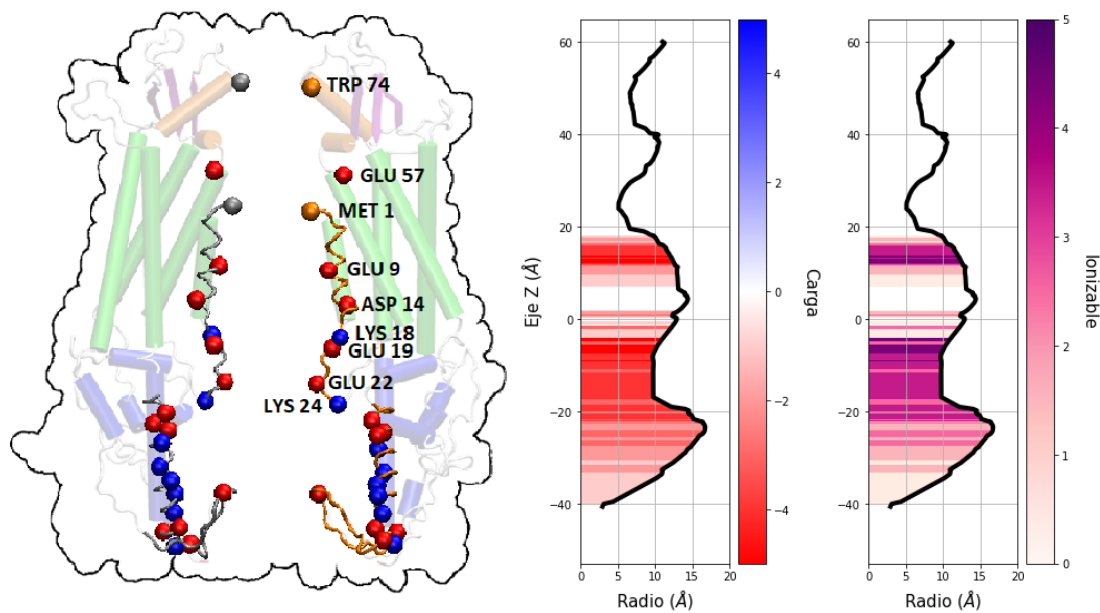


Figura 4: Composición de residuos relevantes del poro en la PANX1 clivada con sus gráficos de carga y de ionización. En azul, residuos con carga positiva, en rojo los con carga negativa; en gris y naranja residuos sin carga con el color del monómero al que pertenecen. Los residuos con carga positiva del lado intracelular, si bien tienen gran presencia en poro, no se observa su presencia en el gráfico de cargas, pero sí en el gráfico de ionización marcando un contrapeso para las cargas negativas.

Visualización de la simulación

Las simulaciones para ambas proteínas registraron bloqueos o arrestos tanto del ion Ca^{2+} como para el ion Cl^- . También se observó que al generarse estas ionizaciones también ocurrían efectos de deformación de la cadena peptídica debido al arrastre o empuje por parte de los iones de Ca^{2+} y de Cl^- .

En la PANX1 completa, se observa la compactación producida en el DCT cuando los iones de Ca^{2+} (amarillo) y Cl^- (cian) ejercen presión contra los residuos de C426, que en un momento inicial $t=0[\text{s}]$ estaban en $Z \approx 33[\text{\AA}]$. Se observa una compactación progresiva del DCT producto de la presión impuesta por la solución de CaCl_2 y H_2O . Esta compactación eventualmente se detiene y mantiene estable de acuerdo con las fuerzas impuestas tanto por la solución y las paredes internas del mismo poro. Esta posición se mantendría hasta el final de la simulación. El desplazamiento del anillo de C426 es imperceptible. Sin embargo, como se observa en la figura 5, si se puede percibir la deformación que sufrió el anillo al encontrarse con los iones de Ca^{2+} y Cl^- . Esta presión por parte de los átomos de Ca^{2+} empujando e ionizando al anillo de C426 desde arriba, e ionizando al anillo de residuos de E414, compacta el tubo del poro, achatándolo en los extremos.

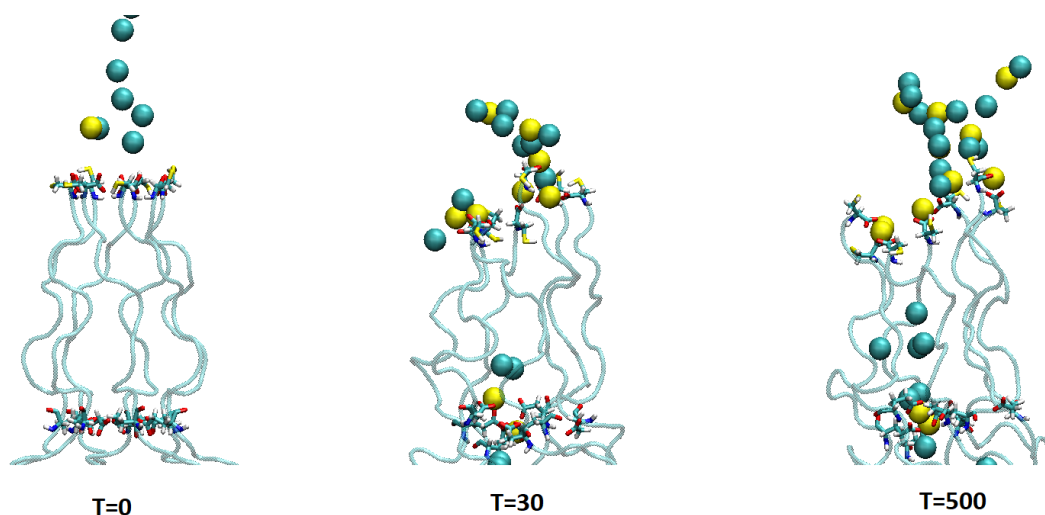


Figura 5: Comportamiento de DCT. Anillos de C426 (ramas en la parte superior) y E414 (ramas en la base). En $T=0[s]$, previo a su interacción con Ca^{2+} (amarillo) y $[Cl^-]$ (cian). En $T=30[ns]$, el anillo de C426 interactuando con iones de Ca^{2+} se deforma tratando de resistir el paso de los iones. En $T=500[ns]$, tanto los residuos de C426 y E414 se mantienen bloqueando el paso de Ca^{2+} , sin embargo, permiten el paso de Cl^- , el cual transita por la zona media del tubo.

Esto crea un espacio entre medio que además está compuesto por R420, R418 y K415 (figura 6), por lo que este espacio se encuentra cargado positivamente. A través de él los iones de Cl^- quedan en libre tránsito, separados del Ca^{2+} , lo que permite un paso facilitado entre el anillo de C426 y E414.

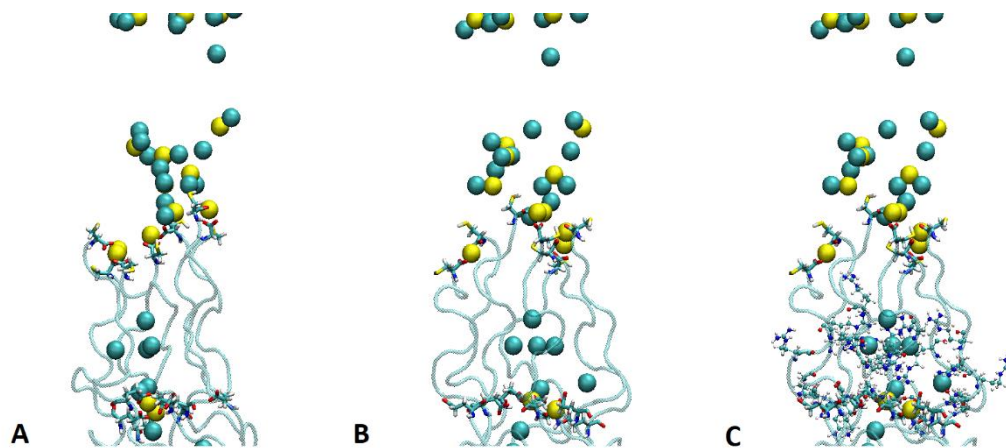


Figura 6: Espacio de tránsito de Cl^- . A) se observa la permeabilidad del tubo solo para el ion Cl^- . B) Misma imagen girada 90 grados a la derecha para visualizar el ensanchamiento del tubo debido a la presión ejercida hacia C426 y E414. C) Misma imagen, esta vez con la nube de carga positiva producida por los residuos R420, R418 y K415.

Este bloqueo de Ca^{2+} se produce gracias a la ionización de los grupos carboxilos de los residuos de E414 por la parte baja y por la parte superior C426 con apoyo de D423. En la figura 7B se observa el arresto de iones de Ca^{2+} por parte de los grupos carboxilos del anillo de E414. La atracción de estos iones reduce el diámetro del poro, prohibiendo el paso de otros iones de Ca^{2+} . Misma situación ocurre en el anillo de C426 el cual se observa en 7C y 7D donde se aprecia inclusive como se tuerce la cadena para retener a un ion de Ca^{2+} con 2 residuos de C426 de distintos monómeros, más el apoyo de un D423.

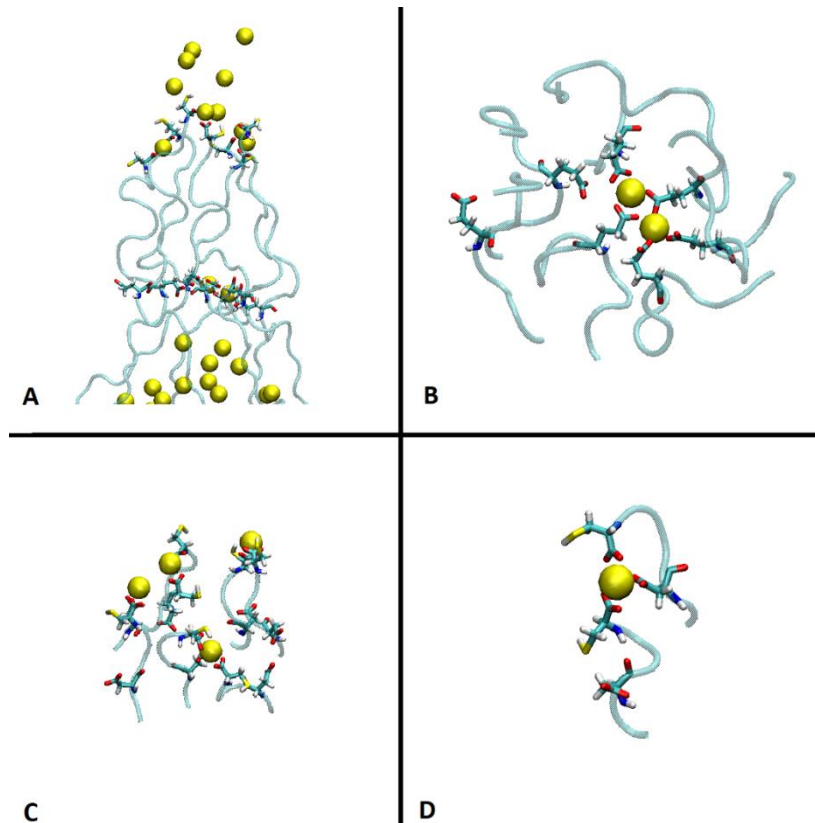


Figura 7: Ionización de residuos E414 y C426 en DCT. A) Bloqueo del paso de Ca^{2+} a través del poro; se observa un vacío entre el anillo de C426 (superior) y E414 (inferior). B) Anillo de E414 reduciendo su radio al ionizarse con dos átomos de Ca^{2+} . C) Anillo de C426 arretando iones de Ca^{2+} . D) Se observan 2 residuos de C426 y 1 de E414 unidos a un átomo de Ca^{2+} . Varios grupos carboxilos pueden unirse a un solo átomo de Ca^{2+} .

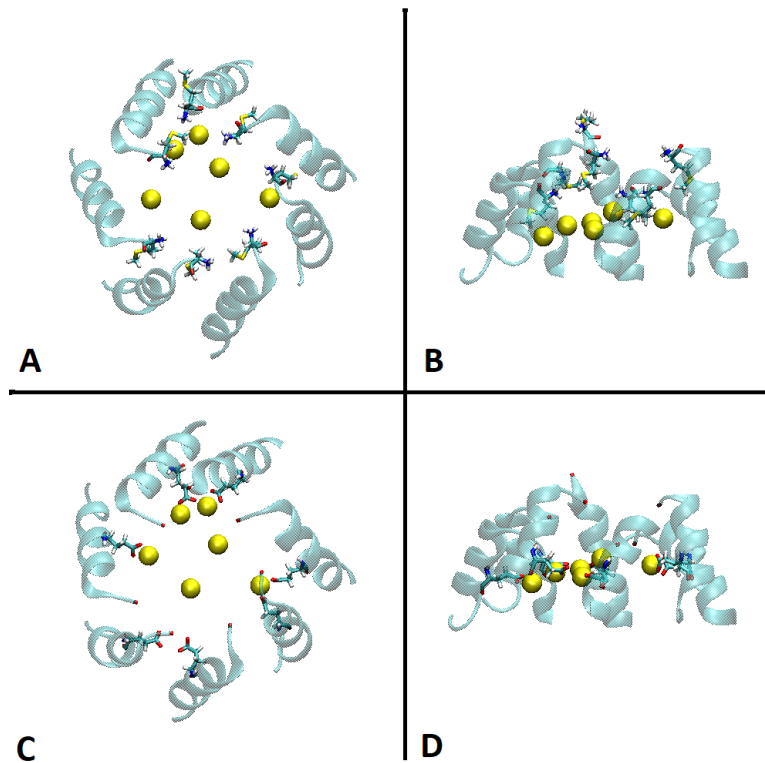


Figura 8: Paso de Ca^{2+} a través del cuello de M1 y E9 en la PANX1 clivada. A y B) Vista aérea y frontal de la nula interacción de Ca^{2+} con el anillo de M1. C y D) Mismas vistas, pero marcando el anillo de E9; los átomos de Ca^{2+} se encuentran alineados con los grupos carboxilos de E9.

En cuanto a la PANX1 en estado clivado, vale decir en alta conductancia, también se observa la ionización de las paredes internas del poro. El cuello de botella formado por M1, en contraste con C426, no se ve afectado por el paso de Ca^{2+} . A quienes sí afecta es a los residuos E9, E14 y E19; como muestran las figuras 8B y 8D. También se observa ionización por parte de Cl^- con los residuos básicos que se encuentran cargados positivamente como la Arginina y Lisina. Ejemplo de esto se muestra en la figura 9B donde se observa a K36 enlazado iónicamente con Cl^- .

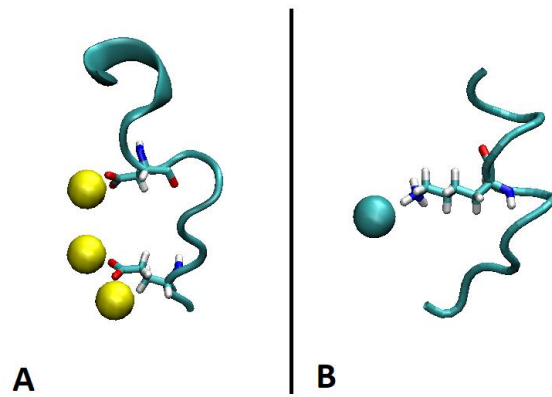


Figura 9: Enlace iónico de entre átomos y residuos del poro. A: Enlace iónico entre átomos de $[Ca^{2+}]$ y grupo carboxilo de residuos de E14 y E19. B: Enlace iónico entre un átomo de $[Cl^-]$ y el grupo amino de K36.

En cuanto las entradas/salidas del poro, caracterizados por los residuos W74 y E177, en la figura 10 se observan los cambios de estos en el tiempo. Tanto en $t=0[s]$, W74 y E177 están intactos y ordenados; a diferencia de en los tiempos $t=30[ns]$ y $t=500[ns]$, donde se nota una ligera deformación de W74 a diferencia de E177.

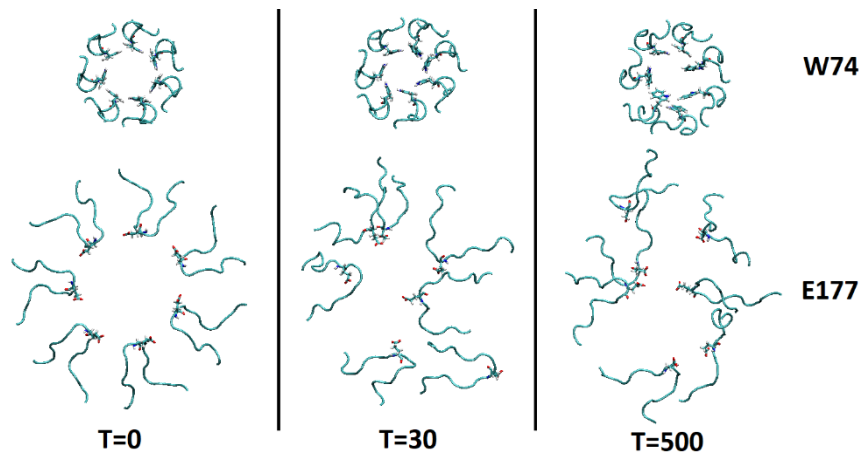


Figura 10: Deformación de las entradas del poro extracelular (W74) e intracelular (E177). Arriba: Movimientos en el anillo W74, el cual está compuesto por una red estructurada, lo que le permite mayor rigidez y estabilidad tanto en $t=0[s]$, $t=30[ns]$ y $t=500[ns]$. Abajo: Movimientos en el anillo E177 más flexibles.

Análisis Estáticos

Densidad de Volumen

Se realizó un análisis de densidad de volumétrica para las partículas de Cl^- , Ca^{2+} y H_2O presentes en el poro de la PANX1 en estado completo y clivado dentro del volumen dado por el cilindro $h\pi r^2$ siendo:

$$h = \{-70[\text{\AA}] < z < 70[\text{\AA}]\} \quad (1)$$

$$\pi r^2 = ((x^2) + (y^2)) < 24^2 \quad (2)$$

El análisis de densidad volumétrica entrega valores entre 0 y 1 y se define como la probabilidad de encontrar una partícula del grupo en cuestión, dentro del espacio solicitado; basándose en el peso y radio de la partícula. Se estima observando todas las partículas presentes, en cada intervalo de tiempo y se promedia su presencia para cada voxel (55). Para el desarrollo matemático completo de la formulación de la ecuación que define este análisis, se recomienda el trabajo de Cohen J., et al (53).

Para observar estas densidades de volumen, se emplea un isovalor mínimo que permite al visualizador mostrar toda densidad con probabilidad igual o mayor a este isovalor. Esto facilita comparar entre zonas poco densas de focos con mayor probabilidad de presentar una partícula, ya sea de Ca^{2+} , Cl^- o H_2O . En el caso de las gráficas a continuación se seleccionó un voxel de $1[\text{\AA}]^3$ y un mínimo isovalor de 0.0001, que representa al 0.01% de probabilidad de encontrar una partícula del grupo de interés.

En la figura 11, se observan coloreados en azul la presencia del ion Cl^- . En este caso se observa la presencia de la partícula a lo largo de todo el cilindro tanto en la PANX1 completa como en la clivada.

Para el ion Ca^{2+} , coloreada en naranja; en la PANX1 completa se observa un vacío de densidad, es decir una ausencia de partículas, en el centro del poro sobre los $20[\text{\AA}]$ y sobre el eje $0[\text{\AA}]$. A su vez esta división está marcada por una alta densidad de partícula justo en los límites de esta división. En la PANX1 clivada, por otro lado, se observa la presencia del ion a lo largo de todo el poro con una alta densidad en el centro, donde en la completa existía un vacío.

Para las moléculas de H_2O en verdes, tanto en la PANX1 completa como clivada se observa una alta densidad de partícula.

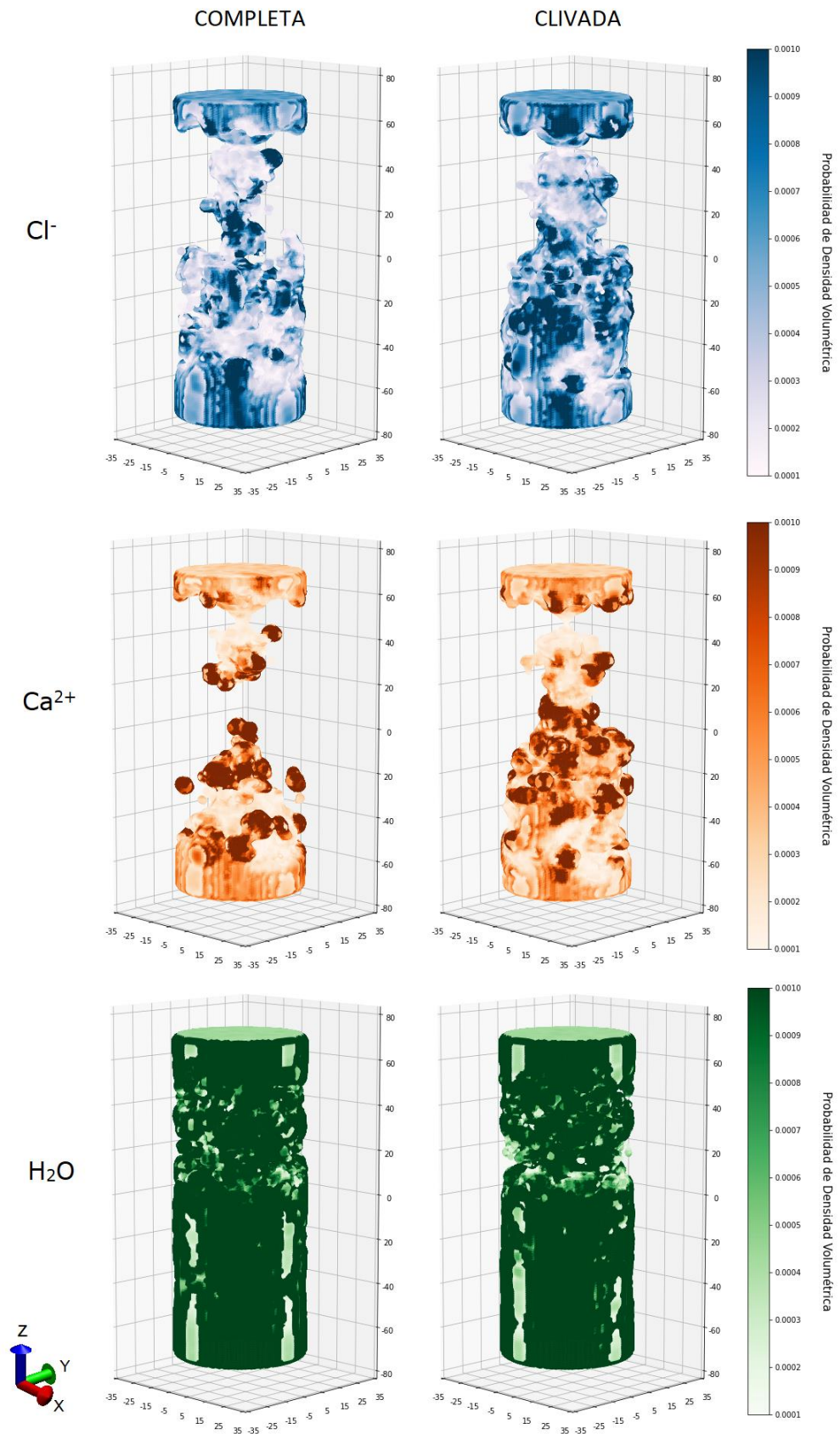


Figura 11: Probabilidad de densidad de partícula para Cl^- , Ca^{2+} y H_2O . Se observa la presencia de las cargas a lo largo de todo el poro, salvo para el ion Ca^{2+} en la PANX1 completa.

Análisis de Permeabilidad

Se hizo un conteo de eventos de permeabilidad, para el poro de la PANX1 en estado completo y clivado. Para la PANX1 completa no hubo ningún evento de permeación o para Ca^{2+} o para Cl^- , sí para H_2O . En cambio, para la PANX1 en estado clivado sí se registraron permeaciones tanto para Ca^{2+} , Cl^- como para H_2O . A continuación, se muestra en la tabla 2 los eventos de permeación y las corrientes registradas para Ca^{2+} , Cl^- y H_2O en las PANX1 completa y clivada.

De acuerdo con trabajos previos que sugieren el paso de Ca^{2+} a través del canal de PANX1 cuando está unido a otra PANX1 vía "*gap junction*". Se puede inferir que el paso de Ca^{2+} por el canal puede ser ascendente y descendente. Es por esto que se consideró la suma total de permeaciones para el cálculo del flujo de partículas. El cálculo de flujo de partículas está en función de una ecuación de la recta entre el tiempo y los eventos de permeación ocurridos en este intervalo de tiempo:

$$f(x) = ax + b \quad (3)$$

Por otro lado, el cálculo de corriente I está dado por la ecuación:

$$I = \frac{Nq}{t} \quad (4)$$

En donde N es el número de eventos de permeación, q es el valor de la carga y t es el tiempo transcurrido. Para efectos de flujo se consideró a q como un valor unitario que representa a cada partícula que permea el poro. Al extrapolar las ecuaciones (3) y (4) se obtiene:

$$N = It + b \quad (5)$$

con b como el offset al inicio de cada conteo.

	Ca^{2+}		Cl^-		H_2O	
	COM	CLIV	COM	CLIV	COM	CLIV
Perm ascendentes	0	43	0	277	1742	65091
Perm descendentes	0	29	0	251	1632	64986
Total permeaciones	0	72	0	528	3374	130077
Total Partículas/[ns]	0.0	0.0803	0.0	0.5675	3.1109	131.3688
R^2	1.0	0.9839	1.0	0.9770	0.9891	0.9961
b	0.0	-1.1366	0.0	17.1678	126.5601	3228.5951

Tabla 2: Conteos de permeaciones, y flujo de partículas promedio

En la figura 12 se muestran los eventos de permeación y corrientes instantáneas para los iones Cl^- en azules, Ca^{2+} en rojos y H_2O en verdes.

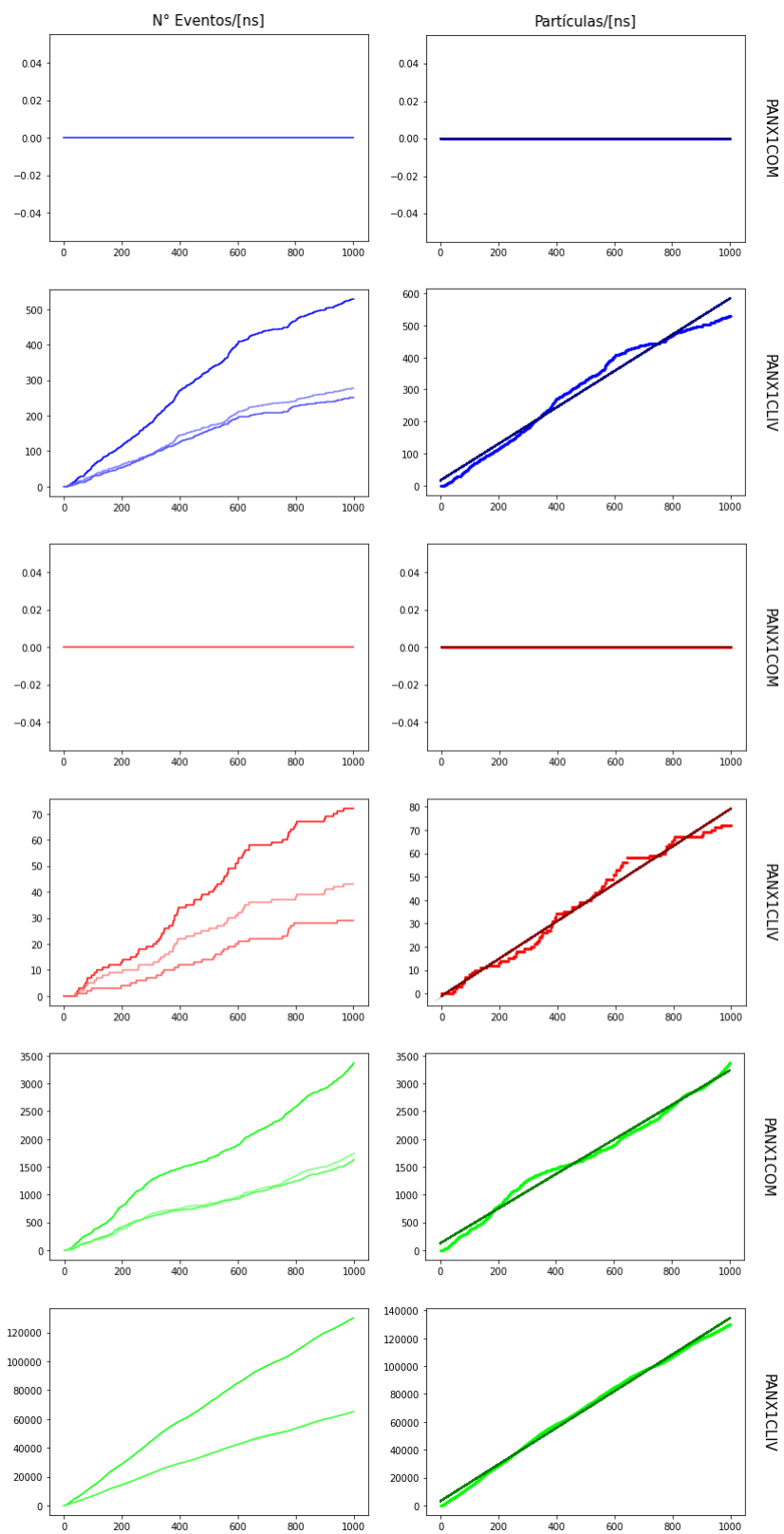


Figura 12: Curvas de permeación y corrientes instantáneas para Cl^- (Azules), Ca^{2+} (Rojos) y H_2O (Verdes).

DISCUSIÓN

Modelos de PANX1

Los modelos creados coinciden con la forma que entrega la literatura, si bien existen algunos residuos con valores atípicos, esto puede deberse a la baja resolución del cristal donde se obtuvieron los modelos. Sin embargo, para una proteína de este tamaño el análisis de Ramachandran arroja valores de puntuación Z menores [2], significando que está por dentro de los valores óptimos.

La cantidad elevada de soluto aplicado fue con la intención de visualizar de mejor manera los eventos de permeación y densidades dentro del poro. Sin embargo, estos iones se encuentran en gradientes de concentración que determinan la dirección de su flujo. Para dirigir el flujo se aplicó un potencial eléctrico de -134mV, que no tuvo efecto probablemente ante la alta concentración de iones.

PANX1 Completa

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que en los anillos de C426 y E414 de la PANX1 en estado completo, existe un bloqueo al paso de iones de Ca^{2+} debido a la afinidad que estos tienen con la carga negativa de los residuos que componen el anillo. Esto se puede observar en las imágenes de las simulaciones, donde se muestra la ausencia de Ca^{2+} entre los anillos, imágenes que coinciden con el mapa de densidades volumétricas que muestra el mismo vacío entre los 20[Å] y 0[Å] del eje Z, y una alta concentración de iones rodeando este vacío; específicamente donde se encuentran los anillos C426 y E414 desplazados por la presión producida por el flujo de iones.

Caso contrario ocurre para los iones Cl^- los cuales si pueden traspasar estos anillos. Si bien se observan en las imágenes de simulaciones y de densidad volumétrica, la presencia del ion dentro del espacio entre los anillos, no se observan eventos de permeación a través del poro. Posiblemente esto puede deberse a que los iones lograron atravesar un anillo, pero no los 2, atrayéndose a la zona compuesta por anillos de K415, R418 y R420. Probablemente es necesario más tiempo de observación para este proceso.

Para el caso de la molécula de H₂O en el mapa de densidades se observa en su máximo observable y en el análisis de permeabilidad se observa una gran cantidad de permeaciones, tanto ascendentes como descendentes.

PANX1 Clivada

En el caso de la PANX1 en estado clivado, a diferencia del canal en estado completo, se observa en que sí existe un paso de Ca²⁺ por el poro, de acuerdo con las imágenes de simulación, densidad volumétrica y análisis de permeabilidad. Sin embargo, también se observan uniones de Ca²⁺ con los residuos con carga negativa que existen en las paredes internas del poro.

Además, se muestra una diferencia en la cantidad de permeaciones entre el ion Ca²⁺ y el ion Cl⁻. A pesar de que el solvente es de CaCl₂, lo que significa un ion Ca²⁺ por dos iones de Cl⁻, se observa que la cantidad de Cl⁻ que permea al poro supera en más de 7 veces a la cantidad de Ca²⁺. Esto indica que el ion Ca²⁺ no tiene un flujo tan expedito.

Si se comparan los valores de permeaciones ascendentes y descendentes, en todos se observa una diferencia a favor de las permeaciones que provienen desde -Z. Sin embargo, esta diferencia es mínima.

Para el caso de la molécula de H₂O, no existen limitaciones para su presencia dentro del poro clivado, sus eventos de permeabilidad superaron en más de 38 veces su permeabilidad en la PANX1 completa.

CONCLUSIONES

- Es factible el paso del ion Ca²⁺ a través del canal de PANX1 en estado clivado, y este se puede dar por ambos sentidos, considerando el estado fisiológico y el gradiente de concentración del Ca²⁺.
- No es factible el paso del ion Ca²⁺ a través del canal de PANX1 en estado completo, debido al bloqueo ocurrido por los anillos de C426 y E414 en el DCT.
- Las paredes internas del poro en la PANX1 están compuestas por residuos con carga negativa, los cuales se acoplan con iones de Ca²⁺.
- Los modelos y simulaciones generados en este trabajo entregaron valores coincidentes con la literatura, y por lo tanto los resultados sirven como un respaldo para apoyar experimentos in vitro o in vivo aplicados a la PANX1 dirigidos a evaluar el flujo iónico de Ca²⁺ mediante otras técnicas.

- El paso de H₂O por el canal de PANX1 no tiene restricciones en su flujo, lo que puede sugerir cambios en la presión osmótica de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

1. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*. 1 de junio de 2000;10(13):R473-4.
2. Prochnow N, Abdulazim A, Kurtenbach S, Wildförster V, Dvorianchikova G, Hanske J, et al. Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. *Barnes S, editor. PLoS ONE*. 20 de diciembre de 2012;7(12):e51767.
3. Ardiles AO, Flores-Muñoz C, Toro-Ayala G, Cárdenas AM, Palacios AG, Muñoz P, et al. Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 15 de octubre de 2014 [citado 17 de octubre de 2022];8. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00326/abstract>
4. Gajardo I, Salazar CS, Lopez-Espíndola D, Estay C, Flores-Muñoz C, Elgueta C, et al. Lack of Pannexin 1 Alters Synaptic GluN2 Subunit Composition and Spatial Reversal Learning in Mice. *Front Mol Neurosci*. 10 de abril de 2018;11:114.
5. Adamson SE, Meher AK, Chiu Y hsin, Sandilos JK, Oberholtzer NP, Walker NN, et al. Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol Metab*. septiembre de 2015;4(9):610-8.
6. Billaud M, Chiu YH, Lohman AW, Parpaite T, Butcher JT, Mutchler SM, et al. A molecular signature in the pannexin1 intracellular loop confers channel activation by the $\alpha 1$ adrenoreceptor in smooth muscle cells. *Sci Signal* [Internet]. 17 de febrero de 2015 [citado 17 de octubre de 2022];8(364). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2005824>
7. Crespo Yanguas S, Willebrords J, Johnstone SR, Maes M, Decrock E, De Bock M, et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. enero de 2017;1864(1):51-61.
8. Yeung AK, Patil CS, Jackson MF. Pannexin-1 in the CNS: Emerging concepts in health and disease. *J Neurochem*. 2020;154(5):468-85.
9. Flores-Muñoz C, Gómez B, Mery E, Mujica P, Gajardo I, Córdova C, et al. Acute Pannexin 1 Blockade Mitigates Early Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci*. 19 de marzo de 2020;14:46.
10. Zhang S, Yuan B, Lam JH, Zhou J, Zhou X, Ramos-Mandujano G, et al. Structure of the full-length human Pannexin1 channel and insights into its role in pyroptosis. *Cell Discov*. diciembre de 2021;7(1):30.
11. Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 Channels Contain a Glycosylation Site That Targets the Hexamer to the Plasma Membrane. *J Biol Chem*. octubre de 2007;282(43):31733-43.
12. Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. Glycosylation Regulates Pannexin Intermixing and Cellular Localization. *Gilmore R, editor. Mol Biol Cell*. 15 de octubre de 2009;20(20):4313-23.
13. Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels*. mayo de 2011;5(3):193-7.

14. Ruan Z, Orozco IJ, Du J, Lü W. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating. *Nature*. 27 de agosto de 2020;584(7822):646-51.
15. Ma W, Compan V, Zheng W, Martin E, North RA, Verkhratsky A, et al. Pannexin 1 forms an anion-selective channel. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 1 de abril de 2012;463(4):585-92.
16. Adamson SE, Leitinger N. The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett*. 17 de abril de 2014;588(8):1416-22.
17. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. octubre de 2010;467(7317):863-7.
18. Sandilos JK, Chiu YH, Chekeni FB, Armstrong AJ, Walk SF, Ravichandran KS, et al. Pannexin 1, an ATP Release Channel, Is Activated by Caspase Cleavage of Its Pore-associated C-terminal Autoinhibitory Region. *J Biol Chem*. marzo de 2012;287(14):11303-11.
19. Yang D, He Y, Muñoz-Planillo R, Liu Q, Núñez G. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*. noviembre de 2015;43(5):923-32.
20. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*. 2004;572(1-3):65-8.
21. Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, et al. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol*. 14 de agosto de 2006;174(4):535-46.
22. Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy. *Nat Methods*. marzo de 2018;15(3):173-82.
23. Von Neumann J, Burks AW (Arthur W. Theory of self-reproducing automata [Internet]. Urbana, University of Illinois Press; 1966 [citado 31 de octubre de 2022]. 418 p. Disponible en: http://archive.org/details/theoryofselfrepr00vonn_0
24. Miramontes, Pedro. Un esquema de autómatas celular como modelo matemático de la evolución de los ácidos nucleicos [Internet]. [citado 31 de octubre de 2022]. Disponible en: https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000175889
25. Sieburg HB. Physiological Studies in Silico. En: 1990 Lectures In Complex Systems. CRC Press; 1991.
26. Gini G. QSAR Methods. En: Benfenati E, editor. In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity [Internet]. New York, NY: Springer; 2016 [citado 6 de noviembre de 2022]. p. 1-20. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0_1
27. Bak A. Two Decades of 4D-QSAR: A Dying Art or Staging a Comeback? *Int J Mol Sci*. 14 de mayo de 2021;22(10):5212.
28. Borio A, Holgado A, Garate JA, Beyaert R, Heine H, Zamyatina A. Disaccharide-Based Anionic Amphiphiles as Potent Inhibitors of

- Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *ChemMedChem*. 2018;13(21):2317-31.
29. Ozu M, Alvear-Arias JJ, Fernandez M, Caviglia A, Peña-Pichicoi A, Carrillo C, et al. Aquaporin Gating: A New Twist to Unravel Permeation through Water Channels. *Int J Mol Sci*. 14 de octubre de 2022;23(20):12317.
 30. Bernardi M, Marracino P, Ghaani MR, Liberti M, Del Signore F, Burnham CJ, et al. Human aquaporin 4 gating dynamics under axially oriented electric-field impulses: A non-equilibrium molecular-dynamics study. *J Chem Phys*. 28 de diciembre de 2018;149(24):245102.
 31. Crystallography: Protein Data Bank. *Nature New Biol*. 1 de octubre de 1971;233(42):223-223.
 32. wwPDB consortium, Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, et al. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res*. 8 de enero de 2019;47(D1):D520-8.
 33. Baker D, Sali A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*. 5 de octubre de 2001;294(5540):93-6.
 34. Pirovano W, Heringa J. Protein Secondary Structure Prediction. En: Carugo O, Eisenhaber F, editores. *Data Mining Techniques for the Life Sciences* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [citado 14 de noviembre de 2022]. p. 327-48. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-241-4_19
 35. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. *Science*. 12 de julio de 1991;253(5016):164-70.
 36. Muhammed MT, Aki-Yalcin E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chem Biol Drug Des*. 2019;93(1):12-20.
 37. Qu R, Dong L, Zhang J, Yu X, Wang L, Zhu S. Cryo-EM structure of human heptameric Pannexin 1 channel. *Cell Res*. mayo de 2020;30(5):446-8.
 38. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*. 1 de abril de 2010;26(7):889-95.
 39. Zhou AQ, O'Hern CS, Regan L. Revisiting the Ramachandran plot from a new angle. *Protein Sci Publ Protein Soc*. julio de 2011;20(7):1166-71.
 40. Bank RPD. RCSB PDB: Homepage [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/>
 41. PDBFixer [Internet]. OpenMM; 2023 [citado 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://github.com/openmm/pdbfixer>
 42. About MODELLER [Internet]. [citado 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://salilab.org/modeller/>
 43. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci Publ Protein Soc*. enero de 2018;27(1):293-315.

44. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem*. 2008;29(11):1859-65.
45. Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J Comput Chem*. 2014;35(27):1997-2004.
46. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes: *Biophysical Journal* [Internet]. [citado 27 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(09\)00791-7](https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(09)00791-7)
47. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations | *PLOS ONE* [Internet]. [citado 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000880>
48. Lee J, Patel DS, Ståhle J, Park SJ, Kern NR, Kim S, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans. *J Chem Theory Comput*. 8 de enero de 2019;15(1):775-86.
49. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1 de febrero de 1996;14(1):33-8.
50. Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro JV, Bernardi RC, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys*. 28 de julio de 2020;153(4):044130.
51. Hopkins CW, Le Grand S, Walker RC, Roitberg AE. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *J Chem Theory Comput*. 14 de abril de 2015;11(4):1864-74.
52. Pravda L, Sehnal D, Toušek D, Navrátilová V, Bazgier V, Berka K, et al. MOLEonline: a web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update). *Nucleic Acids Res*. 2 de julio de 2018;46(W1):W368-73.
53. Cohen J, Arkhipov A, Braun R, Schulten K. Imaging the Migration Pathways for O₂, CO, NO, and Xe Inside Myoglobin. *Biophys J*. 1 de septiembre de 2006;91(5):1844-57.
54. Ainavarapu SRK, Brujic J, Huang HH, Wiita AP, Lu H, Li L, et al. Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds. *Biophys J*. 1 de enero de 2007;92(1):225-33.
55. volmap [Internet]. [citado 28 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.1/ug/node153.html>

ANEXOS

PANX1 COMPLETA

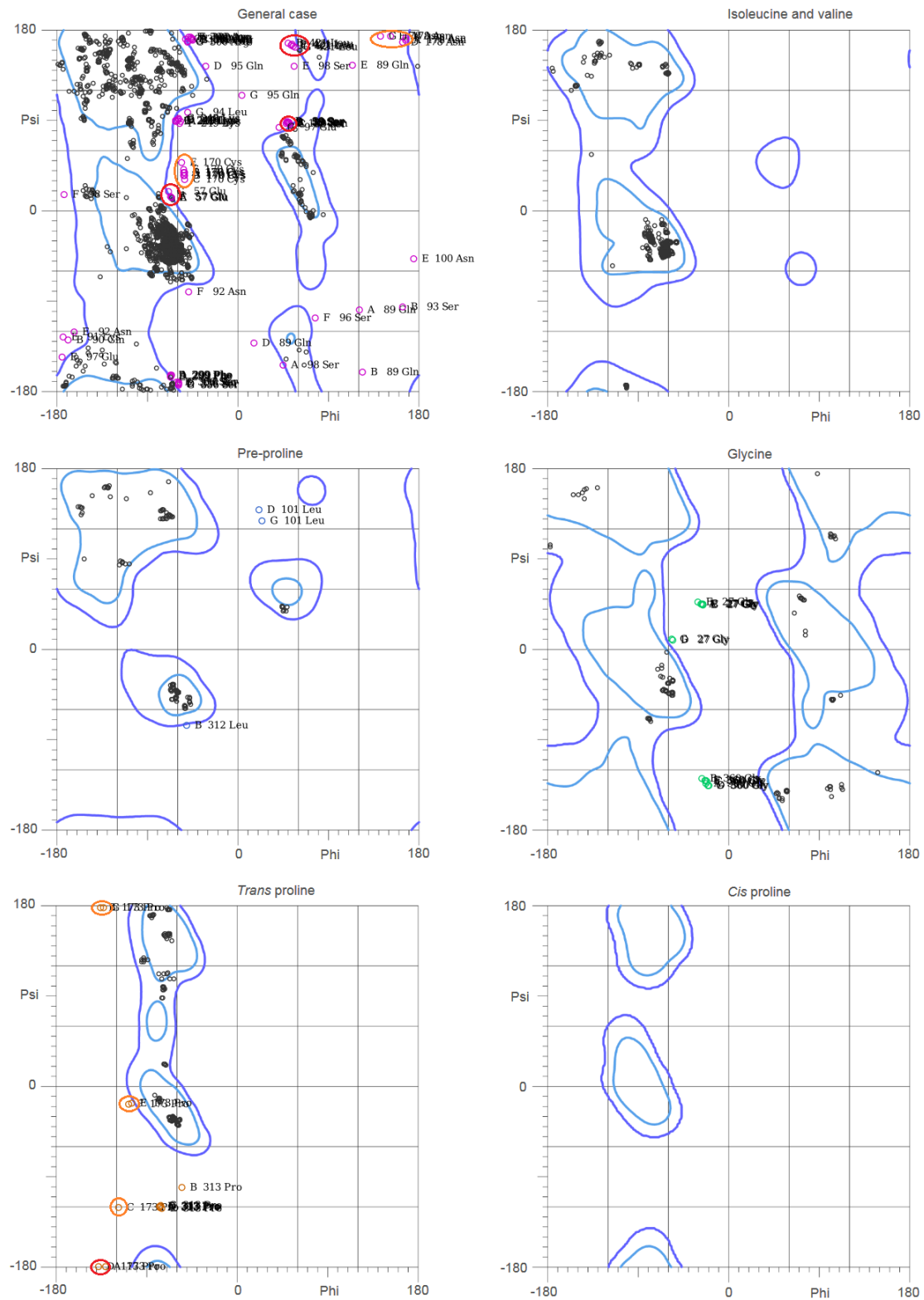


Figura 13: Plot de Ramachandran para la PANX1 completa. En rojo están marcados los residuos atípicos que se encuentran en la cara interna del poro. En naranja se encuentran los residuos atípicos que se encuentran en la entrada del poro.

Outliers PANX1 Completa

A 27 G	Glycine / -28.4,45.9	C 313 P	Trans-Pro / -77.1,-119.7	E 313 P	Trans-Pro / -75.6,-121.7
A 57 G	General / -66.3,13.6	C 356 S	General / -59.3,-171.6	E 360 G	Glycine / -24.4,-131.8
A 59 S	General / 51.8,88.2	C 360 G	Glycine / -22.8,-133.0	E 421 L	General / 54.1,166.1
A 89 G	General / 122.0,-99.4	C 421 L	General / 55.3,165.0	F 27 G	Glycine / -27.8,45.3
A 98 S	General / 45.6,-154.0	D 27 G	Glycine / -56.5,9.1	F 57 G	General / -67.3,14.7
A 170 C	General / -54.7,38.8	D 59 S	General / 49.1,83.4	F 59 S	General / 49.9,88.2
A 173 P	Trans-Pro / -131.9,-179.8	D 89 G	General / 16.4,-132.5	F 92 A	General / -49.9,-81.5
A 178 A	General / 167.1,170.9	D 95 G	General / -32.5,144.9	F 96 S	General / 77.7,-107.2
A 249 L	General / -57.6,89.4	D 100 A	General / 48.6,87.3	F 98 S	General / -173.4,16.1
A 299 P	General / -66.5,-164.3	D 101 L	Pre-Pro / 21.1,139.7	F 170 C	General / -54.2,41.3
A 300 A	General / -47.0,172.2	D 170 C	General / -54.2,35.8	F 173 P	Trans-Pro / -108.3,-17.3
A 313 P	Trans-Pro / -77.0,-120.9	D 173 P	Trans-Pro / -138.4,-179.4	F 178 A	General / 167.7,172.1
A 360 G	Glycine / -23.8,-134.3	D 178 A	General / 164.3,168.8	F 249 L	General / -58.0,87.6
B 27 G	Glycine / -26.7,44.6	D 249 L	General / -59.8,91.8	F 300 A	General / -49.4,173.2
B 59 S	General / 50.9,88.3	D 299 P	General / -67.7,-165.3	F 313 P	Trans-Pro / -77.1,-119.4
B 89 G	General / 124.5,-161.1	D 300 A	General / -47.5,171.5	F 356 S	General / -59.2,-172.9
B 90 G	General / -169.7,-129.5	D 313 P	Trans-Pro / -77.3,-119.8	F 360 G	Glycine / -23.5,-131.4
B 93 S	General / 164.5,-96.4	D 356 S	General / -59.2,-173.8	F 421 L	General / 53.2,165.1
B 170 C	General / -53.8,38.2	D 360 G	Glycine / -20.6,-136.4	G 27 G	Glycine / -57.0,10.9
B 173 P	Trans-Pro / -136.8,179.7	E 27 G	Glycine / -31.1,47.5	G 57 G	General / -69.5,19.5
B 249 L	General / -62.7,89.9	E 57 G	General / -66.3,13.5	G 59 S	General / 49.5,88.8
B 299 P	General / -67.6,-164.9	E 59 S	General / 51.5,87.3	G 94 L	General / -50.5,98.8
B 300 A	General / -45.8,170.3	E 89 G	General / 114.6,145.1	G 95 G	General / 4.5,115.2
B 312 L	Pre-Pro / -51.8,-76.1	E 91 L	General / -174.4,-126.3	G 97 G	General / 41.8,83.1
B 313 P	Trans-Pro / -55.6,-100.3	E 92 A	General / -163.8,-121.9	G 101 L	Pre-Pro / 24.6,128.9
B 356 S	General / -61.2,-171.5	E 95 G	General / -45.7,171.3	G 170 C	General / -53.0,35.1
B 360 G	Glycine / -27.9,-129.1	E 97 G	General / -175.5,-146.8	G 173 P	Trans-Pro / -133.8,179.6
B 421 L	General / 50.6,167.1	E 98 S	General / 56.4,144.3	G 178 A	General / 142.3,175.0
C 27 G	Glycine / -26.6,45.0	E 100 A	General / 175.0,-48.3	G 249 L	General / -59.1,92.8
C 59 S	General / 52.2,86.6	E 170 C	General / -56.9,48.7	G 300 A	General / -50.1,168.2
C 170 C	General / -53.3,31.6	E 173 P	Trans-Pro / -105.9,-16.6	G 313 P	Trans-Pro / -76.9,-118.6
C 173 P	Trans-Pro / -118.4,-121.0	E 178 A	General / 152.0,174.1	G 356 S	General / -59.6,-174.5
C 178 A	General / -50.9,169.0	E 249 L	General / -60.3,91.0	G 360 G	Glycine / -21.4,-136.2
C 249 L	General / -63.0,90.3	E 299 P	General / -67.1,-166.8	G 421 L	General / 57.1,164.0
C 300 A	General / -52.2,171.8	E 300 A	General / -47.5,173.2		

Tabla 3: Listado de residuos atípicos en el análisis de Ramachandran para la PANX1 completa.

PANX1 CLIVADA

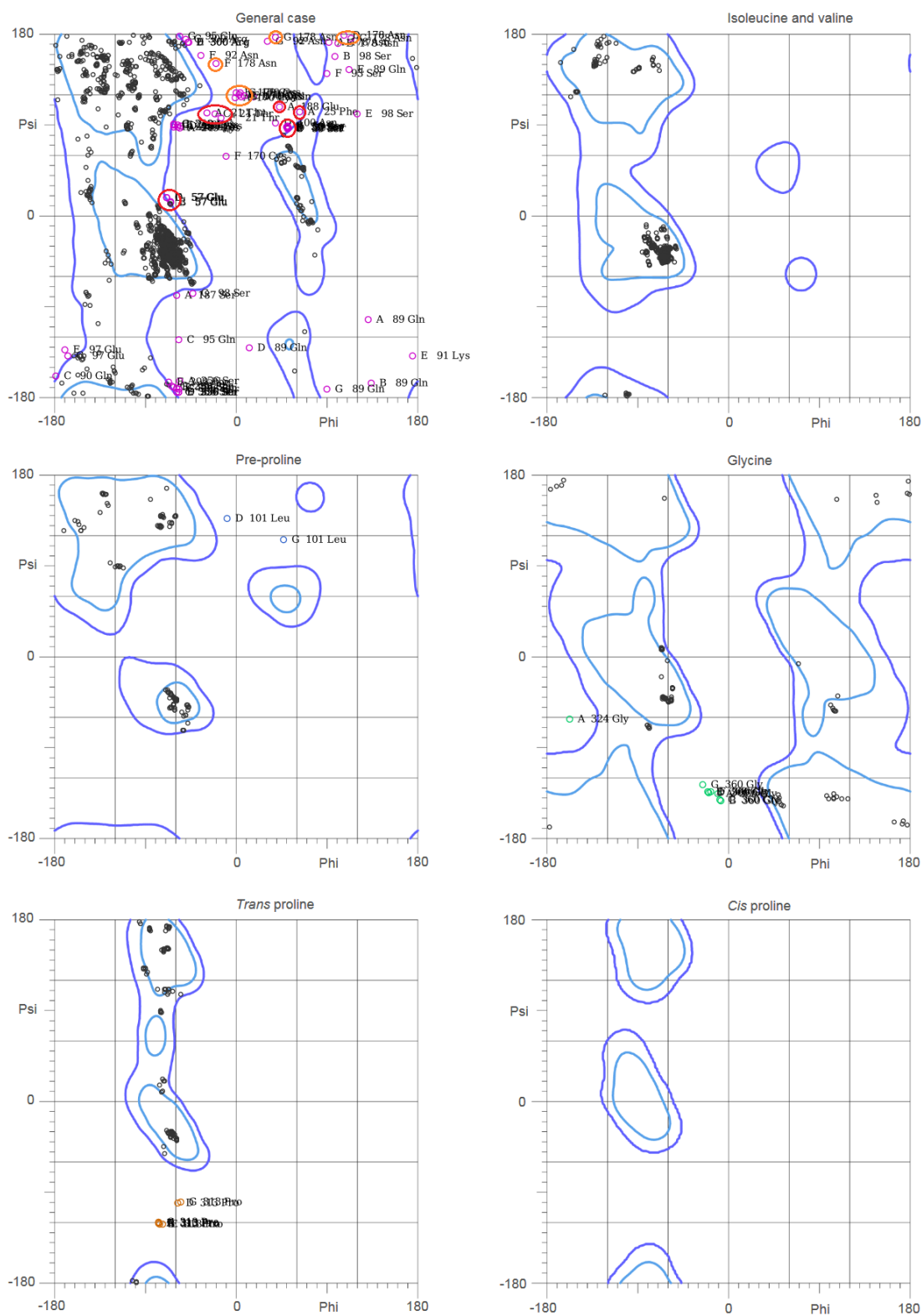


Figura 14: Plot de Ramachandran para la PANX1 clivada. En rojo están marcados los residuos atípicos que se encuentran en la cara interna del poro. En naranja se encuentran los residuos atípicos que se encuentran en la entrada del poro.

Outliers PANX1 Clivada

A 21 THR	General / -29.4,102.8	D 300 ARG	General / -48.2,172.9
A 25 PHE	General / 63.3,103.1	D 313 PRO	Trans-Pro / -58.2,-100.9
A 59 SER	General / 51.0,88.4	D 356 SER	General / -57.2,-175.7
A 89 GLN	General / 131.7,-103.0	D 360 GLY	Glycine / -20.7,-135.3
A 170 CYS	General / -1.9,117.1	E 57 GLU	General / -65.9,14.3
A 178 ASN	General / 92.7,172.3	E 59 SER	General / 51.1,87.8
A 187 SER	General / -59.5,-79.8	E 89 GLN	General / 112.2,145.1
A 188 GLU	General / 43.4,108.4	E 91 LYS	General / 175.6,-139.3
A 249 LYS	General / -56.7,88.0	E 97 GLU	General / -170.8,-133.1
A 313 PRO	Trans-Pro / -77.7,-120.7	E 98 SER	General / 120.9,101.9
A 324 GLY	Glycine / -158.9,-62.8	E 170 CYS	General / 8.4,119.4
A 356 SER	General / -56.1,-164.1	E 178 ASN	General / 101.7,171.1
A 360 GLY	Glycine / -11.2,-136.3	E 249 LYS	General / -58.9,90.9
B 57 GLU	General / -65.6,13.6	E 299 PHE	General / -67.1,-165.7
B 59 SER	General / 51.2,88.9	E 300 ARG	General / -47.5,172.1
B 89 GLN	General / 134.8,-166.9	E 313 PRO	Trans-Pro / -73.5,-121.1
B 98 SER	General / 98.9,158.1	E 356 SER	General / -57.8,-175.5
B 170 CYS	General / 0.3,122.5	E 360 GLY	Glycine / -21.2,-134.2
B 249 LYS	General / -58.9,88.3	F 21 THR	General / -15.2,97.8
B 313 PRO	Trans-Pro / -76.5,-121.8	F 59 SER	General / 51.2,88.2
B 356 SER	General / -59.4,-171.6	F 92 ASN	General / -35.1,153.4
B 360 GLY	Glycine / -8.7,-143.3	F 93 SER	General / 90.6,141.7
C 21 THR	General / -21.6,101.3	F 170 CYS	General / -10.2,59.8
C 57 GLU	General / -69.5,18.1	F 178 ASN	General / -20.8,151.8
C 59 SER	General / 51.9,86.5	F 249 LYS	General / -62.0,88.2
C 90 GLN	General / -179.7,-159.5	F 313 PRO	Trans-Pro / -77.0,-120.7
C 95 GLN	General / -57.9,-123.2	F 356 SER	General / -62.5,-170.2
C 97 GLU	General / -167.1,-139.1	F 360 GLY	Glycine / -18.2,-134.4
C 170 CYS	General / 4.5,122.1	G 59 SER	General / 51.0,89.1
C 178 ASN	General / 114.6,176.9	G 89 GLN	General / 90.2,-172.9
C 249 LYS	General / -62.1,91.2	G 92 ASN	General / 31.3,173.6
C 313 PRO	Trans-Pro / -77.8,-119.6	G 95 GLN	General / -56.3,178.7
C 356 SER	General / -59.3,-175.8	G 98 SER	General / -43.3,-78.0
C 360 GLY	Glycine / -9.3,-143.0	G 101 LEU	Pre-Pro / 47.2,116.4
D 57 GLU	General / -69.3,18.5	G 170 CYS	General / 6.0,118.3
D 59 SER	General / 52.1,87.3	G 178 ASN	General / 39.2,177.8
D 89 GLN	General / 13.2,-131.1	G 249 LYS	General / -62.5,90.0
D 95 GLN	General / 17.8,118.3	G 299 PHE	General / -64.9,-169.1
D 100 ASN	General / 39.2,92.8	G 300 ARG	General / -50.6,175.1
D 101 LEU	Pre-Pro / -9.3,137.5	G 313 PRO	Trans-Pro / -55.4,-99.7
D 170 CYS	General / 3.5,120.4	G 356 SER	General / -57.9,-172.8
D 178 ASN	General / 107.4,179.8	G 360 GLY	Glycine / -26.1,-127.5
D 249 LYS	General / -55.2,89.7		

Tabla 4: Listado de residuos atípicos en el análisis de Ramachandran para la PANX1 clivada.