

***ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA  
ELECTRONICA DE LA  
CARIBDOTOXINA MONOIODADA***

Tesis que presenta la  
Q. Angélica Beatriz Raya Rangel  
Para la obtención del grado de  
Maestra en Química  
Diciembre, 1997

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

DENOMINACION DE LA TESIS

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA

ELECTRONICA DE LA

CARIBDOTOXINA MONOTODADA.

En México, D. F. se presentaron a las 11:00 horas del día 17 del mes de DICIEMBRE del año 1997 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DRA. ANA MARIA FRANCISCA VIVIER JEGOUX;

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ;

DR. GABRIEL EDUARDO CUEVAS GONZALEZ BRAVO Y

DR. MARCELO ENRIQUE GALVAN ESPINOSA

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron para proceder al examen de grado de

Maestro en: QUIMICA

de ANGELICA BEATRIZ RAYA RANGEL

quien presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

APROBARLA

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ANGELICA BEATRIZ RAYA R.  
FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

DRA. ANA MA. FCA. VIVIER J.  
PRESIDENTE

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ  
DR. GABRIEL E. CUEVAS G.  
VOCAL

DR. MARCELO E. GALVAN E.  
SECRETARIO

El suscrito Director de División de C.B.I. hace constar que las firmas que aparecen son auténticas y corresponden a los señores Miembros del Jurado cuyos nombres aparecen en esta acta.

DR. LUIS MIER Y TERAN C.  
DIRECTOR DE DIVISION

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Area de Físicoquímica Teórica bajo la dirección del Doctor Marcelo Enrique Galván Espinosa

El examen de grado se llevó a cabo el día 17 de diciembre de 1997 a las 11:00 hrs. en la Sala Cuicacalli de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El jurado estuvo integrado por :

Dra. Annik Vivier

Presidente

Dr. Marcelo Enrique Galván Espinosa

Secretario

Dr. Arturo Rojo Domínguez

Vocal

Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo

Vocal

Este trabajo se realizó con apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del **Proyecto No. 400200-5-4875E**. Agradezco la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Expreso mi agradecimiento al **Laboratorio de Visualización y Cómputo en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**, por las facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo.

### ***Un agradecimiento especial:***

Al Dr. **Marcelo Galván** por la oportunidad brindada para integrarme a su grupo de investigación, motivarme día tras día en la búsqueda de un porqué, el gran entusiasmo y compromiso mostrados durante la realización de este trabajo y su extraordinaria calidad humana.

Al M. en Q. **Joel Ireta**, cuya participación en la realización de este trabajo ha sido fundamental. Por compartir conmigo su experiencia académica y sobre todo, con admiración a su entrega y compromiso con la carrera de la investigación científica.

A los integrantes de las áreas de Físicoquímica Teórica y Química Cuántica por su apoyo. En particular a **Andrés Cedillo**, ya que es muy grato saber que se cuenta con el consejo y la palabra de aliento de alguien admirable. A **Marco Mora**, por las charlas serias y las no tan serias que acompañaron mi estancia en esta Universidad y a **Víctor Uc** por su amistad incondicional.

A **Ignacio González** y **Tere Oropeza**, siempre motivándome a alcanzar mi objetivo, siempre dispuestos a ayudarme. Es un gran halago contar con su amistad.

A los doctores **Annik Vivier**, **Arturo Rojo**, **Gabriel Cuevas** y **Laura Escobar**, por el tiempo y paciencia brindados a la revisión y discusión del manuscrito, y el juicio crítico y enriquecedor que han hecho del presente trabajo.

A **Gustavo** y **Lorena**, mis amigos de ayer, hoy y siempre, por sus palabras de aliento y apoyo incondicional, por todas las aventuras compartidas hasta ahora y por las que vienen.

## **A MIS PADRES Y HERMANOS**

Por su paciencia, apoyo y comprensión.

No es sencillo sobrellevar las aventuras de  
un espíritu de trotamundos y soñador.

# ÍNDICE

---

	Pág.
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1 Estructura Molecular de Proteínas	5
2.1.1 Aminoácidos: Unidades Estructurales de las Proteínas	5
2.1.2 Naturaleza del Enlace Peptídico	8
2.1.3 Elementos de Estructura Secundaria : hélice $\alpha$ y hoja $\beta$ plegada	11
2.1.4 Estructura Terciaria	14
2.1.5 Estructura Cuaternaria	15
2.2 Caribdotoxina: Un Polipéptido Inhibidor de Canales de Transporte de $K^+$	16
2.2.1 Características Estructurales y Funcionales de la ChTX	17
2.2.2 Modificación Química de la ChTX	24
2.3 Estructura Electrónica de Proteínas	26
<b>3 CÁLCULOS “A PRIMEROS PRINCIPIOS” DE ENERGÍA TOTAL     EMPLEANDO EL ALGORITMO DE CAR-PARRINELLO</b>	<b>34</b>
3.1 Teoría de Funcionales de la Densidad	34
3.1.1 Ecuaciones de Kohn-Sham en Espacio Recíproco	36
3.2 Pseudopotenciales en la Descripción de la Interacción Núcleo-Electrón	39
3.3 Métodos de Minimización Iterativa	43
3.3.1 Algoritmo de Car-Parrinello	44
3.4 Uso de Superceldas	49
3.5 Blandura local: Un Criterio de Reactividad en la Teoría de Funcionales de la Densidad	49

## ÍNDICE

---

	<b>Pág.</b>	
<b>4</b>	<b>CÁLCULO DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE LA CARIBDOTOXINA MONOIODADA</b>	54
4.1	Densidad de Estados y Estructura de Bandas	58
	4.1.1 Asignación de bandas	61
4.2	Potencial Electrostático	67
4.3	Blandura Local	71
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	76
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS</b>	78



## LISTA DE FIGURAS

---

	Pág.	
Figura 1	Características geométricas del enlace peptídico	9
Figura 2	Definición de los ángulos $\phi$ y $\psi$ en la cadena principal de una proteína	10
Figura 3	Representación de Ramachandran	10
Figura 4	Estructura de una hélice $\alpha$	11
Figura 5	Conformación $\beta$ plegada de una cadena polipeptídica	12
Figura 6	Estructura de un giro $\beta$	13
Figura 7	Secuencia de aminoácidos de la ChTX	18
Figura 8	Elementos de estructura secundaria de la ChTX	20
Figura 9	Mapa funcional de la ChTX	22
Figura 10	Modelo propuesto para la interacción ChTX-canal de $K^+$	23
Figura 11	Estructura de bandas propuesta para polipéptidos	29
Figura 12	Efecto de la hidratación y cargas localizadas en la estructura de bandas de una proteína	31
Figura 13	Estructura de bandas propuesta para una cadena polipeptídica	32
Figura 14	Algoritmo de Car-Parrinello	48
Figura 15	Técnica de la supercelda	56
Figura 16	Densidad de estados de ChTX-hoja $\beta$	60
Figura 17	Densidad de estados de ChTX-hoja $\beta$ yodada	60
Figura 18	Asignación de bandas 1-4 de ChTX hoja $\beta$	63
Figura 19	Asignación de bandas 5,6 de ChTX-hoja $\beta$	64
Figura 20	Bandas 5,6 de ChTX-hoja $\beta$ yodada	65
Figura 21	Orbitales virtuales de ChTX-hoja $\beta$ y ChTX-hoja $\beta$ yodada	66
Figura 22	Potencial electrostático	70
Figura 23	Blandura local $s^+(r)$	74
Figura 24	Blandura local $s^-(r)$	75

## **LISTA DE TABLAS**

---

		<b>Pág.</b>
<b>Tabla I</b>	<b>Clasificación de aminoácidos de acuerdo con la polaridad del grupo R</b>	<b>7</b>
<b>Tabla II</b>	<b>Clasificación de los residuos de aminoácidos de la ChTX de acuerdo con su funcionalidad</b>	<b>21</b>
<b>Tabla III</b>	<b>Parámetros electrónicos para una estructura <math>\beta</math> plegada de poliglicina</b>	<b>30</b>
<b>Tabla IV</b>	<b>Asignación y ancho de bandas para ChTX-hoja <math>\beta</math> y ChTX-hoja <math>\beta</math> yodada</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

El vertiginoso desarrollo de la Mecánica Cuántica a través del presente siglo y los extraordinarios avances logrados en materia de cómputo en las últimas dos décadas, han permitido explorar con detalle la estructura electrónica de los más variados sistemas, y comprender fenómenos que involucran los niveles de energía atómicos, las características del enlace covalente y la diferencia entre materiales metálicos y aislantes, por citar sólo algunos. Sin embargo, existen complejos problemas al tratar sistemas constituidos por un considerable número de átomos, pues conforme crece el número de partículas del sistema, aumenta el grado de dificultad para resolver las ecuaciones que contienen la información del mismo.

En la primera y tercera partes del capítulo 2 se hace una descripción breve y sencilla de la complejidad estructural y electrónica de las proteínas, materiales estructurales y funcionales de gran importancia que han despertado enorme interés por lograr una descripción microscópica de ellos. A pesar del avance logrado en la caracterización estructural y dinámica, las limitaciones computacionales y metodológicas han impedido obtener una descripción adecuada de la estructura electrónica de estos sistemas.

La Química Teórica se encuentra en una búsqueda continua de metodologías que, aunadas al uso eficiente de los recursos computacionales existentes, permitan alcanzar el objetivo de describir moléculas con cientos de átomos. Recientemente, la literatura reporta estudios que ofrecen un halagador panorama al respecto. Por un lado se tiene el desarrollo de métodos que usan bases localizadas, donde se encuentran los derivados de la propuesta "*divide y vencerás*", introducida por Yang y colaboradores.<sup>1</sup> Por el otro lado, existen los métodos basados en desarrollos multipolares para construir la parte coulombica del operador de Fock;<sup>2</sup> en ambos casos ya se cuenta con resultados en polipéptidos de distinto tamaño.

Una tercera opción la constituyen los métodos que se basan en ondas planas para desarrollar la función de onda, Teoría de Funcionales de la Densidad para modelar la interacción electrón-electrón y pseudopotenciales para la interacción núcleo-electrón (FDBOP). Dichos métodos han sido aplicados con gran éxito en la física del estado sólido tratando sistemas con cientos de átomos. Esta tesis se enmarca dentro de la utilización de estos últimos, en combinación con el cómputo en paralelo, para estudiar “a primeros principios” el caso particular de la caribdotoxina (ChTX) y de su derivado monoiodado.

La ChTX es una proteína relativamente pequeña (constituída por 37 aminoácidos, un total de 577 átomos), segregada por el escorpión *Leiurus quinquestriatus var. hebraeus* y su actividad radica en bloquear selectivamente a cierto tipo de canales iónicos de potasio. Esta característica la hace interesante desde dos puntos de vista: la elucidación del mecanismo de transporte de  $K^+$  y del desarrollo de fármacos específicos que inhiban su acción. En la segunda parte del capítulo 2, se describen las características estructurales y funcionales de esta toxina, cuyo sitio activo se encuentra dotado de un ambiente químico muy diverso<sup>3</sup> que origina que la toxina interactúe con el canal de  $K^+$  a través de interacciones electrostáticas de largo alcance e interacciones de corto alcance, involucrando esta última probable transferencia de carga.

La iodación de ChTX<sup>4</sup> trae como consecuencia la alteración de su actividad: datos experimentales han demostrado que esta modificación afecta la constante de disociación toxina-canal. Lo anterior genera un planteamiento interesante, ¿introduce el yodo cambios significativos en la estructura electrónica de ChTX, tales que puedan ser responsables o corresponsables del cambio de actividad observado? Tratando de responder esta interrogante, en el presente trabajo se calcula la estructura electrónica de ChTX y de su derivado monoiodado.

La metodología que permitirá calcular la estructura electrónica del sistema de estudio se describe en el capítulo 3.

Los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 4, dentro de un contexto meramente cualitativo. Las interacciones electrostáticas de largo alcance se analizan a través del potencial electrostático, lo que permite caracterizar, haciendo referencia a factores electrostáticos, ciertas zonas determinadas experimentalmente como cruciales.<sup>3</sup>

En el caso de las interacciones de corto alcance con posible transferencia de carga, este estudio se apoya en los criterios de reactividad dados por el formalismo de la Teoría de Funcionales de la Densidad.<sup>5</sup>

Dada la naturaleza polimérica de una proteína, se analiza también la densidad de estados electrónicos, asociándolos con los diferentes enlaces presentes en la molécula, gracias al uso de visualizadores gráficos.<sup>6</sup> Finalmente, se presentan las conclusiones de este trabajo y el alcance futuro en el estudio de sistemas polipeptídicos que tendrá la utilización de la metodología aquí empleada.

## 2 ANTECEDENTES

Las proteínas constituyen el segundo componente esencial de la materia viva y juegan un papel clave en prácticamente todos los procesos biológicos. Las enzimas, los catalizadores de las reacciones químicas en los sistemas biológicos, son prácticamente siempre proteínas, que controlan las transformaciones químicas en las células. Además, las proteínas participan en una amplia gama de funciones tales como el transporte y el almacenamiento, el movimiento coordinado, el soporte mecánico, la protección inmune, la excitabilidad y el control de la diferenciación y el crecimiento.

De acuerdo a su estructura, las proteínas se clasifican en dos grandes categorías: estructurales y globulares.

Las proteínas estructurales se encuentran constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas paralelamente a lo largo de un eje, de manera tal, que forman fibras o láminas largas. Son materiales físicamente resistentes, insolubles en agua y disoluciones salinas diluidas. Constituyen los elementos básicos estructurales del tejido conjuntivo en animales superiores, tales como el colágeno de los tendones y la matriz de los huesos, la  $\alpha$ -queratina del cabello, cuero, uñas y plumas y la elastina del tejido conjuntivo elástico.

Las proteínas globulares están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente, de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. La mayor parte son solubles en medios acuosos. Generalmente desempeñan una función móvil o dinámica en la célula. A esta categoría pertenecen los anticuerpos, algunas hormonas y diversas proteínas que desempeñan una función de transporte como la seroalbúmina y la hemoglobina.

Gran parte de lo que se conoce acerca de la estructura de proteínas globulares proviene de estudios de cristalografía de rayos X.<sup>7-10</sup> Las primeras estructuras de alta resolución de proteínas, obtenidas por esa técnica, fueron las correspondientes a mioglobina y hemoglobina, determinadas a inicios de los 60's por Kendrew y col.<sup>11</sup> y

Perutz,<sup>12</sup> respectivamente. La primera estructura de una enzima, lisozima, fue reportada por Phillips y col. en 1965.<sup>13</sup> A partir de ese momento, numerosas estructuras de proteínas han sido determinadas y, algunas de ellas, depositadas en el Protein Data Bank,<sup>14</sup> en donde se incluyen las coordenadas atómicas. Estos resultados han hecho posible el análisis comparativo de la estructura de proteínas.<sup>15</sup>

## **2.1 Estructura Molecular de Proteínas**

### **2.1.1 Aminoácidos: Unidades Estructurales de las Proteínas**

Al igual que los ácidos nucleicos, las proteínas son moléculas poliméricas de elevado peso molecular. Sus unidades básicas estructurales son los  $\alpha$ -aminoácidos (Tabla I). Todas las proteínas de todas las especies, desde las bacterias hasta el hombre, están construidas generalmente a partir de un conjunto de 20 aminoácidos comunes. Las cadenas laterales de estos bloques moleculares de construcción difieren en tamaño, forma, carga, capacidad para formar puentes de hidrógeno y funcionalidad química.

Los 20 aminoácidos pueden clasificarse en subclases de acuerdo con la naturaleza química (alifática, aromática, heterocíclica) de sus grupos R (o residuo). Sin embargo, resulta más útil una clasificación que se base en la polaridad del grupo R, debido a que ello acentúa el carácter funcional de cada aminoácido en la proteína. Esta clasificación se presenta en la tabla I y se describe a continuación:

#### **1) Aminoácidos con grupos R apolares, alifáticos**

Este grupo contiene aminoácidos con residuos hidrocarbonados hidrofóbicos. Las cadenas laterales voluminosas de alanina, valina, leucina, e isoleucina, juegan un papel importante en la promoción de interacciones hidrofóbicas dentro de las estructuras proteicas. La prolina es un caso especial, ya que el átomo de nitrógeno de su cadena principal aparece en forma de una amina secundaria en vez de la amina primaria usual.

## **2) Aminoácidos con grupos R aromáticos**

La fenilalanina, tirosina y triptófano son residuos relativamente apolares (hidrofóbicos). Pueden participar en interacciones hidrofóbicas. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno, lo que le confiere la potencialidad de interactuar con otras porciones de la cadena polipeptídica (cercanas en el espacio) y actúa como un grupo funcional importante en la actividad de algunas enzimas. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina, debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico de triptófano.

## **3) Aminoácidos con grupos R polares sin carga**

Los grupos R de estos aminoácidos son más solubles en agua, o hidrofílicos, que los de los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman puentes de hidrógeno con el agua. Algunos de los residuos poseen un grupo hidroxílico (serina, treonina y tirosina) o bien grupos sulfhidrilo (cisteína), mientras que la asparagina y la glutamina poseen grupos amida.

## **4) Aminoácidos con grupos R cargados negativamente (ácidos)**

Los dos aminoácidos que tienen grupos R con una carga negativa a pH 7.0 son aspartato y glutamato, cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo. Estos aminoácidos son los compuestos de los que se originan la asparagina y la glutamina, respectivamente.

## **5) Aminoácidos con grupos R cargados positivamente (básicos)**

En este grupo se incluyen tres aminoácidos: lisina, que tiene un segundo grupo amino en la posición  $\epsilon$  de su cadena alifática; arginina, que contiene una función guanidino fuertemente básica. Por lo que al ionizarse, lisina y arginina pueden formar enlaces iónicos en la estructura proteica. El tercer integrante de este grupo es la histidina, que contiene un grupo imidazol. La histidina es el único aminoácido estándar que tiene una cadena lateral con un  $pK_a$  próximo a la neutralidad. Esta característica permite a ciertos residuos de histidina desempeñar un papel importante en las actividades catalíticas de algunas enzimas.



Tabla I. Clasificación de aminoácidos de acuerdo con la polaridad del grupo R.<sup>16(a)</sup>

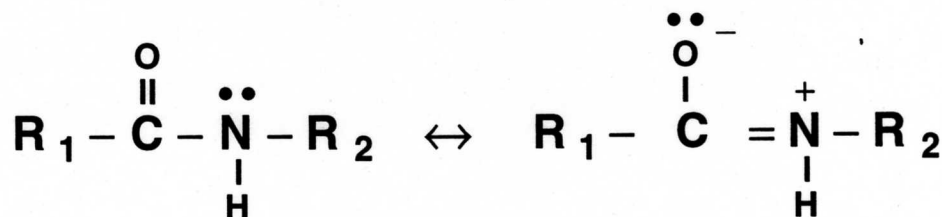
Grupo	Aminoácidos	Abrev.	$Pk_{a1}$ ( $\alpha$ -carboxilo)	$Pk_{a2}$ ( $\alpha$ -amino)	$pk_{a3}$ (cadena lateral)	pl
(1)	Glicina	Gly(G)	2.34	9.6		5.97
	Alanina	Ala (A)	2.34	9.69		6.01
	Valina	Val (V)	2.32	9.62		5.97
	Leucina	Leu (L)	2.36	9.6		5.98
	Isoleucina	Ilu (I)	2.36	9.68		6.02
	Prolina	Pro (P)	1.99	10.96		6.48
(2)	Fenilalanina	Phe (F)	1.83	9.13		5.48
	Tirosina	Tyr (Y)	2.20	9.11	10.07	5.66
	Triptofano	Trp (W)	2.38	9.39		5.89
(3)	Serina	Ser (S)	2.21	9.15	13.60	5.68
	Treonina	Thr (T)	2.11	9.62	13.60	5.87
	Cisteína	Cys (C)	1.96	8.18	10.28	5.07
	Metionina	Met (M)	2.28	9.21		5.74
	Asparagina	Asn (N)	2.02	8.80		5.41
	Glutamina	Gln (Q)	2.17	9.13		5.65
(4)	Aspartato	Asp (D)	1.88.1	9.60	3.65	2.77
	Glutamato	Glu (E)	2.19	9.67	4.25 ( $\gamma$ -carboxilo)	3.22
(5)	Lisina	Lys (K)	2.18	8.95	10.53	9.74
	Arginina	Arg (R)	2.17	9.04	12.48	10.76
	Histidina	His (H)	1.82	9.17	6.00	7.59

Una cadena polipeptídica está constituida normalmente por más de 100 aminoácidos, unidos secuencialmente mediante enlaces peptídicos. Un enlace peptídico une el grupo carboxilo- $\alpha$  de un aminoácido y el grupo amino- $\alpha$  del próximo (figura 1). Las proteínas consisten de una o más cadenas polipeptídicas, y pueden variar ampliamente en tamaño. Además que el número de residuos, lo que distingue a las diferentes proteínas, es la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Cada clase de proteína tiene una secuencia única de aminoácidos que está genéticamente determinada. Esta secuencia es conocida como la estructura primaria de la proteína. La estructura primaria es uno de los principales determinantes de la conformación nativa, estructura estable bajo condiciones fisiológicas y responsable de la función biológica de la proteína.

### 2.1.2 Naturaleza del Enlace Peptídico

Hacia finales de 1930, Pauling y Corey comenzaron su trabajo sobre la estructura de proteínas, centrándose en la conformación del enlace peptídico. Los carbonos  $\alpha$  de aminoácidos adyacentes están separados por tres enlaces de naturaleza covalente, dispuestos en la secuencia  $C\alpha-C-N-C\alpha$ .

Estudios de difracción de rayos X, efectuados a cristales de aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos, demostraron que el enlace amida C-N peptídico es un poco más corto que el correspondiente de una amida simple y que los átomos asociados con el enlace, son coplanares (las características geométricas del enlace se muestran en la figura 1). Esto indica una resonancia o parcial compartición de dos pares de electrones entre el oxígeno del grupo carbonilo y el nitrógeno de la amida:



El oxígeno tiene una carga parcial negativa y el nitrógeno una carga parcial positiva,

estableciendo un pequeño dipolo eléctrico. Los cuatro átomos del grupo péptido yacen en un solo plano, en el que el átomo de oxígeno del grupo carbonilo y el átomo de hidrógeno de la amida se encuentran en posición trans.

A partir de estos estudios, Pauling y Corey concluyeron que el enlace amido C-N es incapaz de rotar libremente, debido a su carácter parcial de doble enlace, por lo que el esqueleto de una cadena polipeptídica puede esquematizarse como una serie de planos rígidos separados por grupos metileno sustituidos -CH(R)- (figura 1). La rigidez de los enlaces peptídicos limita el número de conformaciones que una cadena polipeptídica puede asumir.

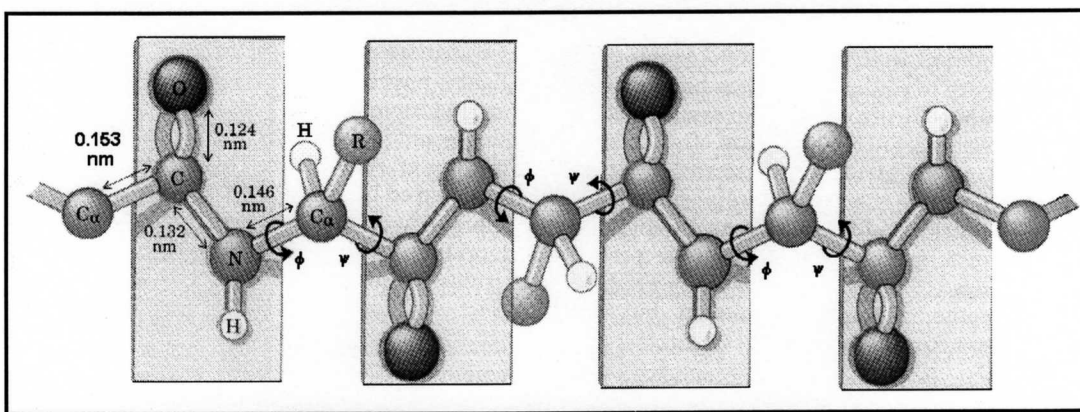


Figura 1. La estructura de un aminoácido está constituida por un átomo central de carbono,  $C\alpha$ , unido a un grupo amino,  $NH_2$ , un grupo carboxilo,  $C'OOH$ , y una cadena lateral, R. En una cadena polipeptídica, el grupo carboxilo de un aminoácido forma un enlace peptídico, C-N, con el grupo amino del siguiente. Alrededor de dos de los tres tipos de enlaces presentes en una cadena polipeptídica, puede ocurrir rotación limitada. Los enlaces C-N en el grupo péptido planar, los cuales constituyen la tercera parte de todos los enlaces de la cadena principal, no pueden rotar libremente. Otros enlaces sencillos en la cadena principal también pueden estar rotacionalmente impedidos, dependiendo del tamaño y carga de los grupos R.<sup>16(a)</sup>

Debido a la planaridad del enlace peptídico, únicamente se permiten las rotaciones alrededor de los enlaces N- $C\alpha$  y  $C\alpha$ -C. Por convención, los ángulos de rotación se denominan  $\phi$  (phi) para el enlace N- $C\alpha$  y  $\psi$  (psi) para el enlace  $C\alpha$ -C. También, por convención,  $\phi$  y  $\psi$  son definidos como  $0^\circ$  en la conformación en la que los dos enlaces peptídicos conectados a un mismo  $C\alpha$  están en el mismo plano, como se muestra en la figura 2.

En principio,  $\phi$  y  $\psi$  pueden tomar todos los valores comprendidos entre  $-180^\circ$  y  $+180^\circ$ , pero ciertos valores están prohibidos por interferencias estéricas entre átomos

de la cadena principal del polipéptido y las cadenas laterales. Por esta razón, la conformación en la que  $\phi$  y  $\psi$  tienen un valor de  $0^\circ$  es inaccesible, y constituye tan solo un punto de referencia para describir los ángulos de rotación.

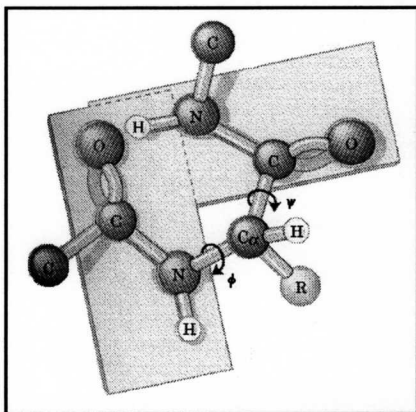


Figura 2. Por convención,  $\phi$  y  $\psi$  son definidos como  $0^\circ$  cuando los dos enlaces peptídicos adyacentes a un carbono  $\alpha$  están en el mismo plano. En una proteína, esta conformación es prohibida por traslape estérico entre un oxígeno del carbonilo y un átomo de hidrógeno del  $\alpha$ -amino.<sup>16(a)</sup>

A partir del análisis de diversas estructuras de proteínas, se ha encontrado que el enrollamiento de porciones de la cadena polipeptídica frecuentemente tiene ciertas regularidades, llamadas elementos de estructura secundaria. Todas las posibles conformaciones de la cadena principal están completamente definidas por los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de cada aminoácido. Los valores permitidos para  $\phi$  y  $\psi$  pueden visualizarse gráficamente representando  $\phi$  versus  $\psi$ , un arreglo conocido como representación de Ramachandran (figura 3).

regularidades, llamadas elementos de estructura secundaria. Todas las posibles conformaciones de la cadena principal están completamente definidas por los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de cada aminoácido. Los valores permitidos para  $\phi$  y  $\psi$  pueden visualizarse gráficamente representando  $\phi$  versus  $\psi$ , un arreglo conocido como representación de Ramachandran (figura 3).

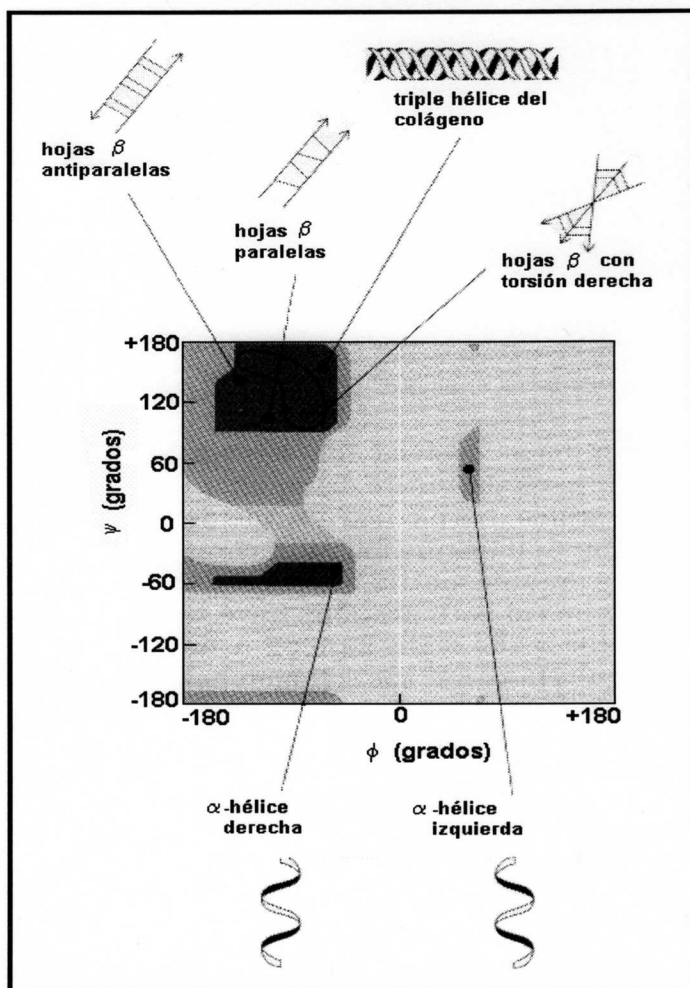


Figura 3. Representación de Ramachandran. Se muestran las conformaciones teóricamente permitidas para péptidos, que se definen por los valores de  $\phi$  y  $\psi$ . Las áreas sombreadas indican las conformaciones accesibles a los aminoácidos.<sup>16(a)</sup>

### 2.1.3 Elementos de Estructura Secundaria: hélice $\alpha$ y hoja $\beta$ plegada

La disposición más simple que una cadena polipeptídica podría asumir, con sus enlaces peptídicos rígidos (pero con otros enlaces sencillos libres para rotar), es una estructura helicoidal, denominada hélice  $\alpha$  por Pauling y Corey.<sup>17</sup> La hélice  $\alpha$  es una estructura compacta, semejante a una varilla, con 3.6 aminoácidos por vuelta, un ascenso de solamente 1.5 Å por vuelta y un enlace de hidrógeno, C=O...H-N, entre los residuos  $n$  y  $n+4$  (figura 4).

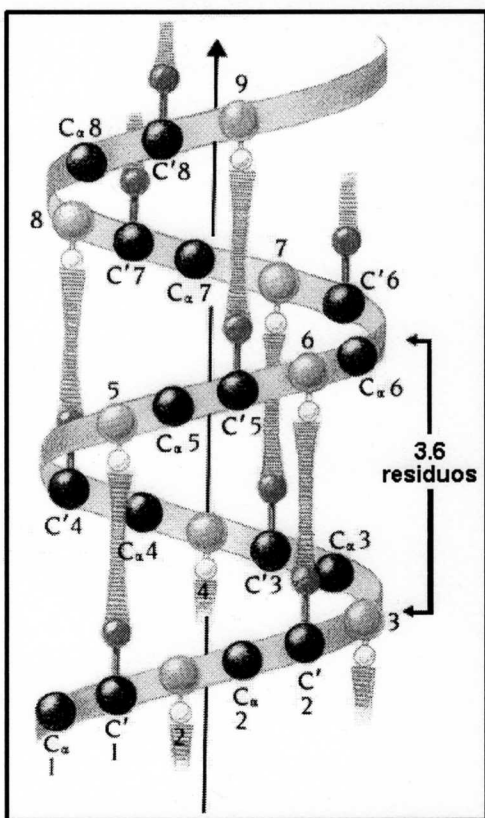


Figura 4. Esquema de la cadena principal de una hélice  $\alpha$ . La hélice  $\alpha$  es uno de los principales elementos de estructura secundaria en proteínas, con 3.6 residuos por vuelta, correspondiente a 5.4 Å (1.5 Å por residuo) y la formación de puentes de hidrógeno intracadenarios.<sup>16(b)</sup>

Todos los enlaces de hidrógeno en una hélice  $\alpha$  apuntan aproximadamente en la misma dirección, por lo que las unidades péptidas presentan igual orientación a lo largo del eje helicoidal. Ya que una unidad péptida tiene un momento dipolar originado por la diferencia de polaridad de los grupos amino y carboxilo, estos momentos dipolares se encuentran alineados a lo largo del eje helicoidal, y en consecuencia se tiene un dipolo neto para la hélice  $\alpha$ , con una carga parcial positiva en el amino terminal y una carga parcial negativa en el carboxilo terminal de esta estructura.

Pauling y Corey,<sup>17</sup> predijeron un segundo tipo de estructura repetitiva, la conformación  $\beta$ . Esta estructura se construye de la combinación de varias regiones de la cadena polipeptídica, en contraste con la hélice  $\alpha$ , que se construye con los elementos de una región continua.

Las cadenas  $\beta$ , usualmente tienen de 5 a 10 residuos de longitud y una

conformación extendida en zig zag (figura 5). Se encuentran alineadas adyacentemente una con respecto a la otra, de manera tal que se forman enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo de una cadena y los grupos amino de la cadena adyacente. Las hojas  $\beta$  que están formadas de varias cadenas son "plegadas", con átomos  $C\alpha$  por encima y por debajo del plano de la hoja  $\beta$  sucesivamente.

Las cadenas  $\beta$  pueden interaccionar de dos diferentes maneras para formar una hoja plegada. Los aminoácidos en las cadenas adyacentes pueden estar orientados en la misma dirección: amino terminal a carboxilo terminal (orientación paralela) o amino terminal a carboxilo terminal, carboxilo terminal a amino terminal (orientación antiparalela). Las probables orientaciones de las cadenas  $\beta$  se muestran en la figura 5.

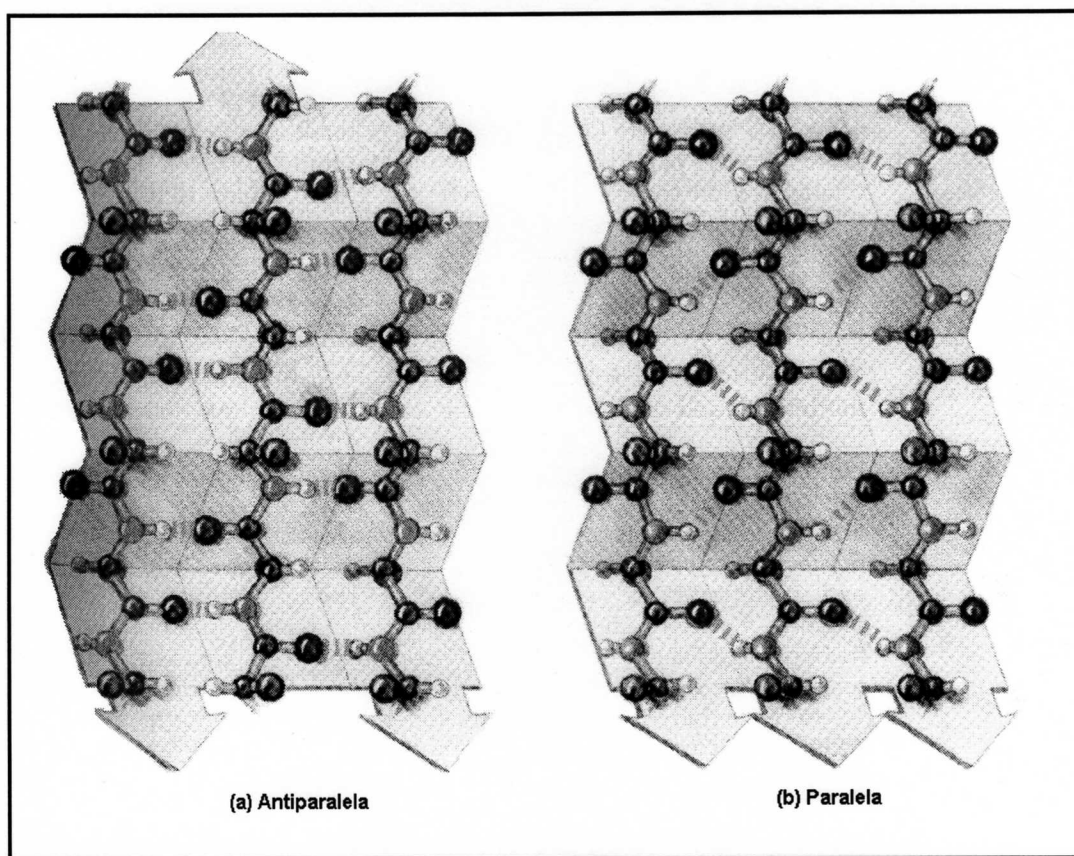


Figura 5. Conformación  $\beta$  de una cadena polipeptídica. (a) Hoja  $\beta$  antiparalela. (b) Hoja  $\beta$  paralela<sup>16a</sup>.

La hélice  $\alpha$  y la conformación  $\beta$  son los principales elementos de estructura secundaria encontrados en una amplia variedad de proteínas. Existen otras

estructuras repetitivas, que se presentan con menor frecuencia (v.g. la hélice del colágeno).

Otro tipo de estructura secundaria común es el giro  $\beta$  (figura 6), encontrado frecuentemente cuando una cadena polipeptídica cambia abruptamente de dirección. Estas giros generalmente conectan los extremos de dos segmentos adyacentes de una hoja  $\beta$  plegada antiparalela, de aquí que sean denominados giros  $\beta$ ). La estructura es una vuelta estrecha ( $\sim 180^\circ$ ) que involucra cuatro aminoácidos. Los grupos peptídicos adyacentes al primer aminoácido forman enlaces de hidrógeno con el grupo peptídico adyacente al cuarto aminoácido. Glicina y prolina son residuos participantes en vueltas debido a que sus cadenas laterales son grupos pequeños y en el caso de glicina, muy flexible. Los giros  $\beta$  se encuentran frecuentemente cerca de la superficie de la proteína.

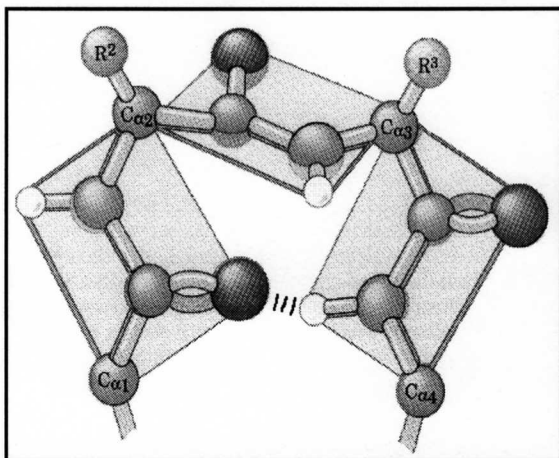


Figura 6. Estructura de un giro  $\beta$ . Ya que las proteínas globulares tienen un radio de giro finito de 15 a 80 Å o más, los elementos de estructura secundaria tales como la hélice  $\alpha$  y la hoja  $\beta$  plegada, están limitadas en longitud y frecuentemente terminan en vueltas, con formación de enlace de hidrógeno entre los grupos peptídicos del primero y cuarto residuos involucrados en la vuelta. Las vueltas presentan ciertas características, por lo que pueden ser clasificadas en dos tipos: I y II, difiriendo estos tipos únicamente en la orientación del grupo peptídico central.<sup>16(a)</sup>

Frecuentemente se ha encontrado en la estructura de proteínas la combinación de algunos elementos de estructura secundaria con un arreglo geométrico específico. Estas unidades han sido llamadas estructuras supersecundarias o motivos.<sup>16(b)</sup> Algunos de estos motivos son asociados con una función particular tal como ligar DNA; para otros no se ha determinado una función biológica especial, pero son parte de grandes conglomerados estructurales. El motivo más simple, con una función estructural específica, consiste de dos hélices  $\alpha$  unidas por una región no clasificada estructuralmente, denominada "loop".

## 2.1.4 Estructura Terciaria

La estructura terciaria de una proteína es el arreglo espacial de los aminoácidos que la constituyen. Puede describirse en términos del empaquetamiento de sus elementos de estructura secundaria, junto con la disposición espacial de las cadenas laterales.

El enrollamiento de una proteína, y la estabilización de tal estructura, se debe a las diferentes interacciones no covalentes asociadas a los grupos R de los residuos de aminoácidos, donde los tipos de interacciones principales son:

### 1) Interacciones electrostáticas

Se dan entre grupos de cadenas laterales cargadas positiva y negativamente.<sup>18</sup> Esta interacción es conocida como par iónico o puente salino.

### 2) Puentes de hidrógeno<sup>19-25</sup>

Son interacciones entre un grupo ácido débil y un átomo aceptor que tiene un par de electrones libres. Los puentes de hidrógeno proveen una base estructural para el patrón de enrollamiento de la proteína. Estos puentes pueden formarse por los grupos C=O y N-H de cada enlace peptídico y los átomos electronegativos de cadenas laterales polares. Estos grupos pueden formar enlaces de hidrógeno con otros grupos o con moléculas de agua presentes en el exterior de la proteína.

### 3) Interacciones de van der Waals<sup>26</sup>

Son interacciones entre moléculas no cargadas eléctricamente. Surgen de las interacciones electrostáticas entre dipolos permanentes y/o inducidos.

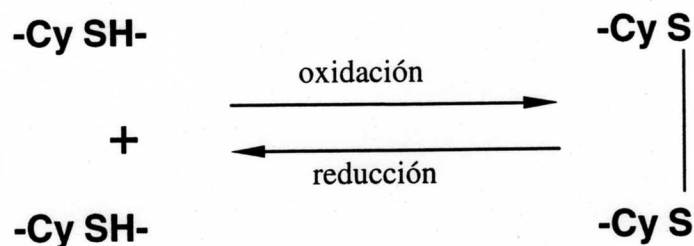
### 4) Efecto hidrofóbico

Son efectos relacionados con interacciones que inducen a las moléculas y grupos no polares a minimizar su contacto con el agua. Son determinantes en la estructura terciaria.

En ciertas proteínas, algunas cadenas laterales quedan enlazadas entrecruzadamente por enlaces disulfuro, que resultan de la oxidación de los residuos



de cisteína. Estos puentes disulfuro, denominados cistina, se forman después de que la proteína se enrolla en su conformación nativa. Su función es estabilizar la estructura tridimensional.<sup>16(b)</sup>



En la estructura plegada de las proteínas globulares, las cadenas laterales no polares de los aminoácidos tienden a estar en el interior de la proteína, formando un núcleo estabilizado. La mayor parte de las cadenas laterales cargadas y otros residuos polares se concentran sobre la superficie de la proteína, con cúmulos de estos aminoácidos frecuentemente agrupados en la región del sitio activo. Los residuos polares, como el grupo carbonilo y amido de la cadena polipeptídica, tienden a estar más uniformemente distribuidos, con todos los donadores o aceptores de enlace de hidrógeno localizados, por lo que forman puentes de hidrógeno ya sea con otras partes de la proteína o con el solvente.

### 2.1.5 Estructura Cuaternaria

La estructura cuaternaria define el grado de asociación de una unidad proteica. Muchas proteínas están compuestas de dos o más cadenas polipeptídicas, a las cuales se les llama subunidades, que pueden ser idénticas o diferentes en estructura. Estas subunidades se asocian por medio de interacciones no covalentes y en algunos casos a través de enlaces disulfuro. La asociación de cadenas polipeptídicas puede resultar útil para una variedad de funciones. Muchas proteínas multisubunitarias tienen funciones reguladoras; sus actividades se encuentran alteradas por unión de ciertas moléculas. Ciertas interacciones entre subunidades pueden permitir cambios muy grandes en la actividad enzimática en respuesta a cambios pequeños en la concentración de moléculas de sustrato. En otros casos, subunidades diferentes pueden llevar a cabo funciones separadas aunque relacionadas. Mientras que otras asociaciones de proteínas tienen principalmente una función estructural.

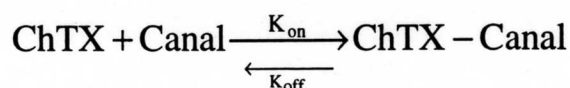
## 2.2 Caribdotoxina: Un Polipéptido Inhibidor de Canales de Transporte de K<sup>+</sup>

Los canales iónicos, responsables de la conducción selectiva de potasio a través de las membranas celulares, son notables por su diversidad y susceptibilidad a efectos de modulación, así como blancos efectivos de intervención farmacológica por diversos tipos de drogas.<sup>27</sup> Además de los inhibidores sintéticos, el veneno de abejas, escorpiones y serpientes produce una gran variedad de toxinas que actúan sobre diversos tipos de canales iónicos, perturbando el sistema nervioso y/o muscular. Estas toxinas son valiosas como ligandos naturales para discriminar clases de canales de transporte de K<sup>+</sup> y como herramientas en el desarrollo de los estudios bioquímicos de los mismos. Algunas se han estudiado ampliamente con respecto a su estructura, modo de acción y localización del sitio activo.

Hacia finales de los 80's<sup>28</sup> se aisló, a partir del veneno de escorpiones, una nueva familia de péptidos neurotóxicos que actúan sobre diversos canales de transporte de K<sup>+</sup>. Su secuencia primaria es de 30-40 aminoácidos e incluye tres puentes disulfuro, con la misma posición relativa de los residuos de cisteína.

La elucidación de la organización tridimensional de esta nueva clase de toxinas ha sido fundamental para comprender la base molecular de su actividad. Estudios de RMN<sup>29</sup> han revelado que esta familia de toxinas presenta un motif estructural común, a pesar de su diferencia en tamaño, secuencia y actividad biológica. El motif comprende una hélice  $\alpha$  y una hoja  $\beta$  plegada antiparalela, unidas por dos puentes disulfuro, y un pequeño fragmento extendido.

Una de estas toxinas, llamada caribdotoxina (ChTX), fue originalmente identificada por su potente actividad bloqueadora de los canales de conducción de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>.<sup>30</sup> Su acción radica en bloquear reversiblemente, con afinidad nanomolar<sup>28,31-39</sup> y por un proceso de inhibición bimolecular,<sup>34,40</sup>



la actividad del canal por interacción con el poro externo de éste.<sup>41</sup>

Estudios posteriores<sup>37</sup> establecieron que la caribdotoxina se une a una variedad de canales de transporte de K<sup>+</sup> en tejidos de vertebrados.

### 2.2.1 Características Estructurales y Funcionales de la ChTX

La caribdotoxina se encuentra presente como un componente menor (-0.2%)<sup>33</sup> en el veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus*. Esta toxina es una proteína pequeña formada por una sola cadena polipeptídica de 37 residuos de aminoácidos (un total de 577 átomos), con peso molecular aproximado de 4.353 kDa.

Su mecanismo de acción ha sido estudiado ampliamente con técnicas bioquímicas y de electrofisiología niveles.<sup>30,33,34</sup> Su secuencia primaria<sup>4,33,37</sup> presenta una notable concentración de residuos básicos entre las posiciones 21 y 28, por lo que esta región se convierte en un potencial sitio de interacción con los canales de transporte de K<sup>+</sup>, ya que el poro del canal presenta cargas negativas funcionalmente importantes.<sup>40</sup> Los residuos cargados positivamente (cuatro lisinas, tres argininas), y los grupos cargados negativamente (un glutamato y el C-terminal), le confieren una carga neta de +5 a pH fisiológico.<sup>33</sup>

La toxina contiene tres puentes disulfuro, que son esenciales para mantener su conformación, ya que la reducción de éstos<sup>34</sup> conlleva a la pérdida completa de la actividad inhibitoria; por otra parte, las cadenas laterales de Thr3, Val5, Val16 y Leu20 forman un cúmulo hidrofóbico que contribuye a la estabilización de la estructura.

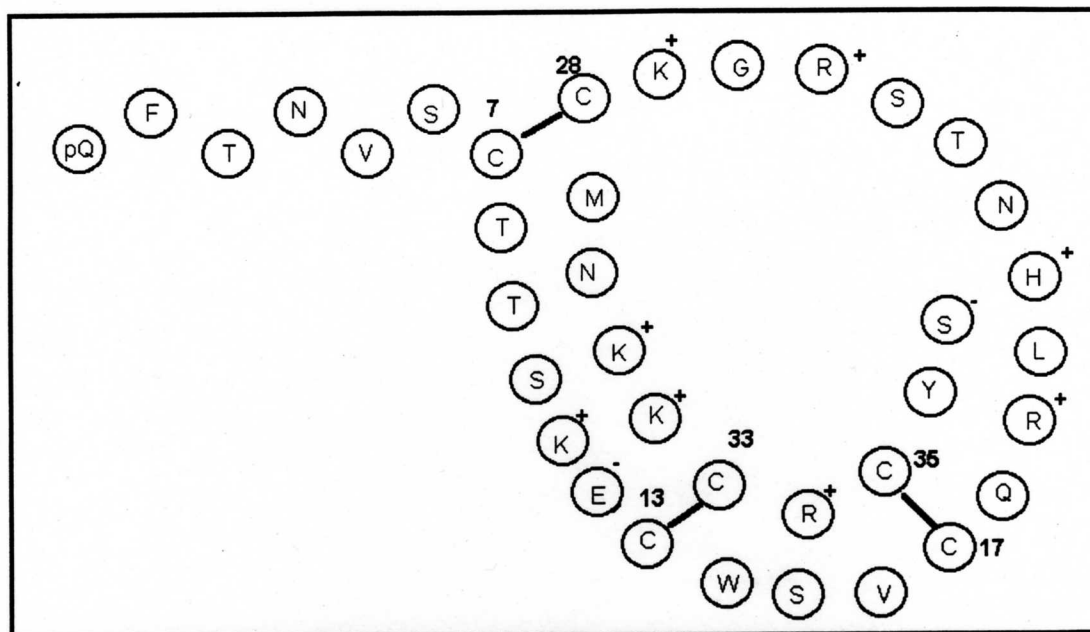


Figura 7. Secuencia de aminoácidos componentes de ChTX.<sup>42</sup> La estructura secundaria presenta tres puentes disulfuro, determinados por digestión enzimática del péptido oxidado. La ubicación de estos puentes fue confirmada con la elucidación de la estructura tridimensional por RMN-2D.<sup>43</sup>

Recientemente,<sup>29,43</sup> se determinó la estructura tridimensional de la caribdotoxina, en la que se identifican dos diferentes regiones con estructura regular (figura 8a): una pequeña hoja  $\beta$  antiparalela de tres cadenas pequeñas (secuencia 1 a 2, 25 a 29 y 32 a 36), unida a una bien definida hélice  $\alpha$  (secuencia 1 a 19) por dos puentes disulfuro (Cys13-Cys33, Cys17-Cys35) y a un fragmento extendido (secuencia 4 a 7) por un tercer puente (Cys7-Cys28).

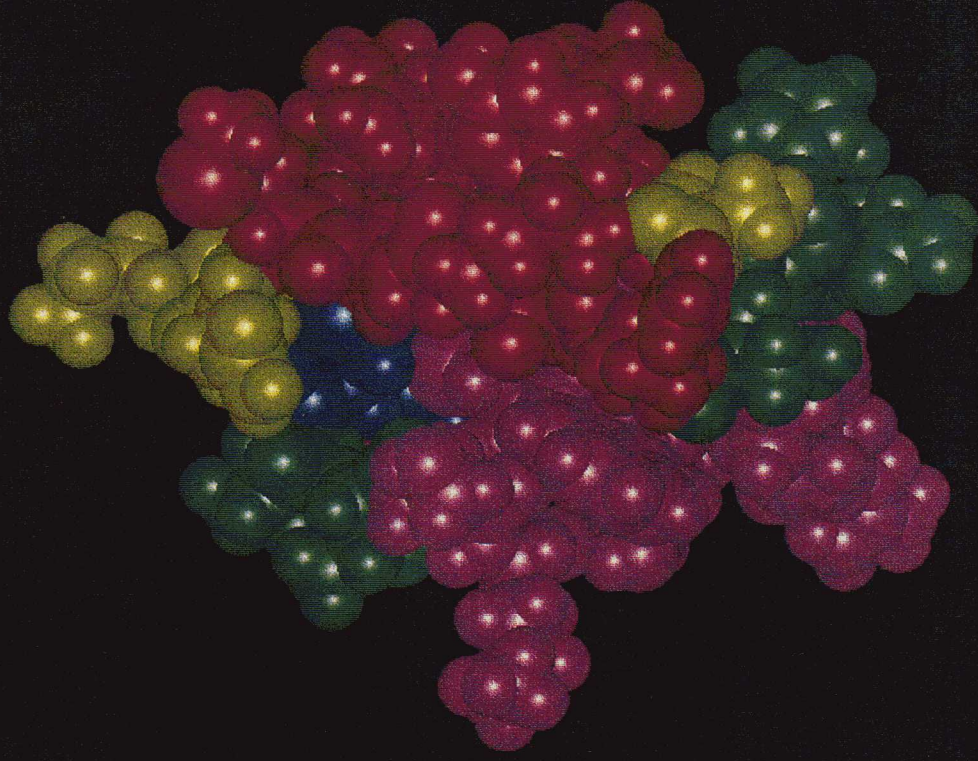
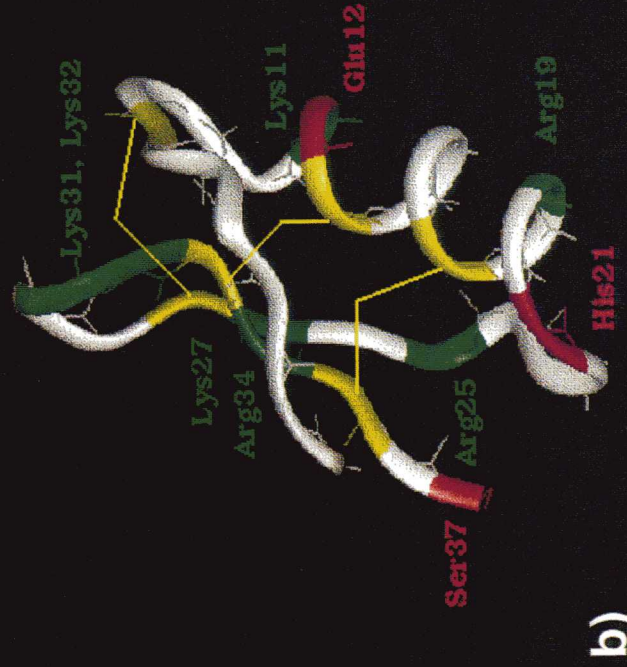
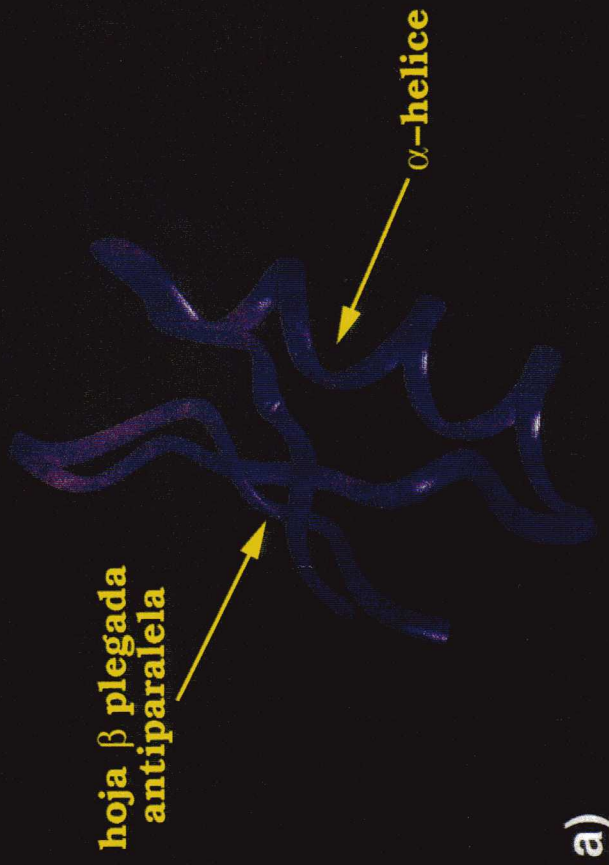
La hélice está conectada al fragmento extendido y a la cadena  $\beta$  con la secuencia 25 a 29 por dos "loops". Las dos cadenas 25 a 29 y 32 a 36 están conectadas por un giro  $\beta$  tipo I. La parte 29-32 une las dos pequeñas cadenas por un giro, mientras que los residuos Asn30 y Lys31 se localizan en el centro de éste.

Seis de los residuos cargados, Arg25, Lys27, Lys31, Lys32, Arg34 y el C-terminal, se localizan en la hoja  $\beta$ , en tanto que Lys11, Glu12, Arg19 se ubican en los extremos de la hélice. His21 está en el "loop" que conecta la hélice con la hoja. Esta organización espacial de los residuos, da lugar a la formación de dos superficies cargadas (figura 8b). La primera, localizada sobre la hélice y la segunda, sobre la hoja  $\beta$ . Las cadenas laterales que forman estas dos superficies presentan varias

características interesantes. En la hélice, las cadenas laterales de Lys11 y Arg19 están orientadas en la misma dirección (separadas por dos vueltas de la hélice) y se encuentran expuestas al solvente, mientras que Glu12 se localiza hacia el interior de la proteína.

Sobre la hoja  $\beta$ , las cadenas laterales de Arg25, Lys27, Lys31 y Lys32 se orientan hacia la fase acuosa, mientras que la de Arg34 está menos expuesta al solvente. La cadena lateral de Arg34 está rodeada por las cadenas laterales de Phe2, Lys27 y Tyr36, con la que se encuentra involucrada en una serie de contactos cortos que corresponden a interacciones débiles.

Las interacciones múltiples entre las cadenas laterales de los residuos, dan como resultado una estructura tridimensional de ChTX, compacta y ligeramente semejante a un prolato, de dimensiones 20 x 20 x 25 Å (Figura 8c).



**20 x 20 x 25 Å**

**Figura 8.** (a) Elementos de estructura secundaria encontrados en ChTX.<sup>3,29</sup> (b) Los aminoácidos cargados positivamente se indican en color verde, los cargados negativamente en rojo. His21 no se encuentra cargada. La disposición espacial de estos residuos da lugar a la formación de dos superficies cargadas. Las cisteínas se indican en color amarillo (la estructura tiene 3 puentes disulfuro). (c). Estructura tridimensional de ChTX (superficie de van der Waals). La hélice  $\alpha$  se indica en color rosa, la hoja  $\beta$  plegada antiparalela en rojo, el fragmento extendido en azul, los "loops" en verde y el giro  $\beta$  en amarillo.

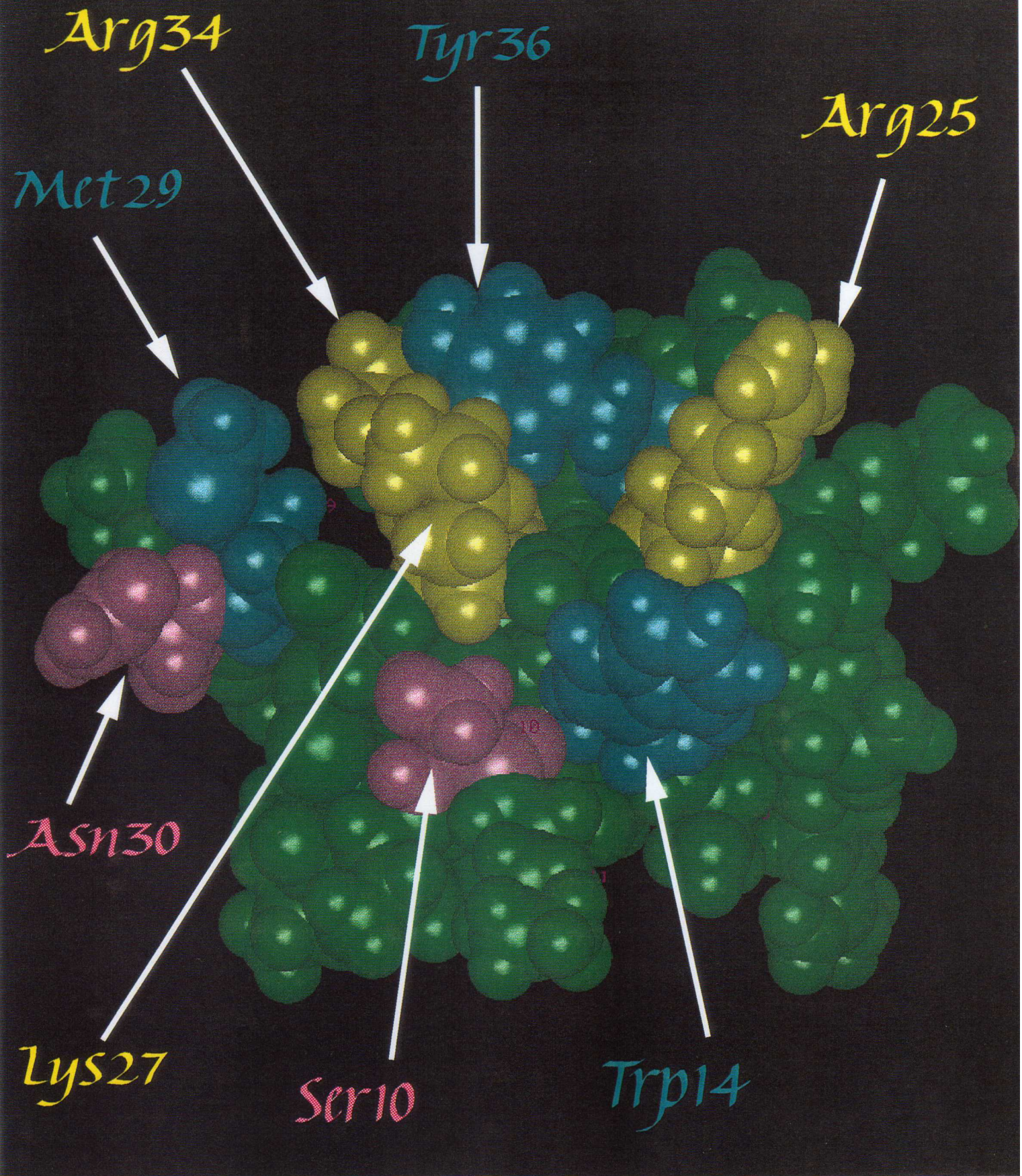
Debido a su contenido de puentes disulfuro, ChTX es un buen candidato para trabajos de mutagénesis. Y ya que algunas de las cadenas laterales que no son de cisteína se proyectan hacia el solvente, es difícil que un solo punto de mutación pueda ocasionar la pérdida del plegamiento de la toxina.

Park y Miller<sup>3</sup> centraron su trabajo de mutagénesis dirigida en los residuos cargados de CTX y mostraron que sólo tres de ellos (Arg25, Lys27 y Arg34) son funcionalmente importantes. Estos residuos se localizan conjuntamente sobre la superficie del polipéptido, en la parte correspondiente a la superficie de la hoja  $\beta$ ; en tanto que, los residuos cargados de la hélice no se encuentran involucrados directamente con la actividad de la toxina.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone una clasificación de los residuos expuestos al solvente como cruciales o indiferentes para la función de bloqueo del canal. Se define un residuo como crucial si al reemplazarlo por un residuo de aminoácido conservado cambia hasta 8 veces o más la constante de la rapidez de disociación. De igual manera, un residuo indiferente es definido como tal cuando, al mutarlo por un residuo no conservado, la constante de la rapidez de disociación aumenta menos de tres veces. Con este criterio, 8 residuos se clasifican como cruciales. Asimismo, 16 residuos caen dentro de la categoría de indiferentes. También se encontraron cuatro residuos ambiguos con incrementos de la rapidez de disociación entre 3 y seis veces para mutaciones conservadas. Esta clasificación se muestra en la Tabla II y la disposición espacial de los residuos en la figura 9.

Tabla II. Clasificación de los residuos de aminoácidos de la ChTX, de acuerdo con su función.<sup>3</sup>

<b>Cruciales</b>	<b>Indiferentes</b>	<b>Ambiguos</b>
Ser10, Trp14, Arg25, Lys27, Met29, Asn30, Arg34, Tyr36	Asn4, Val5, Ser6, Thr8, Lys11, Glu12, Ser15, Val16, Gln18, Arg19, Leu20, His21, Asn22, Ser24, Lys31, Lys32	pGlu1, Phe2, Thr3, Ser37

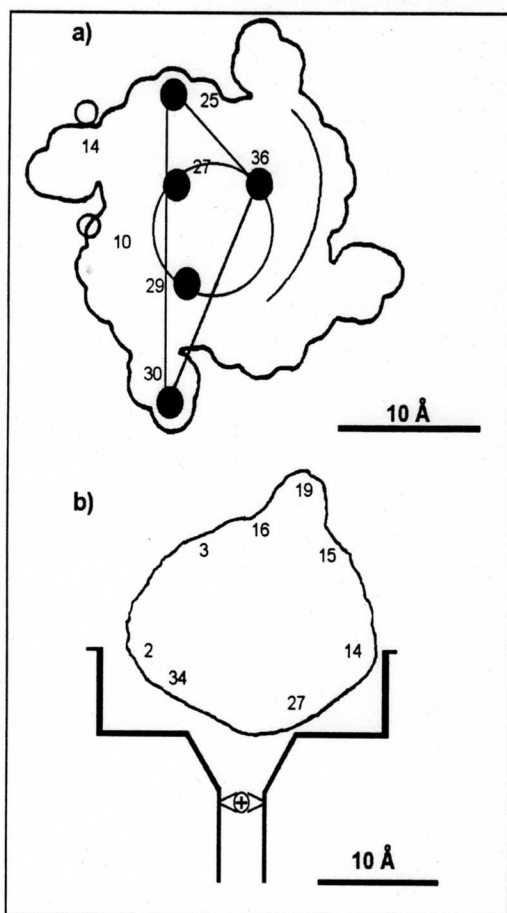


**Figura 9.** Mapa funcional de ChTX. Superficie de van der Waals, determinada por RMN 2-D,<sup>29</sup> con los residuos cruciales indicados. El color azul corresponde a los residuos con carácter hidrofóbico, amarillo a los residuos cargados positivamente y rosa a los que presentan capacidad para formar enlaces de hidrógeno.<sup>3</sup>



Los residuos de aminoácidos cruciales incluyen grupos con una variedad de características químicas: con cargas positivas (Lys27, Arg25, Arg34), hidrofóbicos (Trp14, Met29, Tyr36), y con la capacidad de formar enlaces de hidrógeno (Ser10, Asn30). Por lo que se puede esperar que el sitio receptor esté dotado de un ambiente químico muy diverso.

Los ocho residuos cruciales están espacialmente separados de los indiferentes y ambiguos sobre la superficie molecular de la toxina.<sup>43</sup> Visto por un ion  $K^+$  emergiendo del canal de conducción, seis de los residuos cruciales constituyen una superficie plana de forma triangular que hace contacto con el sitio receptor localizado sobre la superficie del canal. La superficie de interacción cubre cerca del 25% de la superficie molecular de ChTX.



Mediante un análisis detallado de la conformación de la toxina y al considerar que, 1) la toxina y el canal interactúan minimizando los efectos estéricos, 2) no existe perturbación alguna en la estructura de la toxina cuando se une al canal, 3) el canal de transporte de  $K^+$  (canal maxi-K) es un tetrámero simétrico de subunidades idénticas, y 4) la Lys27 está físicamente ubicada muy cerca de un sitio de unión a  $K^+$  en la superficie externa del poro; se ha podido deducir un modelo del sitio receptor complementario en el vestíbulo externo del canal de transporte de  $K^+$  (figura 10).<sup>44</sup>

Figura 10. Modelo propuesto para el receptor de CTX.<sup>44</sup> (a) Localización de los residuos sobre la superficie de interacción con respecto al vestíbulo teratmérico. (b) Modelo de interacción toxina-canal. Lys27, Arg34 y Trp14 están en contacto con el vestíbulo. La posición de Phe2 es lo suficientemente cercana para establecer interacciones débiles. Thr3, Ser15, Val16 y Arg19 se ubican lejos de los sitios de interacción con el canal.

## 2.2.2 Modificación Química de la ChTX

Como ya se ha mencionado, las cadenas laterales importantes funcionalmente, Arg25, Lys27, Arg34, se encuentran juntas sobre el mismo lado de la molécula, mientras que los residuos indiferentes Lys11, Glu12, Arg19, His21 y Lys32, ocupan posiciones sobre el lado opuesto. Esta clara distribución espacial sugiere que la base de la molécula hace contacto directo con la boca del canal, mientras que la parte superior no lo hace. Esta propuesta es reforzada por efectos funcionales ocasionados por mutaciones químicas de ChTX, las cuales sugieren que los residuos hidrofóbicos se encuentran también involucrados en las interacciones de unión de la toxina con el canal.

La iodación de la Tyr36,<sup>4</sup> y el rompimiento con quimotripsina en Phe2,<sup>34</sup> ocasionan efectos adversos sobre las constantes de rapidez de asociación y disociación de la unión toxina-canal. El valor de la constante de rapidez de asociación sufre un decremento, mientras que el correspondiente a la disociación se incrementa de 20 a 50 veces.<sup>4,42</sup>

Estudios de mutaciones electrostáticas<sup>3</sup> han mostrado que Phe2 es un residuo con carácter funcional ambiguo, pero con una ubicación espacial lo suficientemente cercana para establecer interacciones débiles con residuos cruciales, mientras que la Tyr36 es considerada como crucial para la actividad biológica de la toxina. Ambos residuos se localizan en la base de la molécula, orientados hacia Arg34.

En el caso particular de la iodación de ChTX, la disminución de la capacidad bloqueadora aparece como resultado de la iodación de una sola tirosina en la posición 36 y, posiblemente, de la oxidación de la metionina en la posición 29. La inhibición de la actividad de proteínas ocasionada por iodación de la tirosina, ha sido observada comúnmente para diversos péptidos y enzimas.<sup>45</sup> Se considera que dicho efecto se debe al gran tamaño del átomo de yodo (similar al diámetro del anillo de benceno), lo que puede impedir estéricamente al anillo de fenol para interactuar con una superficie hidrofóbica. Además, la iodación puede disminuir el  $pK_a$  del grupo hidroxilo de la tirosina, lo que perturbaría las interacciones electrostáticas en su vecindad.

De acuerdo con las características estructurales y funcionales que presenta la ChTX, la unión toxina-canal se lleva a cabo por diversos tipos de interacciones: los grupos cargados positivamente, y ubicados sobre la superficie molecular de la ChTX, promueven la interacción toxina-canal por dos vías: influencias electrostáticas espaciales y por contacto directo con el canal. Las interacciones hidrofóbicas estarían relacionadas con los residuos Tyr36, Met29 y Phe2; además, se puede considerar la posible transferencia de carga en diferentes sitios de la molécula de la ChTX cuando ésta interactúa con el canal. Este último tipo de interacción será el problema de estudio a tratar en el presente trabajo de tesis.

## 2.3 Estructura Electrónica de Proteínas

En la primera sección de este capítulo, se cita la importancia de las proteínas como materiales estructurales y funcionales y la complejidad estructural de las mismas. Estos aspectos han despertado el interés por lograr una descripción microscópica de este tipo de moléculas. A pesar del gran avance logrado en la caracterización estructural y dinámica de este tipo de sistemas,<sup>1,2,46-51</sup> las limitaciones computacionales y metodológicas no han permitido lograr una descripción adecuada de su estructura electrónica. En esta sección se dará un resumen de los aspectos importantes logrados en la búsqueda de una descripción detallada de la estructura electrónica de polipéptidos.

Un aspecto de particular significado en la estructura de proteínas es, sin duda, el referente a la existencia de deslocalización electrónica general. El esqueleto del péptido está formado, como ya se ha mencionado, de la repetición periódica de

pequeñas unidades resonantes  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{C}-\text{N}- \\ | \\ \text{H} \end{array}$ , separadas por carbonos saturados. Por lo

que a lo largo de la cadena principal de la proteína no puede establecerse deslocalización electrónica. En la estructura proteica existen enlaces secundarios, llamados enlaces de hidrógeno. Ya que estos enlaces pueden participar en la deslocalización electrónica y transmitir efectos de conjugación, dicha deslocalización electrónica se puede extender involucrando toda la estructura molecular del polipéptido.

Szent-Gyorgy<sup>52,53</sup> postuló que la deslocalización electrónica puede desempeñar un papel importante en las propiedades de transporte de las proteínas, al proponer que la transferencia de energía en sistemas biológicos puede llevarse a cabo por un mecanismo análogo al fenómeno de conductividad observado en cristales, y en particular, que el arreglo regular de los enlaces peptídicos en las proteínas puede resultar en la existencia de bandas de energía, similar a aquellas que se presentan en semiconductores. Esta hipótesis marcó la pauta para innumerables investigaciones experimentales sobre las propiedades semiconductoras de proteínas (y ácidos

nucleicos), a la par de dar origen a diversas discusiones y controversias.

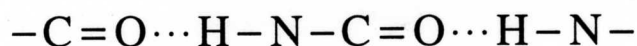
En el campo de la investigación experimental de este fenómeno, destaca el trabajo realizado por Eley y col.<sup>54-59</sup>, quienes establecieron que las proteínas manifiestan conductividad eléctrica. La conductancia específica,  $\chi$ , de estas sustancias depende de la temperatura de acuerdo con la expresión clásica para semiconductores:

$$\chi = \chi_0 \exp - (\Delta E / 2KT) \text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

donde  $\chi_0$  es una constante, K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y  $\Delta E$  el gap. Estos autores encontraron valores para el gap de energía en diversas proteínas, globina 2.97 eV, hemoglobina 2.75 eV, poliglicina 3.12 eV y de 2.92 eV para el monómero de glicina.

Los resultados anteriores condujeron a Eley a postular la existencia de una semiconductividad electrónica intrínseca en proteínas. El carácter electrónico e intrínseco de la conductividad observada en proteínas fue cuestionado severamente por diversos autores, quienes estimaron que los resultados experimentales presentados por Eley no excluían la posibilidad de una conductividad iónica<sup>60</sup> o electrónica extrínseca,<sup>61</sup> y por lo tanto a nivel experimental no quedaba claramente establecida la naturaleza de dicho fenómeno. En el aspecto teórico tampoco se ha resuelto el problema de la conducción electrónica en polipéptidos, y a este respecto se ha de mencionar que los trabajos de Ladik<sup>62</sup> y Suhai<sup>63-65</sup> han servido para poner de manifiesto el efecto que los métodos y aproximaciones utilizados tienen sobre los resultados.

Utilizando el método Extended-Hückel, Evans y Gergely<sup>66</sup> efectuaron el primer cálculo de bandas de energía para una proteína. Los cálculos estuvieron basados sobre la red conjugada de electrones  $\pi$



formada por enlaces de hidrógeno y que se extiende en dirección perpendicular a la

cadena polipeptídica principal en las estructuras secundarias hélice  $\alpha$  y  $\beta$ -plegada de una proteína. Coulson<sup>67</sup> fue el primero en sugerir que el sistema electrónico  $\pi$  arriba mencionado, puede dar origen a una ruta de conducción electrónica en una proteína.

Considerando que cada unidad péptida  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{C}-\text{N}- \\ | \\ \text{H} \end{array}$  consiste de un sistema deslocalizado

de electrones  $\pi$ , asociados con los orbitales  $\pi$  de los átomos de C y O junto con el orbital del par libre de electrones del átomo de N, Evans y Gergely propusieron que la deslocalización electrónica ocurre a través de los enlaces de hidrógeno, para dar lugar a un acoplamiento electrónico entre todas las unidades péptidas de las cadenas enlazadas por hidrógeno. De lo anterior se obtiene que para una cadena de  $n$  péptidos, enlazada por hidrógeno, los tres niveles discretos de energía  $\pi$  de cada unidad péptida pueden ensancharse en tres bandas de energía de  $n$  niveles cercanos.

Para un sistema polipeptídico como el mostrado en la figura 5(a), el estado intrínseco de semiconducción se obtuvo por la excitación de electrones a través de la energía del gap,  $\epsilon_g$ , entre la banda más alta ocupada y la banda más baja desocupada, como se muestra en la figura 11. Asumiendo una estructura trigonal para el nitrógeno del amino, Evans y Gergely obtuvieron un valor de 3.05 eV para el gap y de 0.26 eV y 0.12 eV para el ancho de la bandas de valencia y conducción, respectivamente.

Algunos años más tarde, Itoh<sup>68</sup> utilizó funciones orbitales de Bloch para los electrones del sistema formado por enlaces de hidrógeno, obteniendo anchos de banda y un valor de 4.4 eV para  $\epsilon_g$ . Algunos cálculos posteriores<sup>69-74</sup> utilizaron datos espectroscópicos obtenidos para los péptidos y asignaron valores a ciertas integrales, además de considerar el par electrónico libre de los átomos de oxígeno.

El concepto de deslocalización electrónica  $\pi$  a través de los enlaces de hidrógeno fue tomado en cuenta al incluir dentro de la base de orbitales atómicos el orbital vacío 2p del átomo de H. Como resultado de estos cálculos se obtuvo el esquema de bandas de energía mostrado en la figura 11. Este esquema consiste de dos bandas  $\pi$  y una banda  $n$ , con ancho de banda de alrededor de 1 eV y un gap de

energía del orden de 5-7 eV. Este valor del gap excluye definitivamente la posibilidad de una significativa generación intrínseca de portadores de carga móviles en las estructuras hélice  $\alpha$  y  $\beta$ -plegada.

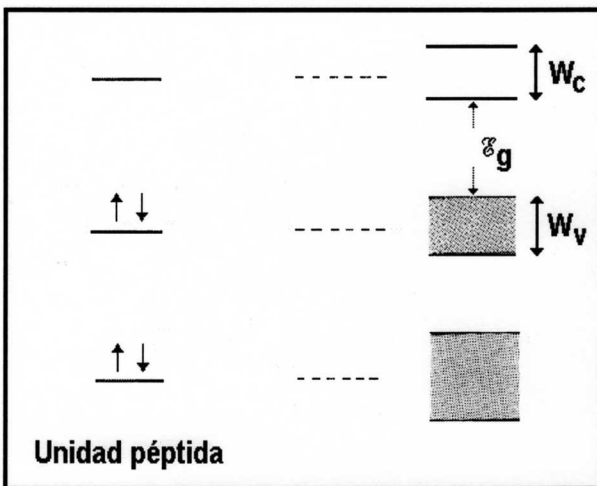
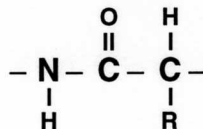


Figura 11. Formación de la estructura de bandas de energía para un polipéptido con estructura  $\beta$ -plegada.<sup>75</sup>  $W_c$  corresponde al ancho de la banda de conducción y  $W_v$  al de la banda de valencia.

Los cálculos de bandas de energía para estructuras de proteínas hasta ahora se han descrito basándose en la posibilidad de deslocalización electrónica a través de los enlaces de hidrógeno entre las unidades péptidas. Cálculos más recientes, han mostrado que es posible la formación de bandas de energía de amplitud considerable debido a las interacciones atómicas que se suscitan a lo largo de la cadena polipeptídica principal. Esta aproximación sigue la propuesta de Brillouin<sup>76</sup>, en la que los grupos



de la cadena polipeptídica constituyen la celda unitaria para un modelo de estructura periódica de proteína (de acuerdo con la idea original de Laki<sup>77</sup>), con los cadenas laterales (R) actuando como perturbaciones para producir niveles tipo impureza dentro del gap.

Al calcular la estructura electrónica de poliglicina en forma de hélice  $\alpha$ , Fujita e Imamura<sup>78</sup> llegaron a la conclusión que hay una considerable mezcla de orbitales  $\pi$  y  $\sigma$  en las bandas de energía. Esto indica que los sistemas electrónicos  $\pi$  y  $\sigma$  no pueden

ser tratados independientemente, y que los primeros cálculos de bandas de energía usando solamente los electrones  $\pi$  de la estructura de proteínas requieren reinvestigación y posible modificación. Esta conclusión fue confirmada más tarde por los cálculos (MINDO/2) de Beveridge y col.<sup>79</sup> para poliglicina, donde se obtuvieron valores del gap de 5.7 eV y 6.14 eV para las estructuras hélice  $\alpha$  y  $\beta$ -plegada respectivamente.

Al considerar simultáneamente, en una conformación  $\beta$ -plegada de poliglicina,<sup>80</sup> las interacciones que se dan a través de la red formada por los enlaces de hidrógeno, y aquellas que tienen lugar a lo largo de la cadena polipeptídica principal, se observó que la amplitud de la banda de energía depende de la geometría molecular usada y si se toman o no en cuenta las interacciones con segundos vecinos.

Se ha encontrado que las amplitudes de las banda de energía son mayores para interacciones atómicas a lo largo de la cadena principal del polipéptido que aquellas que resultan de interacciones a través de la red formada por enlaces de hidrógeno. Esto puede apreciarse en la tabla III, en donde se muestran algunos parámetros electrónicos característicos obtenidos por Suhai<sup>81</sup> y Ladik<sup>82</sup> para la estructura hoja  $\beta$ -plegada paralela de poliglicina, usando los métodos MINDO/2 y ab initio SCF LCAO, respectivamente. En el caso del cálculo efectuado por Ladik para la cadena principal, se incluyeron correcciones para efectos de correlación de largo alcance.

Tabla III. Parámetros electrónicos para una estructura  $\beta$ -plegada de poliglicina.<sup>75</sup>

	Cadena polipeptídica principal		Cadena Enlazada por hidrógeno	
	Suhai <sup>81</sup>	Ladik <sup>82</sup>	Suhai <sup>81</sup>	Ladik <sup>82</sup>
Ancho banda de valencia (eV)	1.23	1.91	0.31	0.29
Ancho banda de conducción (eV)	1.68	1.26	0.48	0.14



Como conclusión de los resultados obtenidos, Suhai<sup>81</sup> propone que el mecanismo más favorable para el transporte de electrones en proteínas, involucra conducción a lo largo de la cadena principal del polipéptido, más que a través de la red pseudoconjugada formada por los enlaces de hidrógeno, y que para que esto ocurra, se requiere de la interacción por transferencia de carga con otra molécula.

Por otra parte, el hecho de que la amplitud de las bandas de energía se encuentre asociada con interacciones atómicas a lo largo de la cadena principal del polipéptido, sugiere que las propiedades de conducción electrónica de las proteínas están asociadas principalmente con la estructura primaria.

La hidratación puede modificar la estructura de bandas de energía de una proteína como resultado de su influencia sobre los valores de permitividad local (Figura 12a). La presencia de cargas localizadas es otro de los factores que modifican la estructura de bandas. En la vecindad de un grupo cargado negativamente, las repulsiones coulómbicas pueden incrementar la energía potencial de los estados electrónicos en esa región, mientras que la atracción coulómbica originada por la cercanía de grupos cargados positivamente tiende a reducir la energía potencial de los estados. El efecto de tales interacciones electrostáticas sobre la banda de valencia es mostrado esquemáticamente en la figura 12 (b).

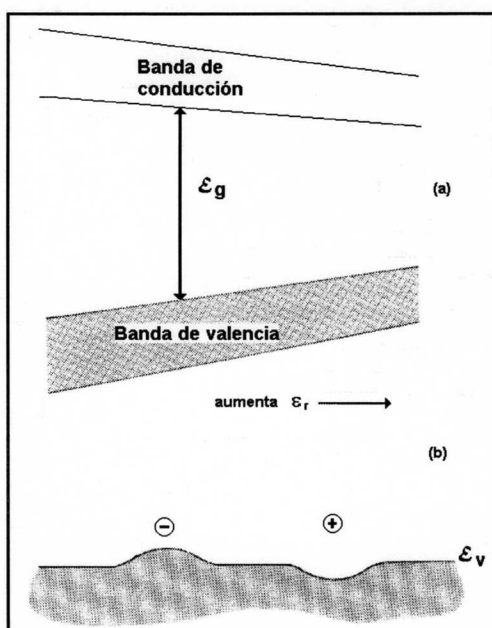


Figura 12. (a) Variación de la estructura de bandas de energía como una función de la permitividad relativa. (b) La influencia de cargas localizadas sobre la estructura de la banda de valencia. Efectos similares pueden ocurrir para la banda de conducción<sup>75</sup>.

Petrov y col.<sup>83</sup> sugieren que las aproximaciones utilizadas en los diferentes cálculos de bandas de energía para proteínas no describen los estados excitados de las cadenas polipeptídicas, ya que la mayoría de los cálculos emplean bases mínimas e incluyen solamente los orbitales de Slater 1s 2s y 2p para los átomos de N, C y O y el orbital 1s para el átomo de hidrógeno, a pesar de ser conocido que el espectro de los elementos del segundo periodo de la tabla periódica involucra los estados 3s y 3p.

Petrov y col. proponen para las bandas de energía de una cadena polipeptídica la forma mostrada en la figura 13. Puesto que los estados 3s y  $\pi^*$  se encuentran mezclados en la banda de conducción, un electrón puede migrar a lo largo de la cadena polipeptídica, se encuentre o no presente una estructura de electrones  $\pi$  asociada con enlaces de hidrógeno en las estructuras hélice  $\alpha$  y  $\beta$ -plegada. Estando en buen acuerdo con Suhai,<sup>81</sup> que la ruta de conducción electrónica predominante se da a través de los enlaces  $\sigma$  de la cadena polipeptídica principal.

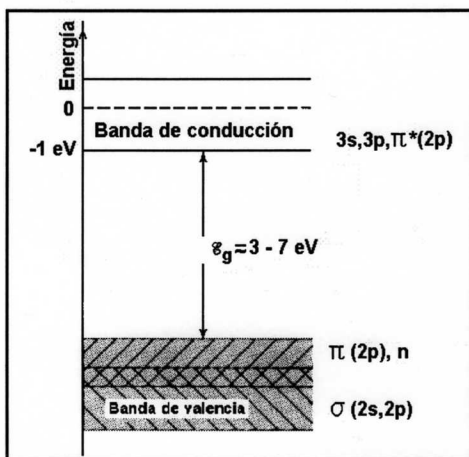


Figura 13. Estructura de bandas de energía sugerida por Petrov y col.<sup>83</sup> para cadenas polipeptídicas.<sup>75</sup>

Los estudios mencionados, son sólo algunos de los intentos realizados para describir la estructura electrónica de las proteínas. A pesar de que la Mecánica Cuántica se ha distinguido por ser una de las teorías con mayor impacto en el desarrollo de las ciencias naturales durante el siglo XX, y que, teóricamente, basándose en sus postulados, se podría describir el comportamiento de cualquier sistema físico (electrones, núcleos, átomos, proteínas, minerales, polímeros, etc.) cuando éste se encuentre aislado o interactuando con otros sistemas (fenómenos

físicos, químicos, biológicos, etc.), también lo es el hecho de que en la práctica sólo es posible analizar una estrecha gama de problemas, lo cual se corrobora con lo descrito en esta sección.

Los recientes avances logrados en el ámbito computacional y metodológico indican que no está lejano el día en que se pueda lograr una descripción detallada de la estructura electrónica de proteínas.

Son diversas las opciones metodológicas con las que actualmente se cuenta para resolver este problema. Esta tesis se enmarca en la utilización de la metodología Funcionales de la Densidad con Bases de Ondas Planas (FDBOP), en combinación con el cómputo en paralelo (uso de la supercomputadora CM-5) para estudiar "a primeros principios" el caso particular de la caribdotoxina y su derivado monoiodado.

### 3 CÁLCULOS "A PRIMEROS PRINCIPIOS" DE ENERGÍA TOTAL EMPLEANDO EL ALGORITMO DE CAR Y PARRINELLO

El floreciente desarrollo de la Mecánica Cuántica a través del presente siglo, y los extraordinarios avances logrados en materia de cómputo en los últimos veinte años, han permitido explorar con detalle la estructura electrónica de los más variados sistemas. Sin embargo, existen complejos problemas al tratar sistemas constituidos por un considerable número de átomos. Diversas metodologías "a primeros principios" se han desarrollado para intentar describir sus propiedades.

Los cálculos de la estructura electrónica de sistemas con muchos átomos y/o electrones requieren de la combinación de un buen número de ingredientes y aproximaciones.

A través del presente capítulo, se hará una breve descripción de dichos ingredientes y de las aproximaciones realizadas al calcular la energía total de una molécula con cientos de átomos (una biomolécula).

#### 3.1 Teoría de Funcionales de la Densidad

Al calcular la estructura electrónica de átomos y moléculas, dentro del contexto formal de la Teoría de Funcionales de la Densidad, el problema central radica en encontrar la densidad electrónica que minimice la energía total del sistema, de acuerdo con el funcional planteado por Hohenberg y Kohn:<sup>84</sup>

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{N-e}[\rho] + V_{e-e}[\rho] + E_{N-N} \quad (1)$$

En donde  $T[\rho]$  es la energía cinética del sistema,  $V_{N-e}[\rho]$  y  $V_{e-e}[\rho]$  representan las contribuciones de la energía potencial debido a las interacciones núcleo-electrón y electrón-electrón, respectivamente y  $E_{N-N}$  es la energía de repulsión internuclear.

Para el caso de sistemas multielectrónicos, la ec. (1) involucra interacciones de muchos cuerpos, con un considerable grado de dificultad para modelar.

De acuerdo con la propuesta hecha por Kohn y Sham<sup>85</sup>, el problema de obtener la densidad electrónica correspondiente al estado de mínima energía del sistema, se resume en un conjunto de ecuaciones monoeléctricas autoconsistentes, en el que para los spin-orbitales,  $\Psi_i(\mathbf{r})$ , se cumple que<sup>\*</sup>:

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{N-e}(\mathbf{r}) + V_{e-e}(\mathbf{r}) + V_{xc}(\mathbf{r}) \right] \Psi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \Psi_i(\mathbf{r}) \quad (2)$$

En la expresión anterior,  $V_{N-e}(\mathbf{r})$  representa el potencial correspondiente a la interacción núcleo-electrón,  $V_{e-e}$  es el potencial coulombico clásico repulsivo sentido por un electrón y generado por el resto de los electrones, y  $V_{xc}(\mathbf{r})$  es la contribución no clásica al potencial, debido al intercambio y correlación electrónica. El sistema de ecuaciones se resuelve a través de un desarrollo autoconsistente, similar al de las ecuaciones de Hartree-Fock. Una vez obtenido el conjunto de  $\{\Psi_i(\mathbf{r})\}$ , se calcula la densidad electrónica para el caso de espín restringido (capas llenas), de acuerdo con:

$$\rho(\mathbf{r}) = 2 \sum_{i=1}^{n/2} |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (3)$$

siendo  $n$  el número de electrones que constituyen el sistema. La energía total se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$E[\{\Psi_i(\mathbf{r})\}] = 2 \sum_{i=1}^{n/2} \int \frac{1}{2} \Psi_i^*(\mathbf{r}) \nabla^2 \Psi_i(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \int V_{N-e}(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] + E_{N-N}(\{\mathbf{R}_n\}) \quad (4)$$

\* A menos que se indique lo contrario, todas las ecuaciones mostradas se expresan en unidades atómicas.

La parte derecha de la igualdad, incluye los términos correspondientes a las energías cinética, de interacción núcleo-electrón, electrostática clásica electrón-electrón, de intercambio y correlación y de interacción núcleo-núcleo.

Son muy variadas las implementaciones que permiten resolver las ecuaciones de Kohn-Sham. En el desarrollo de este trabajo de tesis, se emplean pseudopotenciales para modelar la interacción núcleo-electrón, ondas planas para la expansión de la función de onda y una aproximación local al potencial de intercambio y correlación electrónica con la parametrización de Perdew-Zunger.<sup>86</sup>

### 3.1.1 Ecuaciones de Kohn-Sham en Espacio Recíproco

De acuerdo con estudios realizados en sólidos, cuando se tiene un potencial invariante traslacional<sup>87</sup> de la forma:

$$U(\mathbf{r} + \mathbf{R}) = U(\mathbf{r}) \quad (5)$$

para toda  $\mathbf{R}$  en la malla de Bravais, las eigenfunciones correspondientes a un hamiltoniano monoeléctrico:

$$H = \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 + U(\mathbf{r}) \right], \quad (6)$$

se pueden elegir de forma tal, que sean una onda multiplicada por una función  $f_j(\mathbf{r})$  con la periodicidad de la malla de Bravais :

$$\Psi_{jk}(\mathbf{r}) = e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} f_j(\mathbf{r}) \quad (7)$$

donde  $\mathbf{k}$  recibe el nombre de vector de onda y la expresión dada por la ec. (7),

corresponde al Teorema de Bloch.<sup>87</sup>

Al suponer una solución tipo Bloch para la ec. (2), y al desarrollar  $f_j$  como una sumatoria de ondas planas, entonces  $\Psi_i(r)$  puede expresarse como:<sup>88,89</sup>

$$\Psi_{jk} = \sum_G C_{j,k+G} e^{i(k+G)\cdot r}, \quad (8)$$

siendo  $\mathbf{G}$  los vectores de la malla recíproca, definidos por  $\mathbf{G}\cdot\mathbf{R}=2\pi m$  para toda  $\mathbf{R}$  en la malla de Bravais y cualquier entero  $m$ .

En general, debería escribirse una función como la ec. (8) por cada punto  $\mathbf{k}$  permitido en la primera zona de Brillouin, pero se ha encontrado que para calcular ciertas propiedades de los sistemas periódicos, como es el caso de la densidad electrónica, sólo es necesario calcularla en un conjunto especial de puntos  $\mathbf{k}$  y hacer un promedio de estos valores pesados con coeficientes determinados con respecto a la simetría presentada por el sistema.<sup>90</sup> Para obtener el conjunto especial de puntos  $\mathbf{k}$ , y sus correspondientes pesos de acuerdo con el tipo de celda unitaria, se han desarrollado diversas técnicas.<sup>90-92</sup>

El número de puntos  $\mathbf{k}$  requeridos para efectuar un cálculo de estructura electrónica, es proporcional al volumen de la primera zona de Brillouin, que a su vez, es el inverso del volumen de la celda unitaria en el espacio real. Lo anterior implica que a medida que la celda unitaria en espacio real crece, los puntos  $\mathbf{k}$  permitidos se encuentran más cercanos unos de los otros. En consecuencia, el comportamiento de la solución en los distintos puntos  $\mathbf{k}$  es muy cercana, y por lo tanto es factible reducir el número de ellos y tener un aceptable promedio de las propiedades. En el caso particular de moléculas aisladas, las celdas unitarias en el espacio real son de dimensiones considerables (superceldas), ya que se requiere evitar posibles interacciones entre celdas vecinas. Lo anterior permite utilizar un sólo punto  $\mathbf{k}$  en la solución de la ecuación de Kohn-Sham. Dadas las dimensiones del sistema a estudiar en el presente trabajo, el cálculo se efectúa en un solo punto  $\mathbf{k}$ .

Al sustituir la ec. (8) en la ec. (2) y tomar la transformada de Fourier, se obtiene:

$$\frac{1}{v} \int d\mathbf{r} e^{-i(\mathbf{k}+\mathbf{G})\cdot\mathbf{r}} \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 - \varepsilon_j + v_{N-e}(\mathbf{r}) + v_{e-e}(\mathbf{r}) + v_{xc}(\mathbf{r}) \right] \sum_{\mathbf{G}'} C_{j,\mathbf{k}+\mathbf{G}'} e^{i(\mathbf{k}+\mathbf{G}')\cdot\mathbf{r}} = 0 \quad (9)$$

en donde  $v$  representa el volumen de la celda unitaria. Si se supone que las eigenfunciones son normalizadas sobre el volumen de la celda, la expresión resultante corresponde a la ecuación de Kohn-Sham en espacio recíproco:<sup>88,89</sup>

$$\sum_{\mathbf{G}'} \left[ \frac{1}{2} |\mathbf{k} + \mathbf{G}|^2 \delta_{\mathbf{G}\mathbf{G}'} + v_{N-e}(\mathbf{k} + \mathbf{G}, \mathbf{k} + \mathbf{G}') + v_{e-e}(\mathbf{G} - \mathbf{G}') + v_{xc}(\mathbf{G} - \mathbf{G}') \right] C_{j,\mathbf{k}+\mathbf{G}'} = \varepsilon_{j,\mathbf{k}+\mathbf{G}} C_{j,\mathbf{k}+\mathbf{G}} \quad (10)$$

De esta manera, mientras que la energía cinética es diagonal, los potenciales son descritos en términos de sus transformadas de Fourier. En el caso del potencial de interacción coulombico clásico,  $v_{e-e}(\mathbf{G}-\mathbf{G}')$ , éste se determina a partir de la ecuación de Poisson:<sup>93,94</sup>

$$\nabla^2 v_{e-e}(\mathbf{r}) = -4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (11)$$

La transformada de Fourier de la ec. (11) corresponde a la expresión :

$$\int d\mathbf{r} e^{-i(\mathbf{G}-\mathbf{G}')\cdot\mathbf{r}} \nabla^2 v_{e-e}(\mathbf{r}) = -4\pi \int d\mathbf{r} e^{-i(\mathbf{G}-\mathbf{G}')\cdot\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \quad (12)$$

y a partir de ella se obtiene que:

$$v_{e-e}(\mathbf{G} - \mathbf{G}') = 4\pi \frac{\rho(\mathbf{G} - \mathbf{G}')}{|\mathbf{G} - \mathbf{G}'|^2} \quad (13)$$



De manera análoga,  $v_{xc}(G-G')$  corresponde a la transformada de Fourier del potencial de intercambio y correlación electrónica. Como ya se mencionó al inicio de este capítulo, en el cálculo que nos ocupa, se utilizó una aproximación local a  $v_{xc}$  con la parametrización de Perdew-Zunger.<sup>86</sup>

A partir de  $\rho(G)$ , y empleando la expresión:

$$\rho(r) = \sum_G \rho(G) e^{i(k+G)r} \quad (14)$$

se calcula  $\rho(r)$  y con este valor se procede a calcular  $v_{xc}(r)$  en una malla, para posteriormente hacer la transformada de Fourier numéricamente sobre la malla, con lo que se genera  $v_{xc}(G-G')$ .

En el caso del potencial de interacción núcleo-electrón, éste se aproxima por medio de pseudopotenciales.

### 3.2 Pseudopotenciales en la Descripción de la Interacción Núcleo-Electrón

De acuerdo con el teorema de Bloch, es factible desarrollar la función de onda completa de Kohn-Sham usando como base un conjunto de ondas planas, lo cual computacionalmente no es práctico, ya que se necesitan un gran número de ellas para describir las oscilaciones que presentan las funciones de onda de los electrones de valencia en la región cercana al núcleo (core), y en consecuencia, el cálculo de la estructura electrónica no sería factible debido a la cantidad de tiempo de cómputo requerido. El empleo de pseudopotenciales en la descripción de la interacción núcleo-electrón, permite el desarrollo de la función de onda con una considerable reducción en el número de ondas planas, y en consecuencia el método se vuelve computacionalmente viable.<sup>88</sup>

Fermi introduce en 1934 la aproximación por pseudopotenciales y, un año después, Hellmann propone que podría usarse en el cálculo de los niveles de energía de átomos alcalinos.<sup>95</sup> El objetivo de esta aproximación fue simplificar los cálculos de la estructura electrónica, al eliminar los orbitales del core y el fuerte potencial responsable de la atracción de los electrones en esa región, basándose en el hecho de que un gran número de las propiedades físicas y químicas de los sistemas pueden describirse de acuerdo con el comportamiento de los electrones de valencia.

Las funciones de onda de valencia oscilan rápidamente en la región ocupada por los electrones del core, debido al fuerte potencial iónico presente en esa región. Debido a estas oscilaciones, se mantiene la ortogonalidad entre las funciones de onda de los electrones del core y los electrones de valencia, requerida por el principio de exclusión. Al no considerar en el cálculo los electrones de la región del core, el potencial en dicha zona se suaviza (es menos atractivo) y, por consiguiente, las funciones de onda de valencia (pseudofunciones) no presentan nodos ni rápidas oscilaciones en tal región (funciones suaves). Por lo que el número de ondas planas necesario para describirlas se reduce considerablemente.

Inicialmente, los pseudopotenciales se obtenían modelando el potencial total efectivo que actúa sobre los electrones, de manera que éste fuese suave en la región del core, utilizando parámetros que eran ajustados hasta reproducir los datos experimentales como estructuras de bandas en sólidos. Estos pseudopotenciales se emplearon principalmente en el estudio de semiconductores, y fueron llamados pseudopotenciales empíricos.

Phillips y Kleinman,<sup>96</sup> basándose en el método de cálculo de bandas "a primeros principios", llamado OPW (orthogonalized plane waves), encontraron una justificación teórica al uso de esta aproximación. Son muy diversos los modelos que han sido desarrollados para generar pseudopotenciales "a primeros principios", entre los que se encuentran: pseudopotenciales Phillips-Kleinman; con conservación de la norma; Kleinman-Bylander y del tipo convergentes y transferibles. Este último modelo fue empleado en la generación de los pseudopotenciales utilizados en este trabajo.<sup>97</sup>

El desarrollo de los pseudopotenciales convergentes y transferibles tuvo como punto de partida el hecho de que la convergencia en la energía cinética de un pseudoátomo y la del sólido que lo contiene son muy semejantes.<sup>98</sup> La convergencia de la energía cinética del pseudoátomo es un indicador de gran precisión de la convergencia en la energía total y constituye una medida indirecta de la convergencia en la energía del sólido que lo contiene. Esto originó el uso de pseudofunciones con convergencia rápida en la energía cinética en la generación de pseudopotenciales a través de la inversión de la ecuación de Kohn-Sham. El objetivo es obtener una pseudofunción controlando convergencia en la energía cinética y la transferibilidad del pseudopotencial a otros ambientes químicos.

Tomando como punto de partida estos criterios, el pseudopotencial se genera modelando la pseudofunción de onda  $\psi_p$ , a través de funciones de Bessel esféricas  $j_i$ :

$$\Psi_{pl} = \theta(r_c - r) \sum_{i=1}^N \alpha_i j_i(q_i \cdot r) + \theta(r - r_c) \phi_l(r) \quad (15)$$

donde  $q_i$  son vectores de onda, seleccionados de tal forma que la pseudofunción es igual a la función real para  $r$  igual o mayor que un cierto radio de core,  $r_c$ . Para que el pseudopotencial generado sea transferible a otros ambientes químicos, las derivadas logarítmicas de la pseudofunción y de la función real deben ser las mismas.

En lo que respecta a la convergencia en la energía, la estrategia para alcanzarla rápidamente consiste en imponer un corte,  $q_c$ , en la definición de la base, con lo que se hacen a un lado las contribuciones a la energía cinética provenientes del intervalo ( $q_c \rightarrow \infty$ ) en espacio recíproco, y así, al minimizar dichas contribuciones, se asegura una mejor representación de la energía cinética total del sistema. Ambas restricciones pueden tratarse de forma simultánea, minimizando la siguiente ecuación:

$$\beta \left( - \int_0^{\infty} \Psi_l^*(r) \nabla^2 \Psi_l(r) dr - \int_0^{q_c} q^2 |\Psi_l(q)|^2 dq \right) + (1 - \beta) \left( \sum_{i=1}^M (\chi(E_i) - \gamma(E_i))^2 \right) \quad (16)$$

donde  $\chi$ , que es función de la energía, representa la derivada logarítmica de la función real para cierto radio de core. La función  $\gamma$  representa la derivada logarítmica de la pseudofunción. De esta manera, se obtiene la constante  $\alpha$  (presente en la ec. 15). Invertiendo la ecuación de Kohn-Sham utilizando la pseudofunción generada, se obtiene el pseudopotencial.<sup>98</sup>

La forma general del pseudopotencial generado es :

$$V_{NI} = \sum_l |Y_{lm} \langle v_l \rangle Y_{lm}| \quad (17)$$

Para llevar a cabo el estudio de la estructura electrónica de una molécula con el método FDBOP, es necesario generar un pseudopotencial por cada diferente átomo presente.<sup>97</sup> Sumando los pseudopotenciales para cada tipo de átomo, cada uno multiplicado por un factor de estructura<sup>98</sup> (ecuación 18), que contiene la información de la posición del ion en la molécula, se obtiene la aproximación al potencial total de interacción núcleo-electrón,  $V_{N-e}$ , de la ec. (10).

$$S_\alpha(G - G') = \frac{1}{N_c v} \sum_\beta e^{-i(G-G')r_\beta} \quad (18)$$

Para el caso de un sistema poliatómico, el pseudopotencial total es:

$$V_{ps,\alpha}(k + G, k + G') = \sum_\alpha S_\alpha(G - G') v_{NI,\alpha}(k + G, k + G') \quad (19)$$

donde  $\alpha$  etiqueta los diferentes átomos,  $S_\alpha$  es el factor de estructura definido en la ec. (18) y  $v_{NI,\alpha}$  es la transformada de Fourier del potencial no local.

De especial relevancia son los parámetros radio de core,  $r_c$ , y energía cinética máxima,  $q_c$ , ya que deben ser fijados de forma tal que el pseudopotencial sea el óptimo, esto es, que sea generado con el mínimo de ondas planas, la pseudofunción se desarrolle con el número mínimo de funciones base, y el pseudopotencial sea capaz de reproducir resultados precisos. No obstante lo anterior,  $r_c$  y  $q_c$  no son parámetros arbitrarios.  $r_c$  se escoge de acuerdo al formalismo descrito en párrafos anteriores y  $q_c$  tiene un valor mínimo para el cual la energía del sistema ha convergido por completo.<sup>98</sup>

### 3.3 Métodos de Minimización Iterativa

Como ha sido mencionado con anterioridad, en el contexto de la Teoría de Funcionales de la Densidad, el problema del cálculo de la estructura electrónica de un sistema se reduce a resolver el conjunto de ecuaciones propuestas por Kohn-Sham ec. (2), que en espacio recíproco adquiere la forma de la ec. (10) y habitualmente se resuelve diagonalizando la matriz resultante. El costo computacional de la diagonalización de dicha matriz se incrementa como la tercera potencia del número de funciones base.

En un cálculo de estructura electrónica, utilizando pseudopotenciales, aun para sistemas que contienen unos cuantos átomos en la celda unitaria, el número de ondas planas por cada átomo es del orden de 100 en los casos más favorables, lo que marca una gran limitante en el número de átomos por celda unitaria que se pueden estudiar. El uso de técnicas alternativas, como dinámica molecular<sup>99</sup> y gradientes conjugados<sup>100</sup> en la diagonalización de matrices, ha permitido incrementar en un orden de magnitud el número de átomos o electrones de los sistemas a tratar.

La filosofía de los cálculos de estructura electrónica donde se emplean pseudopotenciales se transformó con el método de dinámica molecular, desarrollado por Car y Parrinello.<sup>99</sup> En lugar de determinar el conjunto mínimo de coeficientes de ondas planas diagonalizando la matriz de Kohn-Sham, Car y Parrinello consideraron que una minimización directa de la energía tendría mayor eficiencia si los grados de libertad iónico y electrónico se trataran en forma equivalente. Para realizar la minimización introdujeron una técnica iterativa de optimización, donde los coeficientes de las ondas planas son tratados como partículas ficticias interactuando a través de un lagrangiano clásico. La integración de las ecuaciones de movimiento para estas partículas conduce a la configuración que minimiza la energía total del sistema.

El método de gradientes conjugados<sup>100</sup> consume en ciertos casos, un orden de magnitud menos de tiempo de CPU que los mejores esquemas de dinámicas electrónicas ficticias. Sin embargo, la memoria disponible en las supercomputadoras vectoriales convencionales limita ambos métodos a sistemas que involucran alrededor de 100 átomos.

Aunado a las técnicas mencionadas, el uso de computadoras masivamente paralelas abre una nueva expectativa para el estudio de sistemas con un gran número de átomos o electrones, ya que el tiempo empleado por el proceso se reduce. En este trabajo de tesis, se utilizó la versión paralelizada del código, que incluye como método de minimización iterativa, la dinámica molecular de Car y Parrinello.

### 3.3.1 Algoritmo Car-Parrinello

El método consiste en aplicar el formalismo de la dinámica molecular al problema de encontrar el conjunto de coeficientes  $\{c_i\}$  que satisfagan la ec. (10). El problema a resolver es encontrar aquél conjunto de posiciones de las moléculas  $\{x_i\}$  que cumplan con las ecuaciones de movimiento :

$$\frac{d}{dt} \frac{\partial L}{\partial x_i} + \frac{\partial L}{\partial x_i} = 0, \forall x_i \quad (20)$$

El lagrangiano está definido por :

$$L = T - V \quad (21)$$

En la expresión anterior, T representa la energía cinética y V la energía potencial.

Car y Parrinello aplicaron esta idea en el espacio de funciones en las cuales se desarrolla la función de onda.<sup>99</sup> Un lagrangiano para un sistema electrónico se define como:<sup>88</sup>

$$L = \sum_i \mu \langle \dot{\psi}_i | \dot{\psi}_i \rangle - E [\{\psi_i\}, \{R_i\}, \{\alpha_n\}] \quad (22)$$

donde  $\mu$  es una masa ficticia asociada con la dinámica de los coeficientes de la función de onda, E es el funcional de energía de Kohn-Sham que ocupa el lugar de la energía potencial en una formulación clásica del lagrangiano,  $R_i$  es la posición del ion i, y  $\alpha_n$  define las dimensiones tamaño y de la celda unitaria. Adicionando al lagrangiano la restricción de ortonormalidad para las funciones de onda, la expresión resultante es:<sup>88</sup>

$$L = \sum_i \mu \langle \dot{\psi}_i | \dot{\psi}_i \rangle - E [\{\psi_i\}, \{R_i\}, \{\alpha_n\}] + \sum_{i,j} \Lambda_{i,j} \left[ \int \psi_i^*(r) \psi_j(r) dr \right] - \delta_{ij} \quad (23)$$

Entonces las ecuaciones de movimiento para los estados electrónicos serían de la forma:

$$\frac{d}{dt} \left[ \frac{\partial L}{\partial \dot{\psi}_i^*} \right] = - \frac{\partial L}{\partial \psi_i^*} \quad (24)$$

dando lugar a:

$$\mu \ddot{\psi}_i = -\mathbf{H}\psi_i + \sum_j \Lambda_{ij}\psi_j \quad (25)$$

Con el objeto de hacer la ec. (25) más tratable, los multiplicadores indeterminados de Lagrange se consideran independientes del tiempo, con lo cual las funciones de onda obtenidas en cada intervalo de tiempo no son ortonormales, por lo que la ortonormalización tendrá que hacerse posteriormente. De esta manera, se puede trabajar con una ecuación de movimiento para las funciones monoeléctricas parcialmente restringida, donde los multiplicadores indeterminados son aproximados a través de los valores esperados de las funciones de onda:<sup>90</sup>

$$\mu \ddot{\psi}_i = -[\mathbf{H} - \lambda_i] \psi_i \quad (26)$$

Empleando el algoritmo de Verlet<sup>101</sup> para integrar la ecuación anterior se tiene:<sup>88</sup>

$$\psi_i(\Delta t) = 2\psi_i(0) - \psi_i(-\Delta t) - \frac{\Delta t^2}{\mu} [\mathbf{H} - \lambda_i] \psi_i(0) \quad (27)$$

Siendo  $\Delta t$  la longitud del paso en el tiempo,  $\psi_i(0)$  el valor del estado en  $\Delta t$  presente y  $\psi_i(-\Delta t)$  el valor en el paso anterior. La ec. (27) se resuelve de manera autoconsistente hasta obtener una solución estacionaria, teniéndose una ecuación de este tipo por cada orbital que se desee calcular. Después se tendrá que ortonormalizar la función de onda.

El conjunto de soluciones estacionarias  $\{\psi_i\}$  a las ecuaciones como la ec. (27), son las soluciones que satisfacen las ecuaciones de Kohn-Sham.

Al considerar una base de ondas planas para desarrollar la función  $\psi_i$  (ec. (8)) e integrando la ec. (26), ésta se transforma en:



$$\mu \ddot{C}_{i,k+G} = - \left[ \frac{1}{2} |k + G|^2 - \lambda_i \right] C_{i,k+G} - \sum_{G'} [v_{N-e}(k + G, k + G') + v_{e-e}(G - G') + v_{xc}(G - G')] C_{i,k+G} \quad (28)$$

Se tiene una ecuación como la anterior por cada coeficiente del orbital  $\psi_i$ . Integrando el conjunto de ecuaciones resultantes con el algoritmo de Verlet, en el contexto de un esquema autoconsistente, se obtiene el conjunto de coeficientes  $\{c_i\}$  que cumplen con la ec. (10).

En la figura 14 se esquematiza el algoritmo de Car-Parrinello, implementado por Brommer y col.<sup>102</sup> en una supercomputadora con arquitectura paralela. Comienza tanto con una configuración iónica como con una función de onda de prueba, con un conjunto inicial de coeficientes de ondas planas. A partir de esta función de onda, se calcula una densidad de carga inicial, la cual es usada en los potenciales de Hartree, intercambio y correlación y en los pseudopotenciales local y no local.

Enseguida, se calcula la energía total correspondiente a la función de onda de prueba y los coeficientes de las ondas planas son actualizados a través de la integración de sus ecuaciones ficticias de movimiento, de acuerdo al esquema de Car-Parrinello.

Después de la integración de las ecs. de movimiento, la función de onda es reortogonalizada y partiendo de este punto, comienza la siguiente iteración. Después de cada cinco a diez iteraciones, se calculan las fuerzas iónicas y los iones son movidos con objeto de relajarlos simultáneamente con la función de onda. Este desarrollo continúa hasta que ya no se observa un cambio sustancial en la energía total y fuerzas iónicas de una iteración a la siguiente.

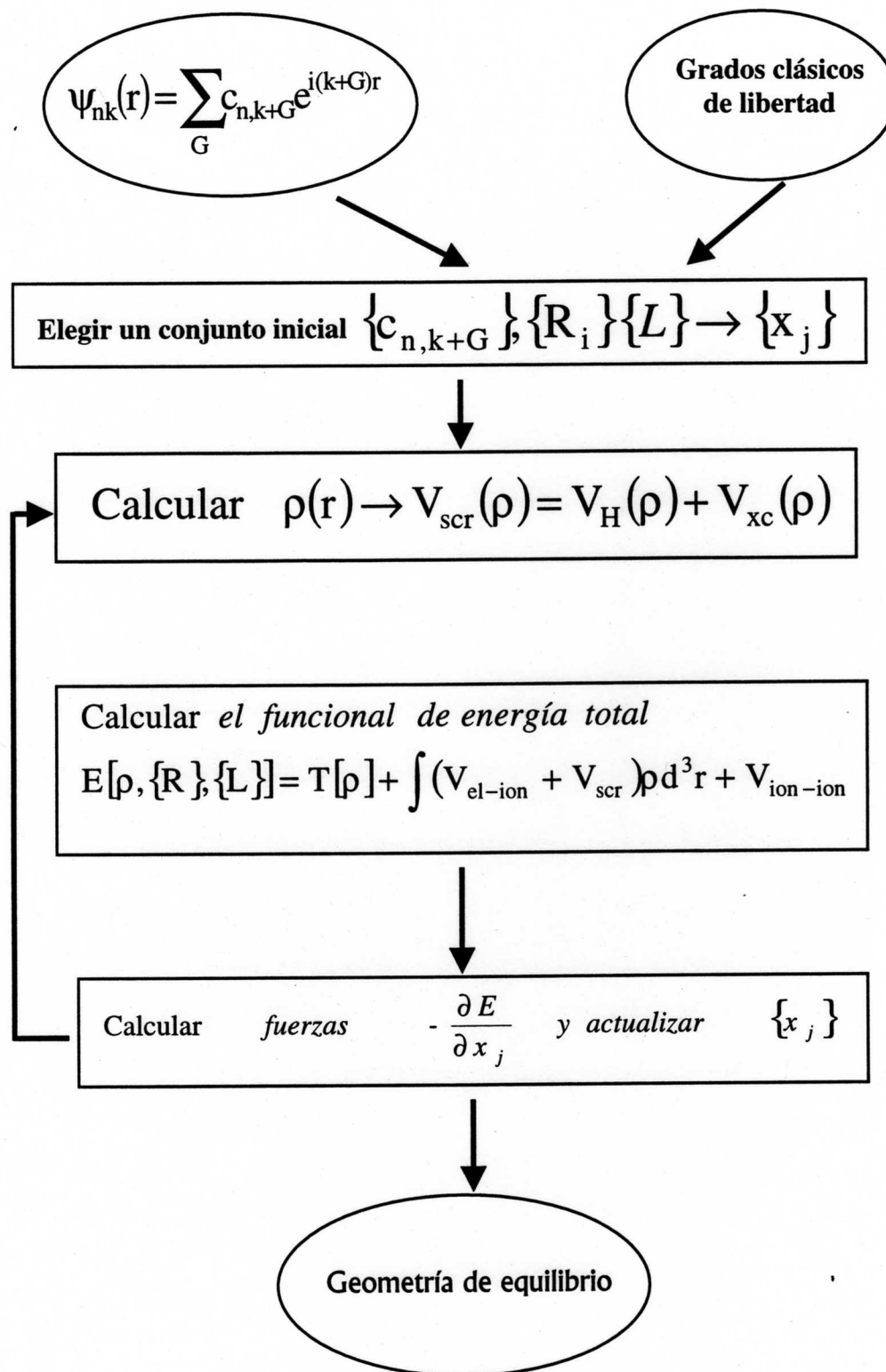


Figura 14. Algoritmo de Carr-Parrinello implementado en una supercomputadora con arquitectura paralela<sup>102</sup>.

### 3.4 Uso de Superceldas

Cuando se utiliza una base de funciones periódicas, como las ondas planas, en la descripción de un *sistema no periódico*, los resultados que se obtienen son erróneos si no se restablece la *no periodicidad* del sistema de alguna forma. La manera de hacerlo, consiste en crecer el tamaño de la celda unitaria para evitar cualquier interacción del sistema con las celdas vecinas. En teoría, se requeriría una celda de dimensiones infinitas para aislar por completo al sistema, y consecuentemente el cálculo no sería viable, pues el número de ondas planas crece con el tamaño de la celda de acuerdo con la relación  $\mathbf{G} \cdot \mathbf{R} = 2\pi m$ , donde  $\mathbf{G}$  son los vectores de la malla recíproca,  $\mathbf{R}$  los vectores de la malla de Bravais y  $m$  es cualquier entero.

Rappe<sup>98</sup> e Ireta,<sup>97,103</sup> entre otros, han aplicado exitosamente la técnica de la supercelda en el estudio de moléculas pequeñas. En dichos trabajos, se han utilizado superceldas de dimensiones tales que aseguren que las moléculas se separan por lo menos la suma de sus radios de van der Waals. Los pseudopotenciales utilizados por ambos, fueron del tipo convergentes y transferibles.

En su trabajo, Ireta hace la descripción de la molécula de cisteína, la cual contiene todos los átomos presentes en polipéptidos comunes (C,H, O , N, y S), analizando parámetros y propiedades de enorme interés. Los pseudopotenciales generados para dicho estudio, fueron utilizados en el cálculo efectuado en el presente trabajo de tesis.

### 3.5 *Blandura Local*: un Criterio de Reactividad en la Teoría de Funcionales de la Densidad

Entre las características principales de la Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD), se encuentra la posibilidad de poder identificar parámetros de su formalismo matemático con parámetros de reactividad química.<sup>5</sup>

Uno de estos parámetros, descritos por TFD, es la blandura.<sup>5,104</sup>

$$S = \left( \frac{\partial N}{\partial \mu} \right)_{v(r)} \quad (29)$$

el cual se encuentra relacionado con fluctuaciones en la densidad electrónica. En la ec. anterior,  $N$  es el número de electrones del sistema,  $\mu$  representa el potencial químico y  $v$  es el potencial externo.

La blandura local fue introducida dentro del contexto de la extensión a temperaturas finitas de la TFD.<sup>105</sup> En este formalismo, el gran potencial es un funcional de la densidad :

$$\Omega [\rho(r)] = \int (v(r) - \mu) \rho(r) dr + F[\rho(r)] \quad (30)$$

$F[\rho(r)]$  es un funcional universal de la densidad, que incorpora la energía cinética, la interacción electrón-electrón y un término de entropía. En esta representación de TFD, las variables naturales son la temperatura,  $T$ , volumen,  $V$ , y el potencial químico.

De acuerdo con Yang y Parr,<sup>104</sup> la blandura local es definida como

$$s(r) = \left[ \frac{\partial \rho(r)}{\partial \mu} \right]_{v(r), T} \quad (31)$$

Tres expresiones alternativas para  $s(r)$  le han conferido a esta cantidad un lugar preponderante entre los índices de reactividad local definidos en el contexto de TFD. La primera expresión fue obtenida por Yang y Parr,<sup>104</sup>

$$s(r) = \frac{1}{kT} (\langle \rho(r)N \rangle - \langle \rho(r) \rangle \langle N \rangle) \quad (32)$$

donde  $N$  es el número de electrones, y  $\langle \rangle$  implica un promedio sobre el ensamble gran canónico. Esta expresión indica que fluctuaciones locales en  $\rho(\mathbf{r})$  van acompañadas con cambios en la blandura local. Yang y Parr señalan que la relevancia de este hecho en catálisis, está relacionada con la idea de Falicov y Somorjai<sup>106</sup> que la actividad catalítica en metales de transición está asociada con fluctuaciones electrónicas de baja energía. La segunda relación establece que la blandura local y la derivada de la densidad con respecto al número de electrones, la función de Fukui,<sup>107</sup>  $f(\mathbf{r})$ , tiene la misma información local

$$s(\mathbf{r}) = \left[ \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial \mu} \right]_{v(\mathbf{r})} = S f(\mathbf{r}) \quad (33)$$

y la blandura global<sup>5,104</sup> viene dada por

$$S = \int s(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (34)$$

Como ha sido indicado,<sup>107</sup> si se emplea la aproximación de "core congelado",  $f(\mathbf{r})$  se reduce a la densidad del orbital más alto ocupado o a la densidad del orbital más bajo desocupado (orbitales de frontera), dependiendo del proceso de transferencia de carga considerado para realizar la derivación con respecto a  $N$ ; consecuentemente, la ec. (33) indica que  $s(\mathbf{r})$  incluye el comportamiento de los orbitales de frontera como un caso límite. La tercera expresión,<sup>108</sup>

$$s(\mathbf{r}) = \left[ \frac{\partial N}{\partial v(\mathbf{r})} \right]_{\mu, T} \quad (35)$$

da una interpretación de  $s(\mathbf{r})$  de gran interés para el propósito de obtener un índice que distinga capacidades regionales para efectos de transferencia de carga: *la blandura local proporciona una medida de la capacidad de ese sitio para aceptar o donar electrones en un punto particular del espacio de acuerdo al cambio de potencial*

*externo en ese punto*, cambio que puede suscitarse cuando otra especie química interactúa con esa zona del sistema.

La utilidad de la dureza y la blandura en sistemas extendidos se ha señalado en diversas aplicaciones de estos conceptos.<sup>109,110,111</sup> Si se considera la superficie de un semiconductor, se puede extender la definición de  $s(\mathbf{r})$ , dada por Yang y Parr para metales, a sistemas con un gap.

El tratamiento de las siguientes ecuaciones se ha hecho por simplicidad a temperatura cero, pero puede extenderse a una temperatura finita. La densidad de carga  $\rho(\mathbf{r})$  para un sistema en estado sólido puede expresarse como

$$\rho(\mathbf{r}, \mu) = \int_0^{\mu} dE g(\mathbf{E}, \mathbf{r}) \quad (36)$$

donde  $g(\mathbf{E}, \mathbf{r})$  es la densidad de estados local

$$g(\mathbf{E}, \mathbf{r}) = \sum_i |\psi_i(\mathbf{r})|^2 \delta(\mathbf{E} - E_i) \quad (37)$$

El potencial químico,  $\mu$ , es igual al nivel de Fermi  $E_F$ . La función de onda  $\psi_i(\mathbf{r})$  está asociada con el eigenvalor  $E_i$ . De acuerdo a la definición de  $s(\mathbf{r})$  dada en la ec. (31), se puede tomar la derivada de la densidad con respecto al potencial químico. Empleando las ecs. (31) y (36), la blandura local puede escribirse en la forma:

$$\left( \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial \mu} \right)_{T, v(\mathbf{r})} = \lim_{\delta\mu \rightarrow 0} \frac{1}{\delta\mu} \int_{\mu}^{\mu + \delta\mu} dE g(\mathbf{E}, \mathbf{r}) \quad (38)$$

que es una expresión del tipo "core congelado". En general,  $\delta\mu$  puede ser positivo o negativo, por lo que tiene dos derivadas diferentes, asociadas a procesos de transferencia de carga en dos direcciones opuestas.

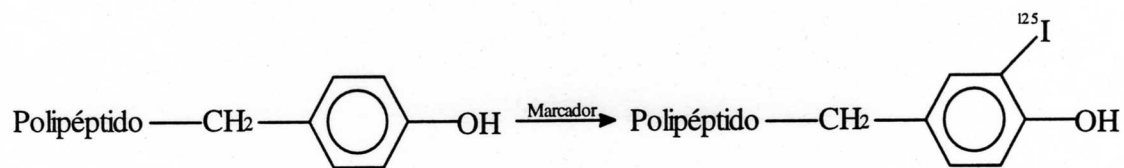
De acuerdo con el material presentado a lo largo de este capítulo, es factible utilizar los datos obtenidos por el método FDBOP y el formalismo dado por la TFD, para estimar teóricamente el comportamiento de diferentes sitios en una molécula al interactuar con otro sistema y desarrollar un estudio de estructura electrónica de caribdotoxina moniodada y el efecto que sobre ésta tiene la yodación en el residuo Tyr36.

## 4 CÁLCULO DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE LA CARIBDOTOXINA MONOIODADA

La iodación radiactiva es una técnica empleada con frecuencia para marcar una proteína con un isótopo radiactivo con el propósito de determinar la presencia de cierto aminoácido en la estructura o si es trascendental para la estructura y función de la misma. Esta modificación química se efectúa primordialmente sobre la tirosina, debido a que su grupo fenólico es muy vulnerable a la iodación directa, aunque los grupos R de la histidina, cisteína y metionina también son susceptibles de ataque. El  $^{125}\text{I}$  es uno de los núclidos de iodo más utilizado para estos propósitos.

Son diversos los agentes empleados para el marcaje radiactivo de proteínas y particularmente de ChTX con  $^{125}\text{I}$ .<sup>4,112</sup> En el rango de valores de pH 7-8, la posición orto del anillo aromático de tirosina es activado para un ataque de naturaleza electrofílica, a causa del efecto donador del grupo hidroxilo.

La reacción general que se efectúa es:



La geometría de ChTX se obtuvo a partir de datos experimentales de RMN.<sup>24,43,113</sup> La iodación se efectuó sobre el residuo Tyr36 (fig. 15a). La distancia  $C_{Ar-I}$  se ajustó a un valor promedio de 2.09 Å.<sup>114</sup>

Para el cálculo sólo se consideró el derivado monoiodado, por ser éste el que ha sido estudiado a nivel experimental.

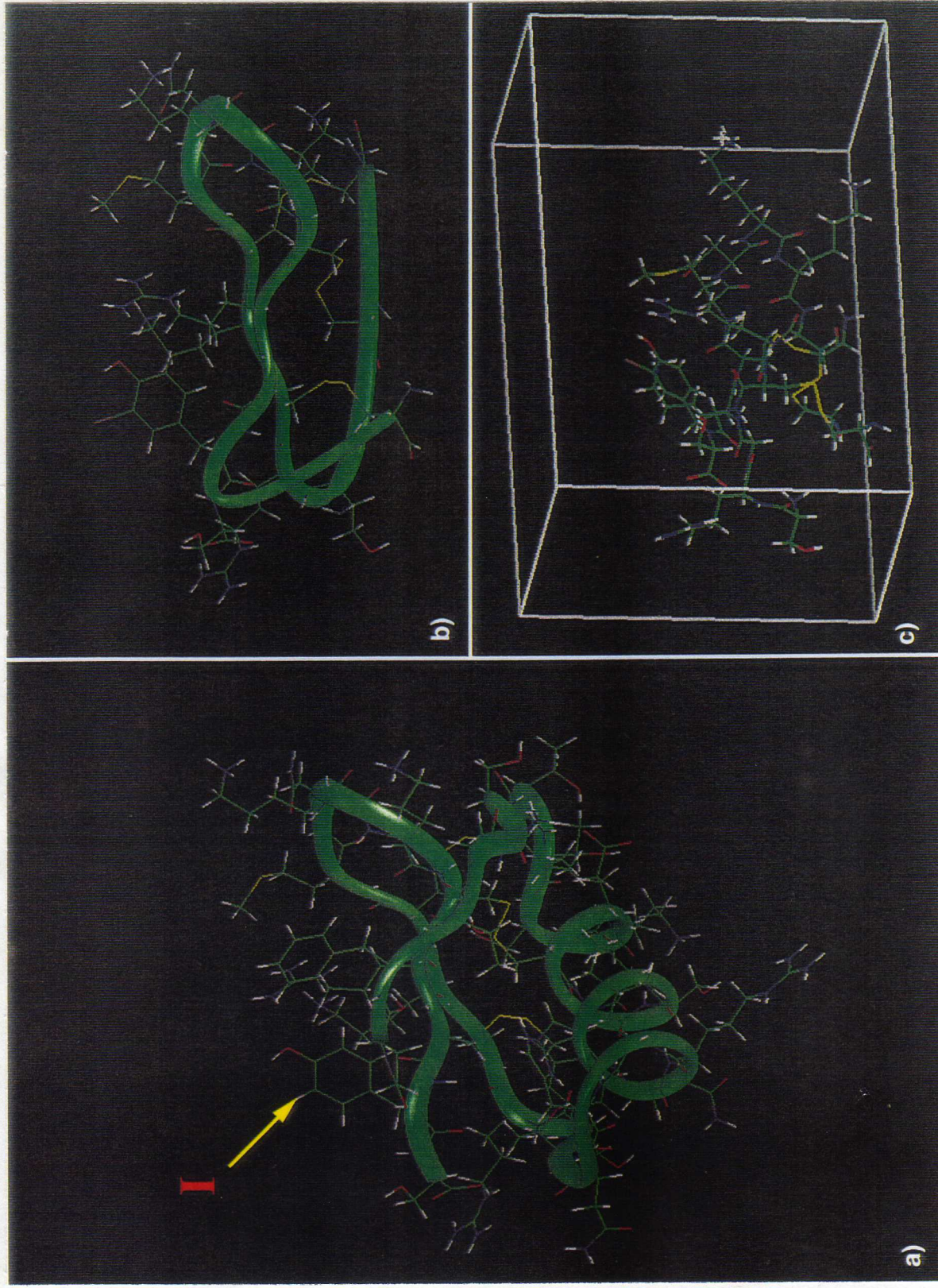


En un estudio previo, Ireta y col.<sup>115</sup> realizan el cálculo de la estructura electrónica de ChTX y de ChTX sin la estructura hélice  $\alpha$ . En sus resultados se aprecia claramente que la forma de  $N(E)$  para ambos polipéptidos es prácticamente la misma. La semejanza observada en  $N(E)$  entre ChTX y ChTX-hoja  $\beta$  sugiere que la forma de esta cantidad es independiente del motif estructural (hoja  $\beta$  o hélice  $\alpha$ ). Este cálculo utilizó un corte en la energía de 6 Ry.

Tomando como base el argumento dado por el estudio mencionado en el párrafo anterior, se decidió aislar la hoja  $\beta$  plegada antiparalela (figura 15b). Este elemento de estructura secundaria contiene la mayor parte de la zona de interacción con el canal de  $K^+$  y el único residuo de tirosina presente en la molécula.

Se realizó el cálculo de la estructura electrónica para dicho fragmento, con y sin iodación (fragmentos ChTX-hoja  $\beta$  y ChTX-hoja  $\beta$  iodada). Las dimensiones de las superceldas empleadas para ambos fragmentos fueron: 30.64x18.37x15.14 Å. El tamaño de esta celda unitaria nos permite tratar el sistema de estudio como una molécula aislada, ya que se incluye un vacío equivalente al menos a la suma de los radios de van der Waals de átomos adyacentes, evitándose así posibles interacciones entre celdas vecinas.

La estructura electrónica de ambos fragmentos se obtuvo calculando la energía total del sistema empleando pseudopotenciales, metodología descrita en el capítulo anterior. Al emplear una base de ondas planas en la resolución de las ecuaciones de Kohn-Sham, es necesario muestrear la Zona de Brillouin (BZ), para lo que se han desarrollado diversas técnicas; en este caso particular se ha utilizado el punto  $\Gamma(0,0,0)$ , ya que ha dado resultados aceptables en el tratamiento de moléculas.<sup>100,103,116,117</sup>



**Figura 15.** Técnica de la supercelda. (a) Iodación de ChTX en el residuo Tyr36. (b) Estructura ChTX hoja  $\beta$  iodada. (c) Supercelda (30.64x18.37x15.14 Å) empleada en el cálculo de estructura electrónica.

También se ha hecho mención en este trabajo del rol preponderante que en esta metodología juegan la precisión en la descripción de la interacción electrón-electrón y la base empleada para la expansión de los orbitales de Kohn-Sham. El cálculo se efectuó con una aproximación local al potencial de intercambio y correlación (parametrización de Perdew-Zunger).<sup>86</sup>

En el caso de la base de ondas planas, se usó un corte en la energía de 10 Ry, aproximación que debe tomarse con cautela por truncar de manera tan drástica la base. Sin embargo, en estudios precedentes<sup>115</sup> se ha encontrado que a pesar de utilizar un corte bajo es posible rescatar muchos aspectos de estructura electrónica, tales como enlaces sigma, pi y pares libres. Para el desarrollo se requirieron 31744 ondas planas y la transformada de Fourier se realizó en una malla de 128x128x64. Aunado a lo anterior, no debe perderse de vista que el sistema de estudio presenta una carga neta de +4, y que este hecho introduce un factor constante de error en la energía total, que es inversamente proporcional al volumen de la celda unitaria.<sup>118</sup>

Los aspectos arriba mencionados circunscriben el presente análisis a un marco de descripción cualitativa de la transferencia de carga y capacidad de interacción electrostática.

Ya que sólo se consideran los electrones de valencia, el número de orbitales ocupados para la estructura ChTX-hoja  $\beta$  es de 367 y de 370 para la estructura ChTX-hoja  $\beta$  yodada. En ambos casos, se evaluaron 34 orbitales virtuales.

Los pseudopotenciales empleados son del tipo convergentes y transferibles,<sup>97</sup> y en el caso del pseudopotencial del yodo, éste incluye efectos relativistas.

Con los parámetros anteriores, se desarrolló el proceso autoconsistente en la búsqueda de los eigenvalores para las ecuaciones de Kohn-Sham, bajo el esquema de Car-Parrinello y dado el tamaño del sistema, se requirió del cómputo en paralelo, utilizándose la supercomputadora CM-5 con 32 procesadores y 1 Gb de memoria RAM. La convergencia en la energía total se llevó hasta  $10^{-3}$  eV.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del cálculo de densidad de estados, potencial electrostático, blandura local, así como de la asignación de las distintas bandas formadas en el polipéptido.

#### 4.1 Densidad de Estados y Estructura de Bandas

Una de las limitaciones que hay que enfrentar al efectuar cálculos de energía total con pseudopotenciales, para estudiar biomoléculas, es que contienen átomos de primera fila. Esto implica el uso de cortes altos en la energía para generar los pseudopotenciales, una situación que prácticamente prohíbe el estudio de polipéptidos que contienen cientos de átomos, ya que el número de ondas planas en la base es considerable.

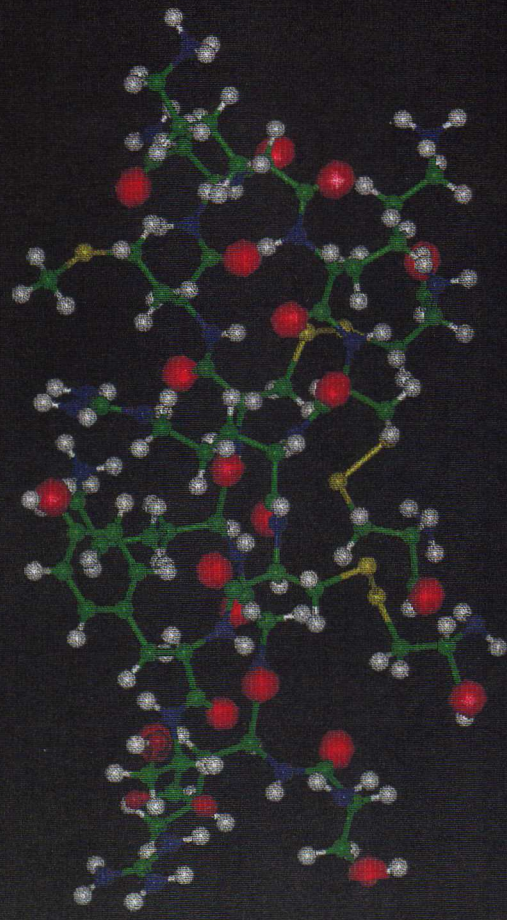
Para realizar cálculos de este tipo de sistemas, que sean computacionalmente factibles, una posibilidad es usar un corte más bajo que aquél implicado en la generación de los pseudopotenciales. Este procedimiento se fundamenta en una calibración que proporciona una idea de la cantidad de información que se pierde por truncar la base de esta manera.

Este tipo de calibración fue hecho recientemente en el estudio de pequeños sistemas moleculares<sup>103</sup> y ya se cuenta con resultados aceptables para un polipéptido de más de 500 átomos.<sup>115</sup> Los pseudopotenciales usados en este trabajo fueron generados con un corte de 40 Ry.<sup>97</sup>

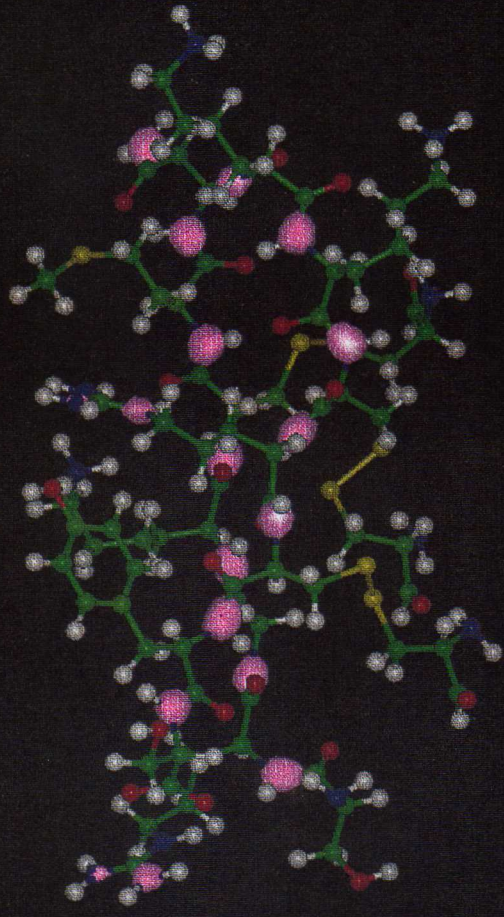
A pesar del bajo corte en la energía usado en este trabajo (10 Ry), la densidad de carga obtenida para las estructuras ChTX-hoja  $\beta$  y ChTX-hoja  $\beta$  yodada, preserva aspectos relevantes de la estructura electrónica del polipéptido, tal y como ha sido mostrado en estudios precedentes.<sup>115</sup>

Para identificar y asignar las bandas formadas a causa de la naturaleza polimérica del sistema de estudio, las figuras 16 y 17 muestran la densidad de estados  $N(E)$  obtenida en el punto  $\Gamma$  en la primera zona de Brillouin. La forma de  $N(E)$  es prácticamente la misma para ambos polipéptidos. En ambas gráficas se aprecia la clara definición de seis agrupaciones de estados electrónicos (que a partir de este momento serán referidas como bandas), etiquetadas en orden ascendente al avanzar de los niveles más profundos hacia el nivel de Fermi ( $E_f$ ).

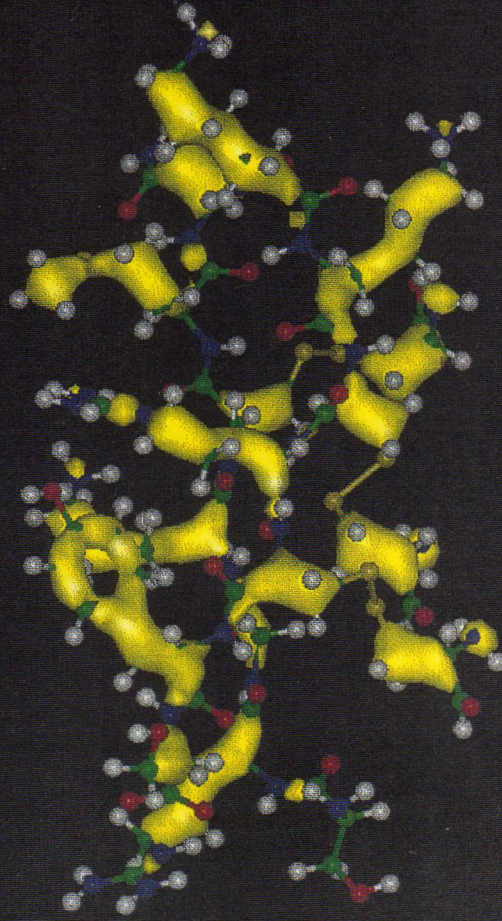
Las diferencias que se pueden apreciar entre la estructura yodada y la que no lo está corresponde a un ligero corrimiento de las bandas hacia la izquierda, debido a la introducción de los estados electrónicos del yodo; además el nivel de Fermi es más profundo para la estructura yodada.



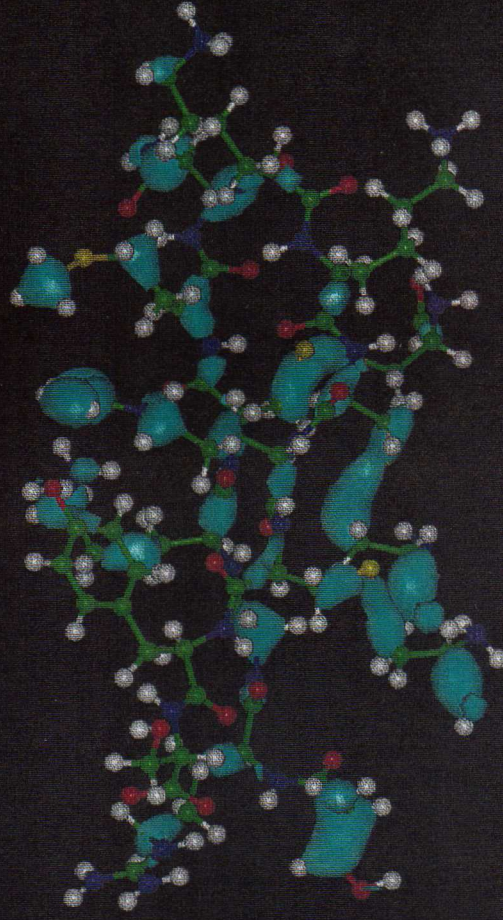
**Banda 1**



**Banda 2**



**Banda 3**



**Banda 4**

**Figura 18.** Isosuperficies de la densidad local de estados integrada por bandas de acuerdo a las figuras 16 y 17. (a) La banda 1 corresponde a enlaces sigma de los oxígenos de grupos carbonilo. (b) En la banda 2, la densidad se localiza sobre nitrógenos y azufres. (c) Banda 3, la densidad se encuentra localizada principalmente en los enlaces C-C de las cadenas laterales hidrocarbonadas. (d) En la banda 4, la densidad se encuentra localizada en los enlaces nitrógeno-hidrógeno, oxígeno-carbono y sobre pares libres del oxígeno. Las isosuperficies de densidad de ambas

### 4.1.1 Asignación de Bandas

Una característica muy importante de una banda es su dispersión o ancho de banda, que es la diferencia entre los niveles de energía más alto y más bajo. La amplitud de una banda es determinada por el traslape de los orbitales interactuantes, a mayor traslape mayor amplitud de banda.

Las características electrónicas asociadas a cada banda, se obtuvieron a partir de la proyección de la densidad correspondiente (isosuperficies), sobre la estructura de ambos polipéptidos. Cabe mencionar que los contornos de densidad (figuras 18 - 21), fueron seleccionados con un criterio cualitativo de visualización.

Las isosuperficies de densidad para las bandas 1 a 4 de ambas estructuras, muestran características electrónicas muy similares (figura 18). La banda 1 es muy estrecha y como cabría esperar, la densidad en esta región se encuentra muy localizada, concentrándose sobre los oxígenos de los grupos carbonilo. En lo que respecta a la banda 2, esta también es estrecha, existiendo una gran localización de la densidad sobre nitrógenos y azufres. La tercera banda tiene una mayor deslocalización de carga. La densidad se encuentra localizada en los carbonos  $\alpha$  unidos a nitrógeno o azufre y en los enlaces carbono-carbono de las cadenas laterales hidrocarbonadas. En la cuarta banda la densidad se encuentra localizada en los enlaces nitrógeno-hidrógeno, oxígeno-carbono y sobre los pares libres del oxígeno. La banda 5 para ambas estructuras es una banda ancha, con amplio traslape, la densidad se encuentra muy deslocalizada (figuras 19a y 20a). Es una banda asociada fundamentalmente a enlaces con hidrógeno. En lo que respecta a la banda 6 o banda de valencia (en ella se ubica el nivel de Fermi), las contribuciones provienen de nubes  $\pi$  de anillos aromáticos y pares libres de oxígeno, nitrógeno y azufre. Vale la pena mencionar que los estados electrónicos correspondientes al yodo sólo aparecen en esta banda (figura 20b).

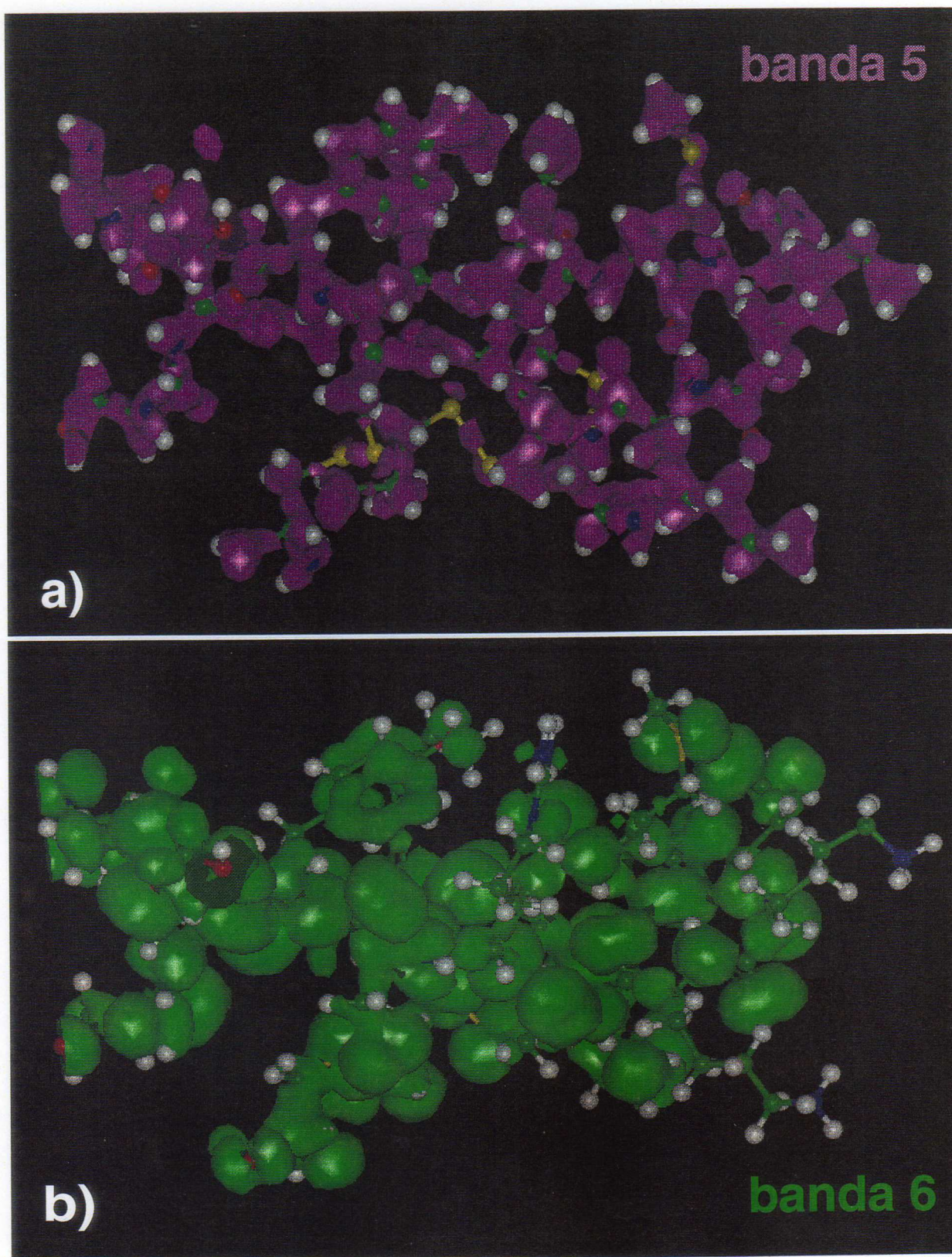
La figura 21 muestra la banda correspondiente a los orbitales virtuales para ambas estructuras. Como se puede apreciar, existe una gran concentración de estados electrónicos en los residuos Lys27, Lys31, Lys32, Arg25 y Arg34. Estos residuos se encuentran cargados en la estructura. Lys27, Arg25 y Arg34 son considerados cruciales para la funcionalidad de la toxina.<sup>3</sup>

En la tabla IV se muestran los anchos de banda obtenidos para las estructuras de estudio.

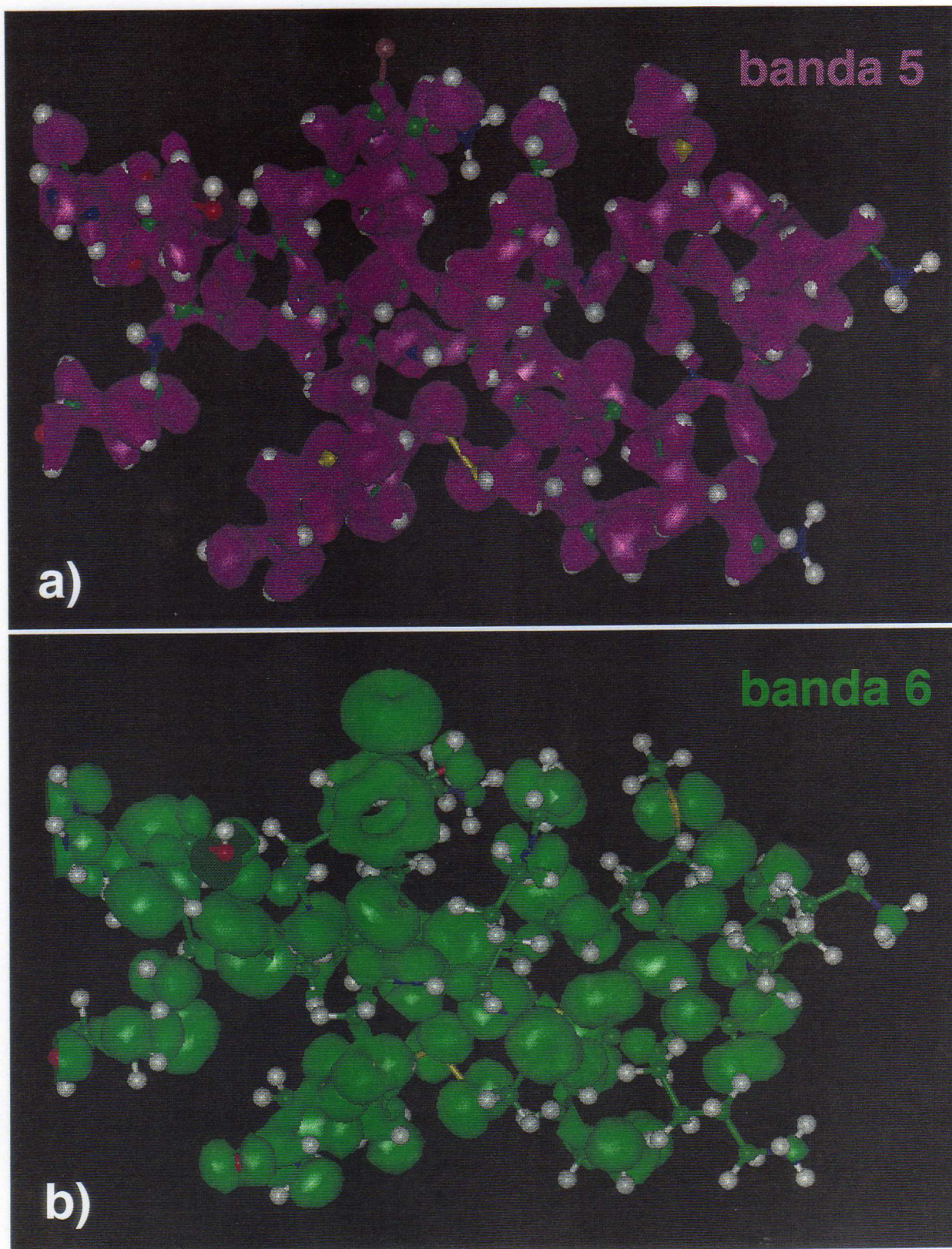
Tabla IV. Bandas características de ChTX-hoja  $\beta$  y ChTX-hoja  $\beta$  yodada

Banda	Polipéptido	Ancho de banda (eV)
1	ChTX-hoja $\beta$	1.78
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	1.69
2	ChTX-hoja $\beta$	1.94
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	2.54
3	ChTX-hoja $\beta$	2.46
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	2.62
4	ChTX-hoja $\beta$	1.57
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	4.62
5	ChTX-hoja $\beta$	12.01
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	6.28
6	ChTX-hoja $\beta$	2.63
	ChTX-hoja $\beta$ yodada	3.08





**Figura 19.** Bandas 5 y 6 de CTX-hoja  $\beta$ . Isosuperficies de la densidad local de estados correspondientes a integrada por bandas de acuerdo a las figura 16 . (a) La banda 5 presenta amplio traslape. La densidad se encuentra muy deslocalizada. Es una banda asociada fundamentalmente a enlaces con hidrógeno. (b) La banda 6 (banda de valencia), contiene al nivel de Fermi, las contribuciones provienen de nubes  $\pi$  de anillos aromáticos y pares libres de oxígeno, nitrógeno y azufre.



**Figura 20.** Bandas 5 y 6 de CTX-hoja  $\beta$  yodada. Isosuperficies de la densidad local de estados correspondientes a integrada por bandas de acuerdo a las figura 17 . (a) La banda 5 presenta amplio traslape. La densidad se encuentra muy deslocalizada. Es una banda asociada fundamentalmente a enlaces con hidrógeno. (b) La banda 6 (banda de valencia), contiene al nivel de Fermi, las contribuciones provienen de nubes  $\pi$  de anillos aromáticos y pares libres de oxígeno, nitrógeno y azufre. Los estados electrónicos correspondientes al yodo sólo aparecen en esta banda.



**Figura 21.** (a) Orbitales virtuales de ChTX hoja  $\beta$ . (b) Orbitales virtuales de ChTX hoja  $\beta$  yodada. Existe una acumulación de densidad en los residuos Lys27, Lys31, Lys32, Arg25 y Arg34. Estos residuos se encuentran cargados en la estructura. Lys27, Arg25 y Arg34 son considerados cruciales para la funcionalidad de la toxina.<sup>3</sup>

## 4.2 Potencial Electrostático

El desarrollo y optimización de métodos que permitan la elucidación y predicción del comportamiento reactivo de moléculas ha sido un tema de búsqueda continua en la Química Teórica. Durante la segunda mitad del presente siglo, se han introducido diversos índices de reactividad con el objeto de proporcionar una medida de la actividad química de regiones de interés en moléculas. Entre estas cantidades se encuentran las cargas atómicas, órdenes de enlace, densidades electrónicas de frontera y energías de estados de transición. El potencial electrostático,  $V(r)$  es generado en el espacio circundante de una molécula por su núcleo y electrones. En las dos últimas décadas,  $V(r)$  ha emergido como una herramienta analítica en el estudio de la reactividad molecular y, a diferencia de otros índices de reactividad, es una propiedad física real que puede ser determinada tanto experimentalmente, por métodos de difracción, como computacionalmente. Es a través de este potencial que una molécula es "vista" o "sentida" electrostáticamente por otra especie química que se aproxima, por lo que  $V(r)$  ha sido usado ampliamente para interpretar y predecir el comportamiento relativo de una gran variedad de sistemas químicos en reacciones nucleofílicas y electrofílicas,<sup>119-125</sup> interacciones por puente de hidrógeno,<sup>121</sup> difusión de substratos cargados<sup>124</sup> y en el reconocimiento molecular.<sup>121,123,124</sup>

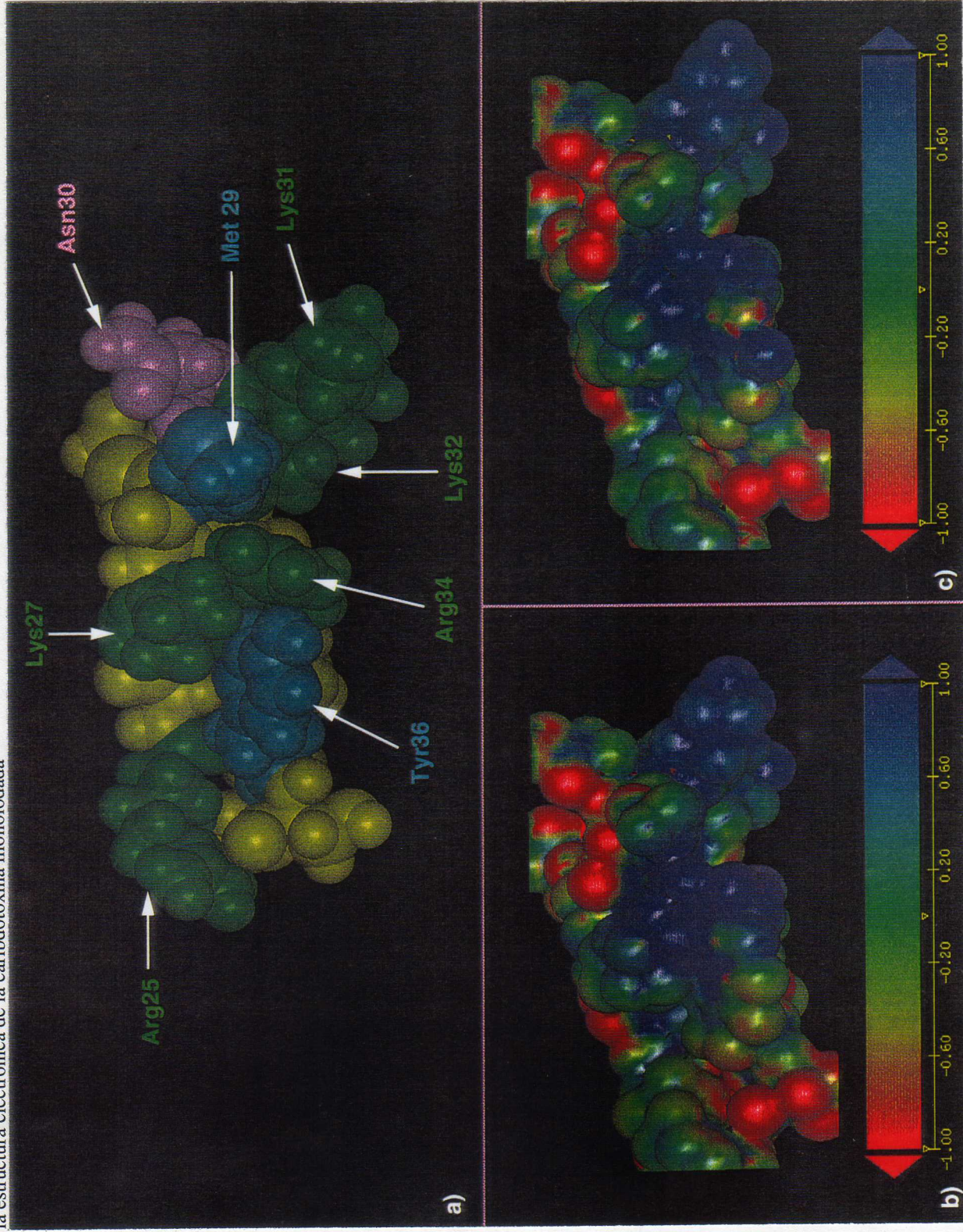
Tanto ChTX como el canal de  $K^+$ , son especies cargadas. En el capítulo 2 se mencionó que la región del sitio activo de la toxina estaba dotada de un ambiente químico muy variado, y que en la interacción de la toxina con el canal se pueden distinguir dos tipos de fuerzas: interacciones electrostáticas de largo alcance entre los sitios cargados de las moléculas e interacciones de corto alcance relacionadas con las regiones que entran en contacto en el ajuste de la topología de la toxina con el canal. El primer efecto puede asociarse con el potencial electrostático, mientras que el segundo, probablemente esté vinculado además a interacciones que implican transferencia de carga.

En la figura 22 se muestran los potenciales electrostáticos generados para las estructuras ChTX-hoja  $\beta$  (fig 22b) y ChTX-hoja  $\beta$  iodada (fig. 22c). La figura 22a) es un indicador de los sitios de interés en la molécula.

En el caso correspondiente a 22b) claramente se distingue que las regiones positivas están asociadas a los residuos cargados positivamente, localizándose una gran acumulación sobre Lys 27, Arg34, Lys31, Lys32 y ligeramente sobre Arg25. La proyección del potencial electrostático se realizó sobre esferas de radio constante (1.5 Å). Al proyectar sobre radios constantes de 2.0 y 2.5 Å, la acumulación de carga sobre Arg25 prácticamente desaparece, por lo que tal vez este residuo no es un buen candidato para interacciones electrostáticas de largo alcance, contrario a lo que ocurre con Lys27, Lys31, Lys32 y Arg34.

En lo que respecta a la estructura ChTX-hoja  $\beta$  yodada (fig. 22 c), los cambios observados en el potencial electrostático son verdaderamente interesantes; la iodación no provoca cambios en los residuos Lys31 y Lys32, pero en el caso de Lys27, se aprecia una disminución en el carácter positivo de éste; cabe recordar que ha sido propuesto como fundamental, a nivel de interacción electrostática, el papel de este aminoácido en la unión toxina-canal de  $K^+$ . En lo que respecta a Arg34, también se observa un cambio considerable, mientras que el cambio observado en Met29 es ligero. En el caso de Try36, en la fig. 22b), se observa un carácter prácticamente neutro, mientras que al ser iodada sufre un cambio que va de neutro a ligeramente negativo, concentrándose carga positiva en el iodo, es decir, se genera una zona altamente positiva en un lugar en el que no existía antes de la modificación. Lo anterior puede generar un impacto en las interacciones hidrofóbicas.

Se mencionó en el cap. 2, que la iodación de ChTX afecta la constante de disociación toxina-canal de  $K^+$ , y que como consecuencia de la iodación podría darse una disminución en el  $pK_a$  del grupo hidroxilo de la tirosina, lo que perturbaría las interacciones electrostáticas en su vecindad. Se observa que efectivamente, el yodo introduce un cambio apreciable en el potencial electrostático, sin embargo, hasta este momento, el sólo cálculo del potencial electrostático no permite establecer una clara conexión entre el cambio en la estructura electrónica y la alteración en la funcionalidad de la toxina.



**Figura 22.** Potencial electrostático. (a) Indicador de los residuos de interés en la molécula de ChTX-hoja  $\beta$  yodada. (b) Potencial electrostático de ChTX-hoja  $\beta$ . Las regiones positivas están asociadas a los residuos cargados positivamente, localizándose gran acumulación sobre Lys27, Arg34, Lys31, Lys32 y ligeramente sobre Arg25. (c) Potencial electrostático de ChTX-hoja  $\beta$  yodada. La yodación no provoca cambios significativos en los residuos Lys31 y Lys32, pero se aprecia una disminución en el carácter positivo de Lys37, Arg34 y un ligero cambio en Met29. La proyección del potencial electrostático se realizó sobre esferas de radio constante (1.5 Å).

### 4.3 Blandura Local

La capacidad de transferencia de carga fue estudiada utilizando la blandura local.<sup>104,110</sup> Como ya se ha señalado<sup>104</sup> (cap. 3), existen dos blanduras locales,  $s^+(\mathbf{r})$  relacionada a la transferencia electrónica del polipéptido al canal y  $s^-(\mathbf{r})$  que mide la capacidad de aceptar carga de la toxina. La cantidad  $\delta\mu$  que aparece en la ec. (38), está relacionada con el ancho de las bandas de frontera del sistema.

Al analizar  $s^+(\mathbf{r})$  para la estructura ChTX-hoja  $\beta$  (fig. 23b), se encuentra que no existe una capacidad donadora especial relacionada con los residuos cruciales. Se observa capacidad donadora en el átomo de azufre de Met29 y en algunos sitios que no han sido considerados, desde un punto de vista experimental, como cruciales para la funcionalidad de la toxina. La observación anterior sugiere que la transferencia de carga en el sentido toxina a canal, tal vez no sea crucial.

En la fig. 23c), se muestra  $s^+(\mathbf{r})$  para la estructura que ha sido iodada. Es sorprendente el ambiente que se genera sobre el yodo, pues cede carga y además tiene posibilidad de ser aceptor de carga del canal.

En el caso de  $s^-(\mathbf{r})$  para la ChTX-hoja  $\beta$ , mostrada en la figura 24 a), existen varias regiones con alta capacidad para aceptar carga. Una de ellas está formada por Lys27, Met29, Arg34 y Tyr36, la segunda incluye Lys31 y Lys32; y la tercera solamente Arg25. Como puede apreciarse, son los residuos cruciales los que se ven involucrados en aceptar carga del canal. Nuevamente, es interesante el papel del yodo en la estructura (fig. 24 b). Las regiones aceptoras de carga, ven disminuida su capacidad aceptoras, mientras que en el yodo reside parte de esa capacidad.

Podemos apreciar que el impacto del yodo en la capacidad de transferencia de carga del sitio activo, es global. Además, la posible transferencia de carga como una interacción de corto alcance, adquiere relevancia en este problema de estudio y tiene sentido plantear transferencia de carga del canal hacia la toxina.



Tal y como debía esperarse, los aminoácidos cargados positivamente son buenos aceptores, pero es interesante observar que aminoácidos cruciales neutros muestren carácter marcadamente aceptor. Es interesante observar que la mayor parte de los aminoácidos asociados con las tres regiones mostradas en la fig. 24b), han sido reportados como cruciales en la actividad de la toxina debido a que alteran la cinética de la interacción ChTX-canal principalmente a través del incremento de la constante de disociación,  $K_{off}$  en la reacción<sup>39,40,127</sup> de asociación-disociación toxina-canal. Constante que también es seriamente afectada cuando la toxina es iodada.<sup>41</sup>

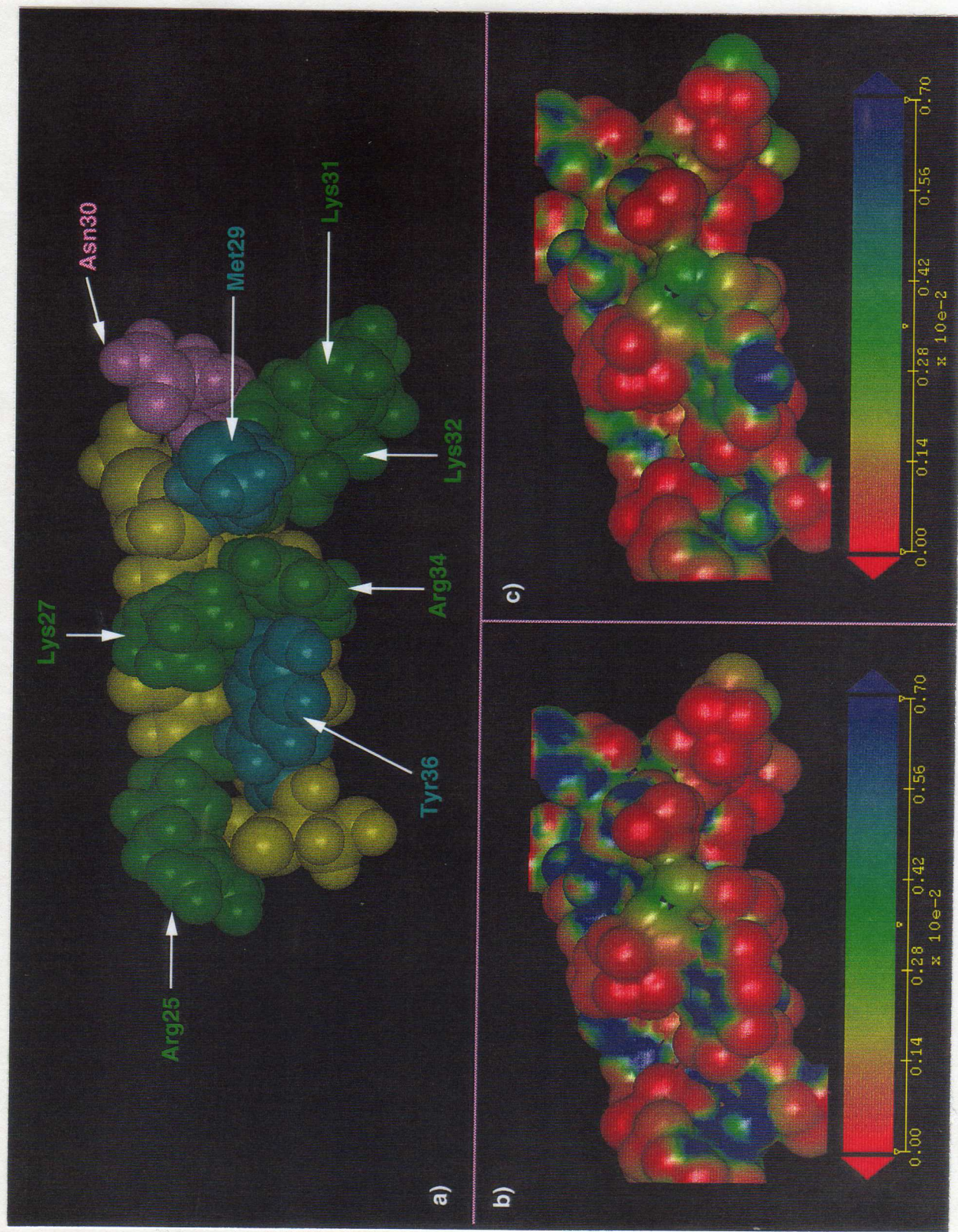
Los resultados presentados, sugieren que la transferencia de carga es, posiblemente, uno de los principales efectos estabilizadores del complejo toxina-canal.

Lys31 y Lys32, son aminoácidos cargados, que no afectan la  $K_{off}$ . Tal vez un hecho que induce esta situación es que se encuentran ubicados lejos de la región en la cual ChTX hace contacto directo con el canal; otra posibilidad es que la región correspondiente en el canal no exhiba capacidad donadora de carga. En efecto, resultados experimentales han mostrado que dichos aminoácidos toman parte en interacciones de largo alcance,<sup>127-129</sup> lo que se encuentra en buen acuerdo con el potencial electrostático que Ireta y col.<sup>115</sup> analizan para la estructura completa de ChTX y con el presentado en este estudio para la ChTX-hoja  $\beta$ .

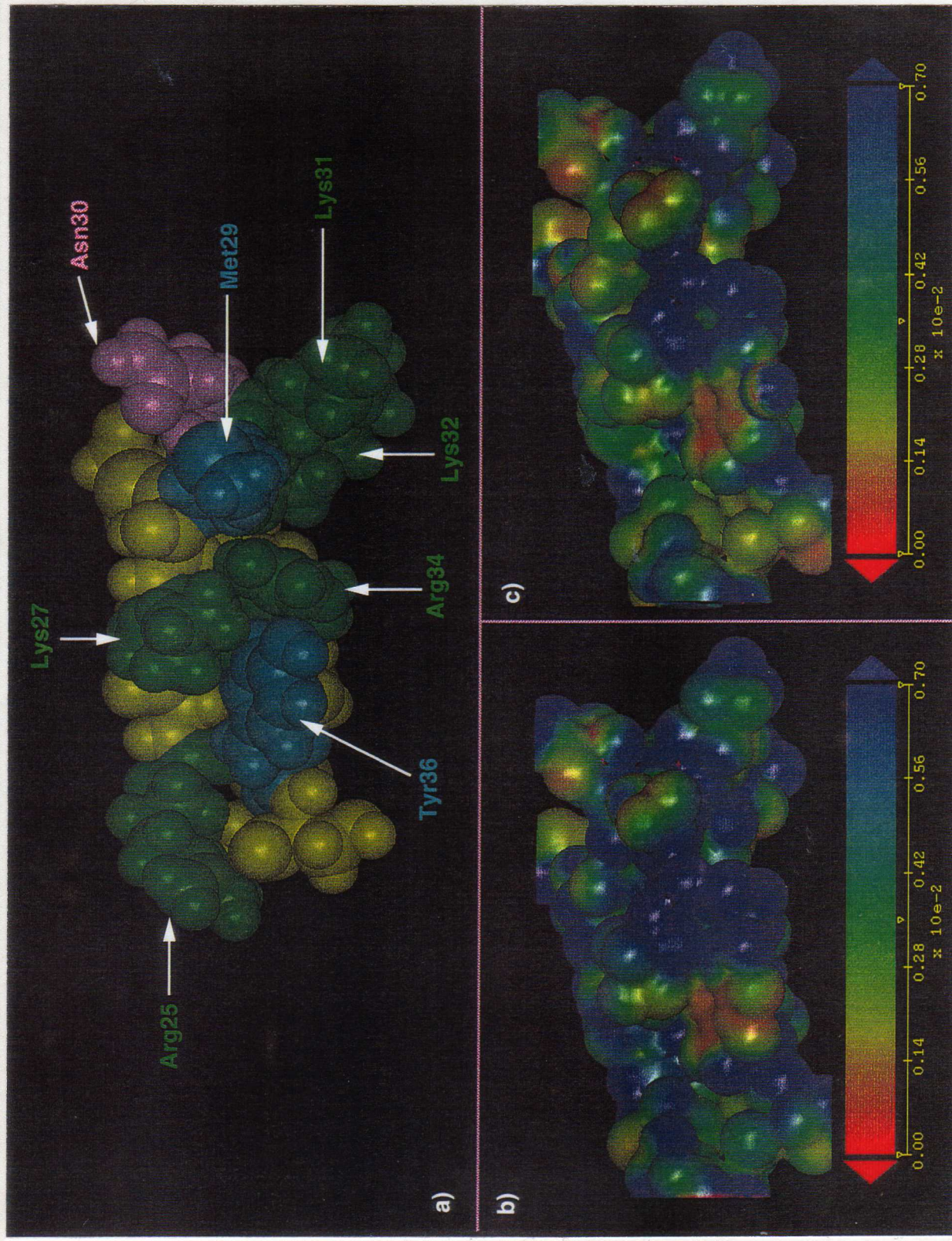
Es interesante notar que la región definida por Lys27, Arg34, Tyr36 y Met29 es la única que exhibe una combinación de alta capacidad aceptora, fuerte carácter positivo, y un átomo (el átomo de S en Met29) con carácter donador de electrones. Experimentalmente es conocido que esta región, la cual se encuentra en contacto directo con la boca del canal, y es la más activa en los casos de mutaciones, juega un importante papel en la comprensión de la afinidad de ChTX por los canales de  $K^+$ . De lo anterior, podemos notar que no es posible explicar el comportamiento de la interacción ChTX-canal exclusivamente por efectos electrostáticos.

La blandura local, nos ha provisto una útil herramienta para tratar de elucidar si las interacciones de corto alcance pueden deberse a procesos de transferencia de carga y el sentido en que ésta se da, hecho que se manifiesta con los cambios inducidos por el yodo en la estructura electrónica de la ChTX-hoja  $\beta$ .

Por lo que en efecto, tal y como lo han propuesto Ireta y col.<sup>115</sup>, la combinación del potencial electrostático y la blandura local pueden ser usados para dar una imagen más rica (electrostática y transferencia de carga) de la compleja interacción entre macromoléculas.



**Figura 23.** Blandura local  $s^+(\mathbf{r})$ . (a) Indicador de los residuos de interés en la molécula de ChTX-hoja  $\beta$  yodada. (b)  $s^+(\mathbf{r})$  de ChTX-hoja  $\beta$ . No existe una capacidad donadora especial relacionada con los residuos cruciales. (c)  $s^+(\mathbf{r})$  de ChTX-hoja  $\beta$  yodada. Sobre el iodo se genera un ambiente especialmente interesante, pues cede carga y además tiene posibilidad de ser aceptor de carga del canal. La proyección de  $s^+(\mathbf{r})$  se realizó sobre esferas de radio constante (1.5 Å). Las estructuras ChTX-hoja  $\beta$  y ChTX-hoja  $\beta$  yodada, tienen igual orientación espacial.



**Figura 24.** Blandura local  $s(\mathbf{r})$ . (a) Indicador de los residuos de interés en la molécula de ChTX-hoja  $\beta$  iodada. Existen varias regiones con alta capacidad para aceptar carga. Una de ellas está formada por Lys27, Met29, Arg34 y Tyr36, la segunda incluye Lys31 y Lys32 y la tercera solamente Arg25. (c) Blandura local  $s(\mathbf{r})$  de ChTX-hoja  $\beta$  iodada. Las regiones aceptoras de carga mostradas en (b), ven disminuida su capacidad aceptora, mientras que en el yodo reside parte de esa capacidad. La proyección de  $s(\mathbf{r})$  se realizó sobre esferas de radio constante (1.5 Å). Las estructuras ChTX-hoja  $\beta$  y ChTX-hoja  $\beta$  iodada, tienen igual orientación espacial.

## 5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que a pesar de la utilización de un corte bajo en la energía, es factible obtener una densidad electrónica localizada que permita hacer una descripción confiable, aunque cualitativa, de los orbitales más altos ocupados y aplicar el formalismo de la TFD que caracteriza la reactividad química de una región de un sistema dado. Es importante destacar un resultado de este tipo para sistemas moleculares de gran tamaño como el que ha sido estudiado.

Un pequeño cambio estructural como el que se ha hecho al iodar ChTX en el residuo Tyr36, genera un cambio electrónico considerable en la estructura, lo cual ha sido mostrado en el potencial electrostático y la blandura local obtenidos. Este cambio inducido por el yodo se percibe en una región extendida del sitio activo de la molécula. Desafortunadamente, la limitante del corte utilizado en la energía circunscribe el análisis a un contexto meramente cualitativo, y a pesar de tener una densidad electrónica localizada, los cambios observados deben ser interpretados con cautela, por lo que no se puede hablar de cual es el efecto específico del yodo a larga distancia.

La blandura local obtenida muestra cambios al comparar ambas estructuras, pero no se puede definir de manera contundente una transferencia de carga y el sentido en que ésta se realiza durante la interacción toxina-canal; sólo puede mencionarse que en el caso que ésta exista, debe verse afectada por la iodación.

En el caso del potencial electrostático, es claro que el yodo induce cambios importantes en los aminoácidos considerados cruciales para la funcionalidad de la toxina.

La estructura de bandas observada nos indica que, a pesar del corte bajo utilizado, la densidad de carga obtenida preserva aspectos relevantes de la estructura electrónica del polipéptido, y que independientemente de haber aislado la hoja  $\beta$  de ChTX, la forma de la densidad de estados,  $N(E)$ , es prácticamente la misma. Es decir, que la estructura general es independiente del motif estructural.

La combinación del potencial electrostático y la blandura local, representa un esquema de gran utilidad para estudiar las complejas interacciones entre macromoléculas, pues permiten complementar el estudio de diversas interacciones (electrostáticas y transferencia de carga).

Finalmente, y en base a los resultados mostrados en este trabajo, el realizar cálculos de energía total empleando pseudopotenciales es una opción viable en el estudio de polipéptidos de considerable tamaño.

## 6 REFERENCIAS

1. Yang, W., Lee, T.S., *J. Chem. Phys* **1995**, 103(13), 5674.
2. Challacombe, M., Schwegler, E., *J. Chem. Phys.* **1997**, 106(13), 5526.
3. Park, Chul-Seung and Miller, C., *Biochemistry* **1994**, 31, 7749.
4. Lucchesi, K., Ravindran, A., Young, H., Moczydlowski, E., *J. Membrane Biol.* **1989**, 109, 269.
5. Parr, R.G., Yang, W., *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, 1989; pp. 101-104.
6. InsightII, Biosym Technologies, Inc., San Diego Cal., 1995.
7. Dickerson and Geis, *The Structure and Action of Proteins*; Harper & Row, New York, 1969.
8. Fermi and Perutz, *Haemoglobin and Myoglobin*, Oxford University Press: Oxford, 1982.
9. Shultz and Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, 1979.
10. Creighton, *Proteins*, W. H. Freeman, New York, 1983.
11. Kendrew, R.H., Dickerson, B.E., Strandberg, K.G. Hart, Davies, D.R., Phillips, D.C., Shore, V.C., *Nature (Lond.)* **1960**, 185, 422.
12. Perutz, M.F., *Nature (Lond.)* **1951**, 167, 1053.
13. Blake, C.F., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., Sarma, V.R., *Nature (Lond.)* **1965**, 206, 757; Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., Sarma, V.R., *Proc. Roy. Soc., London* **1967** B167, 378.
14. Protein Data Bank\* (PDB), es un archivo de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas. Los archivos contienen coordenadas atómicas, citas bibliográficas, información de las estructuras primaria y secundaria, factores de estructura cristalográfica y reportes experimentales de RMN.  
\*Brookhaven National Laboratory (BNL) of the National Institute of Health; U.S. National Science Foundation.
15. Karplus, M., McCammon, J.A., *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, 53, 263.

16. (a) Lehninger, *Principios de Bioquímica*, Ediciones Omega, Segunda Edición, España, 1995; (b) Branden, C., Tooze J., *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc. New York, 1991. En el pie de las figuras incluídas en este manuscrito, se indica la fuente de la que han sido tomadas.
17. Pauling, L., Corey, R.B., and Bransm, H.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1951**, 36, 205; Pauling, L., Corey, R.B., Bransm, H.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1951**, 37, 251.
18. Tanford, C., in "*Symposium on Protein Structure*", Neuberger, A., De., Methuen, London, 1968. p. 35.
19. Pimentel, G.S. and McLellan, a.L., *The Hydrogen Bond*, Freeman, San Francisco, 1960.
20. Hadzi, D., De., *Hydrogen Bonding*, Pergamon, London, 1959.
21. Hamilton, W.C. and Ibors, J.A., *Hydrogen Bonding in Solids*, Benjamin, New York, 1968.
22. Covington, A.K. and Jones, P., *Hydrogen-Bonded Solvent Systems*, Taylor and Francis, London, 1968.
23. Vinogradov, S.N. and Linnell, R.H., *Hydrogen Bonding*, Van Nostrand, New York, 1971.
24. Emsley, J., *Chem. Soc. Rev.* **1980**, 9, 91.
25. Latimer, W.M., Rodebush, W.H., *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, 42, 1419.
26. Waugh, D.F., *Rev. Mod. Phys.* **1959**, 31, 84.
27. Cook, N.S., *The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential*. Trends Pharmacol. Sci. **1988**, 9, 21.
28. Moczydlowski, E., Lucchesi, K., & Ravindran, A., *J. Membr. Biol.* **1988**, 105, 95.
29. Miller, C., *Science* **1991**, 252, 1092; Bomtems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljansky, Y., *Eur. J. Biochem.* **1991**, 196, 19.
30. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., Phillips, M., *Nature (London)* **1985**, 313, 316.
31. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A., *Nature (London)* **1982**, 296, 90.



32. Possani, L.D., Martin, B.M., Svendensen, Y., *Carlsberg Res. Commun.* **1982**, 47, 285.
33. Gimenez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 3329.
34. Smith, C., Phillips, M., Miller, C., *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 14607.
35. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 11083.
36. Wolff, D., Cecci, X., Spalvins, A., Canessa, M., *J. Memb. Biol.* **1988**, 106, 243.
37. Schweitz, H., Bidard, J.N., Maes, P., Lazdunski, M., *Biochemistry* **1989**, 28, 9708.
38. Price, M., Lee, S.C., Deutsch, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 10171.
39. Vázquez, J., Feigenbaum, P., King, V.E., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15564.
40. Anderson, C., Mackinnon, R., Smith, C., Miller, C., *J. Gen. Physiol.* **1988**, 91, 317.
41. Mackinnon, R., Miller, C., *J. Gen. Physiol.* **1988**, 91, 317.
42. Garcia, Maria L., Knaus, H., Munujos, P., Slaughter, R.S., Kaczorowski, G.J., *Am. J. Physiol.* **1995**, 269, pp. C1-C10.
43. Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A., Toma, F. *Biochemistry* **1992**, 31, 7756.
44. Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., Miller, C., *Biochemistry* **1994**, 33, 443.
45. Regoeczi, E., *Iodine-Labeled Plasma Proteins*, CRC, Boca Raton, Fl., 1984.
46. Suhai, S., *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol. XL **1991**, 559.
47. Lee, T.S., York, D.M., Yang, W., *J. Chem. Phys.* **1996**, 105(7), 2744.
48. Lee, T.S., York, D.M., Yang, W., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10940.
49. Van Alsenoy, C., Peeters, A., Martin, J., **1996** (personal communication)
50. Van Alsenoy, C., *J. Comp. Chem.* **1988**, 9, 620.
51. Van Alsenoy, C., Peeters, A., *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1993**, 286, 19.
52. Szent-Gyorgyi, A., *Nature* **1941**, 148, 157.
53. Szent-Gyorgyi, A., *Science* **1941**, 93, 609.

54. Eley, D.D., Parfitt, G.D., Perry, M.J., Taysum, D.H., *Trans. Faraday Soc.* **1953**, 49, 79.
55. Eley, D.D., Spirey, D.F., *Trans. Faraday Soc.* **1960**, 56, 1432.
56. Eley, D.D., Spirey, D.F., *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411.
57. Cardew, H.H., Eley, D.D., *Discussions Faraday Soc.* **1959**, 27, 115.
58. Eley, D.D., *Research* **1959**, 12, 293.
59. Eley, D.D., Kasha, M., Pullman, B., *Horizons in Biochemistry*, Albert Szent-Gyorgy's Dedicatory volume, Academic Press, New York, 1962.
60. Taylor, P., *Discussions Faraday Soc.* **1959**, 27, 237.
61. Kasha, M., *Rev. Mod. Phys.* **1959**, 31, 162.
62. Ladik, J., *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol.* **1974**, 51, 5.
63. Suhai, S., *Theoret. Chim. Acta (Berlin)* **1974**, 34, 157.
64. Suhai, S., Ladik, J., *Theoret. Chim. Acta (Berlin)* **1972**, 28, 27.
65. Suhai, S., Ladik, J., *Acta Phys. Hung.*
66. Evans, M.G., Gegerly, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1949**, 3, 188.
67. Ladik, J., Private communication.
68. Itoh, R., *Ann. Report Res. Gp. Biophys. Japan* **1961**, 1, 11.
69. Suard, M., Berthier G., Pullman, B., *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, 52, 254.
70. Suard, M., *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 64, 400.
71. Suard, M., *J. Chem. Phys.* **1965**, 62, 78; *ibid.*, p. 89.
72. Yomosa, S., *J. Phys. Soc. Japan* **1963**, 18, 1494.
73. Pullman, A., *C. R. Acad. Sci. Paris* **1963**, 256, 5435.
74. Ladik, J., *Nature* **1964**, 202, 1208.
75. Pethig, R., *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*, John Wiley & Sons, Chichester, 1979.
76. Brillouin, L., in *Horizons in Biochemistry*, Eds. M. Kasha and B. Pullman, Academic Press, New York 1962, p. 295.
77. Laki, K., *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* **1942**, 2, 43 and private communication
78. Fujita, H., Imamura, A., *J. Chem. Phys.* **1970**, 53, 4555.

79. Beveridge, D.L., Jano, Y., Ladik, J., *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 4744.
80. Suhai, S., Ladik, J., *Theor. Chim. Acta* **1972**, 28, 27.
81. Suhai, S., *Biopolymers* **1974**, 13, 1731.
82. Ladik, J., in *Quantum Theory of Polymers*, Eds. J.M. Andre, J. Delhalle and J. Ladik, D. Reidel, Dordrecht-Holland 1978, pp. 257-278.
83. Petrov, E.G., Ukrainskii, Y., Kharkyanen, V.N., *Academy of Sciences of the Ukrainian SSR*, Kiev, March, 1977.
84. Hohenberg, P., Kohn, W., *Phys. Rev.* **1964**, 136, 864B.
85. Kohn, W., Sham, L. J., *Phys. Rev* **1965**, 140, 1133 A.
86. Perdew, J.P., Zunger, A., *Phys. Rev B* **23** **1981**, 5048.
87. Ashcroft, N.W., Mermin, N.D., *Solid State Physics*, Holt-Saunders International Edition, 1976.
88. Payne, M.C., Teter, M.P., Allan, D.C., Arias, T.A., Joannopoulos, J.D., *Rev. Mod. Phys.* **1992**, 64, 1045.
89. Denteener, P.J.H., van Haeringen, W., *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1985**, 18, 4127.
90. Evarestov, R.A., Smirnov, V.P., *Phys. State Sol. (b)* **1983**, 119, 9.
91. Chadi, D.J., Cohen, M.L., *Phys. Rev. B* **1973**, 8, 5747.
92. Monkhorst, H.J., Pack, J.D., *Phys. Rev. B* **1976**, 13, 5188.
93. Schlüter, M., Chelikowsky, J.R., Louie, S.G., Cohen, M.L., *Phys. Rev. B* **1975**, 12, 4200.
94. Ihm, J., Zunger, A., Cohen, M.L., *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1979**, 12, 4409.
95. Cohen, M.L., Chelikowsky, J.R., *Electronic Structure and Optical Properties of Semiconductors*, Springer Verlag, New York, 1989.
96. Phillips, J.C., Kleinman, L., *Phys. Rev.* **1959**, 116, 287.
97. Ireta, J., *Pseudopotenciales y Bases de Ondas Planas para el Cálculo en Biomoléculas*, Universidad Autónoma Metropolitana, 1995.
98. Rappe, A.M., *Ab-initio Theoretical Studies of Transition-metal, Molecular and Photonic band-gap Materials*, Massachussets Institute of Technology, 1992.
99. Car, R., Parrinello, M., *Phys. Rev. Lett.* **1985**, 55, 2471,

100. Teter, M.P., Payne, M.C., Allan, D.C., *Phys. Rev. B* 40 **1985**, 12255.
101. Verlet, L., *Phys. Rev.* **1967**, 159, 98.
102. Brommer, K.D., Larson, B.E., Needels, M., Joannopoulos, J.D., *Computers in Physics* **1993**, vol. 7 no. 3, 350.
103. Ireta, J., Galvan, M., *J. Chem. Phys.* **1996**, 105, 18.
104. Yang, W., Parr, R.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 6723.
105. Mermin, N.D., *Phys. Rev.* **1965**, 137, A1441.
106. Falicov, M.L., Somorjai, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 2207.
107. Parr, R.G., Yang, W., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4049.
108. Harbola, M.K., Chattaraj, P.K., Parr, R.G., *Isr. J. Chem.*, **1991**, 31, 395.
109. Baekelant, B.G., Mortier, W.J., Schoonheydt, *Struct. Bonding* **1993**, 80, 187.
110. Dronskowski, R., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7230.
111. Brommer, K.D., Galvan, M., Dal Pino, A., Joannopoulos, J.D., *Surface Science* **1994**, 314, 57.
112. En este trabajo se tomó la geometría de la primera de las 12 estructuras reportadas en la ref. 29.
113. Salacinski, P.R., Maclean, C., Sykes, J., Clement-Jones, V., Lowry, P., *Analytical Biochemistry*, **1981**, 117, 136.
114. Handbook of Chemistry and Physics, 2 V. CRC, Cleveland, Ohio, 1974.
115. Ireta, J., Galvan, M., Cho, K., Joannopoulos, J.D., sometido.
116. Andrews, S.B., Burton, n.A., Hillier, I.H., Holender, J.M., Gillan, M.J., *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 261,521.
117. Milman, B., Lee, M.H., *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 6093.
118. Leslie, M., Gillian, M., *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **1985**, 18, 973.
119. Scrocco, E., Tomasi, J., in *Topics in Current Chemistry*, No. 42, Springer-Verlag, Berlin, 1973, p. 95.
120. Scrocco, E., Tomasi, J., *Adv. Quant. Chem.*, **1978**, 11, 115.
121. Politzer, P., Daiker, K.C., in *The Force Concept in Chemistry*. D.M. Deb, De., Van Nostrand Reinhold Co., 1981, chap. 6.

122. Politzer, P. Truhlar, D.G., Eds. *Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials*. Plenum Press, New York, 1981.
123. Politzer, P., Laurence, P.R., Jayasuriya, K., in *Structure-activity Correlation in Mechanism Studies and Predictive Toxicology*. J. Mckinney, Ed., special issue of *Environ Health Perspect.* **1985**, 61, 191.
124. Politzer, P., Murray, J.S., in *Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics: a Comprehensive Survey*, vol. 2 Proteins. D.L. Beveridge and R. Lavery, Eds. Adenine Press, Schnectady, NY, 1991, chap. 13.
125. Politzer, P. and J.S. Murray, *Trans. Am. Cryst. Assoc*, in press.
126. B. Honig and A. Nicholls, *Science* **1995**, 268, 1144.
127. Golsdtein, S.A., Pheasant, D.J., Miller, C., *Neuron* **1994**, 12, 1377.
128. Naini, A.M., Miller, C., *Biochemistry* **1996**, 35, 1681.
129. Munujos, P., Knaus, H., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., *Biochemistry* **1995**, 34, 10771.