

Material Suplementario

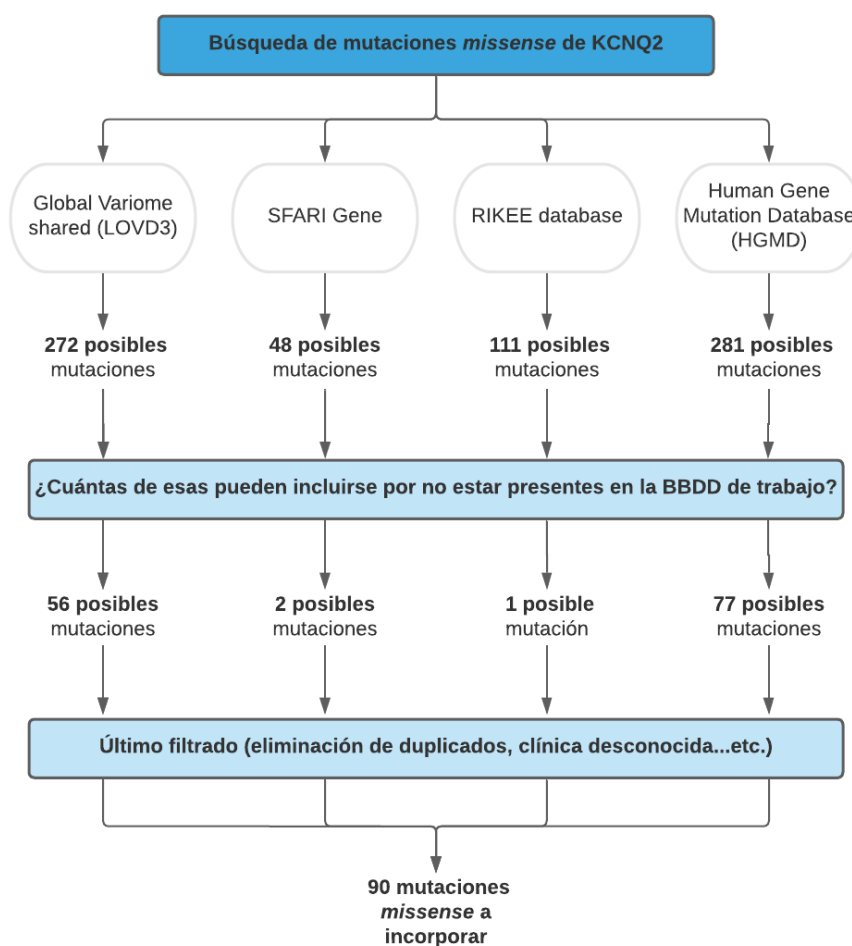
Ampliación de la base de datos

La base de datos de KCNQ2 fue diseñada a partir del trabajo de Zhang *et al.* (2020) y las mutaciones registradas en ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Adicionalmente, se realizó una ampliación de la BBDD siguiendo el procedimiento que se muestra a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva para resolver las variantes *missense* de KCNQ2 clasificadas por Zhang *et al.* (2020) y ClinVar como variantes de significado desconocido (“*uncertain significance variants*” también denominadas como “*VUS*”) o variantes de significado conflictivo (“*conflictive interpretation variants*”).

En segundo lugar, se buscaron nuevas mutaciones *missense* de KCNQ2 en 4 bases de datos adicionales, entre las que se encuentra Global Variome Shared LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes>), SFARI Gene (<https://gene.sfari.org/>), Human Gene Mutation Database o HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>) y RIKEE database (<https://www.rikee.org/>). Esta última base de datos es específica para mutaciones de KCNQ2. Posteriormente, se filtraron aquellas mutaciones ya incluidas en la base de datos original. Finalmente, se realizó un último filtrado eliminando posibles duplicados o variantes sin una clínica clara. El procedimiento completo se resume en la **Figura S1**.

Figura S1. Workflow llevado a cabo para la ampliación de mutaciones de KCNQ2 no presentes en ClinVar empleando otras bases de datos conocidas.



Diseño de los descriptores de la base de datos

Trece características fueron empleadas para predecir el efecto de las variantes de KCNQ2: el aminoácido previo a la mutación (*initial_aa*), el aminoácido resultante de la mutación (*final_aa*), el dominio topológico de Kv7.2 donde tiene lugar la mutación (*topological_domain*), el dominio funcional de Kv7.2 donde ocurre la mutación (*functional_domain*), el valor de conservación evolutiva del residuo mutado (*residue_conserv*), la estructura secundaria que afecta la mutación (*secondary_str*); así como los cambios de tamaño (*d_size*), de hidrofobicidad (*d_hf*), de volumen (*d_vol*), de accesibilidad media al solvente (*d_msa*), de carga (*d_charge*), de polaridad (*d_pol*) y de aromaticidad (*d_aro*) que tienen lugar entre el aminoácido original y el resultante de la mutación.

Todos los descriptores fueron obtenidos de fuentes bibliográficas, a excepción de la conservación evolutiva (*residue_conserv*) y la estructura secundaria (*secondary_str*) de los residuos afectados por requerirse de software externo.

Sobre los dominios topológicos y funcionales afectados...

Los principales dominios topológicos y funcionales de Kv7.2 se obtuvieron directamente de información disponible en Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) (ID Uniprot: O43526), del PDB 7CR3 que puede ser encontrado en RCSB (<https://www.rcsb.org/>) a partir de información actualmente conocida en el laboratorio así como de otras fuentes bibliográficas (**Tablas S1 y S2**).

Tabla S1. Principales dominios topológicos de Kv7.2.

| Dominio topológico | Residuo inicial | Residuo final | Referencia |
|--------------------|-----------------|---------------|---------------------------|
| S1 | A92 | F112 | Uniprot (O43526) |
| S2 | E123 | V143 | Uniprot (O43526) |
| S3 | P167 | S187 | Uniprot (O43526) |
| S4 | A196 | W218 | Uniprot (O43526) |
| S5 | L232 | L252 | Uniprot (O43526) |
| Poros | A265 | P285 | Uniprot (O43526) |
| S6 | L292 | L312 | Uniprot (O43526) |
| hA | R332 | N350 | RSCB PDB (7CR3) |
| hTW | H357 | T366 | RSCB PDB (7CR3) |
| hB | G535 | L559 | RSCB PDB (7CR3) |
| hC | D563 | G594 | RSCB PDB (7CR3) |
| hD | R622 | R647 | Bernardo-Seisdedos (2015) |

Tabla S2. Principales dominios funcionales de Kv7.2.

| Dominio topológico | Residuo inicial | Residuo final | Referencia |
|-------------------------------|--|---------------|---|
| voltage_sensor_domain (S1-S4) | A92 | W218 | Ambrosino <i>et al.</i> (2015) |
| selectivity_filter | T277 | D282 | Uniprot (O43526) |
| pore_domain (S5-S6) | L232 | L312 | Bañales-Belaunde (2019); Yus-Nájera <i>et al.</i> (2002) |
| CaM_interaction (hA-hTW-hB) | R332 | L559 | Ambrosino <i>et al.</i> (2015) |
| SID_domain(hC-hD) | D563 | R647 | Bernardo-Seisdedos (2015) |
| unknown_function | <i>Residuos que no se incluyan en ninguno de los anteriores rangos</i> | | |

Sobre los descriptores de cambio...

- **Descriptores cuantitativos (*d_size*, *d_hf*, *d_vol*, *d_msa*).** Estos descriptores fueron calculados sustrayendo el valor del aminoácido original del resultante de la mutación. El peso molecular (Da) de los aminoácidos fue obtenido del trabajo realizado por Lide (2007), la hidrofobicidad de Kyte &

Doolittle (1982) y tanto el volumen como la accesibilidad media al solvente de Bogardt *et al.* (1980) (**Tabla S3**).

- **Descriptores cualitativos (*d_charge*, *d_pol*, *d_aro*).** Para determinar el cambio de carga a pH fisiológico se clasificaron los aminoácidos en función de esta y luego se generó un código único para cada uno de los posibles cambios. Ej.: Si el aminoácido inicial es positivo (*pos*) y el resultante de la mutación es negativo (*neg*) el cambio se registra como *pos_to_neg*, si el aminoácido inicial es neutro (*neu*) y el resultante de la mutación es positivo (*pos*) el cambio se registra como *neu_to_pos*, etc. Se realiza el mismo procedimiento para determinar el cambio de polaridad y el cambio de aromaticidad. Tanto la carga de los aminoácidos como su polaridad y su aromaticidad fueron obtenidas del trabajo de Lodish *et al.* (2012). El pH fisiológico de una célula nerviosa es de 7.4 (Jalalvand *et al.*, 2016).

Tabla S3. Características físico-químicas de los aminoácidos a pH = 7.4.

| Aminoácido | Carga | Polaridad | Aromaticidad | Tamaño (Da) | Volumen estandarizado (%) | Accesibilidad media al solvente (%) | Hidrofobicidad |
|------------|-------|-----------|--------------|-------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| (Ser) S | neu | polar | non_aromatic | 105.09 | 18.1 | 40.5 | -0.8 |
| (Thr) T | neu | polar | non_aromatic | 119.12 | 34.0 | 35.3 | -0.7 |
| (Gln) Q | neu | polar | non_aromatic | 146.15 | 51.3 | 43.6 | -3.5 |
| (Asn) N | neu | polar | non_aromatic | 132.12 | 35.4 | 46.1 | -3.5 |
| (Tyr) Y | neu | non_polar | aromatic | 181.19 | 78.5 | 30.1 | -1.3 |
| (Cys) C | neu | polar | non_aromatic | 121.16 | 28.0 | 7.4 | 2.5 |
| (Gly) G | neu | polar | non_aromatic | 75.07 | 0.0 | 54.0 | -0.4 |
| (Ala) A | neu | non_polar | non_aromatic | 89.09 | 15.9 | 37.4 | 1.8 |
| (Val) V | neu | non_polar | non_aromatic | 117.15 | 47.7 | 19.6 | 4.2 |
| (Leu) L | neu | non_polar | non_aromatic | 131.17 | 63.6 | 10.1 | 3.8 |
| (Ile) I | neu | non_polar | non_aromatic | 131.17 | 63.6 | 7.5 | 4.5 |
| (Met) M | neu | non_polar | non_aromatic | 149.21 | 62.8 | 3.9 | 1.9 |
| (Pro) P | neu | non_polar | non_aromatic | 115.13 | 41.0 | 66.2 | -1.6 |
| (Phe) F | neu | non_polar | aromatic | 165.19 | 77.2 | 5.5 | 2.8 |
| (Trp) W | neu | non_polar | aromatic | 204.23 | 100.0 | 13.8 | -0.9 |
| (Asp) D | neg | polar | non_aromatic | 133.10 | 31.3 | 45.0 | -3.5 |
| (Glu) E | neg | polar | non_aromatic | 147.13 | 47.2 | 48.6 | -3.5 |
| (Lys) K | pos | polar | non_aromatic | 146.19 | 68.0 | 54.3 | -3.9 |
| (Arg) R | pos | polar | non_aromatic | 174.20 | 70.8 | 50.1 | -4.5 |
| (His) H | pos | polar | non_aromatic | 155.16 | 49.2 | 28.1 | -3.2 |

Sobre la conservación evolutiva y la estructura secundaria afectadas...

El valor de conservación evolutiva de cada residuo (*residue_conserv*) se calculó realizando un MSA (*Multiple Sequence Alignment*) con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La secuencia de 62 especies disponibles en Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) fueron introducidas en dicho análisis (**Tabla S4**). Especies con longitud de secuencia similar para el canal Kv7.2 (KCNQ2) fueron alineadas y el valor de conservación evolutiva fue posteriormente calculado empleando el software de Capra & Singh (2007): <https://compbio.cs.princeton.edu/conservation/score.html>. Los valores de conservación evolutiva obtenidos de los residuos de Kv7.2 se muestran en la **Tabla S4** y las 62 especies empleadas para el análisis en la **Tabla S5**.

Tabla S4. Valores de conservación evolutiva de los residuos de KCNQ2 (Uniprot ID: O43526) entre especies.

| Residuo | Posición | Conservación | Residuo | Posición | Conservación |
|---------|----------|--------------|---------|----------|--------------|
| M | 1 | 0.61970 | V | 437 | 0.79104 |
| V | 2 | 0.65838 | S | 438 | 0.81378 |
| Q | 3 | 0.71927 | L | 439 | 0.79428 |
| K | 4 | 0.74279 | K | 440 | 0.82063 |
| S | 5 | 0.73004 | D | 441 | 0.77796 |
| R | 6 | 0.74378 | R | 442 | 0.83206 |
| N | 7 | 0.68946 | V | 443 | 0.81933 |

| | | | | | |
|---|----|---------|---|-----|---------|
| G | 8 | 0.64081 | F | 444 | 0.84624 |
| G | 9 | 0.59054 | S | 445 | 0.84304 |
| V | 10 | 0.54742 | S | 446 | 0.82763 |
| Y | 11 | 0.60965 | P | 447 | 0.82243 |
| P | 12 | 0.69383 | R | 448 | 0.79558 |
| G | 13 | 0.67435 | G | 449 | 0.70198 |
| P | 14 | 0.68418 | V | 450 | 0.66265 |
| S | 15 | 0.55969 | A | 451 | 0.67856 |
| G | 16 | 0.50648 | A | 452 | 0.67806 |
| E | 17 | 0.52534 | K | 453 | 0.76470 |
| K | 18 | 0.50083 | G | 454 | 0.74590 |
| K | 19 | 0.49240 | K | 455 | 0.80623 |
| L | 20 | 0.47310 | G | 456 | 0.76045 |
| K | 21 | 0.52854 | S | 457 | 0.80282 |
| V | 22 | 0.51094 | P | 458 | 0.75991 |
| G | 23 | 0.58799 | Q | 459 | 0.70307 |
| F | 24 | 0.66750 | A | 460 | 0.51958 |
| V | 25 | 0.63548 | Q | 461 | 0.51320 |
| G | 26 | 0.64271 | T | 462 | 0.55339 |
| L | 27 | 0.70767 | V | 463 | 0.63261 |
| D | 28 | 0.67126 | R | 464 | 0.74819 |
| P | 29 | 0.63120 | R | 465 | 0.79294 |
| G | 30 | 0.65360 | S | 466 | 0.81409 |
| A | 31 | 0.65431 | P | 467 | 0.84498 |
| P | 32 | 0.63033 | S | 468 | 0.82421 |
| D | 33 | 0.59923 | A | 469 | 0.79260 |
| S | 34 | 0.54350 | D | 470 | 0.78636 |
| T | 35 | 0.52223 | Q | 471 | 0.77468 |
| R | 36 | 0.66177 | S | 472 | 0.77842 |
| D | 37 | 0.69874 | L | 473 | 0.71105 |
| G | 38 | 0.73496 | E | 474 | 0.78308 |
| A | 39 | 0.71499 | D | 475 | 0.76771 |
| L | 40 | 0.70248 | S | 476 | 0.81098 |
| L | 41 | 0.69546 | P | 477 | 0.84046 |
| I | 42 | 0.70573 | S | 478 | 0.83284 |
| A | 43 | 0.65683 | K | 479 | 0.84257 |
| G | 44 | 0.66238 | V | 480 | 0.82904 |
| S | 45 | 0.56026 | P | 481 | 0.85236 |
| E | 46 | 0.52478 | K | 482 | 0.83295 |
| A | 47 | 0.42796 | S | 483 | 0.83999 |
| P | 48 | 0.41791 | W | 484 | 0.83860 |
| K | 49 | 0.56875 | S | 485 | 0.82450 |
| R | 50 | 0.62326 | F | 486 | 0.83764 |
| G | 51 | 0.65121 | G | 487 | 0.76978 |
| S | 52 | 0.69629 | D | 488 | 0.77072 |
| I | 53 | 0.65510 | R | 489 | 0.78869 |
| L | 54 | 0.64843 | S | 490 | 0.70855 |
| S | 55 | 0.63184 | R | 491 | 0.81382 |
| K | 56 | 0.65363 | A | 492 | 0.75318 |
| P | 57 | 0.70067 | R | 493 | 0.82220 |
| R | 58 | 0.65339 | Q | 494 | 0.85722 |
| A | 59 | 0.56349 | A | 495 | 0.79832 |
| G | 60 | 0.57381 | F | 496 | 0.83207 |
| G | 61 | 0.50685 | R | 497 | 0.82022 |
| A | 62 | 0.54134 | I | 498 | 0.70973 |
| G | 63 | 0.53546 | K | 499 | 0.76549 |
| A | 64 | 0.49678 | G | 500 | 0.77879 |
| G | 65 | 0.60756 | A | 501 | 0.76190 |
| K | 66 | 0.63722 | A | 502 | 0.80566 |
| P | 67 | 0.68279 | S | 503 | 0.82992 |
| P | 68 | 0.71356 | R | 504 | 0.84095 |
| K | 69 | 0.70467 | Q | 505 | 0.86274 |
| R | 70 | 0.72897 | N | 506 | 0.78213 |
| N | 71 | 0.72612 | S | 507 | 0.70751 |
| A | 72 | 0.69610 | E | 508 | 0.62932 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| F | 73 | 0.69416 | E | 509 | 0.59824 |
| Y | 74 | 0.72552 | A | 510 | 0.67193 |
| R | 75 | 0.70251 | S | 511 | 0.74747 |
| K | 76 | 0.67593 | L | 512 | 0.78220 |
| L | 77 | 0.69504 | P | 513 | 0.80217 |
| Q | 78 | 0.72178 | G | 514 | 0.76074 |
| N | 79 | 0.72360 | E | 515 | 0.74760 |
| F | 80 | 0.69293 | D | 516 | 0.75322 |
| L | 81 | 0.61123 | I | 517 | 0.63781 |
| Y | 82 | 0.59896 | V | 518 | 0.59993 |
| N | 83 | 0.43987 | D | 519 | 0.65224 |
| V | 84 | 0.48211 | D | 520 | 0.71512 |
| L | 85 | 0.48271 | K | 521 | 0.71581 |
| E | 86 | 0.57100 | S | 522 | 0.76492 |
| R | 87 | 0.63044 | C | 523 | 0.84590 |
| P | 88 | 0.74223 | P | 524 | 0.76275 |
| R | 89 | 0.72844 | C | 525 | 0.85568 |
| G | 90 | 0.71578 | E | 526 | 0.81577 |
| W | 91 | 0.76343 | F | 527 | 0.81931 |
| A | 92 | 0.71083 | V | 528 | 0.77401 |
| F | 93 | 0.74692 | T | 529 | 0.73981 |
| I | 94 | 0.71086 | E | 530 | 0.78351 |
| Y | 95 | 0.76732 | D | 531 | 0.81479 |
| H | 96 | 0.77205 | L | 532 | 0.78477 |
| A | 97 | 0.73175 | T | 533 | 0.81818 |
| Y | 98 | 0.79362 | P | 534 | 0.83474 |
| V | 99 | 0.74242 | G | 535 | 0.77760 |
| F | 100 | 0.79735 | L | 536 | 0.75804 |
| L | 101 | 0.77863 | K | 537 | 0.80999 |
| L | 102 | 0.76658 | V | 538 | 0.76296 |
| V | 103 | 0.80002 | S | 539 | 0.77400 |
| F | 104 | 0.80824 | I | 540 | 0.80950 |
| S | 105 | 0.81681 | R | 541 | 0.82550 |
| C | 106 | 0.85110 | A | 542 | 0.80048 |
| L | 107 | 0.78350 | V | 543 | 0.79354 |
| V | 108 | 0.79292 | C | 544 | 0.86626 |
| L | 109 | 0.77893 | V | 545 | 0.77938 |
| S | 110 | 0.80437 | M | 546 | 0.86202 |
| V | 111 | 0.79193 | R | 547 | 0.84002 |
| F | 112 | 0.82657 | F | 548 | 0.83488 |
| S | 113 | 0.80996 | L | 549 | 0.78915 |
| T | 114 | 0.80304 | V | 550 | 0.81625 |
| I | 115 | 0.80977 | S | 551 | 0.80222 |
| K | 116 | 0.75526 | K | 552 | 0.82888 |
| E | 117 | 0.77053 | R | 553 | 0.84257 |
| Y | 118 | 0.80443 | K | 554 | 0.84028 |
| E | 119 | 0.76221 | F | 555 | 0.85607 |
| K | 120 | 0.72616 | K | 556 | 0.83927 |
| S | 121 | 0.75475 | E | 557 | 0.83665 |
| S | 122 | 0.74631 | S | 558 | 0.83903 |
| E | 123 | 0.72438 | L | 559 | 0.81458 |
| G | 124 | 0.70236 | R | 560 | 0.84883 |
| A | 125 | 0.72888 | P | 561 | 0.85411 |
| L | 126 | 0.72318 | Y | 562 | 0.86988 |
| Y | 127 | 0.77728 | D | 563 | 0.85911 |
| I | 128 | 0.73963 | V | 564 | 0.83841 |
| L | 129 | 0.74417 | M | 565 | 0.88011 |
| E | 130 | 0.80182 | D | 566 | 0.84738 |
| I | 131 | 0.77148 | V | 567 | 0.83374 |
| V | 132 | 0.77773 | I | 568 | 0.84894 |
| T | 133 | 0.80987 | E | 569 | 0.84468 |
| I | 134 | 0.81786 | Q | 570 | 0.86378 |
| V | 135 | 0.81173 | Y | 571 | 0.86204 |
| V | 136 | 0.81600 | S | 572 | 0.84569 |
| F | 137 | 0.84209 | A | 573 | 0.82470 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| G | 138 | 0.81408 | G | 574 | 0.81734 |
| V | 139 | 0.81812 | H | 575 | 0.87221 |
| E | 140 | 0.82903 | L | 576 | 0.80738 |
| Y | 141 | 0.85121 | D | 577 | 0.83355 |
| F | 142 | 0.79688 | M | 578 | 0.86693 |
| V | 143 | 0.83165 | L | 579 | 0.79913 |
| R | 144 | 0.84035 | S | 580 | 0.78338 |
| I | 145 | 0.82283 | R | 581 | 0.83210 |
| W | 146 | 0.87457 | I | 582 | 0.81029 |
| A | 147 | 0.79082 | K | 583 | 0.82548 |
| A | 148 | 0.82708 | S | 584 | 0.80103 |
| G | 149 | 0.83054 | L | 585 | 0.74974 |
| C | 150 | 0.87656 | Q | 586 | 0.74901 |
| C | 151 | 0.89056 | S | 587 | 0.64406 |
| C | 152 | 0.89513 | R | 588 | 0.66296 |
| R | 153 | 0.86800 | V | 589 | 0.70078 |
| Y | 154 | 0.88678 | D | 590 | 0.78494 |
| R | 155 | 0.86497 | Q | 591 | 0.85222 |
| G | 156 | 0.82749 | I | 592 | 0.82961 |
| W | 157 | 0.89334 | V | 593 | 0.82265 |
| R | 158 | 0.84422 | G | 594 | 0.79464 |
| G | 159 | 0.81661 | R | 595 | 0.79581 |
| R | 160 | 0.84997 | G | 596 | 0.75567 |
| L | 161 | 0.80405 | P | 597 | 0.67580 |
| K | 162 | 0.83310 | A | 598 | 0.66703 |
| F | 163 | 0.84854 | I | 599 | 0.70066 |
| A | 164 | 0.82071 | T | 600 | 0.71874 |
| R | 165 | 0.85153 | D | 601 | 0.80121 |
| K | 166 | 0.85337 | K | 602 | 0.78879 |
| P | 167 | 0.86041 | D | 603 | 0.80683 |
| F | 168 | 0.86208 | R | 604 | 0.80612 |
| C | 169 | 0.88252 | T | 605 | 0.63462 |
| V | 170 | 0.83160 | K | 606 | 0.77249 |
| I | 171 | 0.84385 | G | 607 | 0.69574 |
| D | 172 | 0.84773 | P | 608 | 0.66474 |
| I | 173 | 0.80309 | A | 609 | 0.70432 |
| M | 174 | 0.85607 | E | 610 | 0.71386 |
| V | 175 | 0.80831 | A | 611 | 0.65708 |
| L | 176 | 0.79154 | E | 612 | 0.77115 |
| I | 177 | 0.77401 | L | 613 | 0.71805 |
| A | 178 | 0.78984 | P | 614 | 0.77089 |
| S | 179 | 0.80554 | E | 615 | 0.78590 |
| I | 180 | 0.80296 | D | 616 | 0.82801 |
| A | 181 | 0.75635 | P | 617 | 0.84615 |
| V | 182 | 0.79708 | S | 618 | 0.84275 |
| L | 183 | 0.77764 | M | 619 | 0.88422 |
| A | 184 | 0.76103 | M | 620 | 0.87769 |
| A | 185 | 0.79684 | G | 621 | 0.81022 |
| G | 186 | 0.79120 | R | 622 | 0.83746 |
| S | 187 | 0.78411 | L | 623 | 0.79490 |
| Q | 188 | 0.84800 | G | 624 | 0.75039 |
| G | 189 | 0.81077 | K | 625 | 0.81890 |
| N | 190 | 0.84766 | V | 626 | 0.80865 |
| V | 191 | 0.82801 | E | 627 | 0.82266 |
| F | 192 | 0.84783 | K | 628 | 0.80592 |
| A | 193 | 0.81929 | Q | 629 | 0.83384 |
| T | 194 | 0.82264 | V | 630 | 0.80001 |
| S | 195 | 0.82273 | L | 631 | 0.70846 |
| A | 196 | 0.80430 | S | 632 | 0.76364 |
| L | 197 | 0.75503 | M | 633 | 0.77189 |
| R | 198 | 0.82569 | E | 634 | 0.73121 |
| S | 199 | 0.82131 | K | 635 | 0.71495 |
| L | 200 | 0.79274 | K | 636 | 0.74626 |
| R | 201 | 0.84353 | L | 637 | 0.70963 |
| F | 202 | 0.84811 | D | 638 | 0.73671 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| L | 203 | 0.80278 | F | 639 | 0.74417 |
| Q | 204 | 0.85940 | L | 640 | 0.70391 |
| I | 205 | 0.83876 | V | 641 | 0.72659 |
| L | 206 | 0.81167 | N | 642 | 0.70343 |
| R | 207 | 0.85191 | I | 643 | 0.70858 |
| M | 208 | 0.88118 | Y | 644 | 0.75633 |
| I | 209 | 0.84613 | M | 645 | 0.70608 |
| R | 210 | 0.86252 | Q | 646 | 0.76508 |
| M | 211 | 0.88965 | R | 647 | 0.74660 |
| D | 212 | 0.85085 | M | 648 | 0.76628 |
| R | 213 | 0.84835 | G | 649 | 0.71980 |
| R | 214 | 0.84763 | I | 650 | 0.67970 |
| G | 215 | 0.82331 | P | 651 | 0.71743 |
| G | 216 | 0.82260 | P | 652 | 0.69726 |
| T | 217 | 0.83901 | T | 653 | 0.62658 |
| W | 218 | 0.87503 | E | 654 | 0.71308 |
| K | 219 | 0.83142 | T | 655 | 0.71047 |
| L | 220 | 0.80629 | E | 656 | 0.68449 |
| L | 221 | 0.80341 | A | 657 | 0.71780 |
| G | 222 | 0.79880 | Y | 658 | 0.73906 |
| S | 223 | 0.82258 | F | 659 | 0.73216 |
| V | 224 | 0.81382 | G | 660 | 0.68716 |
| V | 225 | 0.82573 | A | 661 | 0.59854 |
| Y | 226 | 0.86404 | K | 662 | 0.60503 |
| A | 227 | 0.82537 | E | 663 | 0.51886 |
| H | 228 | 0.87637 | P | 664 | 0.55157 |
| S | 229 | 0.84016 | E | 665 | 0.58567 |
| K | 230 | 0.82729 | P | 666 | 0.69463 |
| E | 231 | 0.82851 | A | 667 | 0.73156 |
| L | 232 | 0.79232 | P | 668 | 0.76551 |
| V | 233 | 0.77404 | P | 669 | 0.77228 |
| T | 234 | 0.83568 | Y | 670 | 0.78021 |
| A | 235 | 0.81594 | H | 671 | 0.78082 |
| W | 236 | 0.87925 | S | 672 | 0.73827 |
| Y | 237 | 0.87002 | P | 673 | 0.73743 |
| I | 238 | 0.83796 | E | 674 | 0.65522 |
| G | 239 | 0.83092 | D | 675 | 0.64413 |
| F | 240 | 0.84961 | S | 676 | 0.63492 |
| L | 241 | 0.80435 | R | 677 | 0.57415 |
| C | 242 | 0.86024 | E | 678 | 0.55321 |
| L | 243 | 0.80036 | H | 679 | 0.50938 |
| I | 244 | 0.82149 | V | 680 | 0.35257 |
| L | 245 | 0.80565 | D | 681 | 0.47152 |
| A | 246 | 0.80424 | R | 682 | 0.56888 |
| S | 247 | 0.82305 | H | 683 | 0.57840 |
| F | 248 | 0.84188 | G | 684 | 0.60209 |
| L | 249 | 0.80184 | C | 685 | 0.65720 |
| V | 250 | 0.81736 | I | 686 | 0.62997 |
| Y | 251 | 0.85175 | V | 687 | 0.59120 |
| L | 252 | 0.79964 | K | 688 | 0.68721 |
| A | 253 | 0.80417 | I | 689 | 0.60867 |
| E | 254 | 0.81514 | V | 690 | 0.62360 |
| K | 255 | 0.81637 | R | 691 | 0.68417 |
| G | 256 | 0.75477 | S | 692 | 0.69459 |
| E | 257 | 0.77953 | S | 693 | 0.59774 |
| N | 258 | 0.83332 | S | 694 | 0.69098 |
| D | 259 | 0.77117 | S | 695 | 0.68403 |
| H | 260 | 0.81164 | T | 696 | 0.56848 |
| F | 261 | 0.84291 | G | 697 | 0.66882 |
| D | 262 | 0.76888 | Q | 698 | 0.69566 |
| T | 263 | 0.83447 | K | 699 | 0.65899 |
| Y | 264 | 0.85251 | N | 700 | 0.70111 |
| A | 265 | 0.80531 | F | 701 | 0.67598 |
| D | 266 | 0.84725 | S | 702 | 0.63064 |
| A | 267 | 0.83389 | A | 703 | 0.65117 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| L | 268 | 0.81455 | P | 704 | 0.63333 |
| W | 269 | 0.88507 | P | 705 | 0.53845 |
| W | 270 | 0.87828 | A | 706 | 0.42804 |
| G | 271 | 0.81171 | A | 707 | 0.33483 |
| L | 272 | 0.80077 | P | 708 | 0.45186 |
| I | 273 | 0.78549 | P | 709 | 0.47314 |
| T | 274 | 0.78146 | V | 710 | 0.50582 |
| L | 275 | 0.75447 | Q | 711 | 0.56289 |
| T | 276 | 0.77933 | C | 712 | 0.71446 |
| T | 277 | 0.79332 | P | 713 | 0.71804 |
| I | 278 | 0.78844 | P | 714 | 0.73266 |
| G | 279 | 0.79177 | S | 715 | 0.75568 |
| Y | 280 | 0.81632 | T | 716 | 0.74417 |
| G | 281 | 0.76872 | S | 717 | 0.72578 |
| D | 282 | 0.79944 | W | 718 | 0.74612 |
| K | 283 | 0.78856 | Q | 719 | 0.67592 |
| Y | 284 | 0.77557 | P | 720 | 0.56963 |
| P | 285 | 0.80780 | Q | 721 | 0.52495 |
| Q | 286 | 0.76005 | S | 722 | 0.30845 |
| T | 287 | 0.79635 | H | 723 | 0.42621 |
| W | 288 | 0.83935 | P | 724 | 0.43604 |
| N | 289 | 0.80378 | R | 725 | 0.54037 |
| G | 290 | 0.77211 | Q | 726 | 0.59040 |
| R | 291 | 0.79372 | G | 727 | 0.58205 |
| L | 292 | 0.75034 | H | 728 | 0.63708 |
| L | 293 | 0.74788 | G | 729 | 0.68395 |
| A | 294 | 0.76429 | T | 730 | 0.62876 |
| A | 295 | 0.76361 | S | 731 | 0.72936 |
| T | 296 | 0.78176 | P | 732 | 0.72778 |
| F | 297 | 0.79581 | V | 733 | 0.65787 |
| T | 298 | 0.78553 | G | 734 | 0.66628 |
| L | 299 | 0.75815 | D | 735 | 0.67839 |
| I | 300 | 0.77863 | H | 736 | 0.61778 |
| G | 301 | 0.76378 | G | 737 | 0.60725 |
| V | 302 | 0.77402 | S | 738 | 0.66095 |
| S | 303 | 0.77749 | L | 739 | 0.65984 |
| F | 304 | 0.79736 | V | 740 | 0.66588 |
| F | 305 | 0.79759 | R | 741 | 0.71180 |
| A | 306 | 0.75832 | I | 742 | 0.66137 |
| L | 307 | 0.75125 | P | 743 | 0.72372 |
| P | 308 | 0.79440 | P | 744 | 0.76479 |
| A | 309 | 0.76203 | P | 745 | 0.73318 |
| G | 310 | 0.78401 | P | 746 | 0.74910 |
| I | 311 | 0.81146 | A | 747 | 0.67086 |
| L | 312 | 0.78539 | H | 748 | 0.73760 |
| G | 313 | 0.80228 | E | 749 | 0.70835 |
| S | 314 | 0.82267 | R | 750 | 0.71329 |
| G | 315 | 0.79829 | S | 751 | 0.70899 |
| F | 316 | 0.83733 | L | 752 | 0.62458 |
| A | 317 | 0.80975 | S | 753 | 0.62360 |
| L | 318 | 0.80373 | A | 754 | 0.60727 |
| K | 319 | 0.83670 | Y | 755 | 0.62417 |
| V | 320 | 0.82515 | G | 756 | 0.57099 |
| Q | 321 | 0.86930 | G | 757 | 0.61883 |
| E | 322 | 0.85252 | G | 758 | 0.60271 |
| Q | 323 | 0.88018 | N | 759 | 0.59563 |
| H | 324 | 0.89251 | R | 760 | 0.66625 |
| R | 325 | 0.86843 | A | 761 | 0.58570 |
| Q | 326 | 0.88753 | S | 762 | 0.58460 |
| K | 327 | 0.86197 | M | 763 | 0.53144 |
| H | 328 | 0.88636 | E | 764 | 0.57581 |
| F | 329 | 0.86687 | F | 765 | 0.50947 |
| E | 330 | 0.84997 | L | 766 | 0.44810 |
| K | 331 | 0.85537 | R | 767 | 0.43576 |
| R | 332 | 0.85615 | Q | 768 | 0.31124 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| R | 333 | 0.85028 | E | 769 | 0.44719 |
| N | 334 | 0.85654 | D | 770 | 0.41838 |
| P | 335 | 0.85016 | T | 771 | 0.36963 |
| A | 336 | 0.81318 | P | 772 | 0.48446 |
| A | 337 | 0.81124 | G | 773 | 0.39527 |
| G | 338 | 0.80873 | C | 774 | 0.45784 |
| L | 339 | 0.78368 | R | 775 | 0.46464 |
| I | 340 | 0.80753 | P | 776 | 0.48966 |
| Q | 341 | 0.84599 | P | 777 | 0.53256 |
| S | 342 | 0.75125 | E | 778 | 0.57115 |
| A | 343 | 0.81259 | G | 779 | 0.54675 |
| W | 344 | 0.87974 | N | 780 | 0.56080 |
| R | 345 | 0.83277 | L | 781 | 0.57495 |
| F | 346 | 0.81752 | R | 782 | 0.62359 |
| Y | 347 | 0.87162 | D | 783 | 0.61770 |
| A | 348 | 0.81789 | S | 784 | 0.68221 |
| T | 349 | 0.82835 | D | 785 | 0.71302 |
| N | 350 | 0.84759 | T | 786 | 0.69935 |
| L | 351 | 0.79809 | S | 787 | 0.71355 |
| S | 352 | 0.79218 | I | 788 | 0.72628 |
| R | 353 | 0.83002 | S | 789 | 0.72552 |
| T | 354 | 0.79713 | I | 790 | 0.73600 |
| D | 355 | 0.81798 | P | 791 | 0.73034 |
| L | 356 | 0.79340 | S | 792 | 0.74211 |
| H | 357 | 0.76207 | V | 793 | 0.75895 |
| S | 358 | 0.82396 | D | 794 | 0.75029 |
| T | 359 | 0.83093 | H | 795 | 0.78207 |
| W | 360 | 0.88364 | E | 796 | 0.75249 |
| Q | 361 | 0.82192 | E | 797 | 0.74811 |
| Y | 362 | 0.87464 | L | 798 | 0.73425 |
| Y | 363 | 0.87464 | E | 799 | 0.73364 |
| E | 364 | 0.83577 | R | 800 | 0.74535 |
| R | 365 | 0.84564 | S | 801 | 0.76741 |
| T | 366 | 0.83517 | F | 802 | 0.76956 |
| V | 367 | 0.81897 | S | 803 | 0.78319 |
| T | 368 | 0.80378 | G | 804 | 0.78461 |
| V | 369 | 0.82805 | F | 805 | 0.79780 |
| P | 370 | 0.82623 | S | 806 | 0.76669 |
| M | 371 | 0.81816 | I | 807 | 0.77024 |
| Y | 372 | 0.77736 | S | 808 | 0.75023 |
| S | 373 | 0.59502 | Q | 809 | 0.77169 |
| S | 374 | 0.54782 | S | 810 | 0.75459 |
| Q | 375 | 0.52380 | K | 811 | 0.70336 |
| T | 376 | 0.40535 | E | 812 | 0.72413 |
| Q | 377 | 0.41262 | N | 813 | 0.67918 |
| T | 378 | 0.37023 | L | 814 | 0.65035 |
| Y | 379 | 0.37022 | D | 815 | 0.67015 |
| G | 380 | 0.40128 | A | 816 | 0.57812 |
| A | 381 | 0.45914 | L | 817 | 0.66230 |
| S | 382 | 0.54948 | N | 818 | 0.62224 |
| R | 383 | 0.68661 | S | 819 | 0.61281 |
| L | 384 | 0.73815 | C | 820 | 0.61274 |
| I | 385 | 0.79097 | Y | 821 | 0.65718 |
| P | 386 | 0.84102 | A | 822 | 0.53493 |
| P | 387 | 0.85405 | A | 823 | 0.47340 |
| L | 388 | 0.81305 | V | 824 | 0.39541 |
| N | 389 | 0.84928 | A | 825 | 0.52616 |
| Q | 390 | 0.84681 | P | 826 | 0.58713 |
| L | 391 | 0.78870 | C | 827 | 0.68273 |
| E | 392 | 0.78575 | A | 828 | 0.67071 |
| L | 393 | 0.78719 | K | 829 | 0.72604 |
| L | 394 | 0.78346 | V | 830 | 0.71679 |
| R | 395 | 0.82280 | R | 831 | 0.77135 |
| N | 396 | 0.82550 | P | 832 | 0.79156 |
| L | 397 | 0.79944 | Y | 833 | 0.79310 |

| | | | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| K | 398 | 0.83378 | I | 834 | 0.70398 |
| S | 399 | 0.80528 | A | 835 | 0.61937 |
| K | 400 | 0.82181 | E | 836 | 0.58794 |
| S | 401 | 0.81105 | G | 837 | 0.57744 |
| G | 402 | 0.79364 | E | 838 | 0.62442 |
| L | 403 | 0.79234 | S | 839 | 0.68507 |
| A | 404 | 0.74404 | D | 840 | 0.73743 |
| F | 405 | 0.81288 | T | 841 | 0.71555 |
| R | 406 | 0.78816 | D | 842 | 0.74628 |
| K | 407 | 0.68472 | S | 843 | 0.73611 |
| D | 408 | 0.66353 | D | 844 | 0.70781 |
| P | 409 | 0.60354 | L | 845 | 0.73366 |
| P | 410 | 0.65380 | C | 846 | 0.76451 |
| P | 411 | 0.67547 | T | 847 | 0.68392 |
| E | 412 | 0.68641 | P | 848 | 0.76061 |
| P | 413 | 0.75001 | C | 849 | 0.71251 |
| S | 414 | 0.69041 | G | 850 | 0.67492 |
| P | 415 | 0.68824 | P | 851 | 0.67796 |
| S | 416 | 0.61419 | P | 852 | 0.59805 |
| K | 417 | 0.41752 | P | 853 | 0.52417 |
| G | 418 | 0.37653 | R | 854 | 0.47339 |
| S | 419 | 0.33857 | S | 855 | 0.51862 |
| P | 420 | 0.31154 | A | 856 | 0.53656 |
| C | 421 | 0.33261 | T | 857 | 0.61094 |
| R | 422 | 0.23592 | G | 858 | 0.63367 |
| G | 423 | 0.23244 | E | 859 | 0.62538 |
| P | 424 | 0.27089 | G | 860 | 0.62220 |
| L | 425 | 0.31812 | P | 861 | 0.61726 |
| C | 426 | 0.39539 | F | 862 | 0.62613 |
| G | 427 | 0.37752 | G | 863 | 0.60150 |
| C | 428 | 0.40771 | D | 864 | 0.66308 |
| C | 429 | 0.40906 | V | 865 | 0.59772 |
| P | 430 | 0.37813 | G | 866 | 0.63029 |
| G | 431 | 0.38120 | W | 867 | 0.77927 |
| R | 432 | 0.41429 | A | 868 | 0.59610 |
| S | 433 | 0.45711 | G | 869 | 0.64025 |
| S | 434 | 0.53396 | P | 870 | 0.63782 |
| Q | 435 | 0.75031 | R | 871 | 0.53425 |
| K | 436 | 0.76496 | K | 872 | 0.45264 |

Tabla S5. Especies de las que se obtuvieron las secuencias de KCNQ2 para el cálculo de los valores de conservación de sus aminoácidos. Las secuencias de todas especies (62) oscilan entre los 850 y 875 aminoácidos.

| Código Uniprot | Especie | Código Uniprot | Especie |
|----------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| A0A6J1YBD7 | <i>Acinonyx jubatus</i> | A0A6J1VM80 | <i>Notechis scutatus</i> |
| A0A7N5JUP3 | <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | A0A7L4BX40 | <i>Nyctiprogne leucopyga</i> |
| A0A2K5EWT1 | <i>Aotus nancymae</i> | A0A6P3FS62 | <i>Octodon degus</i> |
| A0A6P3GU07 | <i>Bison bison bison</i> | A0A2U3WMF7 | <i>Odobenus rosamaris divergens</i> |
| G3N2R2 | <i>Bos taurus</i> | A0A6J0W124 | <i>Odocoileus virginianus texanus</i> |
| F7CY15 | <i>Callithrix jacchus</i> | A0A7L1ERT0 | <i>Oenanthe oenanthe</i> |
| A0A452E7F3 | <i>Capra hircus</i> | H0X1I7 | <i>Otolemur garnettii</i> |
| A0A286XK97 | <i>Cavia porcellus</i> | A0A6P3YM10 | <i>Ovis aries</i> |
| A0A2K5QX14 | <i>Cebus imitator</i> | A0A2R9AU86 | <i>Pan paniscus</i> |
| A0A2K5L1K5 | <i>Cercocebus atys</i> | H2QKS4 | <i>Pan troglodytes</i> |
| A0A7L3EB03 | <i>Chaetops frenatus</i> | A0A6P9E117 | <i>Pantherophis guttatus</i> |
| A0A6J2VKS8 | <i>Chanos chanos</i> | A0A2I3NHI2 | <i>Papio anubis</i> |
| A0A6I9KEP6 | <i>Chrysochloris asiatica</i> | A0A6J0CPL8 | <i>Peromyscus maniculatus bairdii</i> |
| A0A6J2PDX4 | <i>Cottoperca gobio</i> | A0A6P5JXG8 | <i>Phascolarctos cinereus</i> |
| A0A2Y9QH4 | <i>Delphinapterus leucas</i> | A0A6J2MPK5 | <i>Phyllostomus discolor</i> |
| A0A4W4F1P1 | <i>Electrophorus electricus</i> | A0A2Y9T7Y1 | <i>Physeter macrocephalus</i> |
| F6VHK7 | <i>Equus caballus</i> | A0A2K6ET95 | <i>Propithecus coquereli</i> |
| A0A1S3WCY9 | <i>Erinaceus europaeus</i> | O88943 | <i>Rattus norvegicus</i> |
| M3WAG9 | <i>Felis catus</i> | A0A671F4Z0 | <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> |
| G3QZ98 | <i>Gorilla gorilla gorilla</i> | A0A2K6P629 | <i>Rhinopithecus roxellana</i> |
| A0A7K9DPE3 | <i>Hemiprocne comata</i> | A0A7N4NU17 | <i>Sarcophilus harrisii</i> |

| | | | |
|------------|-----------------------------------|------------|---------------------------------|
| O43526 | <i>Homo sapiens</i> | A0A672MMS1 | <i>Sinocyclocheilus grahami</i> |
| A0A2D0RWX1 | <i>Ictalurus punctatus</i> | A0A286ZS06 | <i>Sus scrofa</i> |
| A0A287DBX6 | <i>Ictidomys tridecemlineatus</i> | A0A6J3Q231 | <i>Tursiops truncatus</i> |
| A0A6J0IPQ1 | <i>Lepidothrix coronata</i> | A0A452SKB9 | <i>Ursus americanus</i> |
| A0A340XT99 | <i>Lipotes vexillifer</i> | A0A3Q7W3Y1 | <i>Ursus arctos horribilis</i> |
| A0A2K6C5Y1 | <i>Macaca nemestrina</i> | A0A6J3BGW9 | <i>Vicugna pacos</i> |
| A0A1U8BXY3 | <i>Mesocricetus auratus</i> | A0A4X2LHR0 | <i>Vombatus ursinus</i> |
| F6WQP9 | <i>Monodelphis domestica</i> | A0A3Q7U035 | <i>Vulpes vulpes</i> |
| B7ZBV9 | <i>Mus musculus</i> | A0A6I8QM30 | <i>Xenopus tropicalis</i> |
| A0A341BVZ4 | <i>Neophocaena asiaorientalis</i> | A0A6J2FFJ4 | <i>Zalophus californianus</i> |

Para generar el descriptor de estructura secundaria fue necesario combinar la información estructural de KCNQ2 resuelta hasta la fecha (PDB ID: 7CR3) con programas bioinformáticos de predicción de estructura secundaria para completar las zonas estructuralmente desconocidas del canal. Aunque existen diversos programas para tal fin, se decidió trabajar con el metaserver PROTEUS2 (<http://www.proteus2.ca/proteus2/>) por permitir recibir como input el fichero PDB y modelar a partir de él mediante homología (*homology modelling*). La estructura secundaria de cada residuo de KCNQ2 se muestran en la **Figura S2**.

Figura S2. Predicción de la estructura secundaria mediante PROTEUS2. La primera línea hace referencia a la secuencia proteica del canal, la segunda a la estructura secundaria de la que forman parte (C = coiled coil, H = helix, T = transmembrane helix y E = beta strand) y la última a la puntuación de la predicción en cada posición, siendo 0 el valor más bajo y 1 el valor más alto.

| | | |
|-----|--|-----|
| 1 | MVQKSRNGGVYPGPSGEKKLVGFVGLDPGAPDSTRDGALLIAGSEAPKRGSLSKPRAG | 60 |
| | CCCCCCCCCCCCCHHHHHHHCCCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | |
| | 998876677777765677777644557887677666666667778777776555777777 | |
| 61 | GAGAGKPPKRNAFYRKLQNFYLVNLERPRGWAIFYHAYVLLVFSCLVSVFSTIKEYEK | 120 |
| | CCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCHHHH | |
| | 77777776664567887767767657876578999999999999999999999996777 | |
| 121 | SSEGALYILEIVTIVFVVEYFVRIWAAGCCCRYGRGRLKFARKPFVIDIMVLIASI | 180 |
| | HHHHHCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCCHHHHHHCCTTTTTTTTTT | |
| | 6667899 | |
| 181 | AVLAAGSQGNVATSLRSLRFLQILRMIRDRRGGTWKLKLSVVYAHSKELVTAWYIGF | 240 |
| | TTTTTTCCHHHHHHHHHHCCTTTTTTTTTTTCCHHHHHHHHHHHCCCCTTTTT | |
| | 99999999666555788999 | |
| 241 | LCLILASFLVYLAEGENDHFDYADALWGLITLTITIGYGDYKYPQTWNGRLLAATFTLI | 300 |
| | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCCCCCTTTTTTCCCCCCCCCCCCTTTTTTTT | |
| | 99 | |
| 301 | GVSFALPAGILGSGFALKVQEQHRQKHFEKRRNPAAGLIQSAWRFYATNLSRTDLHSTW | 360 |
| | TTTTTTTTCTTTTTTCHHH | |
| | 99 | |
| 361 | QYYERTVTVPYSSQTQTYGASRLIPPLNQLLELRNLKSKSGLAFKRDPPPEPSPKSGSP | 420 |
| | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | |
| | 6766788877777777777777777645556557877777777777777777777777777 | |
| 421 | CRGPLCGCCPRSSQKVSILKDRVFSRPGVAAKGGSPQAQTVRRSPSADQSLSDSPSKV | 480 |
| | CCCCCCCCCCCCCECC | |
| | 777777666766765555777677 | |
| 481 | PKSWFGRSRRARQAFRIKGAASRQNEEASLPGEDIVDDKSCPEFVTEDLTPGLKVISI | 540 |
| | CCCE | |
| | 76677543 | |
| 541 | RAVCMRFLVSKRKFKESLRPYDVMVIEQYSAGHLDMSRIKSLQSRVDQIVGRGPAIT | 600 |
| | CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH | |
| | 247999 | |
| 601 | DKDRTKGPAEAEALPEDPSMMGRGLGKVEQVLSMEKKLDFLVNIYMQRMGIPPTETAEYFG | 660 |
| | CCCCCCCCCCCCCCCCCHHH | |
| | 777777777777766655788899999999999999999999999999999999999999 | |
| 661 | AKEPEPAPPYHSPEDSREHVDHGCIVKIVRSSSTGQKNFSAPPAAPPVQCPPTSQWQP | 720 |
| | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | |
| | 77777777777776666666788875678877888568776667667777767777777777 | |
| 721 | QSHPRQGHGTSVPVGHGSLVRIPPPAPHERLSAYGGGNRASMEFLRQEDTPGCRPPEGN | 780 |
| | CCCCCCCCCCCCCCCCCECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH | |
| | 7777777777777677656656765777656654788887776766777777777777777 | |
| 781 | LRSDTISISIPVDHEELERSFGFSISQSKENLDALNSCYAAVAPCAKVRPIAEGESD | 840 |
| | CCCCCCCCCECC | |
| | 77777655567765566677777777666666666777776667665667766678777 | |
| 841 | TDSDLCTPCGPPRSATGEGPFGDVGWAGPRK | 872 |
| | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | |
| | 77777777677766667777776667777 | |

En el GitHub (https://github.com/albasaezmat/TFM_UAM/tree/main/Material_suplementario) se encuentra el fichero “DDBB_generation.ipynb” donde se muestra el proceso automatizado para la creación de la base de datos y sus descriptores.

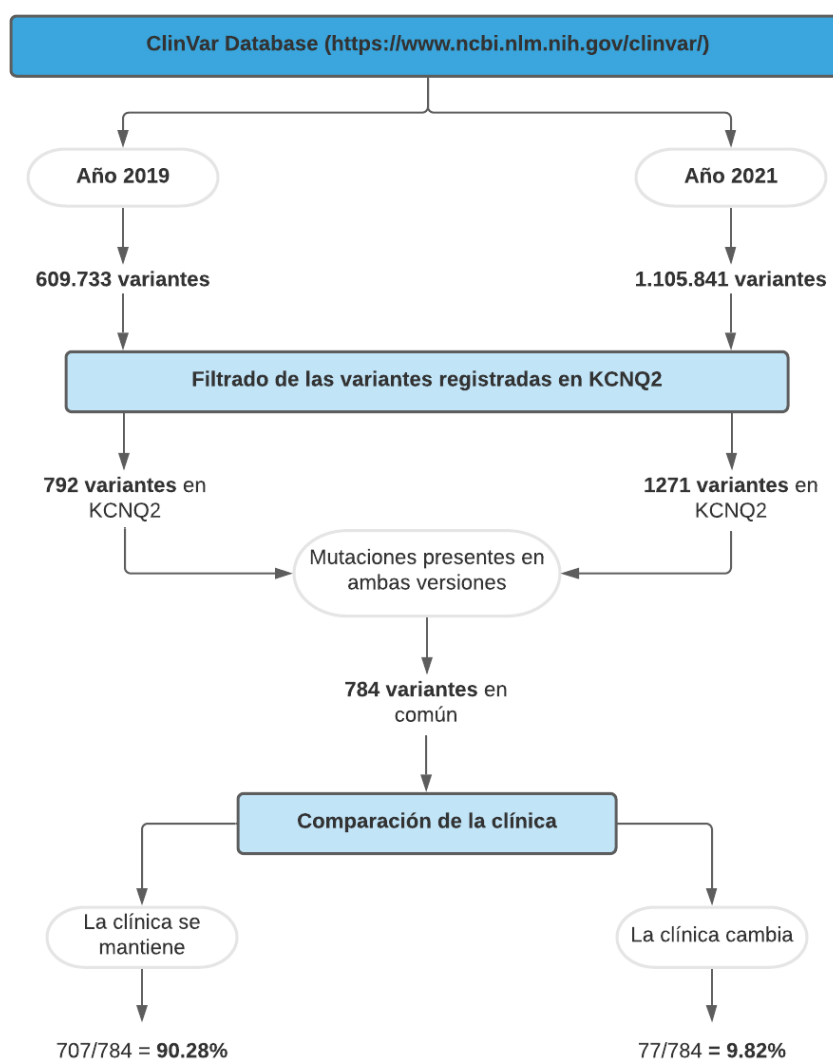
Estudio de las reclasificaciones de KCNQ2 en ClinVar

El estudio de las reclasificaciones se llevó a cabo descargando los archivos VCF correspondientes a 2019 y 2021, respectivamente:

- https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/clinvar/vcf_GRCh38/archive_2.0/2019/clinvar_20191219.vcf.gz
- https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/clinvar/vcf_GRCh38/archive_2.0/2021/clinvar_20211204.vcf.gz

Una vez se descargaron los ficheros de ambos años, se filtraron las variantes específicas de KCNQ2. A continuación, se emparejaron las mutaciones de 2019/2021 y se comparó la clínica entre las mutaciones presentes en ambas versiones. El procedimiento completo se muestra en la **Figura S3**.

Figura S3. Workflow llevado a cabo para el estudio de las reclasificaciones de ClinVar de variantes de KCNQ2.



De las 77 variantes que son reclasificadas entre 2019 y 2021, los cambios de etiqueta que suceden son los que se muestran en la **Tabla S6**.

Tabla S6. Tabla resumen de las reclasificaciones de KCNQ2 en ClinVar durante los años 2019 y 2021. En la primera columna se muestra la clínica de la mutación en cuestión en el año 2019 y, en la segunda, la clínica en 2021. La última columna recoge el número de veces que ocurre ese cambio entre los años elegidos. La etiqueta “B” hace referencia a “*benign*”, “CI” a “*conflicting interpretations*”, “LB” a “*likely benign*”, “LP” a “*likely pathogenic*”, “P” a “*pathogenic*” y “VUS” a “*variant of uncertain significance*”.

| Clínica 2019 | Clínica 2021 | N.º veces |
|--------------|--------------|-----------|
| B | CI | 1 |
| B | LB | 2 |
| CI | B | 1 |
| CI | LB | 5 |
| CI | LP | 4 |
| CI | P | 3 |
| CI | VUS | 1 |
| LB | B | 10 |
| LB | CI | 4 |
| LP | CI | 11 |
| LP | P | 3 |
| P | B | 2 |
| P | CI | 1 |
| P | LP | 10 |
| P | VUS | 2 |
| VUS | CI | 11 |
| VUS | LB | 2 |
| VUS | LP | 2 |
| VUS | P | 2 |

En el GitHub (https://github.com/albasaezmat/TFM_UAM/tree/main/Material_suplementario) se encuentra el fichero “*clinic_reclass_ClinVar.ipynb*” donde se muestra el proceso automatizado para el estudio de las reclasificaciones en ClinVar.

Por último, y siguiendo el mismo procedimiento que para KCNQ2, se realiza el cálculo de las tasas de reclasificación de las variantes anotadas en ClinVar para el resto de miembros de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje ($K_{v7.1}$ - $K_{v7.5}$). Estos canales se codifican a partir de los genes KCNQ1-KCNQ5, respectivamente. En la **Tabla S7** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla S7. Tabla resumen de las tasas de reclasificación estimadas para los miembros de la familia KCNQ.

| | KCNQ1 | | KCNQ2 | | KCNQ3 | | KCNQ4 | | KCNQ5 | |
|------------------------------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|----------------|---------|
| | 2019 | 2021 | 2019 | 2021 | 2019 | 2021 | 2019 | 2021 | 2019 | 2021 |
| Total genes variants | 609733 | 1105841 | 609733 | 1105841 | 609733 | 1105841 | 609733 | 1105841 | 609733 | 1105841 |
| Total KCNQ variants | 945* | 1373 | 792 | 1247 | 486 | 821 | 107 | 192 | 16 | 59 |
| Common variants ('19 - '21) | 944 | | 784 | | 486 | | 107 | | 16 | |
| Variants that kept clinic | 84.85% (801/944) | | 90.18% (707/784) | | 90.95% (442/486) | | 93.46% (100/107) | | 81.25% (13/16) | |
| Variants that changed | 15.15% (143/944) | | 9.82% (77/784) | | 9.05% (44/486) | | 6.54% (7/107) | | 18.75% (3/16) | |

(*) Una variante tuvo que ser eliminada por no tener una clínica definida.

Modelos de machine learning

Para entrenar cada uno de los modelos se creó un `Pipeline()` sobre el que se añadió la clase `StandardScaler()` y uno de los estimadores entrenados. Previamente, se realizó un filtrado de características basado en un *F-score* (ANOVA) mediante la clase `SelectKBest()`. Los *pipelines* finales para cada uno de los modelos así como el número de características seleccionadas (*k*) se muestran en la **Tabla S8**.

Tabla S8. Número de características seleccionadas y *pipelines* completos de los modelos entrenados. En la tabla se recogen el mejor número de *features* (*k*) y los parámetros modificados para los modelos de Regresión Lineal con penalización LASSO (L1), *Support Vector Classifier* (SVC) y *Random Forest* (RF). El resto de parámetros que no se muestran mantuvieron su valor por defecto.

| Modelo | Nº características (<i>k</i>) | Pipeline |
|--------|---------------------------------|---|
| L1 | <i>k</i> = 15 | pipeline_LR1 = Pipeline([("scaler", StandardScaler()), ("logistic_l1", LogisticRegression(solver = "liblinear", penalty = "l1", fit_intercept = False, class_weight = {0: 3, 1:1}, C=2.2, random_state = 1))]) |
| SVC | <i>k</i> = 10 | pipeline_SVC = Pipeline([("scaler", StandardScaler()), ("SVC", SVC(kernel = "sigmoid", coef0 = 0.3, class_weight = {0: 3, 1:2}, probability = True, random_state = 0))]) |
| RF | <i>k</i> = "all" | pipeline_RF = Pipeline([("scaler", StandardScaler()), ("RF ", RandomForestClassifier(criterion = "entropy", max_depth = 3, min_samples_split = 3, n_estimators = 145, max_features = "sqrt", bootstrap = True, max_samples = 15, class_weight = {0: 9, 1:1}, random_state = 12))]) |

En el GitHub (https://github.com/albasaezmat/TFM_UAM/tree/main/Material_suplementario) se encuentra el fichero "ML_models.ipynb" donde se muestra el diseño de los modelos de aprendizaje automático.

Predicción del efecto de las variantes

Treinta y ocho variantes de interpretación conflictiva de KCNQ2 anotadas en ClinVar fueron seleccionadas para poner a prueba la precisión de los modelos entrenados. Los resultados se muestran en la **Tabla S9**.

Tabla S9. Predicciones de las 38 mutaciones conflictivas a partir de los modelos diseñados. La primera columna "*Mutations*" hace referencia a la mutación en cuestión. Las siguientes tres columnas ("LR1", "SVC" y "RF") son las predicciones realizadas por los tres modelos entrenados. Los modelos atribuyen la etiqueta 0 (benigna) o 1 (patológica) en función de las probabilidades calculadas para cada clase. Siempre que la probabilidad es ≥ 0.5 para la clase benigna, el algoritmo hará la predicción como "clase 0". De manera similar, siempre que la probabilidad sea > 0.5 para la clase patológica, el algoritmo hará la predicción como "clase 1". Las últimas tres columnas hacen referencia a las probabilidades calculadas para cada etiqueta por cada uno de los modelos entrenados.

| Mutations | LR1 | SVC | RF | prob_LR1 [class0,class1] | prob_SVC [class0,class1] | prob_RF [class0,class1] |
|-----------|-----|-----|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| P777R | 0 | 0 | 0 | [0.99530601, 0.00469399] | [0.3785825, 0.6214175] | [0.56673998, 0.43326002] |
| P777S | 0 | 0 | 0 | [0.99653039, 0.00346961] | [0.3785825, 0.6214175] | [0.67720888, 0.32279112] |

| | | | | | | |
|-------|---|---|---|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A707T | 0 | 1 | 0 | [0.99892292, 0.00107708] | [0.14351943, 0.85648057] | [0.54208216, 0.45791784] |
| T696M | 0 | 0 | 1 | [0.52318316, 0.47681684] | [0.98931449, 0.01068551] | [0.43411991, 0.56588009] |
| R691H | 1 | 1 | 0 | [0.21712671, 0.78287329] | [0.22780045, 0.77219955] | [0.52121388, 0.47878612] |
| P638L | 1 | 0 | 1 | [0.28724608, 0.71275392] | [0.39393093, 0.60606907] | [0.49933224, 0.50066776] |
| R622W | 1 | 1 | 1 | [0.44650922, 0.55349078] | [0.23570389, 0.76429611] | [0.29378057, 0.70621943] |
| T605S | 0 | 0 | 0 | [0.99779014, 0.00220986] | [0.65678528, 0.34321472] | [0.69669293, 0.30330707] |
| R563P | 1 | 1 | 1 | [0.00627951, 0.99372049] | [0.06588571, 0.93411429] | [0.25208373, 0.74791627] |
| R553W | 1 | 1 | 1 | [0.17329038, 0.82670962] | [0.22172199, 0.77827801] | [0.30960603, 0.69039397] |
| V543M | 1 | 1 | 0 | [0.36062588, 0.63937412] | [0.34280832, 0.65719168] | [0.57424842, 0.42575158] |
| E530K | 1 | 1 | 0 | [0.11963126, 0.88036874] | [0.17496829, 0.82503171] | [0.50661173, 0.49338827] |
| E515D | 0 | 0 | 0 | [0.87606723, 0.12393277] | [0.5, 0.5] | [0.65146637, 0.34853363] |
| P424S | 0 | 0 | 0 | [9.99998380e-01, 1.62046151e-06] | [0.57654608, 0.42345392] | [0.6640806, 0.3359194] |
| S374L | 0 | 0 | 0 | [0.99495521, 0.00504479] | [0.75653673, 0.24346327] | [0.53358947, 0.46641053] |
| T359A | 1 | 1 | 1 | [0.01201439, 0.98798561] | [0.09506401, 0.90493599] | [0.30691391, 0.69308609] |
| L356P | 1 | 1 | 0 | [0.0974694, 0.9025306] | [0.16554593, 0.83445407] | [0.50575105, 0.49424895] |
| R353C | 0 | 1 | 1 | [0.51028539, 0.48971461] | [0.29585997, 0.70414003] | [0.36301281, 0.63698719] |
| H328N | 1 | 1 | 1 | [0.16345402, 0.83654598] | [0.27783501, 0.72216499] | [0.45397837, 0.54602163] |
| G310S | 0 | 0 | 0 | [0.68801449, 0.31198551] | [0.5, 0.5] | [0.6537805, 0.3462195] |
| G301V | 0 | 0 | 1 | [0.70561969, 0.29438031] | [0.49070817, 0.50929183] | [0.42145574, 0.57854426] |
| G301S | 0 | 0 | 0 | [0.77916056, 0.22083944] | [0.57639702, 0.42360298] | [0.66929774, 0.33070226] |
| D282H | 1 | 1 | 0 | [0.13264287, 0.86735713] | [0.29463278, 0.70536722] | [0.50615374, 0.49384626] |
| G281R | 1 | 0 | 1 | [0.23790724, 0.76209276] | [0.39954247, 0.60045753] | [0.45612307, 0.54387693] |
| F261S | 1 | 1 | 1 | [0.35954243, 0.64045757] | [0.28771076, 0.71228924] | [0.36514075, 0.63485925] |
| D259N | 0 | 0 | 0 | [0.68689575, 0.31310425] | [0.55040633, 0.44959367] | [0.55051588, 0.44948412] |
| G239V | 1 | 1 | 1 | [0.12848652, 0.87151348] | [0.25453049, 0.74546951] | [0.35908361, 0.64091639] |
| T234I | 1 | 1 | 1 | [0.31088601, 0.68911399] | [0.24072525, 0.75927475] | [0.35184739, 0.64815261] |
| T217I | 1 | 1 | 1 | [0.02626483, 0.97373517] | [0.23139466, 0.76860534] | [0.33269425, 0.66730575] |
| R201C | 1 | 1 | 1 | [0.08273148, 0.91726852] | [0.28567907, 0.71432093] | [0.28626122, 0.71373878] |
| S195F | 1 | 1 | 1 | [0.24943719, 0.75056281] | [0.27953164, 0.72046836] | [0.311988, 0.688012] |
| A193V | 0 | 1 | 1 | [0.82044947, 0.17955053] | [0.33111732, 0.66888268] | [0.4588543, 0.5411457] |
| V182M | 0 | 0 | 0 | [0.97567406, 0.02432594] | [0.40129456, 0.59870544] | [0.63552224, 0.36447776] |
| R144W | 0 | 1 | 1 | [1.00000000e+00, 1.06172767e-14] | [0.23988083, 0.76011917] | [0.28825358, 0.71174642] |
| V132M | 0 | 0 | 0 | [0.94844004, 0.05155996] | [0.47060159, 0.52939841] | [0.69905012, 0.30094988] |
| S113F | 1 | 1 | 1 | [0.30896159, 0.69103841] | [0.32141595, 0.67858405] | [0.32523173, 0.67476827] |
| A64S | 0 | 1 | 0 | [0.99848584, 0.00151416] | [0.35445448, 0.64554552] | [0.73075382, 0.26924618] |
| A43V | 0 | 0 | 0 | [0.92201648, 0.07798352] | [0.51932628, 0.48067372] | [0.70605748, 0.29394252] |

En el GitHub (https://github.com/albasaezmat/TFM_UAM/tree/main/Material_suplementario) se encuentra el fichero “ML_models.ipynb” donde se muestra también las predicciones de las mutaciones conflictivas.

Cálculo de $\Delta\Delta G$ mediante Rosetta

De las 38 mutaciones conflictivas que se predicen, solo 22 se encuentran en zonas estructuralmente conocidas. Como consecuencia, el cálculo de la inestabilidad o estabilidad proteica que genera una mutación a partir de la variación del cambio en la energía libre de Gibbs ($\Delta\Delta G$) solo puede ser calculada a partir de ellas. Para calcularlo, se sigue el procedimiento detallado por Razquin-Lizarraga (2021).

Debido a los cuatro GAPS que presenta la estructura del canal Kv7.2 es necesario renumerar las posiciones que definen las mutaciones en base a ellos (**Tablas S10 y S11**). Esto se debe a que el PDB del canal empleado (PDB: 7CR3) no tiene en cuenta los GAPS en su numeración.

Tabla S10. GAPS que presenta la estructura de Kv7.2.

| Gap | Residues |
|-----|-----------|
| 1 | 1 - 69 |
| 2 | 185 -194 |
| 3 | 368 - 534 |
| 4 | 596 - 872 |

Tabla S11. Mutaciones de Kv7.2 con estructura conocida y su renumeración para el cálculo de $\Delta\Delta G$. La primera columna hace referencia a la mutación con su nomenclatura estándar. Las dos siguientes columnas son las que necesita Rosetta para hacer el cálculo. Por un lado, “*final_aa*” hace referencia al aminoácido que resulta de la mutación. Por el otro lado, “*pdb_position*” es la posición real de esa mutación en el PDB sin tener en cuenta los GAPS estructurales. Por último, la columna “ $\Delta\Delta G$ ” recoge el valor calculado mediante Rosetta.

| Mutation | final_aa | pdb_position | $\Delta\Delta G$ |
|----------|----------|--------------|------------------|
| R553W | W | 307 | 5,24 |
| V543M | M | 297 | 3,48 |
| T359A | A | 280 | 0,23 |
| L356P | P | 277 | 63,9 |
| R353C | C | 274 | 4,21 |
| H328N | N | 249 | -3,95 |
| G310S | S | 231 | -3,1 |
| G301V | V | 222 | 59,34 |
| G301S | S | 222 | 62,82 |
| D282H | H | 203 | 3,67 |
| G281R | R | 202 | 517,87 |
| F261S | S | 182 | 53,79 |
| D259N | N | 180 | 0,82 |
| G239V | V | 160 | 31,13 |
| T234I | I | 155 | -1,81 |
| T217I | I | 138 | -8,56 |
| R201C | C | 122 | 2,69 |
| S195F | F | 116 | 10,59 |
| V182M | M | 113 | -7,06 |
| R144W | W | 75 | 38,58 |
| V132M | M | 63 | 8,75 |
| S113F | F | 44 | -5,88 |

Bibliografía

- Ambrosino, P., Alaimo, A., Bartollino, S., Manocchio, L., de Maria, M., Mosca, I., Gomis-Perez, C., Alberdi, A., Scambia, G., Lesca, G., Villarroel, A., Tagliatela, M., & Soldovieri, M. V. (2015). Epilepsy-causing mutations in Kv7.2 C-terminus affect binding and functional modulation by calmodulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1856–1866. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.012>
- Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V., van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., . . . Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373(6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
- Bañales-Belaunde, I. (2019). *Regulación del canal de potasio Kv7.2 por la calmodulina. Estudio del conector de las hélices A y B en el dominio citoplasmático C-terminal*. [Trabajo de Fin de Grado no publicado]. Instituto Biofísica, CSIC-UPV/EHU, Universidad del País Vasco, Leioa, Spain.
- Bernardo-Seisdedos, G. (2015). *Structural characterization of helices A and B of Kv7.2 channel bound to Calmodulin. The calcium effect*. [Tesis de doctorado no publicada]. Instituto Biofísica, CSIC-UPV/EHU, Universidad del País Vasco, Leioa, Spain.
- Bogardt, R. A., Jones, B. N., Dwulet, F. E., Garner, W. H., Lehman, L. D., & Gurd, F. R. N. (1980). Evolution of the amino acid substitution in the mammalian myoglobin gene. *Journal of Molecular Evolution*, 15(3), 197–218. <https://doi.org/10.1007/bf01732948>
- Capra, J. A., & Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics*, 23(15), 1875–1882. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm270>
- Illergård, K., Ardell, D. H., & Elofsson, A. (2009). Structure is three to ten times more conserved than sequence—A study of structural response in protein cores. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(3), 499–508. <https://doi.org/10.1002/prot.22458>
- Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Wallén, P., & Grillner, S. (2016). The Spinal Cord Has an Intrinsic System for the Control of pH. *Current Biology*, 26(10), 1346–1351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.048>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982;157:105–132.
- Lide, D. R. (2007). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 88th Edition. Taylor & Francis. Página 1180.
- Lodish, University Harvey, Berk, University Arnold, Kaiser, University Chris A, Krieger, University Monty, Bretscher, University Anthony, Ploegh, University Hidde, Scott, M. P., & Amon, A. (2012). *Molecular Cell Biology* (7th ed.). W. H. Freeman.
- McInnes, G., Sharo, A. G., Koleske, M. L., Brown, J. E., Norstad, M., Adhikari, A. N., Wang, S., Brenner, S. E., Halpern, J., Koenig, B. A., Magnus, D. C., Gallagher, R. C., Giacomini, K. M., & Altman, R. B. (2021). Opportunities and challenges for the computational interpretation of rare variation in clinically important genes. *The American Journal of Human Genetics*, 108(4), 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.003>
- Razquin-Lizarraga, A. (2021). *Computational analysis of 12 mutations in the potassium channel KCNQ2* [Trabajo de Fin de Grado no publicado]. Facultad de Ciencia y Tecnología UPV/EHU, Universidad del País Vasco, Leioa, Spain.
- Yus-Nájera, E., Santana-Castro, I., & Villarroel, A. (2002). The Identification and Characterization of a Noncontinuous Calmodulin-binding Site in Noninactivating Voltage-dependent KCNQ Potassium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28545–28553. <https://doi.org/10.1074/jbc.m204130200>
- Zhang, J., Kim, E. C., Chen, C., Procko, E., Pant, S., Lam, K., Patel, J., Choi, R., Hong, M., Joshi, D., Bolton, E., Tajkhorshid, E., & Chung, H. J. (2020). Identifying mutation hotspots reveals pathogenetic mechanisms of KCNQ2 epileptic encephalopathy. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61697-6>