



Universidade de Brasília - UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR - CEL

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA TEÓRICA E COMPUTACIONAL - LBTC

Mecanismo de ativação de canais iônicos dependentes de voltagem, Kv e Nav, e a interação com anestésicos gerais

Aluno: Cristiano Amaral

Orientador: Dr. Werner Treptow

Co-Orientadora: Dra. Sonia Maria de Freitas

Documento válido para obtenção do título de Doutor pelo aluno Cristiano Amaral do programa de pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

BRASÍLIA - FEVEREIRO DE 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãezinha querida, Ana Maria Guimarães Amaral, por todo suporte emocional e afetivo que me foi dado, para que pudesse trilhar com sucesso e serenidade pela árdua jornada que é a vida acadêmica brasileira. As pessoas próximas ao pesquisador precisam de muita paciência e sabedoria para compreender os inúmeros momentos de angústia e dúvida que se encerram sobre esta carreira, sobretudo por conta do longo período que é requerido para formação do pesquisador, aliado à instabilidade financeira e exígua oferta de trabalho para este profissional. Por todos os seus ensinamentos indispensáveis para a formação do meu caráter como cidadão e ser humano, meus sinceros e afetuosos agradecimentos.

Agradeço ao meu orientador Dr. Werner Treptow pela paciência e sabedoria em guiar meus primeiros passos na carreira científica profissional. Foi com muito trabalho e muitas discussões que pude absorver e compreender um pouco da maturidade intelectual que é exigida para o avanço científico, sobretudo nas regiões limítrofes do conhecimento. Agradeço de coração pelos últimos seis anos que pude compartilhar do aprendizado e convívio com o professor Werner.

Agradeço à minha orientadora Dra. Sonia Maria de Freitas pelo convívio afetivo e por todas as oportunidades que nunca se furtou em me proporcionar. A professora Sonia é a responsável direta pela minha formação básica em biofísica molecular. A descoberta do fascinante mundo atomístico de proteínas e ligantes me foi proporcionado pelas mãos e sabedoria da professora Sonia. É com profunda gratidão que reconheço todo o seu esforço e talento em me cativar para a carreira acadêmica e sinto que a conclusão deste documento de doutoramento é sua prova mais concreta. Agradeço de coração por todo empenho e carinho que me foram dados durante toda a minha história aqui na Universidade de Brasília (UnB).

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional (LBTC) Letícia Stock e Caio Souza pela amizade, cumplicidade em executar as tarefas e cronogramas do laboratório, pela prontidão em ajudar nos momentos mais cruciais e difíceis

de um doutoramento, pela alegria e descontração que os dois possuem de sobra. Muito obrigado Caio e Letícia !

Agradeço ao funcionário querido, Francisco Erivan, do laboratório de Biofísica Molecular da UnB, pelos vários anos de amizade e parceria. Assim como na dissertação de mestrado: valeu chiquinho !

Agradeço a todos os alunos e professores do laboratório de Biofísica Molecular pelo convívio diário partilhando de um ambiente amigável e agradável.

Agradeço a todo o departamento de Biologia Celular (CEL) da UnB, e em especial, ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular pela excelência em ensino e infraestrutura acessível aos alunos. Ressalto o meu obrigado ao professor Dr. Marcelo de Macedo Brígido e à funcionária Ana Hilda Tiberti pela prontidão em resolver todos os inúmeros problemas e imprevistos inerentes a um período de doutoramento.

Meus sinceros agradecimentos aos professores membros da banca de defesa pela disponibilização de seu tempo para leitura e contribuição científica à versão final da Tese. Sem dúvida alguma a participação dos pesquisadores foi indispensável para o ganho ímpar de qualidade deste documento.

Agradeço aos órgãos financiadores de pesquisa CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de doutorado (processo nº 141009/2009-8), ao DPP (Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB) e à FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal) pelos recursos obtidos na forma de editais de fomento à pesquisa (período 2009-2012), que foram indispensáveis para aquisição da infraestrutura atual do LBTC, sem a qual grande parte do trabalho não poderia ter sido executada.

Agradeço a todos os familiares e amigos que direta ou indiretamente participaram dessa caminhada ao longo dos quatro anos de doutorado. Em especial, agradeço aos amigos Ana Caroline Toledo e Antônio Luiz Cruz Gomes (Tonhão) por todas as discussões formais e esclarecedoras sobre ciência e por todas as outras informais também.

Finalmente, agradeço de maneira especial à minha querida namorada, Larissa Rezende Mendonça, com quem tive o prazer e o privilégio de dividir meu dia a dia durante os últimos três anos. Ela que é uma pessoa tão encantadora, amável, carinhosa e inigualavelmente cativante. Sobretudo, te agradeço por todo amor, carinho e compreensão que tiveste comigo ao longo desses anos, e principalmente nos momentos mais difíceis, tanto no nível pessoal quanto profissional. É com muito carinho que te dedico estas palavras e reservo a você um lugar especial no meu coração.

Enfim não é o fim

*No alto da montanha, uma pausa...
Olha primeiro para baixo;
considera o peso da pedra
na tarefa de subir.
Ela ao ombro, relutante,
mal se encaixando, pesada.*

*Lá atrás, as sombras do devir;
tempestade muita, espinhos, temor.
A dúvida castigando a mente:
"To be or not to be"?
– Prosseguir ou desistir ?
À frente, pisca-piscante,
o farol solícito do amor.*

*Estende teu olhar no horizonte...
Tua montanha é apenas mais uma.
Mais gente carrega pedra;
alguns conduzem elefantes,
fardos teimosos e lerdos,
em seara onde nada medra.
Luz no fim do túnel? Nenhuma.
Muita história sem final, ingloria.*

*Mas esta é a tua hora.
Aproveita teu instante de paz,
degusta os fluidos da vitória.
Mas não te esqueças, rapaz,
que entre novas perguntas, tantas,
uma instigante se faz: - E agora ?*

*Agora é prosseguir, sem sossego,
pois enfim não é o fim.
Olha pra cima e contempla
o encanto e o brilho das estrelas.*

Ana Maria Guimarães Amaral.
Bsb, 27/fev/2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO CIENTÍFICO	13
ABSTRACT	14
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	
1.1 CANAIS CATIÔNICOS DEPENDENTES DE VOLTAGEM: CONTEXTO GERAL	16
1.2 MODELO ELÉTRICO DE VGCC	
1.2.1 POTENCIAL DE REPOUSO DA MEMBRANA	18
1.2.2 CIRCUITO EQUIVALENTE	20
1.2.3 POTENCIAL DE AÇÃO: MODELO DE HODGKIN-HUXLEY	23
1.3 ATIVAÇÃO DEPENDENTE DE VOLTAGEM DOS VGCC	28
1.4 NATUREZA MOLECULAR DOS VGCC	30
1.5 ATIVAÇÃO DE VGCC: MOVIMENTOS MOLECULARES DO VSD	33
1.6 MODELOS DE ATIVAÇÃO DE VGCC	34
1.7 BASES ESTRUTURAIIS PARA ATIVAÇÃO DOS VSD: ESTUDOS COM OS CANAIS KV	36
1.8 FOCALIZAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO	38
1.9 ABERTURA DO PORO E ACOPLAMENTO AO VSD	39
1.10 ANESTÉSICOS GERAIS: 1-BUTANOL E HALOTANO	40
1.11 DIREÇÕES FUTURAS SOBRE VGCC: ATIVAÇÃO E MODULAÇÃO DOS CANAIS	42
<u>2. OBJETIVOS</u>	
2.1 OBJETIVO GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	
3.1 ARCABOUÇO TEÓRICO	
3.1.1 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	48
3.1.2 FUNÇÃO DE ENERGIA POTENCIAL	50
3.1.3 EQUAÇÕES DO MOVIMENTO	53
3.1.4 INTEGRADORES DO MOVIMENTO	54
3.1.5 AMOSTRAGEM ESTATÍSTICA	54
3.1.6 SIMULAÇÕES À TEMPERATURA E PRESSÃO CONSTANTES	55
3.1.7 PERFIL DE ENERGIA LIVRE: TRANSPORTE IÔNICO	56
3.1.8 POTENCIAL ELETROSTÁTICO	58
3.1.9 APLICAÇÃO DE POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO	58
3.1.10 MODELANDO VGCC SOBRE POTENCIAL ELETROSTÁTICO...	
...TRANSMEMBRÂNICO: KV1.2	61
3.1.11 CÁLCULO DA DISTÂNCIA ELÉTRICA	62
3.1.12 MEDIDA DIRETA DE GATING CHARGE	62
3.1.13 MATRIZ DE CONTATOS ELETROSTÁTICOS DO VSD E PD	63

3.1.14	<i>SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO</i>	
3.1.14.1	<i>STEERED MOLECULAR DYNAMICS (SMD)</i>	64
3.1.14.2	<i>TARGET MOLECULAR DYNAMICS (TMD)</i>	65
3.1.15	<i>DOCKING MOLECULAR</i>	66
3.1.15.1	<i>ALGORITMO GENÉTICO</i>	67
3.1.15.2	<i>FUNCIONAMENTO DO CÓDIGO DE DOCKING MOLECULAR</i>	69
3.1.15.3	<i>FUNÇÃO EMPÍRICA DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO</i>	70
3.1.16	<i>ESTRUTURA E TOPOLOGIA DE MODELOS DE ANESTÉSICOS GERAIS: 1-BUTANOL E HALOTANO</i>	73
3.2	<i>PROTOCOLOS DE SIMULAÇÃO</i>	
3.2.1	<i>SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR</i>	
3.2.1.1	<i>SIMULAÇÕES DE EQUILÍBRIO EM ENSEMBLE NPT</i>	75
3.2.1.2	<i>CONDIÇÕES INICIAIS DOS SISTEMAS ATOMÍSTICOS</i>	76
3.2.1.3	<i>SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO: APLICAÇÃO DE... ... CAMPO ELÉTRICO</i>	76
3.2.1.4	<i>SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO: APLICAÇÃO DE... ...POTENCIAL EXTERNO</i>	77
3.2.1.5	<i>SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO:... ...ADAPTIVE BIASING FORCE (ABF)</i>	79
3.2.2	<i>DOCKING MOLECULAR</i>	79
4.	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	
4.1	<i>PROCESSO DE ATIVAÇÃO DO Kv1.2</i>	84
	<i>ANEXO I</i>	94
4.2	<i>EXPLORANDO CONFORMAÇÕES DO NAVAb NA MEMBRANA</i>	95
	<i>ANEXO II</i>	109
4.3	<i>MOVIMENTOS DE ABERTURA DO PORO: MODELO DO CANAL DE SÓDIO NACHBAC</i>	110
	<i>ANEXO III</i>	117
4.4	<i>DOCKING MOLECULAR DE MODELOS DE ANESTÉSICOS GERAIS: ESTUDOS COM KV</i>	118
	<i>ANEXO IV</i>	125
5.	<u>CONCLUSÕES GERAIS</u>	127
6.	<u>PERSPECTIVAS</u>	133
7.	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	140

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1.	17
Tabela 1.1.	18
Figura 1.2.	19
Figura 1.3.	21
Figura 1.4.	22
Figura 1.5.	24
Figura 1.6.	25
Figura 1.7.	26
Figura 1.8.	27
Figura 1.9.	28
Figura 1.10.	29
Figura 1.11.	31
Figura 1.12.	32
Figura 1.13.	35
Figura 1.14.	37
Figura 1.15.	40
Figura 1.16.	42

METODOLOGIA.....

Figura 3.1	49
Figura 3.2	50
Figura 3.3	52
Figura 3.4	59
Figura 3.5	60
Figura 3.6	61
Figura 3.7	65
Tabela 3.1	67
Figura 3.8	68
Figura 3.9	72
Figura 3.10	74

Figura 3.11	80
Figura 3.12	81
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	
Figura 4.1	84
Figura 4.2	86
Figura 4.3	87
Figura 4.4	88
Tabela 4.1	89
Figura 4.5	89
Figura 4.6	90
Figura 4.7	91
Figura 4.8	96
Figura 4.9	97
Figura 4.10	98
Figura 4.11	99
Figura 4.12	100
Tabela 4.2	101
Figura 4.13	103
Tabela 4.3	105
Figura 4.14	106
Figura 4.15	108
Figura 4.16	111
Figura 4.17	112
Figura 4.18	112
Figura 4.19	113
Figura 4.20	114
Figura 4.21	116
Figura 4.22	119
Figura 4.23	120
Figura 4.24	121
Figura 4.25	122
Figura 4.26	124

Tabela 4.4	124
<i>PERSPECTIVAS</i>	
Figura 6.1	134
Tabela 6.1	135
Figura 6.2	136
Figura 6.3	137
Figura 6.4	138
Figura 6.5	139

LISTA DE ABREVIATURAS

ABF = *Adaptive Biasing Force*.

A(z) = Energia livre de Helmholtz na direção cartesiana z.

AMBER = *Assisted Model Building with Energy Refinement*.

AT = Estado aberto (domínio do poro) e ativado (domínio sensor de voltagem).

C_m = Capacitância da membrana plasmática.

CHARMM = *Chemistry at HARvard Molecular Mechanics*.

E = Campo elétrico.

E_K = Gradiente químico de potássio.

F = Constante de Faraday.

g_K = Condutância total ao íon potássio.

GA = *Genetic algorithm*

GQR = *Gating charge residues*.

GROMOS = *Groningen Molecular Simulation*.

HC = *Hydrophobic gate*

i_k = Corrente líquida de potássio.

I_{ext} = Corrente externa aplicada a um circuito equivalente.

I_{ion} = Corrente total, que é a soma das contribuições individuais de cada espécime iônica.

LBTC = Laboratório de biologia teórica e computacional.

LGA = *Lamarckian genetic algorithm*.

MD = *Molecular dynamics*.

NMR = *Nuclear magnetic resonance*.

NPT = *Ensemble* estatístico cujos n° de partículas, pressão e temperatura são mantidos constantes.

NVT = *Ensemble* estatístico cujos n° de partículas, volume e temperatura são mantidos constantes.

P_{xi} = Permeabilidade a um cátion *i* qualquer.

P_{Aj} = Permeabilidade a um ânion *j* qualquer.

PBC = *Periodic boundary conditions*.

PC = *Patch clamp*.

PD = *Pore domain*.

PME = *Particle mesh ewald.*

PMF = *Potentials of mean force.*

POPC = 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina.

Q = *Gating charges.*

Q₀ = Quantidade de carga por unidade de área.

R = Constante universal dos gases.

RMSD = *Root mean square deviation.*

RT = Estado desativado (domínio sensor de voltagem) e fechado (domínio do poro).

SCAM = *Substituted cysteine accessibility method.*

SMD = *Steered molecular dynamics.*

T = Temperatura absoluta em Kelvin.

T_m = *Transmembrane domain.*

TMD = *Target molecular dynamics.*

VC = *Voltage clamp.*

VGCC = *Voltage gated cation channels.*

V_m = Potencial de repouso da membrana.

VSD = *Voltage sensor domain.*

$V_m - E_K$ = Força eletroquímica para o íon de potássio.

ΔK = Variação de energia cinética.

ΔV = Diferença de voltagem transmembrânica.

Y_K = Condutância de um canal individual de potássio.

δ_i^λ = Distância elétrica de um dado átomo *i* na conformação λ .

$\delta(z)$ = Distância elétrica na direção transmembrânica (*z*).

ρ_i = Carga pontual.

$\varphi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$ = Campo eletrostático local de uma dada posição *j*.

$\varphi(z)$ = Campo eletrostático local na direção transmembrânica (*z*).

RESUMO CIENTÍFICO

O papel fundamental dos canais catiônicos dependentes de voltagem (*VGCC*) nos mais diversos organismos baseia-se no seu complexo mecanismo de ativação, i.e a transição entre dois estado fisiológicos funcionais desses canais: ativado/aberto (AT) e desativado/fechado (RT). Logo após a publicação da primeira estrutura cristalográfica do canal de mamífero Kv1.2 na conformação AT, alguns modelos do estado RT tem sido propostos na literatura para este canal. Para todos esses modelos, análises estruturais tem sugerido um consenso com os dados experimentais, destacando portanto a natureza inequívoca dessas estruturas RT. Tomados em conjunto, os estudos estruturais sobre o Kv1.2 são até agora o único conjunto de dados disponível, no nível das interações atômicas, para o entendimento sobre o mecanismo de ativação da superfamília *VGCC*. Recentemente, a estrutura cristalográfica de um canal de sódio de procaríoto, dependente de voltagem (NavAb), foi resolvida numa conformação interpretada como estado pré-ativado do canal. Como um possível ancestral da superfamília dos canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem de vertebrados, o surgimento da estrutura atomística do NavAb nos proporciona a primeira, e até então a única, estrutura de alta resolução para estender nossa compreensão sobre outros membros da superfamília *VGCC*. Dessa forma, de modo a contribuir com o referido tema, consideramos as estruturas AT e RT do Kv1.2, equilibradas na membrana, como guias estruturais em uma série de simulações de dinâmica molecular no intuito de investigar o processo de ativação do canal NavAb. Além de identificar a estrutura cristalográfica do NavAb como um estado intermediário dentro do caminho de ativação, nosso trabalho permitiu determinar conformações relacionadas aos estados fisiológicos funcionais estruturalmente relacionados às estruturas AT e RT. De maneira geral, os resultados suportam a ideia de um mecanismo de ativação altamente conservado ao longo de toda a superfamília de *VGCC*.

ABSTRACT

The critical role of voltage-gated cation channels (VGCCs) relies on a complex voltage-dependent activation mechanism linking two physiologically relevant channel states, activated-open (AT) and resting-closed (RT) states. Following the early publication of the x-ray crystal structure of the mammalian Kv1.2 channel in the AT conformation, atomistic models for the RT state of the channel have been proposed. For all of these models, structural analyses demonstrated a consensual explanation of experimental data, thereby highlighting the unambiguous nature of these RT structures. Taken together, these structural studies on Kv1.2 have contributed so far with most of our atomic-level knowledge on the activation mechanism of VGCCs. More recently, the x-ray structure of a prokaryotic voltage-gated sodium channel, NavAb, was resolved in a conformation that was interpreted as representative of the *pre-open* state of the channel. As one of the possible ancestors of the large family of vertebrate voltage-gated Na⁺ and Ca⁺⁺ channels, the appearance of the NavAb structure has provided us with a first, and so far unique, template to extend our knowledge towards other members of the large family of VGCCs. Accordingly, in this contribution, we have considered the well-understood AT and RT structures of Kv1.2, equilibrated in a lipid bilayer, as guide structural models to drive a series of molecular dynamics (MD) simulations aimed at to study the activation process of NavAb. While identifying the reported NavAb structure as an intermediate conformation, not fully-activated, our work has enabled us to determine channel conformations likely related to the RT and AT states of the channel. Overall, the structural results support an activation mechanism highly conserved across the entire family of VGCCs.

Introdução

- In order to succeed, your desire for success should be greater than your fear of failure.”
—Bill Cosby.

1. Introdução

1.1 CANAIS IÔNICOS DEPENDENTES DE VOLTAGEM: CONTEXTO GERAL

Graças ao advento de técnicas de eletrofisiologia, no início dos anos 1950, a resolução experimental sobre o comportamento das células excitáveis foi amplificada a ponto de se poder investigar, no nível celular e molecular, os elementos centrais que determinam a propagação de impulsos nervosos em organismos superiores¹. Esse grupo particular de células permite a passagem de correntes elétricas através de suas membranas quando submetidas à uma diferença de voltagem transmembrânica (ΔV), dando origem ao processo de transmissão dos impulsos nervosos. Em escala atômico-molecular, essas correntes são derivadas da passagem de íons através da capacitância da membrana celular. Apenas vinte anos mais tarde, ficou constatado que o transporte iônico pelas células excitáveis era mediado por proteínas integrais da membrana². Um conjunto peculiar dessas macromoléculas compõem a superfamília dos canais catiônicos dependentes de voltagem (sigla em inglês *VGCC*) que permitem o fluxo seletivo de espécies iônicas através da membrana celular quando submetidos à ΔV ³.

Esses canais são os responsáveis pela geração, e as propriedades de duração e propagação dos potenciais de ação em neurônios. Por conta dessa propriedade extraordinária, essas proteínas funcionam como dispositivos fundamentais em inúmeros processos biológicos de natureza elétrica como a secreção celular, regulação de hormônios, sinalização neuronal e contratibilidade de células musculares¹. Os *VGCC* correspondem a uma superfamília de proteínas dado sua seletividade iônica, estando subdivididos em quatro classes principais: K^+ , Na^+ , Ca^{+2} , e os canais catiônicos não seletivos, correspondendo respectivamente aos canais *Kv*, *Nav*, *Cav* e *HCN*¹ (figura 1.1).

Devida sua relevância em uma série de processos fisiológicos essenciais, os genes que codificam esses canais estão distribuídos na natureza, desde organismos unicelulares até animais superiores. Mutações em uma variedade desses genes estão relacionadas à doenças em humanos, como os distúrbios de hiperexcitabilidade, epilepsia, síndrome cardíaca QT longa e doenças de origem neuromuscular⁴. Muito além de um tema de estudo notavelmente atraente, a investigação dos detalhes atômicos relacionados à estrutura/função dos *VGCC* permitirá desvendar os defeitos estruturais determinantes da alteração do funcionamento elétrico desses canais relacionados à doenças em humanos. Além disso, permitirá o estudo, no nível das interações atômicas, do mecanismo de modulação dos *VGCC* por diferentes moléculas ligantes como os anestésicos gerais e locais.

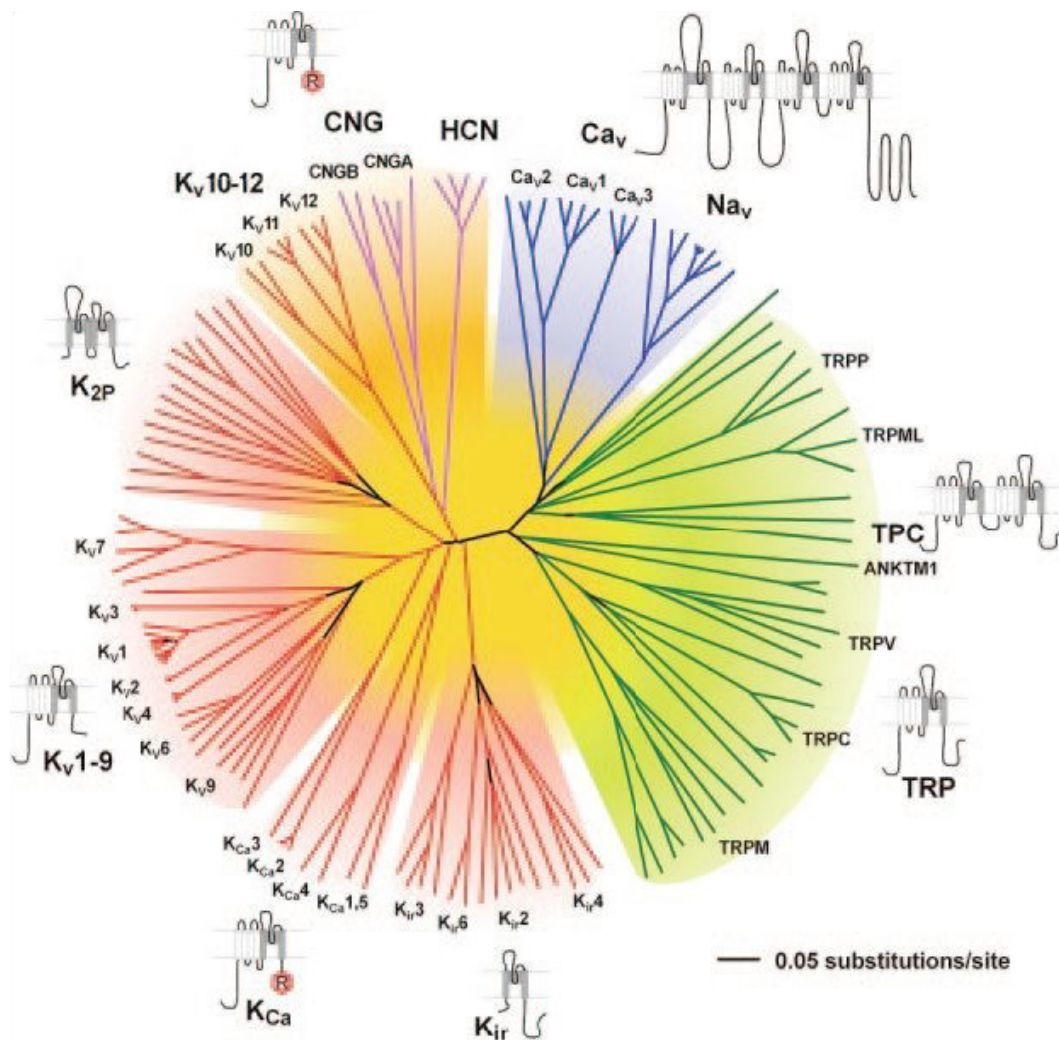


Figura 1.1. Visão esquemática da árvore filogenética da superfamília *VGCC*. Essa visão geral dos 143 genes dos canais estruturalmente relacionados agrupa essas proteínas em sete famílias distintas dada suas respectivas topologias na membrana. Os canais *Kv*, e *Nav/Cav* estão representados respectivamente pelas ramificações vermelhas e azuis, enquanto que os *cyclic nucleotide-gated channels (CNG)* estão coloridos como ramos em lilás, e os canais sensíveis a calor (*TRP*) em verde. As cores de fundo separam os canais iônicos em grupos correlatos: *Cav* e *Nav* (azul claro); canais *TRP* (verde claro); canais *Kv* (vermelho claro), com exceção dos *Kv10-12* que possuem um domínio de ligação à nucleotídeo e que portanto, estão relacionados aos canais *CNG* e *HCN* (laranja claro). Modificado de Yu *et al*, 2005⁵.

1.2 MODELO ELÉTRICO DE VGCC

1.2.1 POTENCIAL DE REPOUSO DA MEMBRANA

Toda a informação que é transmitida por neurônios ocorre por meio de sinais eletroquímicos, que são propagados rapidamente a longas distâncias. O conjunto desses sinais elétricos propagados são oriundos de inversões temporárias da polaridade entre as faces intra e extracelulares que direcionam momentaneamente o potencial elétrico de repouso da membrana celular para valores distintos do potencial de equilíbrio. Essas correntes iônicas são controladas por proteínas integrais da membrana, que por sua vez podem ser separadas em duas classes principais: canais de repouso e os canais ativados.

Canais de repouso encontram-se constitutivamente abertos e não são influenciados por fatores externos como a variação do potencial transmembrânico. Seu papel principal é auxiliar a manutenção do potencial de repouso da membrana (V_m), i.e o potencial elétrico na ausência de estímulos. Em contrapartida, canais ativados encontram-se fechados no equilíbrio⁶. O exemplo mais simples de potencial de repouso é das células da glia cuja a maioria dos canais são permeáveis aos íons de potássio. A tabela 1.1 informa o gradiente químico das principais espécies iônicas.

Tabela 1.1. Distribuição dos principais íons, no equilíbrio, através do axônio gigante de lula.

Espécime iônica	$[X]_{\text{intra}}^*$ (mM)	$[X]_{\text{extra}}^{**}$ (mM)	Potencial de eq. (mV)
K ⁺	400	20	- 75
Na ⁺	50	440	+ 55
Cl ⁻	52	560	- 60
A- (ânions orgânicos)	385	560	-

* $[X]_{\text{intra}}$ é a concentração intracelular; ** $[X]_{\text{extra}}$ é a concentração extracelular. Modificado de Kandel⁶

De modo a exemplificar como ocorre o potencial de repouso da membrana, utilizaremos aqui, o caso de equilíbrio eletroquímico do íon potássio. Como resultado do rápido efluxo de íons K⁺ para a face extracelular, o exterior da membrana acumula um excesso de cargas positivas enquanto o interior fica negativamente carregado. Entretanto, a difusão de íons K⁺ é limitada uma vez que a separação de cargas dá origem a um potencial elétrico. Quanto mais cargas positivas se difundem para a face extracelular mais acentuado fica o potencial elétrico. Dessa forma, os íons estarão sujeitos à duas forças: i) o potencial químico que depende da concentração do gradiente iônico transmembrânico; e ii)

o potencial elétrico que depende da diferença de voltagem através da bicamada³ (figura 1.2).

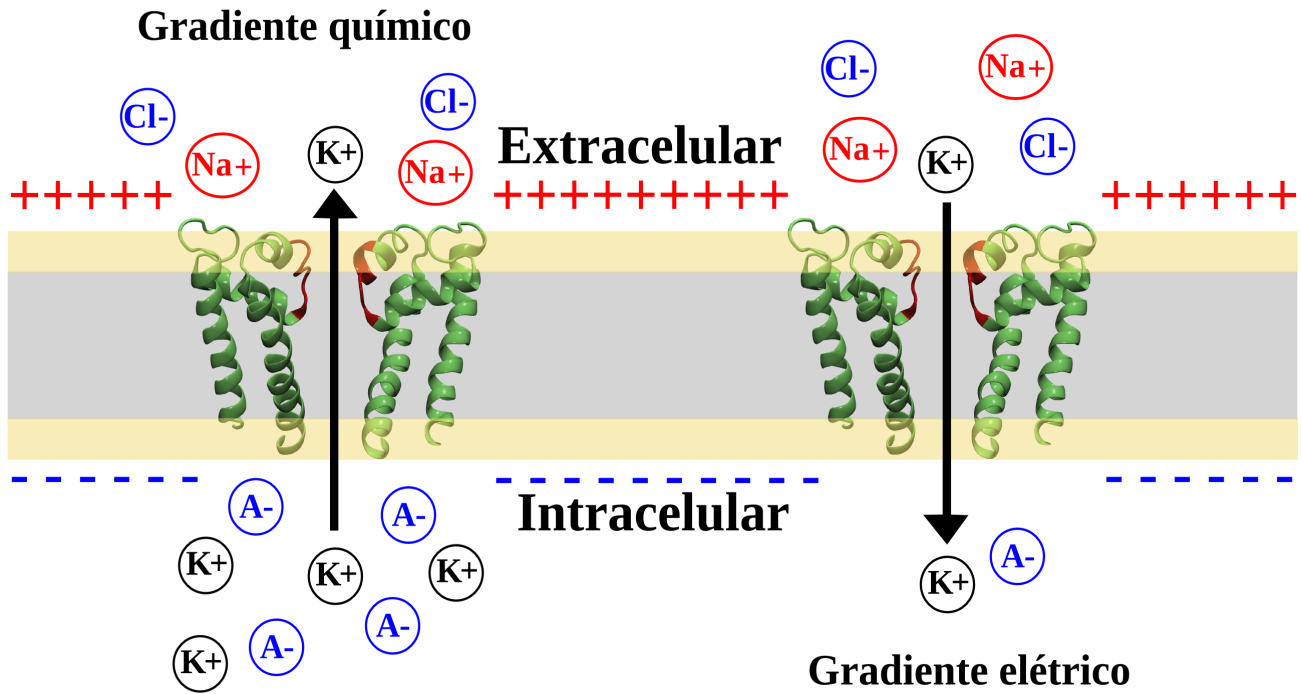


Figura 1.2. Fluxo de íons K⁺ através dos canais de repouso de potássio. O efluxo continuado de K⁺ proporciona o estabelecimento de um excesso de cargas positivas na face extracelular, que por sua vez, dá origem a um potencial elétrico que resiste a esse efluxo. Quando o equilíbrio dinâmico é atingido a quantidade líquida de íons K⁺ que entram e que saem se equivalem dando origem ao potencial de repouso de potássio.

Uma vez que a difusão atinge um determinado valor, desenvolve-se um potencial elétrico transmembrânico, cuja força elétrica direciona os íons K⁺ para a face intracelular, sendo contraposta por um potencial químico que induz o efluxo das espécies iônicas, atingindo-se assim um equilíbrio dinâmico. Esse potencial de equilíbrio é conhecido como potencial de repouso do potássio (E_K) e que pode ser calculado a partir da equação de Nernst:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_{extra}}{[K]_{intra}} \quad [1.1]$$

onde R é a constante universal dos gases, T a temperatura em Kelvin, z a valência do íon, que no caso do íon K⁺ equivale a +1, F é a constante de Faraday, e $[K]_{extra}$ e $[K]_{intra}$ são respectivamente as concentrações iônicas extra e intracelulares⁶.

Considerando que a constante RT/F equivale $\sim 25\text{mV}$ à temperatura ambiente (25 C°), e que a constante de conversão do logaritmo neperiano para o logaritmo de base 10 é $\sim 2.3^6$, podemos substituir esses valores na equação 1.1 do seguinte modo:

$$E_k = \frac{25 \times 2.3}{1} \log \frac{[20]}{[400]} = -75\text{ mV} \quad [1.2]$$

cujo valor calculado é aquele encontrado na tabela 1.1. Note que, a equação de Nernst pode ser usada para encontrar o potencial de repouso de quaisquer espécimes iônicas que estejam em ambos os lados de uma membrana permeável a um dado íon.

De maneira geral, quando o potencial de repouso V_m é determinado por mais de uma espécie iônica, a influência de cada espécie não é determinada apenas pelas concentrações intra e extracelulares de cada íon, mas também pela facilidade que esses íons atravessam a bicamada lipídica. Do ponto de vista elétrico, a condutância da membrana, que significa o inverso da resistência, fornece uma medida conveniente da facilidade de um dado íon em atravessar a membrana. Outra medida conveniente é a permeabilidade (P) da membrana a um dado íon, quantificada em unidades de velocidade (m/s)¹. Dessa forma, pela equação de Goldman, que é uma generalização da equação 1.1, podemos encontrar o potencial de repouso de uma célula levando em consideração todas as espécies iônicas:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{X_i} [X_i]_{\text{extra}} + \sum_j^M P_{A_j} [A_j]_{\text{intra}}}{\sum_i^N P_{X_i} [X_i]_{\text{intra}} + \sum_j^M P_{A_j} [A_j]_{\text{extra}}} \right) \quad [1.3]$$

onde P_{X_i} é a permeabilidade de um dado cátion X_i e P_{A_j} é a permeabilidade de um ânion A_j . É válido ressaltar que a equação 1.3 só é válida para calcular V_m quando este não está variando³.

1.2.2 CIRCUITO EQUIVALENTE

A equação de Goldman (eq. 1.3) é limitada por não ser capaz de determinar a magnitude e o sentido da corrente iônica que percorre um conjunto de canais de repouso. Essas informações podem ser recuperadas aplicando-se um modelo matemático simples derivado dos circuitos elétricos,

conhecido como circuito equivalente. Nesse contexto, as propriedades principais do neurônio são representadas em um circuito elétrico constituído basicamente de resistores (representados pelos canais iônicos), baterias (equivalente ao gradiente químico das espécies iônicas), além da capacitância que é a habilidade da membrana em separar cargas (figura 1.3)⁶.

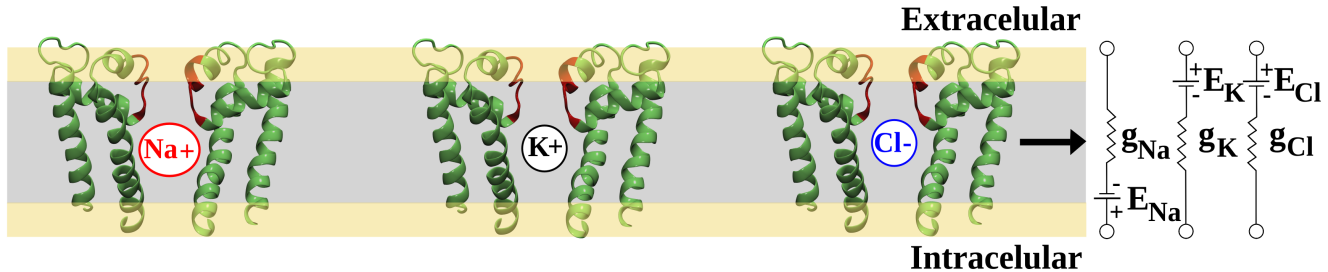


Figura 1.3. População de canais iônicos permeáveis a i íons, onde $i \in Na^+, K^+ e Cl^-$. Aqui, a condutância dos canais é representada por g_i , e a força eletromotriz E_i representa o gradiente iônico. Note que as baterias estão orientadas de acordo com o sentido de difusão dos íons dentro do seu gradiente eletroquímico.

Num circuito equivalente cada canal de potássio possui individualmente uma condutância γ_K . Se eventualmente não houvesse um gradiente de íons K^+ através da membrana a corrente através dos canais de repouso de potássio poderia ser obtida simplesmente pela lei de Ohm, i.e $i_K = \gamma_K V_m$, onde V_m é o potencial de repouso da membrana (eq. 1.3). Entretanto, uma vez que na maioria dos sistemas existe tal potencial, haverá portanto um o potencial químico transmembrânico para o K^+ . No circuito equivalente esse potencial é representado por uma bateria cuja força eletromotriz é dada pela equação de Nernst (eq.1.1) para a espécie iônica K^+ , i.e E_K .

Por convenção, os movimentos de íons da face intracelular para extracelular tem sinal positivo. Considerando que o potencial de equilíbrio para os íons K^+ , verificado a partir da equação de Nernst (eq. 1.2), é negativo e com movimento líquido de íons da face intracelular para extracelular, a corrente iônica de K^+ que se deve exclusivamente ao seu gradiente químico deve ser portanto $i_K = -\gamma_K E_K$. Por esse raciocínio, num modelo real de neurônio onde existem ambos V_m e gradiente de concentração de íons K^+ a corrente líquida de íons K^+ é dada portanto:

$$i_k = (\gamma_K V_m) - (\gamma_K E_K) = \gamma_k (V_m - E_K) \quad [1.4]$$

onde o termo $V_m - E_K$ é conhecido como força eletroquímica, que determina a direção e a magnitude da corrente iônica⁶. A equação 1.4 é uma modificação da lei de Ohm e esclarece que a corrente de íons não é devida apenas à diferença de voltagem transmembrânica como também ao gradiente iônico

estabelecido através da bicamada. Note que, uma membrana celular tem vários canais de potássio que podem ser combinados em um único condutor dentro de um circuito equivalente como $g_K = N_K \gamma_K$, onde γ_K é a condutância de um canal individual a íons K^+ e N_K o número de canais dessa espécie iônica na membrana.

Aplicando o formalismo do circuito equivalente é possível calcular o potencial de repouso independentemente da equação de Goldman (eq. 1.3). Para simplificação do cálculo serão considerados apenas os canais de repouso de sódio e potássio. Além disso, ignoraremos a contribuição da bomba de íons Na^+ e K^+ devido sua reduzida contribuição eletrogênica. Como no equilíbrio V_m não está mudando ignoramos a capacitância da membrana. Como existe um número maior de canais de repouso de K^+ em relação aos de Na^+ , a condutância da membrana para o primeiro é muito maior que para o segundo⁶ (figura 1.4).

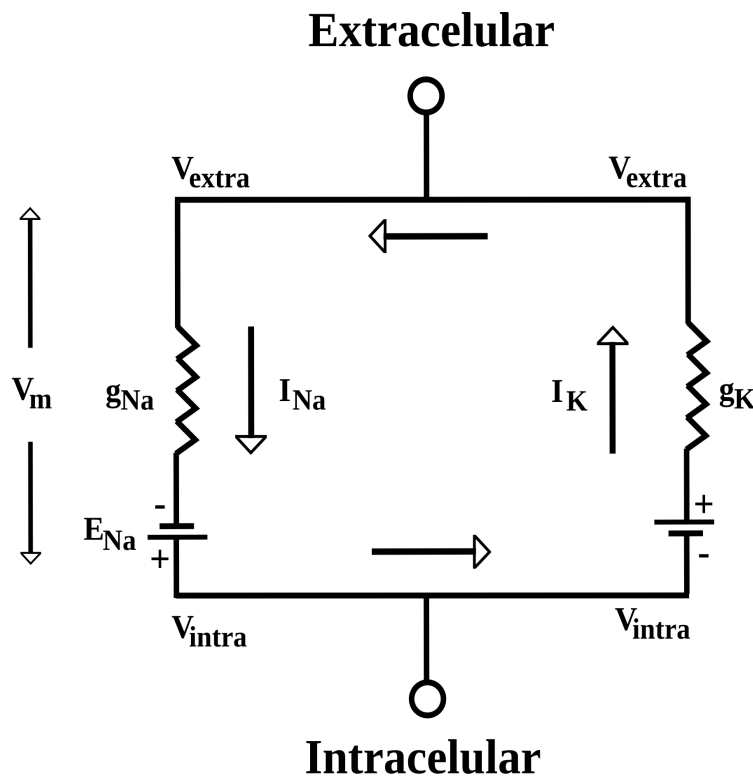


Figura 1.4. Circuito equivalente para o cálculo do potencial de repouso da membrana (V_m) de um sistema simplificado contendo apenas canais de repouso de íons Na^+ e K^+ . Além disso, canais de cloreto, bomba de sódio e potássio e capacitância da membrana não são considerados por simplificação do cálculo. As correntes iônicas seguem para as regiões de menor potencial dentro do circuito. Note que, a polaridade das baterias E_{Na} e E_K são invertidas pois representam o gradiente químico dessas espécies iônicas (tabela 1.1)⁶.

Considerando que V_m é constante no estado de equilíbrio da membrana, a corrente líquida que a

atravessa deve ser nula, pois caso contrário haveria mudanças na separação de cargas positivas e negativas através da bicamada que então alterariam V_m . Dessa forma, a corrente iônica de sódio, i.e I_{Na} , deve ser oposta à de potássio (I_K) da seguinte forma :

$$I_{Na} + I_K = 0 \quad [1.5]$$

Ambas as correntes I_{Na} e I_K podem ser calculadas a partir dos ramos do circuito da figura 1.4. Começando pelo íon Na^+ , e percorrendo o circuito do sentido extracelular para intracelular podemos calcular a diferença de potencial através da condutância dos canais de sódio como:

$$V_m = E_{Na} + I_{Na} / g_{Na} \quad [1.6]$$

e analogamente fazemos o mesmo para o potássio:

$$V_m = E_K + I_K / g_K \quad [1.7]$$

Rearranjando as equações 6 e 7 para corrente iônica teremos:

$$I_{Na} = g_{Na} (V_m - E_{Na}) \quad [1.8.a]$$

$$I_K = g_K (V_m - E_K) \quad [1.8.b]$$

Essas equações indicam que a corrente iônica que atravessa a condutância de cada ramo do circuito é igual ao produto da condutância daquele ramo pela força eletroquímica. Se substituirmos as equações 1.8.a e 1.8.b na equação 1.5, e resolvermos para V_m , obtemos a equação para o potencial de repouso da membrana a partir de um circuito equivalente⁶:

$$V_m = \frac{(E_{Na} g_{Na}) + (E_K g_K)}{g_{Na} + g_K} \quad [1.9]$$

1.2.3 POTENCIAL DE AÇÃO: MODELO DE HODGKIN-HUXLEY

As correntes iônicas de sódio e potássio dependem de dois fatores: da condutância iônica e da força eletroquímica que atua sobre cada íon. Considerando que a condutância da membrana aos íons Na^+ e K^+ é diretamente proporcional ao número desses canais iônicos abertos, podemos ter uma ideia

de como a voltagem transmembrânica controla a abertura desses canais pelo cálculo da amplitude e a variação, em relação ao tempo, da condutância em resposta à despolarizações induzidas em experimentos de voltage-clamp⁶. As medidas de condutância dos íons Na^+ e K^+ em diferentes faixas de potencial da membrana revelam duas similaridades funcionais entre esses canais iônicos: i) em ambos o domínio de condução é aberto em resposta à despolarizações da membrana e ii) à medida que a magnitude da despolarização aumenta, a probabilidade e a taxa de abertura desses canais também aumenta. Entretanto, essas quantidades supracitadas diferem marcadamente quando a despolarização é suficientemente prolongada¹. Em todos os níveis de despolarização os canais de sódio abrem mais rapidamente que os canais de potássio (figura 1.5). Quando a despolarização é mantida por um tempo suficiente os canais de sódio começam a se fechar, o que resulta numa queda de corrente de íons Na^+ . Esse processo de fechamento dos canais Na^+ quando submetidos à despolarizações prolongadas é conhecido como inativação. De modo contrário, os canais de potássio não se inativam e permanecem abertos enquanto a membrana estiver despolarizada⁶ (figura 1.6).

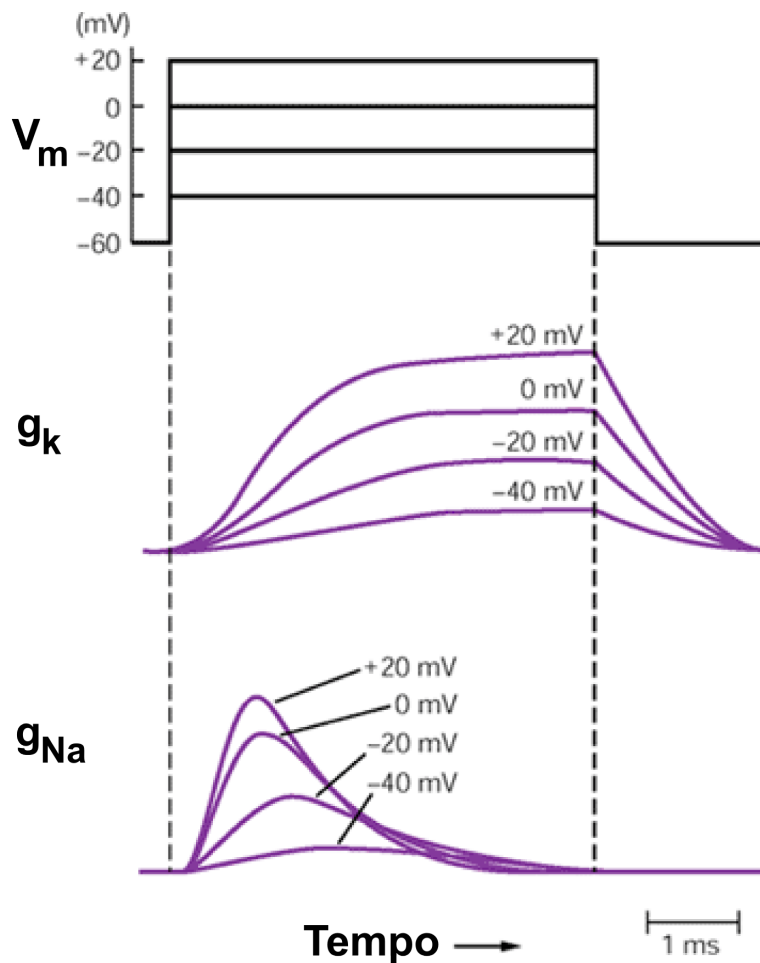


Figura 1.5. Curvas experimentais esquemáticas mostrando que o processo de abertura e fechamento dos canais Na^+ é significativamente mais rápido comparado aos K^+ . **Painel superior:** Despolarização da membrana celular em diferentes valores de potencial transmembrânico (V_m). **Painel central:** Curvas de condutância para o íon K^+ para distintos valores de V_m . **Painel inferior:** Idem para o íon Na^+ . Note que, a variação das condutâncias (g_{Na} e g_K) aqui ilustradas representa a mudança de estado aberto/fechado de milhares de canais iônicos. (Modificado de Kandel *et al*, 2000⁶).

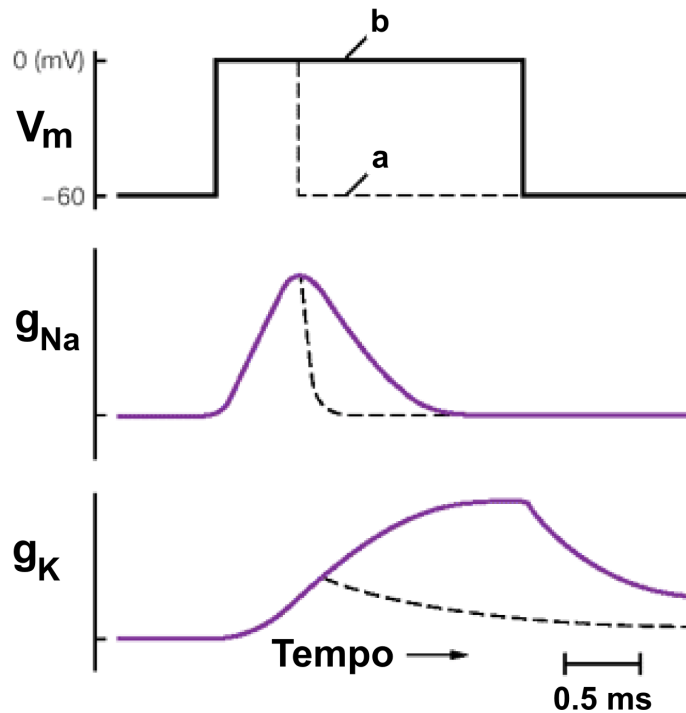


Figura 1.6. Resposta diferenciada de canais Nav e Kv à longas despolarizações da membrana. **Painel superior:** Despolarização da membrana celular. **Painéis central e inferior:** Curvas de condutância iônica em função do tempo para os íons Na⁺ e K⁺ respectivamente. Quando a membrana é repolarizada após uma breve despolarização (linha tracejada a, painel superior), ambas as condutâncias iônicas (g_{Na} e g_K) retornam para seus valores iniciais. Entretanto, se a despolarização é mantida (linha contínua b), os canais de sódio se fecham por um processo de inativação enquanto os Kv permanecem abertos durante toda a despolarização. (Modificado de Kandel *et al*, 2000⁶).

Os canais Nav podem, portanto, transitar por até três estados diferentes de condução durante um evento de despolarização celular: um estado desativado (*resting-state*), outro ativado e por fim um estado inativado. Mediante uma despolarização da membrana o canal passa de um estado desativado, que não conduz íons, para o estado ativado (condutor). Se a despolarização é rápida, o canal retorna para o *resting-state* assim que ocorre a repolarização. Contrariamente, se o evento de despolarização é prolongado, o canal passa do estado aberto e condutor para um estado inativado e não condutor. Uma vez que o canal atinge seu estado inativado ele não abrirá novamente, mesmo se houver outro evento de despolarização. A inativação somente pode ser revertida mediante a repolarização da membrana para seu potencial de repouso³ (figura 1.7).

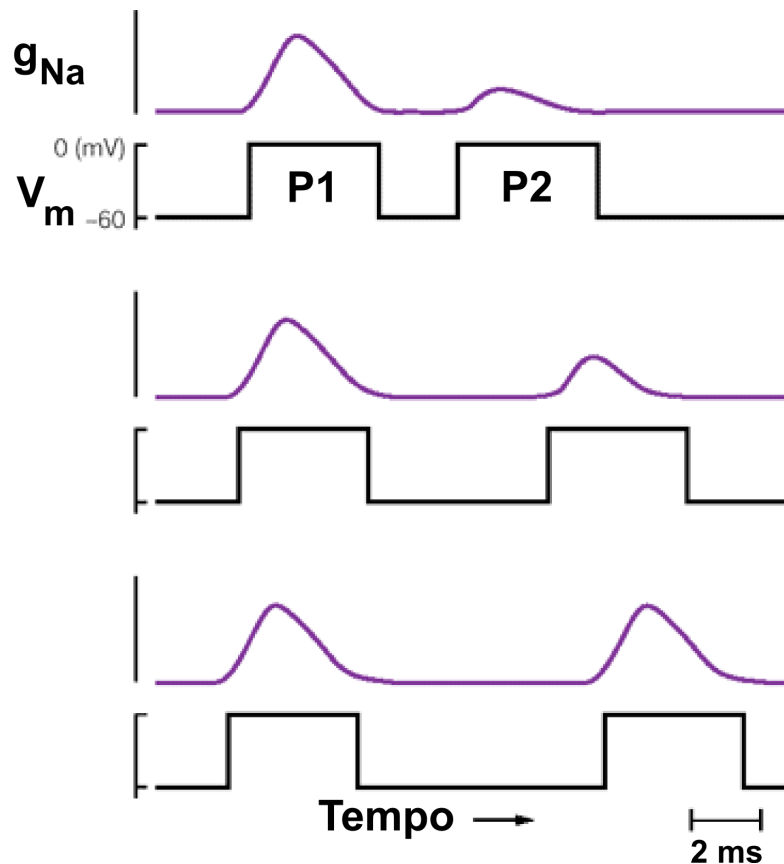


Figura 1.7. Tempo de permanência dos canais Nav no estado de inativação. Se o intervalo entre dois pulsos de despolarização da membrana (P1 e P2) é curto, o segundo pulso é capaz de induzir apenas um pequeno aumento da condutância aos íons Na^+ , pois a maioria dos canais estará no estado de inativação. Dessa forma, quando o intervalo entre dois pulsos de despolarização for suficientemente longo, a ponto da maioria dos canais terem retornado ao seu estado de repouso (*resting-state*), o aumento da condutância será significativo. (Modificado de Kandel *et al*, 2000⁶).

Os pesquisadores Hodgkin e Huxley foram capazes em seus estudos originais⁷ de ajustar suas medidas de variação da condutância a um conjunto de equações diferenciais empíricas que podem descrever completamente a variação da condutância para os íons Na^+ e K^+ em função de V_m e do tempo. Por meio dessas equações e de constantes previamente conhecidas, advindas das propriedades passivas de um axônio, eles puderam finalmente computar a forma e a velocidade do potencial de ação. A curva do potencial de ação assim estimada, na forma de uma onda, praticamente se sobrepôs a uma aferição sobre um axônio gigante de lula. Essa sobreposição quase perfeita entre os dados estimados e aferidos, indica portanto, que a dependência de voltagem e do tempo, calculada por meio da técnica *voltage-clamp*, descreve com grande acurácia as propriedades desses canais que são essenciais para a

geração e propagação do potencial de ação. Esse resultado é tão surpreendente que mesmo passado mais de meia década de suas descobertas originais, o modelo Hodgkin-Huxley (do inglês *HH model*) é até hoje o modelo quantitativo de maior sucesso nas neurociências senão em toda a biologia⁶.

De acordo com o *HH model* um potencial de ação está envolvido em uma série de eventos. Primeiramente uma despolarização da membrana induz a abertura rápida dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, que resulta num aumento de g_{Na} e uma corrente de íons Na^+ para o meio intracelular. Essa corrente então promove uma despolarização adicional que resulta na abertura de mais canais Na^+ e que por sua vez aumentam a magnitude da corrente desse íon. Esse processo de retroalimentação positiva desloca o potencial da membrana para valores próximos ao potencial de Nernst para o íon Na^+ (tabela 1.1). Entretanto, esse estado de despolarização limita a duração do potencial de ação por dois motivos principais: i) é dado início ao processo de inativação gradual dos canais Na^+ que reduz g_{Na} e ii) os canais K^+ começam a transitar para o estado aberto aumentando a condutância dos íons K^+ em direção ao meio extracelular. Conseqüentemente, a corrente de influxo de íons Na^+ passa a ser contrabalaneada pela corrente de efluxo de íons K^+ que termina por repolarizar a membrana até o seu potencial de repouso⁶ (figura 1.8).

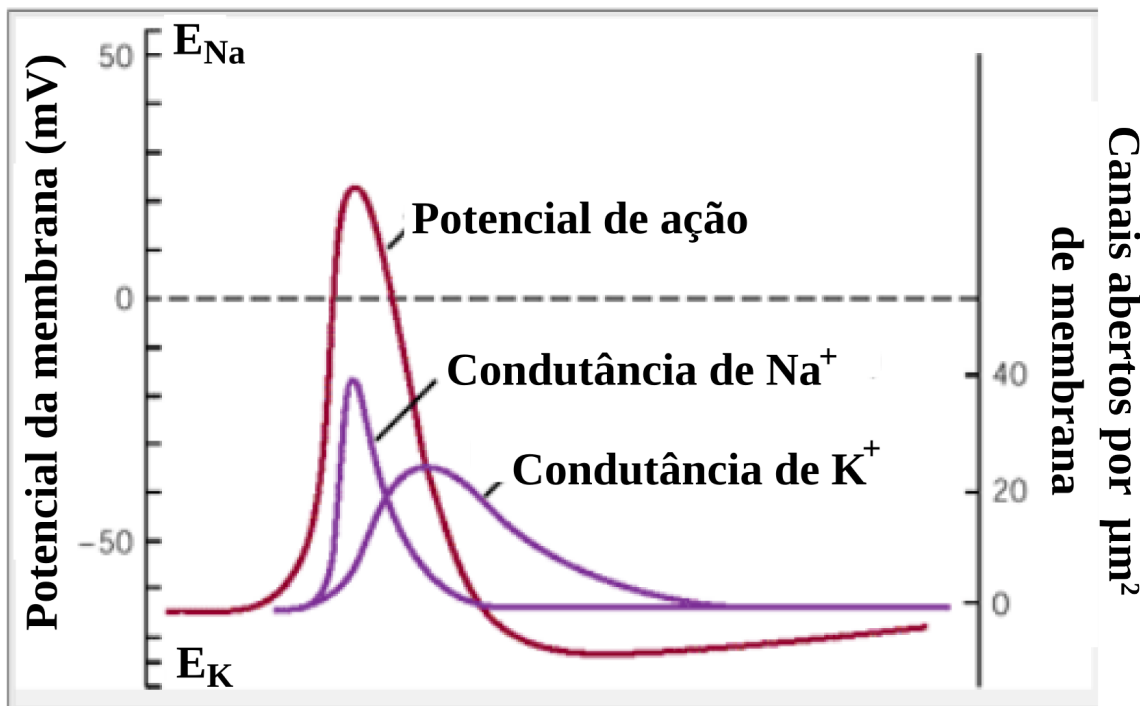


Figura 1.8. Abertura sequencial dos canais Na^+ e K^+ dão a forma do potencial de ação (curva em vermelho). As curvas em roxo indicam as condutâncias dos íons Na^+ (g_{Na}) e K^+ (g_{K}). A grande contribuição de Hodgkin e Huxley foi conseguir separar as curvas de variação de condutância das espécies iônicas durante o potencial de ação, que se devem à abertura dos canais Na^+ e K^+ . (Modificado de Kandel *et al*, 2000⁶).

1.3 ATIVAÇÃO DEPENDENTE DE VOLTAGEM DOS VGCC

O desenvolvimento das técnicas de *voltage-clamp* (sigla em inglês *VC*), até a primeira metade do século XX, foi absolutamente inovador para o ramo das neurociências, porque proporcionou um aprofundamento imprescindível sobre o conhecimento das propriedades elétricas das células excitáveis. Em um sistema do tipo *VC*, eletrodos são colocados em ambos os lados da membrana plasmática afim de medir a corrente iônica que a atravessa, enquanto o circuito eletrônico mantém ΔV constante. O circuito elétrico *VC* aplica uma corrente apenas o suficiente para manter a voltagem intracelular em valores que permitam o desenrolar de um potencial de ação. As primeiras medidas experimentais mostraram que correntes iônicas não eram detectáveis quando células excitáveis eram submetidas à condições de hiperpolarização, ao passo que em condições de despolarização a magnitude dessas correntes aumentava⁷. Apenas no final dos anos 1970 foi demonstrado que o fluxo de íons, dependente de voltagem em células excitáveis, era mediado por proteínas transmembrânicas pertencentes à família *VGCC*². Posteriormente, o método *VC* foi aperfeiçoado para a técnica conhecida como *patch-clamp* (sigla em inglês *PC*), que permite aferir correntes iônicas tão precisas quanto de canais iônicos individuais na membrana (figura 1.9).

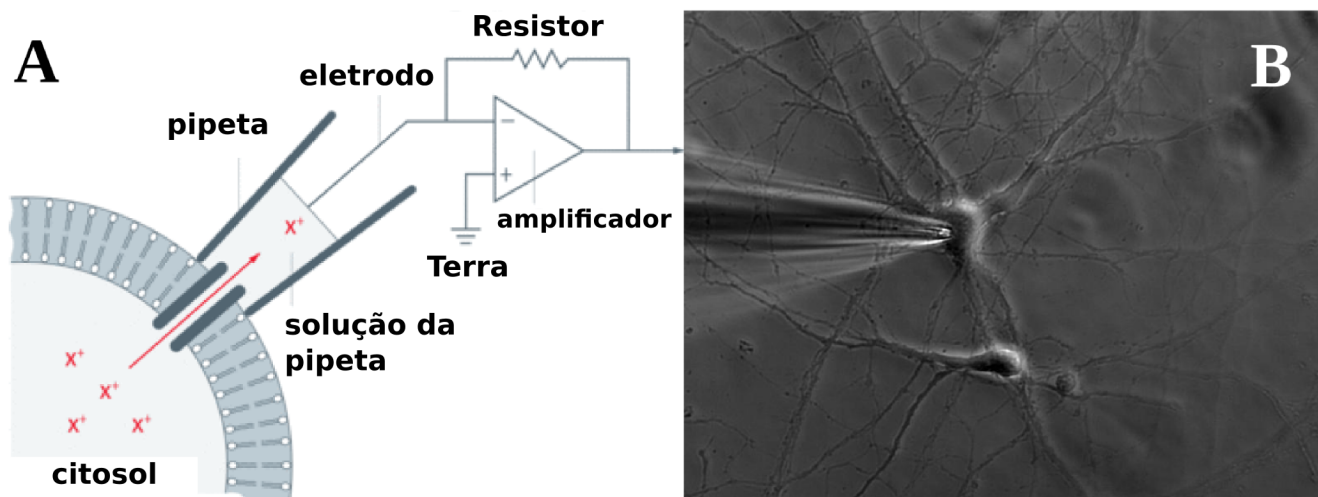


Figura 1.9. A: Princípio geral de um experimento de *patch-clamp*. Uma micropipeta de vidro é selada na membrana. Correntes iônicas fluem através dos canais para dentro da pipeta que é acoplada a um circuito eletrônico para promover a leitura dessas correntes. No esquema de *voltage-clamp* uma corrente é injeta na célula via retroalimentação negativa de modo a compensar a queda de voltagem devido à passagem de íons intracelulares para o meio da pipeta. B: Imagem de contraste de fase evidenciando uma micropipeta selada à membrana de uma cultura de hipocampo de camundongo (Cortesia de Dr. Ainhara Aguado, Ruhr University Bochum, Germany, retirado de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique>).

O estabelecimento dessa nova metodologia foi crucial para revelar que o processo de ativação (abertura) dos *VGCC* é uma etapa fundamental, na qual o canal controla a condução iônica dependentemente da voltagem⁸ (figura 1.10). Sobre potenciais hiperpolarizados, *VGCC* se encontram preferencialmente em estados não condutivos (fechado). Em resposta à uma despolarização da membrana, esses canais alternam para o estado ativado (aberto) exibindo altos níveis de condução iônica⁷. A transição molecular entre os estados fechado/aberto é conhecido como processo de ativação, e tem sido tema de intensa pesquisa científica e aquecida competição internacional.

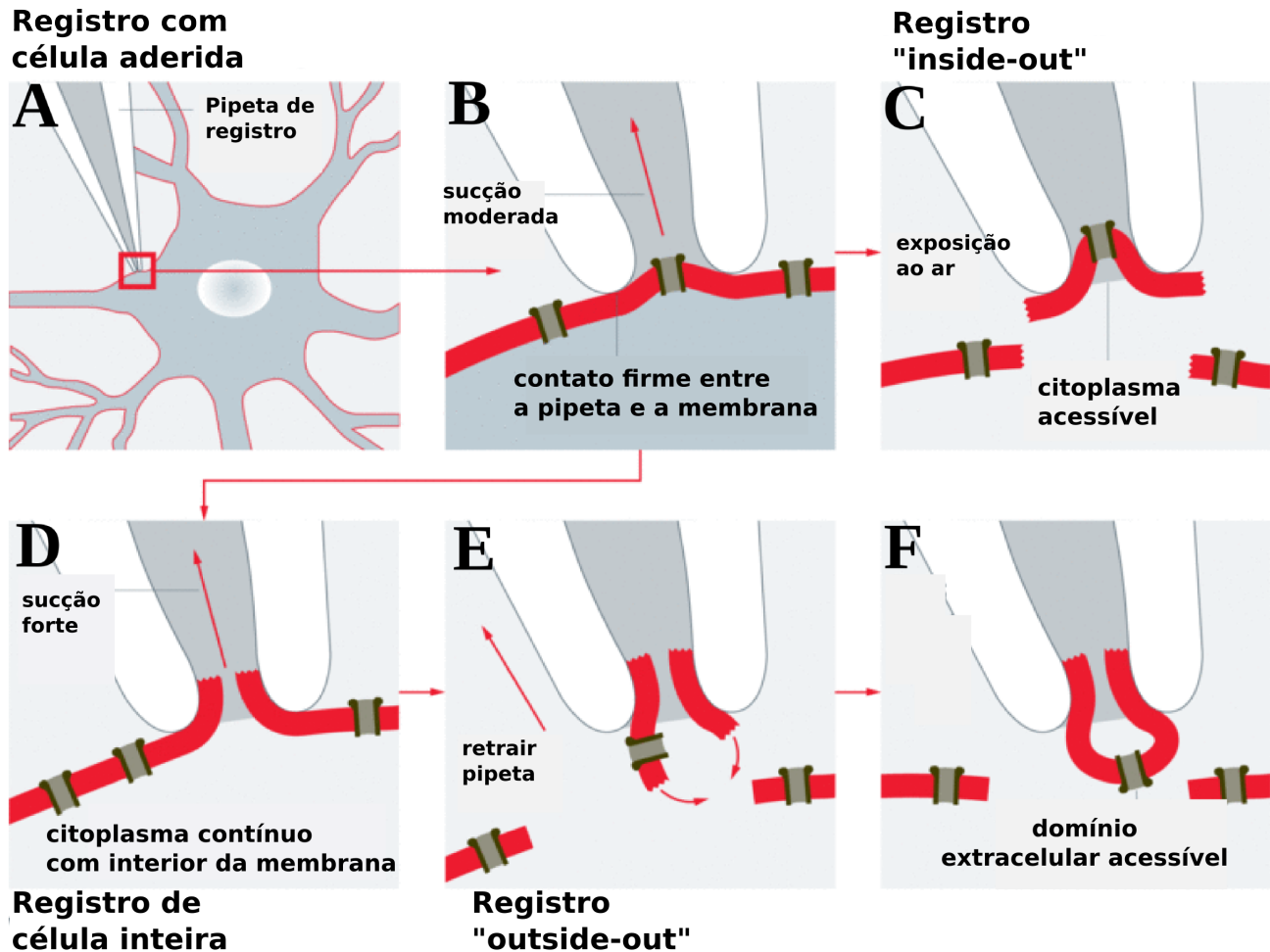


Figura 1.10. Os três principais métodos de *patch-clamp*. **A:** Adesão da micropipeta na membrana celular e **B:** aferição de corrente de um único canal. **C)** *Inside-out*: No modo de adesão celular, a pipeta é retraída e então o adesivo pipeta-membrana é separado do restante da bicamada lipídica e exposto ao ar. A face intracelular da membrana é exposta. **D)** *Whole-cell*: Aplicação de uma sucção de maior intensidade e curta duração, a membrana celular é rompida e então a pipeta ganha acesso ao citoplasma. **E e F)** *Outside-out*: Ainda no modo *the whole-cell*, a pipeta é retraída de modo a separar duas porções da membrana que são reconectadas dando origem a uma estrutura vesicular cuja a face intracelular está voltada para o conteúdo da pipeta (retirado de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique>).

Em seus estudos originais, Hodgkin e Huxley previram que as mudanças na permeabilidade iônica dos canais dependeriam essencialmente da maneira como o campo elétrico transmembrânico (E) afetaria a orientação, em relação ao dipolo, das cargas carregadas dessas proteínas. Dessa forma, durante a despolarização da membrana deveria ser possível detectar correntes transientes oriundas de reorientações dessas cargas sob ação do campo. Entretanto, devido às limitações metodológicas da época, esses pesquisadores não puderam medir diretamente a quantidade física que atualmente é conhecida como correntes de ativação ou *gating currents*. Apenas com o advento da técnica *PC* é que experimentalistas puderam então aferi-las em axônios gigantes de lulas^{9,10} e posteriormente em células da musculatura esquelética¹¹. Apesar de sua magnitude ser aproximadamente duas ordens de grandeza inferior às correntes iônicas de condução, as *gating currents* correspondem a um observável macroscópico bastante característico do processo de ativação dos *VGCC* por estarem fortemente correlacionadas às correntes iônicas de condução e ΔV . Desde então, a quantidade física conhecida como *gating charges* (sigla em inglês Q), que corresponde à integral relativa ao tempo das *gating currents*, a um dado ΔV , tem sido extensivamente estudada para uma variedade de *VGCC*¹². O processo típico de ativação resulta em um valor total de Q que pertence ao intervalo ~12-14 cargas elementares (e)¹³⁻¹⁵.

1.4 NATUREZA MOLECULAR DOS *VGCC*

Em meados dos anos 80, o advento de técnicas sofisticadas de biologia molecular como a clonagem de DNA e o sequenciamento genômico, marcaram o início dos estudos visando a identificação da natureza molecular dos *VGCC*^{16,17}. Revelado por meio desses experimentos imprescindíveis e aliado às estruturas cristalográficas de alta resolução, o padrão estrutural dos *VGCC* é caracterizado por domínio tetraméricos (formados por 4 subunidades) ou então pseudo-tetraméricos (única proteína formado por 4 repetições), em que cada subunidade homóloga incluiu seis segmentos de hélice do domínio transmembrânico (sigla em inglês *TM*). Os primeiros quatro segmentos (S1-S4) do *TM* constituem o domínio sensor de voltagem (sigla em inglês *VSD*), enquanto que os segmentos S5 e S6 constituem o domínio do poro (sigla em inglês *PD*) que incluiu o filtro de seletividade iônica (sigla em inglês *SF*)¹⁸. Esses dois domínios são conectados pelo segmento de ligação, S4-S5 *linker* (L), que atua como uma alavanca que regula a mecânica de funcionamento do processo de abertura/fechamento do poro de condução iônica (figura 1.11). O alinhamento de sequencia mostrando a identidade dos aminoácidos de alguns canais de potássio e sódio dependentes de voltagem está

ilustrado na figura 1.12. Os *VSD* são domínios estruturais adsorvidos à membrana celular e ubíquos em toda superfamília de *VGCC*, atuando como dispositivos elétricos que responde à variações de ΔV . Em detalhe, o *VSD* é estabilizado por interações eletrostáticas de resíduos ácidos das hélices S1-S3 e por resíduos básicos de arginina (R₁-R₄) da hélice S4^{19,20}. Essa rede de interações eletrostáticas dá origem a um lúmen parcialmente hidratado em estados funcionais de *VSD* na membrana. Durante a despolarização celular, o campo elétrico (**E**) realiza trabalho sobre os resíduos carregados da S4 (do inglês *gating charge residues*, *GQR*) induzindo mudanças conformacionais do *VSD* e remodelando a rede de interações eletrostáticas através da capacitância da membrana. Esses eventos sequenciais dão origem à correntes transientes conhecidas como *gating currents*, cuja integral relativa ao tempo dessas correntes são as *Q*.

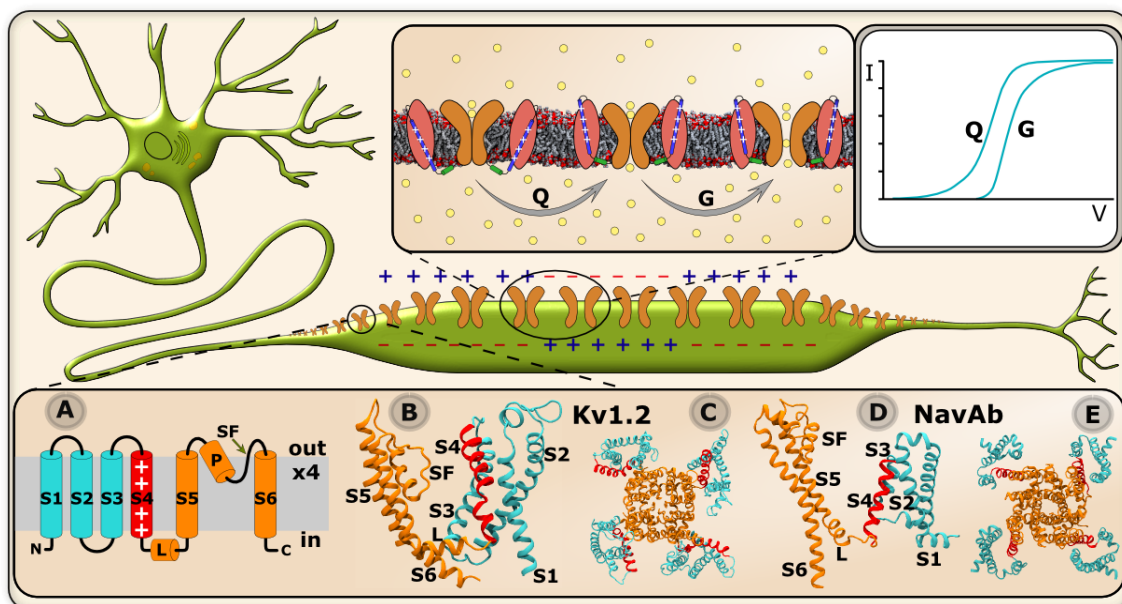


Figura 1.11. Painel superior: Topologia geral dos *VGCC* que compartilham de estruturas e mecanismo de abertura/fechamento similares. Representação esquemática de um neurônio com detalhe atômico da membrana celular e seus canais *VGCC*. Em particular, o segmento S4 contém resíduos básicos carregados positivamente sendo responsável por sensorar variações de ΔV , enquanto que o S4-S5 *linker* (L) conecta o *VSD* (S1-S4) ao *PD* (S5-S6). As correntes normalizadas *Q* e *G* são decorrentes respectivamente do rearranjo das cargas positivas da S4 sobre ação do campo elétrico e do fluxo líquido de íons positivos através da membrana. **Painel inferior:** **A)** Representação esquemática dos segmentos de um *VGCC*. O domínio sensor de voltagem (*VSD*) é composto por 4 hélices S1-S4 sendo a última carregada positivamente por resíduos de arginina e/ou lisina. O domínio do poro (*PD*) é composto pelas hélices S5-S6, cujo segmento SF é o responsável pela seletividade iônica, conhecido como filtro de seletividade (*SF*). O segmento L é uma alfa hélice responsável pelo acoplamento mecânico entre *VSD* e *PD* durante a ativação. **B) e C)** Vistas laterais do *VSD* e extracelulares do canal Kv1.2. **D) e E)** Idem para o canal de sódio NavAb. (Modificado de Stock *et al*, 2013²¹).

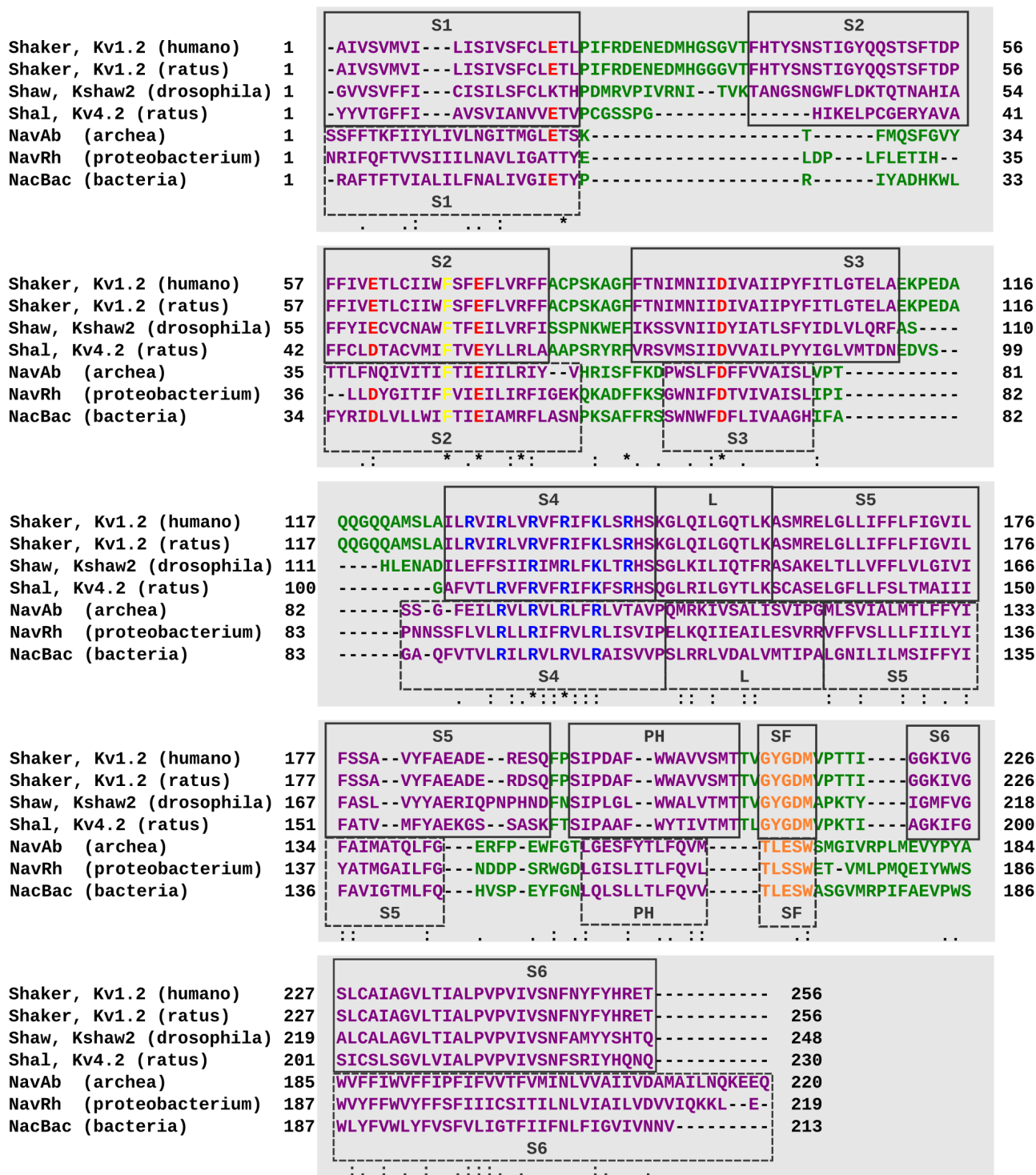


Figura 1.12. Alinhamento de sequência da região transmembrânica de alguns dos principais canais Kv e Nav. As estruturas secundárias em α -hélice dos segmentos S1-S6, S4S5 linker (L) e hélice do poro (PH) estão coloridas em roxo, e o filtro de seletividade (SF) em laranja. Esses segmentos estão ressaltados em quadros contínuos (Kv) e pontilhados (Nav). Os aminoácidos referentes a elementos de *loop* dos canais estão coloridos em verde. Os resíduos altamente conservados dentro da família VGCC estão coloridos a seguir: aminoácidos ácidos (vermelho), básicos da S4 (azul), o resíduo chave Phe do VSD (amarelo). Note que a extensão dos segmentos helicoidais variam entre as proteínas.

1.5 ATIVAÇÃO DE VGCC: MOVIMENTOS MOLECULARES DO VSD

Uma variedade de experimentos visando identificar a contribuição dos *GQR* da hélice S4 para a quantidade total de Q esclareceram que este segmento carregado da proteína atua como elemento crucial dentro do processo de ativação desses canais^{12,22}. Mutações sítio dirigidas nos resíduos carregados da S4, afetam não apenas a dependência à voltagem dos *VGCC*, como também os valores de Q associados. Nesses experimentos, a contribuição dos resíduos básicos da S4 para a quantidade total de *gating charges* é avaliada por meio da neutralização ou reversão das cargas positivas verificando-se posteriormente a resultante de Q , através de medida direta ou então, indiretamente, via estimativa da probabilidade de abertura do poro^{15,23}. O processo de ativação foi então deduzido como um complexo mecanismo determinado por movimentos moleculares dos *VSD*, resultantes essencialmente de movimentos da S4.

A partir de experimentos específicos dispostos a esclarecer a natureza dos movimentos da S4 durante a ativação, como a marcação dos *GQR*, empregados majoritariamente em canais de potássio da família *Shaker B*, foi possível caracterizar o ambiente que permeia esses resíduos carregados da S4 nos estados ativado e desativado do canal. Experimentalistas reuniram indícios de que a S4 desloca as *GQR* ao longo da direção transmembrânica durante a ativação, da face intracelular para extracelular, a partir de experimentos como o método para acessibilidade de resíduos de cisteína substituídos (sigla em inglês *SCAM*)²⁴⁻²⁶. Essa técnica permite investigar a acessibilidade estado dependente dos resíduos básicos, ou polares da hélice S4, mutados para aminoácidos de cisteína, através de reações químicas com reagentes do tipo tiol. Com o objetivo de explorar espaços ainda mais confinados dentro do *VSD*, e preservando as cargas da S4, experimentos adicionais de acessibilidade sujeitos a um gradiente de pH, em que os *GQR* são substituídos por aminoácidos de histidina, permitiram a quantificação de uma corrente de prótons decorrente do deslocamento dos resíduos mutados da face intra para extracelular^{27,28}. De maneira independente, experimentos empregando sondas fluorescentes ligadas aos *GQR* da S4 mostraram adicionalmente que esse segmento cruza a região intracelular em direção à face extracelular levando consigo pelo menos nove resíduos de aminoácidos²⁹, observável que dá suporte às aferições anteriores.

Seguindo diferentes metodologias, como o bloqueio dos *GQR* por ligações dissulfeto, realizados em canais de potássio e mais recentemente em canais de sódio, foi possível caracterizar interações específicas por entre o *VSD* desses canais. Por exemplo, no estado desativado do canal de sódio *NaChBac*³⁰⁻³², foi demonstrado que o resíduo R₄ interage por meio de um contato eletrostático com o

aminoácido D⁷⁰. De modo contrário, no estado ativado do canal, esse resíduo carregado positivamente interage com o resíduo D⁶⁰, que está localizado em uma região próxima à face extracelular quando comparado com o D⁷⁰. Independentemente do sistema investigado, i.e Kv ou Nav, o cenário geral constituído a partir desses experimentos é de que a S4 forma interações eletrostáticas sequenciais dependentes do estado do canal, ao longo do caminho de ativação, movendo-se de um estado em que os *GQR* ocupam sítios mais enterrados, i.e voltados para a face intracelular, para um estado onde estão mais expostos à face extracelular.

1.6 MODELOS DE ATIVAÇÃO DE VGCC

Embora os estudos de ativação dos *VGCC* convirjam para o modelo em que a hélice S4 é responsável por sentir variações de voltagem transmembrânicas, e portanto determinante para o desenrolar do processo de condução iônica, não é possível até então discriminar entre dois mecanismos putativos possíveis de ativação nos quais a S4 transfere *gating charges* através da capacitância da membrana celular³³. O primeiro deles, conhecido como modelo *sliding-helix*, proposto originalmente por Guy & Seerharamulu³⁴ e Catterall³⁵, determina que os resíduos básicos da S4 formam interações eletrostáticas sequenciais com resíduos ácidos dos segmentos vizinhos S2-S3. Durante a ativação, a hélice S4 desloca-se ~10-15 Å perpendicularmente ao plano transmembrânico, cruzando o campo eletrostático (**E**) estático (figura 1.13). Diferentemente, no mecanismo conhecido como modelo *transporter*, é proposto que a hidratação local da S4 proporciona a focalização de **E** por entre o *VSD*, e que a ativação do canal envolve um remodelamento da intensidade do campo focalizado, ao redor da S4. Esse modelo contraria o pressuposto do *sliding-helix* uma vez que no último, é definido que a S4 passa por pequenos deslocamentos físicos dentro de um campo com intenso remodelamento. Devido à hidratação, e portanto, a modificação do dielétrico local da S4, um sutil deslocamento transmembrânico da hélice carregada, acompanhado por uma inclinação da mesma, seria suficiente para conduzir o total de *gating charge* aferido experimentalmente. É válido ressaltar que um canal iônico da superfamília *VGCC* tem dois estados funcionais bem definidos quanto à condução: i) um estado ativado, cujo o poro condutor está aberto e um estado inativado em que não há condução de íons. Este último pode estar relacionado ao fechamento da cavidade central ou ao colapso do filtro de seletividade. Entretanto, em trabalhos de *MD* que envolvam movimentos específicos do *VSD* é usual adotar a nomenclatura ativado e desativado para o *VSD* quando o sensor está respectivamente numa posição mais próxima à face extracelular e intracelular. A figura 1.13 ilustra esses dois estados bem definidos do *VSD*.

Em 2003, foi publicada a estrutura cristalográfica de um canal Kv de archea (*Aeropyum pernix*) o KvAP³⁶, e um terceiro modelo para ativação dos *VGCC* foi então proposto. Esse modelo define que cada hélice S4 faz parte de um remo do *VSD* (*voltage-sensor paddle*) que está voltado para face intracelular quando o canal está fechado. Durante a ativação, esse remo se deslocaria verticalmente ~20 Å ao longo da direção transmembrânica. Entretanto, devido a um número significativo de evidências experimentais que contrariam esse modelo, o mesmo foi abandonado e agora sabe-se que a proteína KvAP provavelmente foi cristalizada em uma conformação não funcional do canal.

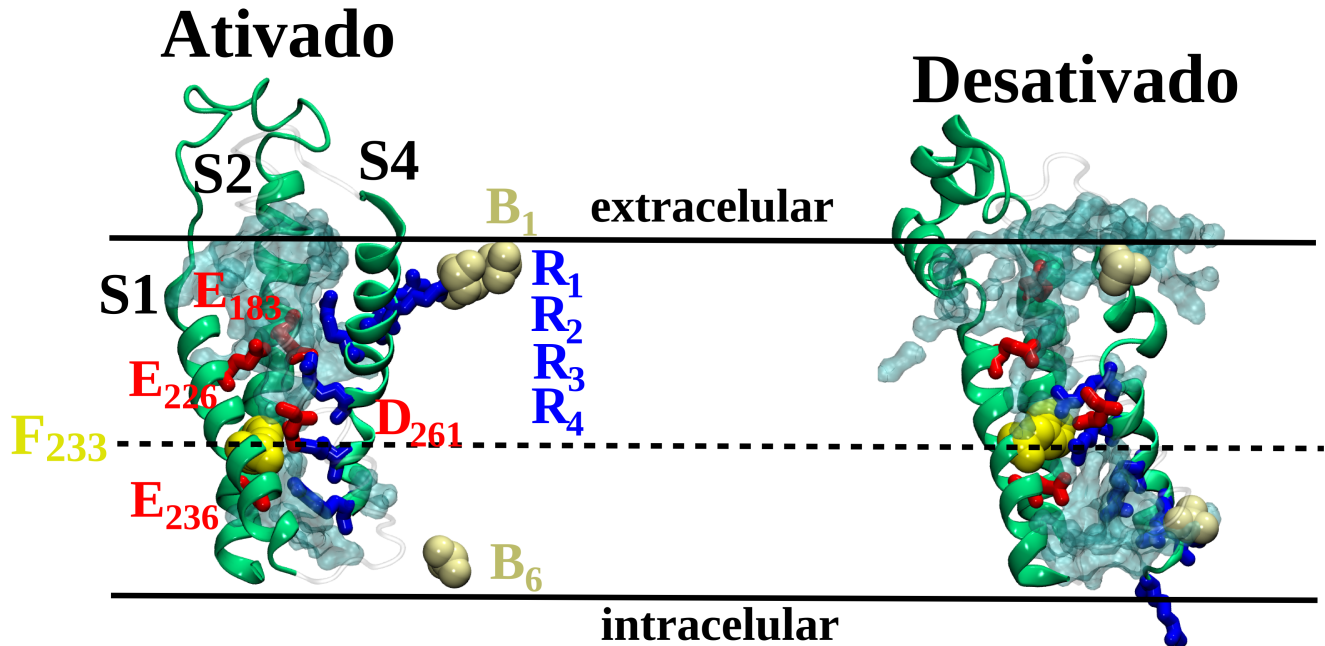


Figura 1.13. Visão lateral das conformações ativada e desativada do *VSD* (representado em *cartoon* verde) do Kv1.2 (S3 omitida da imagem por clareza) conforme o modelo *sliding-helix*. Detalhe microscópico da rede de interações eletrostáticas entre os resíduos de arginina coloridos em azul (R₁-R₄) e seus respectivos sítios de interação negativos (correspondendo respectivamente aos resíduos ácidos (B₂-B₅) E₁₈₃, E₂₂₆, E₂₃₆, D₂₅₉, em vermelho, como também os grupos carregados dos fosfolípidios extra e intracelulares numerados respectivamente como B₁ e B₆ e ilustrados como esferas bege). O processo de ativação envolve o deslocamento da S4 na direção extracelular. Note que, a configuração da F²³³ (amarelo) favorece a desidratação parcial do *VSD* nessa região, em que o campo elétrico transmembrânico é maximamente focalizado (linha tracejada). As estruturas ilustradas foram retiradas de Delemotte *et al*, 2011³⁷.

1.7 BASES ESTRUTURAIS PARA ATIVAÇÃO DOS VSD: ESTUDOS COM OS CANAIS Kv

Por muitos anos, um entendimento mais profundo da relação estrutura/função dos canais *VGCC* foi dificultado devido a escassez de dados estruturais e dinâmicos dessas proteínas no nível atômico molecular. Essa limitação é decorrente da dificuldade de obter dados estruturais no nível das interações atômicas como aqueles alcançados pelas técnicas de difração de raios-X e ressonância magnética nuclear (sigla em inglês *NMR*). A prova disso é que apenas em 2005 a estrutura cristalográfica de um Kv de mamífero, o Kv1.2, foi ineditamente resolvida (figura 1.14)³⁸. Membro da família *Shaker*, esse canal iônico foi cristalizado na conformação ativada, com poro de condução iônica aberto, proporcionando aos pesquisadores o desafio de decifrar questões fundamentais acerca do funcionamento dos canais *VGCC*. De maneira geral, a estrutura atomística revelou que o *VSD* está orientado na direção transmembrânica, levemente aderido ao poro. Diferentemente daquilo que vinha sendo sugerido, a hélice S4 não estava blindada da membrana pelo poro do canal, mas rodeada pelos segmentos S1-S3 de um lado e a superfície lipídica do outro. Além disso, a estrutura revelou o segmento S4-S5 *linker* (L) no formato alfa-helicoidal localizado na interface água/membrana intracelular. O segmento L faz contatos interatômicos com o conjunto de hélices S6 do poro, e sobretudo direciona o deslocamento transmembrânico da S4 à região de abertura/fechamento do poro durante a ativação. O mesmo padrão estrutural é igualmente encontrado na estrutura cristalográfica do canal de potássio Kv1.2-Kv2.1 quimera²⁸. Essas duas recentes estruturas de alta resolução reforçam a observação de que a estrutura do canal KvAP é representativa de uma conformação não funcional do canal.

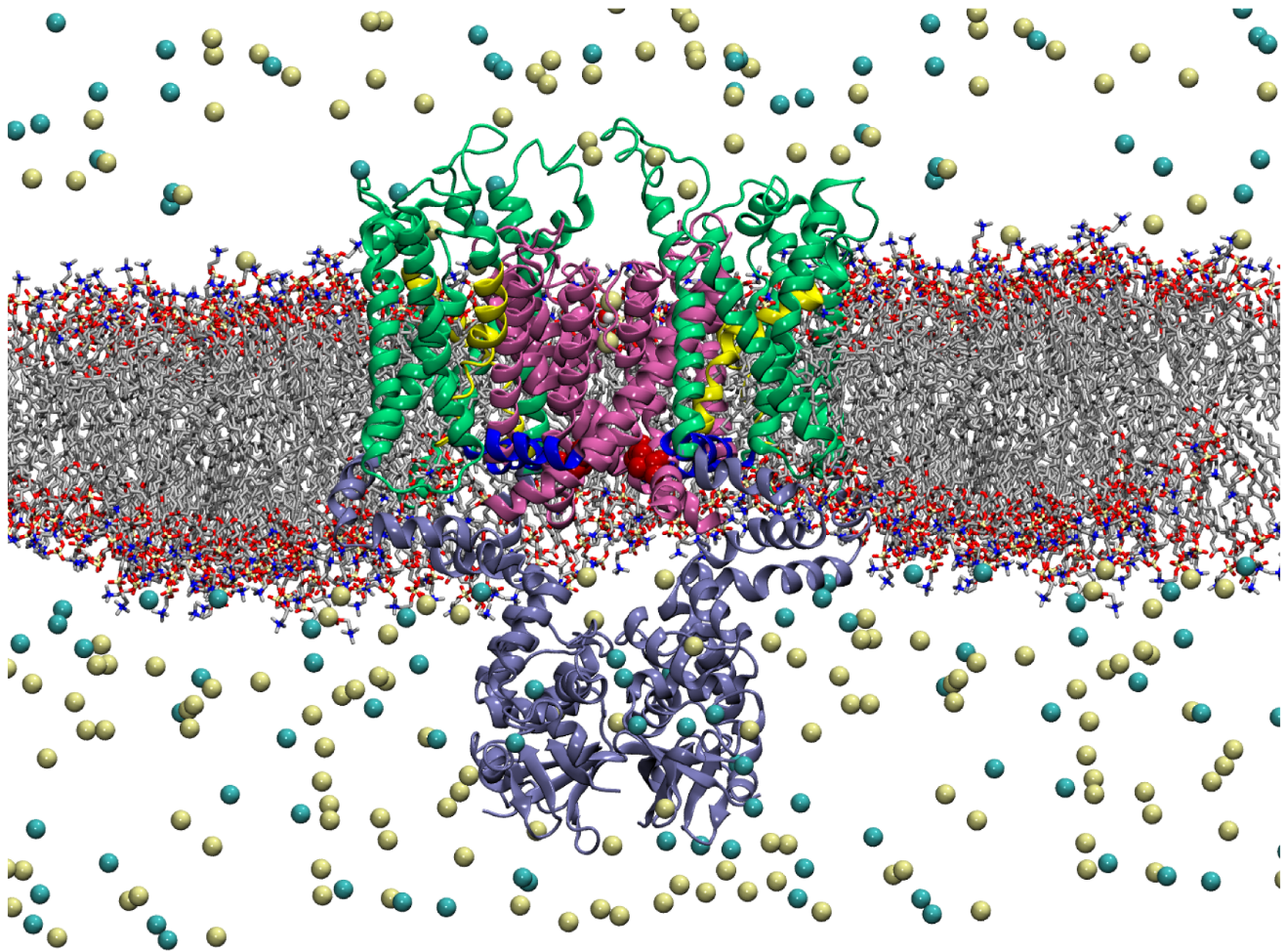


Figura 1.14. Visão geral de um sistema atômico explícito do Kv1.2 (*cartoon*) equilibrado na membrana (bastões). Em detalhe estão representados os domínios estruturais do canal: domínio de tetramerização, T1 (azul gelo); os segmentos S1-S3 do *VSD* na conformação ativada (verde), a hélice S4 (amarelo) voltada para face extracelular; o segmento S4-S5 *linker* (azul escuro) e o domínio do poro (magenta). Os íons cloro (azul ciano) e potássio (bege claro) são visualizados como esferas (moléculas águas omitidas do detalhe por clareza). Note que o filtro de seletividade está ocupado por íons K^+ e uma molécula de água. O portão hidrofóbico (V^{410}), responsável por restringir a entrada do poro, está representado por esferas em vermelho. A estrutura do canal relaxada em membrana foi retirada de Treptow *et al*, 2006³⁹.

Como demonstrado por simulações computacionais de dinâmica molecular (sigla em inglês *MD*), com o objetivo de investigar os detalhes estruturais da estrutura ativada e aberta do Kv1.2 adsorvida na membrana^{39,40}, o arcabouço estrutural do *VSD* se assemelha à forma de uma ampulheta permeada por moléculas de água, expondo os *GQR* ao solvente, e que comunica as faces intra e extracelulares do domínio. Essa característica é consistente com os resultados oriundos dos

experimentos de acessibilidade via *scanning* de histidinas, e posteriormente confirmados por simulações computacionais de *VSD* individuais na membrana⁴¹, aliado a experimentos de *NMR*⁴². Interações eletrostáticas específicas entre os *GQR* com seus vizinhos acídicos e grupos carregados do lipídio foram caracterizadas como determinantes para a estabilização estrutural do canal ativado na membrana^{39,40}. Em detalhe, os resíduos R₁-R₄ estão expostos ao solvente extracelular formando interações iônicas com o grupo carregado dos fosfolipídios (B₁ e B₆) e com os resíduos ácidos B₂-B₅ (figura 1.13). Particularmente interessante, o crescimento implacável do poder computacional da última década permitiu o desenvolvimento de metodologias revolucionárias no contexto das simulações de *MD* e o aparecimento de uma nova geração de experimentos *in-silico* capazes de explorar o processo de ativação do Kv1.2, no nível das interações atômicas, pela implementação de protocolos de aplicação de ΔV . Nesses estudos, intervalos de voltagem fisiologicamente relevantes são obtidos pela aplicação de um campo elétrico externo⁴³⁻⁴⁵, ou através de metodologias que geram uma diferença de voltagem a partir de um desbalanço da quantidade de íons explícitos entre os banhos interno e externo do sistema^{37,46,47}. (vide figura 3.4 da metodologia, tópico 3.1.9). Essa abordagem inovadora permite caracterizar a morfologia de hidratação do *VSD* e verificar que a hidratação local dos resíduos carregados da S4 altera drasticamente a morfologia de **E**³⁹. Esse ambiente permeado por água favorece o colapso do campo elétrico ao redor dos resíduos básicos gerando assim uma focalização de **E** nas proximidades de um centro catalítico. No Kv1.2, esse centro é formado pelos aminoácidos F²³³, E²³⁶ e D²⁵⁹ (figura 1.13), cujo resíduo fenilalanina delinea uma região hidrofóbica dentro do *VSD* que interrompe o caminho de hidratação, e funciona como um catalizador do processo de transferência sequencial dos resíduos básicos da S4 através da região de maior focalização do campo elétrico⁴⁸. O conjunto de informações estruturais oriundos dos estudos de caracterização do estado funcional ativado do *VSD* em membrana, foram requeridos para revelar os detalhes atômicos subsequentes do processo de desativação do Kv1.2.

1.8 FOCALIZAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO

O conjunto de estruturas atômicas oriundas de simulações de *MD* acerca da desativação do Kv1.2 permitiram a quantificação das propriedades eletrostáticas do *VSD*, i.e morfologia de hidratação do dielétrico e do campo eletrostático (**E**), dos estados ativado e desativado do canal. Nesse ponto, simulações independentes empregando um campo elétrico externo⁴⁰, a partir da equação de Poisson-Boltzmann, e de outra maneira, aplicando uma diferença de voltagem ao sistema devido a um

desbalanço de íons explícitos³⁷, apontaram a existência de um campo elétrico focalizado na conformação ativada do Kv1.2 por uma estreita região de ~10-15 Å em relação ao resíduo F²³³. Note que, o aminoácido fenilalanina delimita uma região hidrofóbica, constringida dentro do *VSD*, que desconecta o caminho de hidratação intra/extracelular dentro do domínio e que portanto, determina a focalização de **E** nessa região. Recentemente, um estudo específico³⁷ demonstrou que as propriedades elétricas características do *VSD* não variam substancialmente por entre as conformações ativada e desativada do canal, indicativo de que não há grandes alterações na forma do campo eletrostático local que age sobre o domínio sensível à tensão durante a ativação. Esse resultado é de particular interesse devido à longa discussão acadêmica internacional sobre a natureza estática ou remodelada do campo elétrico em estudos de ativação de *VGCC*.

1.9 ABERTURA DO PORO E ACOPLAMENTO AO *VSD*

Estudos estruturais em canais Kv indicam que a abertura do poro está associada à hidratação transiente do caminho de condução iônica, que possibilita a difusão de íons através de um ambiente hidrofílico como verificado em estados ativados e com poro aberto do Kv1.2³⁸. Estudos independentes mostraram que o estreitamento do portão hidrofóbico (do inglês *hydrophobic gate*, sigla *HC*) do domínio do poro favorece a desidratação da cavidade central que impõe uma considerável penalidade energética ao processo de difusão iônica^{49,50}. No Kv1.2 o elemento hidrofóbico principal dentro do caminho de condução é o resíduo V⁴¹⁰. Como determinado por um estudo específico⁵⁰, quando o raio do portão hidrofóbico constituído pelo resíduo de valina é maior que 4.5 Å, o íon se difunde por uma superfície plana de energia. Em contrapartida, quando a abertura do poro é inferior a esse limite, a barreira de energia livre para o processo pode chegar a 45 kcal/mol, montante similar ao processo de transporte iônico não assistido através de uma membrana lipídica (figura 1.15). Tomados em conjunto, esses estudos indicam que o *HC* atua como um dispositivo eficiente para o controle do transporte assistido de espécies iônicas em *VGCC*. Da mesma maneira, uma variedade de outros canais iônicos também possuem portões hidrofóbicos no poro de condução iônica, como os receptores nicotínicos⁵¹ e os canais bacterianos mecanossensitivos⁵². Notavelmente, os portões hidrofóbicos dos poros de condução iônica desses canais parecem determinar um mecanismo específico de abertura/fechamento permitindo que o domínio funcione autonomamente.

Tal observação foi apontada num estudo computacional do Kv1.2 de *Rattus norvegicus*, partindo da conformação aberta e ativada do canal, e atingindo a escala de tempo da ordem de

microssegundos, que permitiu a visualização da região do poro passando por um processo de desidratação, e procedendo à conformação fechada do canal através de um mecanismo intrínseco do *HC*⁵³. Observada essa questão fundamental, surge então o questionamento sobre o modo como *VSD* e *PD* atuam cooperativamente para gerar as transições aberto/fechado desses canais. Embora sejam dois dispositivos autônomos numa membrana, tanto *VSD* quanto *PD* de alguma maneira devem funcionar de maneira sinérgica.

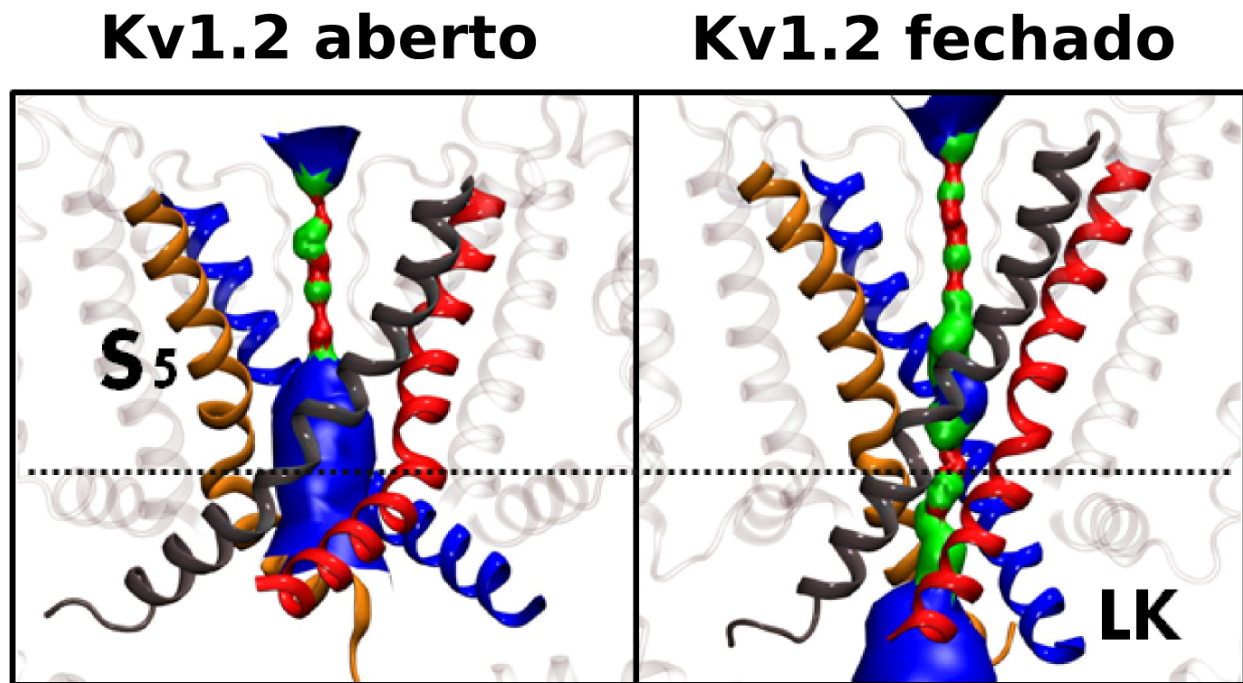


Figura 1.15. Processo de abertura/fechamento do domínio do poro do canal Kv1.2. **(Esquerda)** Conformação aberta do canal ilustrando o volume da cavidade central do poro hidrofílico por onde ocorre a condução iônica. **(Direita)** Estado fechado do canal. Nesta conformação há um colapso do portão hidrofóbico (aminoácido Val⁴¹⁰) e consequente desidratação da cavidade central impedindo o transporte iônico pelo canal. Note que, o S4S5-linker (L) sofre considerável rearranjo conformacional que resulta no fechamento do poro de condução iônica. Resultado retirado de Treptow *et al*, 2006⁵⁴.

1.10 ANESTÉSICOS GERAIS: 1-BUTANOL E HALOTANO

Os anestésicos voláteis e álcoois e cadeia alifática são compostos lipofílicos que afetam o transporte de íons através da membrana celular e são os principais agentes envolvidos no processo de anestesia geral⁵⁵. Como moléculas efetoras tem efeito depressor do sistema nervoso central. Atuam deprimindo progressivamente a respiração por reduzir o volume residual alveolar. Além disso, reduzem os reflexos de faringe e laringe, além de diminuir a pressão sanguínea e a pulsação. Quanto maior a

concentração dessas drogas, mais evidentes são os sintomas decorrentes de sua administração⁵⁵⁻⁵⁷. Até a década de 90 do século passado uma vertente cientificamente aceita, conhecida como regra de Meyer-Overton⁵⁸, preconizava que a melhor capacidade dos anestésicos em difundir pelo ambiente lipídico da membrana estava diretamente relacionado com a potência medicamentosa. Pelo fato do núcleo hidrofóbico da bicamada ser um locus de atração desses anestésicos essa regra ficou conhecida também como hipótese de ligação lipídica. Tal hipótese determina que proteínas de membranas serão indiretamente afetadas por anestésicos lipofílicos pela perturbação física que estes exercem sobre a lamela fosfolipídica^{59,60}. Entretanto, observações experimentais desafiam essa hipótese: i) perturbações sobre a membrana celular causadas pela aplicação de anestésicos gerais são igualmente alcançadas através de variações de temperatura menores que 1 °C⁵⁸; ii) algumas enzimas são afetadas por anestésicos na ausência de fosfolipídios^{58,61,62}; iii) álcoois de cadeia alifática longa tem ação efetiva apenas até um determinado tamanho da cadeia carbônica, além de alguns anestésicos voláteis apresentarem estereoseletividade^{58,61,63}; iv) apenas um número limitado de canais iônicos são afetados por anestésicos gerais⁶⁴. Dado a relevância dessas observações, uma vertente alternativa tem sido então consolidada, conhecida como hipótese de ligação proteica, que sugere uma ligação direta entre anestésicos gerais e proteínas da membrana via interação com sítios anfifílicos discretos. Nesse cenário, proteínas sensíveis a esses agentes provavelmente detêm motivos estruturais comuns que estão localizados em regiões da proteína que de alguma forma estão relacionadas a sua função.

Apesar de estudos importantes demonstrarem a hipótese de ligação proteica para interação dos anestésicos gerais com canais iônicos⁶⁵ a maioria das evidências são indiretas cuja base atômico-molecular ainda é desconhecida. De maneira a aprofundar sobre os questionamentos que residem nessa escala estrutural, empregamos neste estudo o 1-butanol e o halotano como modelos de anestésicos gerais (figura 1.16), representantes respectivamente das classes de n-álcoois e anestésicos voláteis, para identificar sítios putativos de ligação em canais iônicos da família *VGCC* como o Kv1.2 e o K-Shaw2 (vide resultados tópico 4.4).

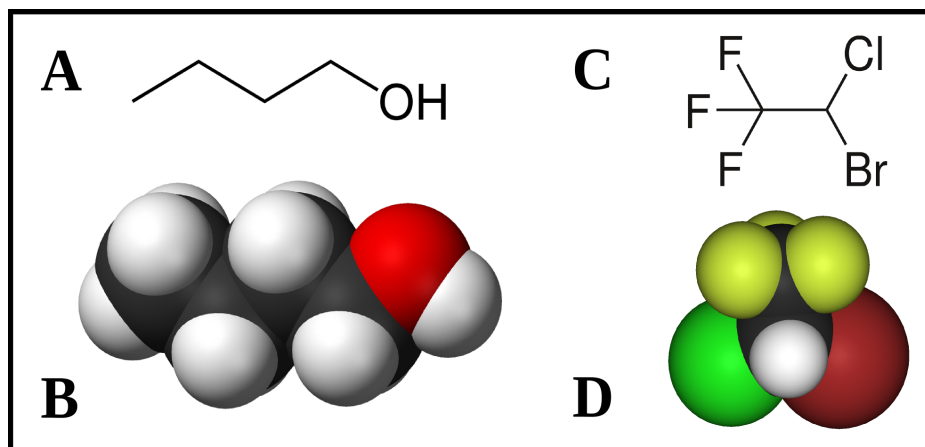


Figura 1.16. A e B: Fórmula química e representação esquemática por esferas de van der Waals do 1-butanol com átomo de oxigênio em vermelho, carbono em cinza e hidrogênio branco. C e D: Fórmula química e representação esquemática por esferas de van der Waals do halotano com átomo de carbono em cinza, flúor em amarelo, cloro em verde e bromo em vermelho escuro (nome IUPAC 2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano).

1.11 DIREÇÕES FUTURAS SOBRE VGCC: ATIVAÇÃO E MODULAÇÃO DOS CANAIS

Considerando o conjunto de dados revelados pelos últimos 50 anos de estudos, o desafio principal da atualidade é colocar todo esse arcabouço de dados estruturais e funcionais em um contexto unificado, possibilitando que a comunidade científica, a partir de agora, possa investigar outros tópicos de igual relevância sobre os VGCC. Como exemplo, a inédita estrutura do canal de sódio bacteriano do organismo *Arcobacter butzleri* (NavAb) resolvida em 2011⁶⁶, serve de repositório estrutural de alta resolução que permitirá expandir o conhecimento sobre a estrutura/função de outros canais menos conhecidos como os Nav e Cav. Dada a elevada similaridade estrutural entre os membros da superfamília VGCC, é esperado que esses canais compartilhem de um mecanismo sensível à voltagem e de abertura/fechamento do PD semelhantes aqueles revelados para o Kv1.2. De fato, elementos estruturais cerne como um portão hidrofóbico na entrada do poro, um segmento helicoidal L e uma hélice carregada positivamente (S4) são estritamente encontrados na estrutura cristalográfica do canal NavAb recentemente publicado. À luz dos resultados aferidos para os canais Kv, metodologias experimentais e teóricas servirão de valiosa fonte de dados estruturais afim de caracterizar atomisticamente os estados ativado e desativado do NavAb, além de elucidar similaridades e divergências entre esse canal e o Kv1.2.

Uma questão fundamental que doravante deverá ser explorada é o mecanismo de modulação

dos *VGCC*. Como evidenciado em estudos recentes, *VGCC* podem ter seu funcionamento modulado pela presença ou não de grupos carregados dos fosfolipídios de membrana. Quando esses canais são adsorvidos numa bicamada lipídica, cujos grupos PO_4^- são removidos enzimaticamente, o *VSD* pára de responder à variações de voltagem⁶⁷. Além disso, quando colocados em membrana com fosfolipídios carregados positivamente, a ação dos sensores de voltagem é igualmente suprimida^{44,46,68}. Apesar das estruturas atuais de canais Kv1.2 equilibrados em membrana sugerirem que os grupos carregados dos fosfolipídios das camadas extra e intracelulares formam interações eletrostáticas com os resíduos básicos da S4, contribuindo para estabilizar ambos estados ativado e desativado do canal, novas evidências indicam que esses lipídios atuam igualmente na estabilização de estados intermediários do caminho de ativação do Kv1.2³⁷. Entretanto, ainda não está inteiramente definido o papel e sobretudo a base estrutural dos fosfolipídios no processo de ativação de *VGCC*. Novos estudos serão requeridos para esclarecer esse tópico.

Tendo em vista o grande progresso sobre a natureza estrutural dos *VGCC* que tem sido alcançado até agora, está chegando o momento crítico em que será possível desvendar questões bastante intrincadas e de grande relevância como a origem molecular de disfunções relacionadas a esses canais. É surpreendente que nos dias de hoje um assunto tão profundo possa ser investigado no nível das interações dos átomos, como demonstrado por uma variedade de estudos recentes de *MD*^{45,69,70} que investigam a natureza e origem de doenças em humanos como epilepsia, paralisias e síndrome QT longa, devido à mutações no segmento de hélice S4. Esses estudos tem conseguido mostrar que mutações específicas na S4 alteram a rede de contatos eletrostáticos dentro do *VSD*, resultando em uma corrente de cátions por dentro do domínio conhecida como correntes ômega^{71,72}. Estudos semelhantes em canais Nav ajudarão a esclarecer as propriedades moleculares fundamentais relacionadas às doenças genéticas hereditárias.

Outro tema fascinante a ser investigado, de grande relevância farmacológica, é a modulação de canais *VGCC* por uma extensa família de moléculas ligantes como cátions divalentes, toxinas e sobretudo os anestésicos gerais e locais. Recentemente, estudos de *docking* molecular combinados com experimentos de *alanine-scanning* ajudaram a identificar sítios putativos de ligação à anestésicos inalatórios como butanol e halotano, em canais Kv sensíveis a essa classe de ligantes⁷³ (vide resultados tópico 4.4). Nesse cenário, o aparecimento da estrutura atomística do NavAb irá motivar novos estudos sobre a ligação de moléculas alvo em *VGCC*. Os efeitos do anestésico inalável isoflurano em canais de sódio como o NaChBac³², indica que o canal NavAb servirá de modelo estrutural, assim como outros canais Kv específicos, para elaboração de trabalhos que que investiguem o efeito dos anestésicos

voláteis sobre a relação estrutura/função de *VGCC*. Particularmente, devido ao papel central dos Nav na geração do potencial de ação em células excitáveis, esses canais são alvo de uma classe muito mais ampla de moléculas efetoras quando comparados aos Kv; por exemplo, existe uma variedade entorno de seis sítios distintos de ligação de toxinas em Nav, enquanto que em canais de potássio esse número é de apenas dois. Como demonstrado para estudos com Kv, simulações de *MD* são uma metodologia imprescindível para investigar detalhes estruturais e funcionais desses canais.

Entretanto, apesar do considerável progresso conquistado ao longo das últimas décadas acerca do entendimento geral sobre o funcionamento dos *VGCC*, decorrente de resultados advindos dos experimentos de eletrofisiologia e de simulações computacionais, muitos questionamentos chave sobre seu funcionamento e modulação ainda não foram completamente solucionados, entre os quais é válido ressaltar:

- Qual é a extensão dos movimentos da S4 durante o processo de ativação do Kv1.2? Como são estruturalmente as conformações intermediárias e fechada desse canal? Como os resultados sobre ativação do Kv1.2 se reconciliam como o modelo *sliding-helix*?

- Como explorar conformações de outros canais *VGCC*, como os Nav, a partir das estruturas obtidas nos estudos de ativação do Kv1.2? Qual a correlação estrutural de *VSD* e *PD* entre os canais Kv e Nav?

- Quem são as estruturas potencialmente relacionadas aos estados funcionais, isto é os estados ativado/aberto e desativado/fechado, de canais de sódio da família *VGCC*? Como essas estruturas reconciliam os resultados experimentais (propriedades de hidratação, distâncias atômicas e *gating charge*)?

- Qual é o espaço total de sítios putativos de ligação a anestésicos voláteis (n-álcoois e haloalcanos) em canais *VGCC* e quem são os sítios candidatos a promover impacto funcional sobre esses canais?

Essas e outras questões foram abordadas no presente trabalho e direcionadas por meio de experimentos *in-silico* via simulações de *MD*, que podem ser resumidas a seguir: **i)** investigação do processo de desativação a partir da estrutura cristalográfica do canal iônico Kv1.2 equilibrado na membrana, por meio de uma longa simulação de ~ 2.2 μ s sobre uma diferença de voltagem constante, e livre da ação de forças externas artificiais (*unbiased simulation*), com aplicação subsequente de *bias* para guiar a estrutura até o estado final, i.e com *VSD* desativado e com o poro fechado. Análises estruturais e a quantificação das *gating charges* (*Q*) foram empregadas para caracterizar os estados intermediários e desativado do canal. Tomados em conjunto nossos resultados sobre a ativação do

Kv1.2 suportam o modelo *sliding-helix*, e oferecem uma valiosa fonte de estruturas de referência que permitem estender o atual conhecimento sobre a estrutura e o funcionamento de canais iônicos *VGCC* a membros menos conhecidos como a família de canais Nav; **ii**) investigação das conformações pertencentes ao caminho de ativação de canais Nav, a partir da estrutura cristalográfica recentemente publicada do NavAb, utilizando as estruturas e protocolos de simulação definidos para o Kv1.2. Os resultados aqui obtidos nos permitiram propor duas conformações potencialmente relacionadas aos estados funcionais do NavAb, i.e uma estrutura com *VSD* completamente ativado e o *PD* aberto (NX^0) e outra com *VSD* desativado e com *PD* fechado (NX^-); **iii**) adicionalmente, a partir dos dados estruturas obtidos para Kv1.2 e NavAb, modelamos os estados ativado/aberto e desativado/fechado do canal de sódio bacteriano NaChBac, ortólogo do NavAb. Dessa forma, estudos sobre os movimentos das hélices S6 e posicionamento do portão hidrofóbico, presentes no caminho de condução iônica, foram investigados e caracterizados nos modelos de NaChBac; **iv**) Mapeamento de sítios putativos de ligação à anestésicos gerais via experimentos *in-silico* como *docking* molecular, em canais Kv, como o Kv1.2 e o os modelos aberto e fechado do K-Shaw2.

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo investigar o processo de ativação de canais iônicos dependentes de voltagem (Kv e Nav) via simulações de dinâmica molecular, e mapear sítios putativos de ligação a anestésicos gerais via *docking* molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Calcular as grandezas *gating charge* (Q) e perfil de distância elétrica dos diversos estados do canal Kv1.2, oriundos de simulações de *MD* sob uma diferença de voltagem transmembrânica.

ii) A partir da estrutura cristalográfica do NavAb equilibrada na membrana, explorar conformações pertencentes ao caminho de ativação desse canal de sódio, considerando como *templates* estruturais as estruturas obtidos para o Kv1.2.

iii) Caracterizar as conformações geradas de NavAb por meio de coordenadas generalizadas parametrizadas dentro do espaço conformacional (*VSD* e *PD*) do Kv1.2.

iv) Quantificar as *gating charges* das conformações do NavAb, e propor estruturas potencialmente relacionadas a estados funcionais do canal, i.e uma estrutura com *VSD* ativado e poro aberto e outra portando *VSD* desativado e poro fechado.

v) Modelar os estados ativado/aberto e desativado/fechado do canal de sódio NaChBac, a partir de conformações obtidas do canal ortólogo NavAb.

vi) Investigar a natureza estrutural dos movimentos das hélices S6 relacionados à abertura/fechamento do domínio do poro (*hinge-bending motions*) do canal NaChBac.

vii) Modelar, a partir dos *templates* de Kv1.2, os estados aberto/fechado do *PD* do canal Kv sensível a anestésicos gerais, o K-Shaw2.

viii) Mapear os sítios putativos de ligação a anestésicos gerais (1-butanol e halotano), utilizando como modelo de receptor para ligação de moléculas anestésicas o canal K-Shaw2, e identificar sítios potencialmente relacionados a ter impacto funcional sobre *VGCC*.

Metodologia

“ People love chopping wood. In this activity, one immediately sees results.”

—Albert Einstein.

3. Metodologia

3.1 ARCABOUÇO TEÓRICO

3.1.1 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

O princípio da dinâmica molecular (sigla em inglês *MD*) consiste em gerar uma trajetória para um conjunto finito de partículas, por meio da integração numérica das equações clássicas do movimento. Isto permite, portanto, determinar as propriedades dinâmicas dos sistemas considerados. Para tal tarefa vários programas encontram-se hoje disponíveis^{74,75}.

Trajетórias, segundo uma visão clássica, são utilizadas para a determinação de propriedades termodinâmicas e dinâmicas do sistema na forma de médias temporais. Para um sistema ergódico, médias temporais coincidem com médias termodinâmicas que podem ser descritas de acordo com a equação:

$$\lim_{(t \rightarrow \infty)} \bar{A}(t) = \langle A \rangle \quad [3.1]$$

onde, A é qualquer propriedade observável, sendo $\bar{A}(t)$ sua média temporal e $\langle A \rangle$ a média termodinâmica.

Os sistemas químicos são inicialmente modelados como um conjunto finito de partículas confinado em uma cela ou caixa, normalmente ortorrômbica. Entretanto, para uma melhor correlação entre os estados microscópicos e as propriedades macroscópicas, os efeitos de contorno do sistema precisam ser eliminados. Para isso, condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*) são utilizadas, permitindo a replicação do sistema nas três direções do espaço (figura 3.1).

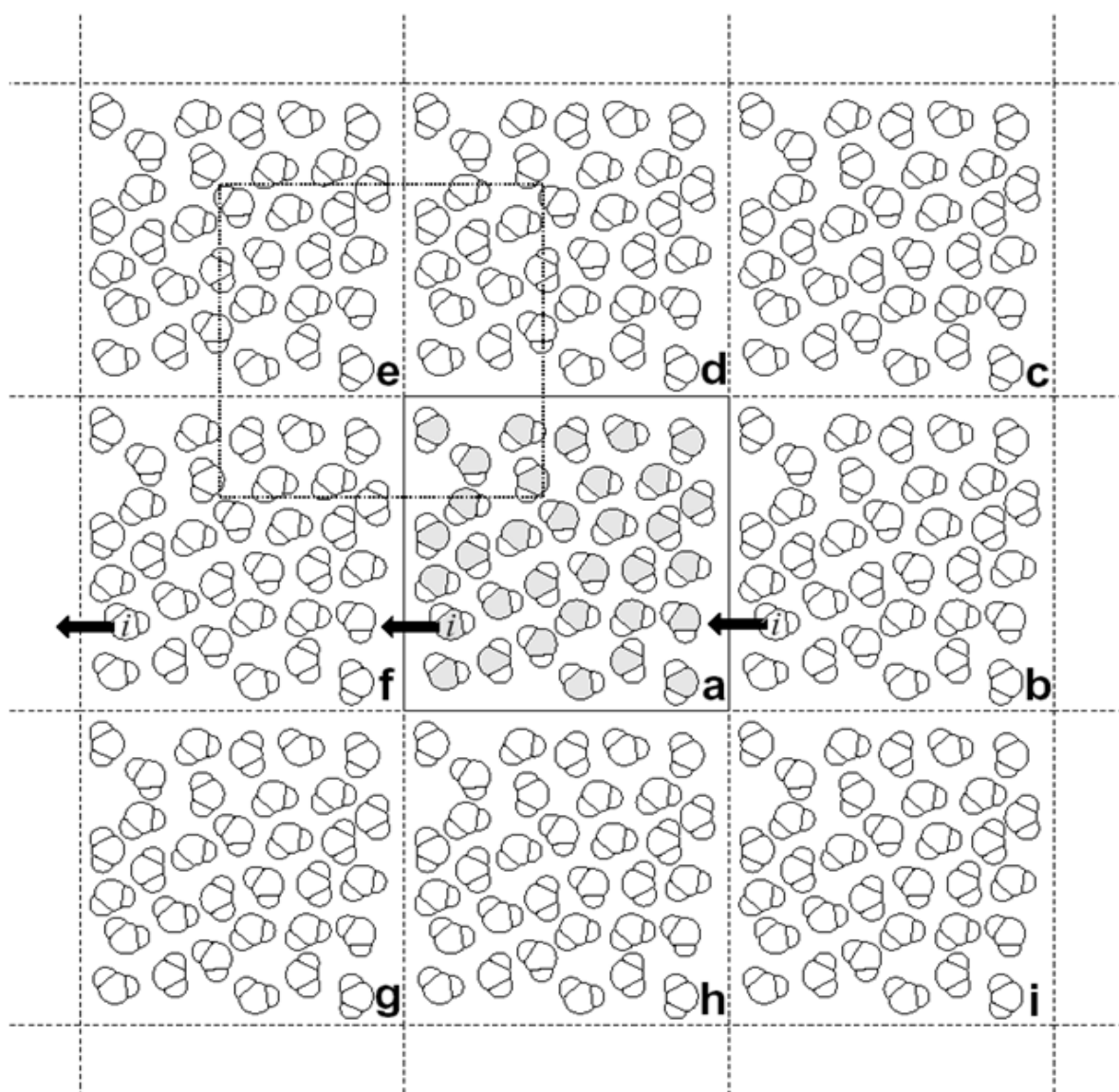


Figura 3.1: Cella de simulação. Representação bidimensional da cela de simulação em condições periódicas de contorno. Nesta representação, quando uma molécula i avança os limites da cela central (**a**) suas imagens no espaço periódico se movimentam de maneira similar. A região delimitada entre as celas **e**, **f**, **a** e **d**, ilustra a aproximação da imagem mínima (Retirado da Tese de Treptow W. de 2003⁷⁶).

O caráter pseudo-infinito desta aproximação requer um tratamento especial das interações intermoleculares⁷⁷. Neste sentido, uma primeira aproximação, denominada de imagem mínima, baseia-se na suposição de que cada partícula i na cela central interage com a imagem mais próxima de todas as outras partículas j . Além disso, as interações podem ser truncadas considerando-se uma distância arbitrária ou raio de corte (em inglês *cut-off*), normalmente menor ou igual à metade da menor dimensão da cela de simulação. Neste caso, interações além do *cut-off* são ignoradas (figura 3.2).

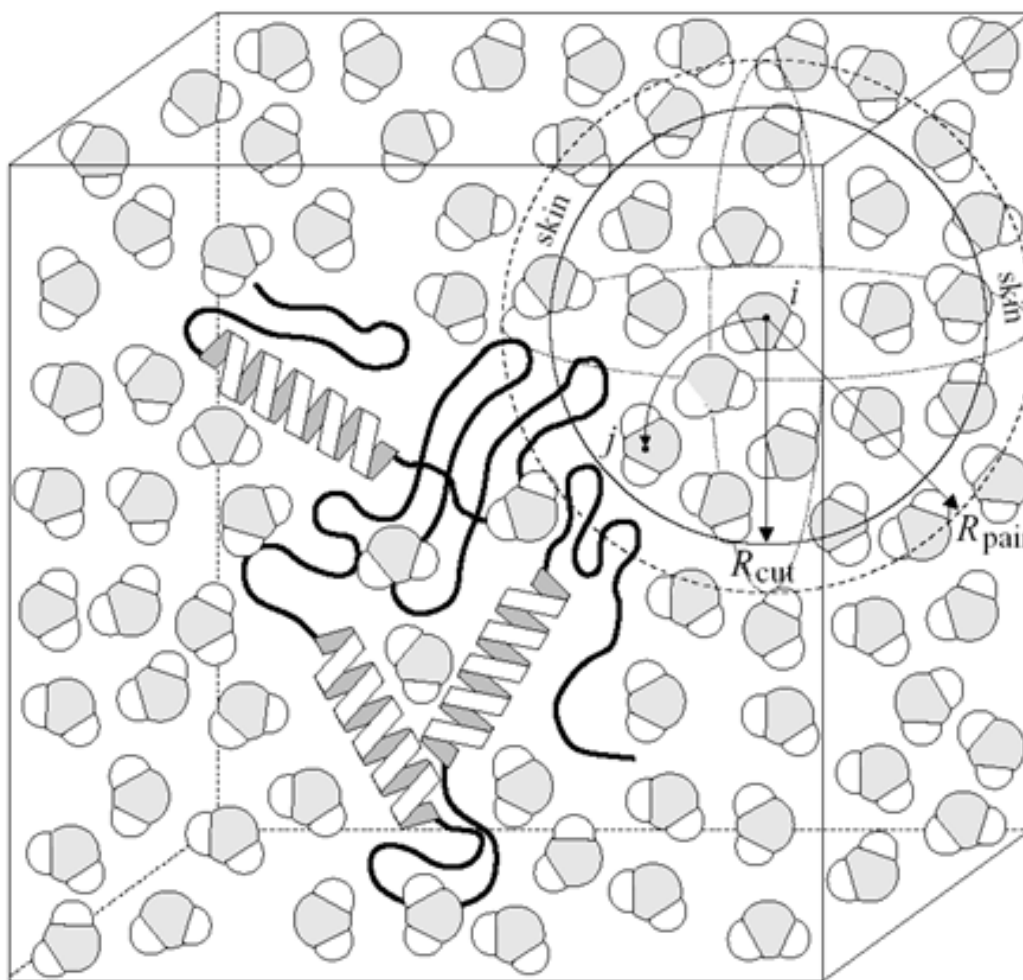


Figura 3.2: Interações intermoleculares são truncadas considerando-se uma distância ou *cut-off*. Uma distância arbitrária correspondendo ao raio de uma esfera (R_{cut}) é considerada para truncar as interações da partícula i com partículas vizinhas na aproximação da imagem mínima. Uma esfera de raio (R_{pair}) maior que R_{cut} também é considerada para construir uma lista de partículas vizinhas a i . Esta lista é atualizada periodicamente durante a simulação (Retirado da Tese de Treptow W. de 2003⁷⁶).

3.1.2 FUNÇÃO DE ENERGIA POTENCIAL

A energia potencial é a principal função de todo cálculo de mecânica molecular. Esta função deve ser capaz de reproduzir as interações inter e intramoleculares. Para isso, a função de energia potencial é associada a diversos parâmetros moleculares do sistema. Tais parâmetros são obtidos a partir de cálculos sofisticados de mecânica quântica, utilizando moléculas elementares como modelos de estruturas moleculares mais complexas, como exemplo os biopolímeros. Este conjunto descritivo dos sistemas moleculares, i.e função de energia potencial + parâmetros moleculares, é denominado

campo de força⁷⁸. Neste contexto, a função que descreve a energia potencial do sistema composto de N partículas pode ser escrito em termos de um somatório:

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{i>j} v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) + \dots \quad [3.2]$$

onde $v_1(\mathbf{r}_i)$, $v_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j)$, ... representa o potencial intramolecular, o potencial de interação de pares atômicos, etc.

A função $U(\mathbf{r}^N)$ é, portanto, característica de um problema de múltiplos corpos. Em algumas aproximações, a função é considerada até o segundo termo do somatório. Neste caso, as interações entre pares atômicos e outros efeitos, por exemplo, interações intermoleculares, são tratadas em um único potencial efetivo (equação 3.3).

$$U(\mathbf{r}^N) \simeq \sum_i v_1(\mathbf{r}_i) + \sum_i \sum_{j>i} v_2^{\text{efetivo}}(\mathbf{r}_{ij}) \quad [3.3]$$

Esta aproximação é usada em muitos campos de força comerciais, em particular aqueles dedicados ao estudo de sistemas macromoleculares. Entre as várias funções de energia implementadas até então, uma descrição simplificada do sistema é oferecida na função do campo de força AMBER, *Assisted Model Building with Energy Refinement*⁷⁹, segundo a equação 3.4 mostrada abaixo:

$$\begin{aligned} U(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{ligação}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \dots \\ & + \sum_{\text{diedro}} \sum_n \frac{U_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \dots \\ & + \frac{1}{k_{vdw}^{1-4}} \times \sum_{\substack{(i<j) \\ ((i,j) \in 1-4)}} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} \times 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{k_{coulomb}^{1-4}} \times \sum_{\substack{(i<j) \\ ((i,j) \in 1-4)}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}} + \dots \quad [3.4] \\ & + \sum_{\substack{(i<j) \\ ((i,j) > 1-4)}} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} \times 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{(i<j) \\ ((i,j) > 1-4)}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_o \epsilon_1 r_{ij}} \end{aligned}$$

onde, k_r e r_0 correspondem a constante de força da ligação química e a posição de equilíbrio da mesma; k_θ e θ_0 correspondem à constante de força do ângulo de valência e seu valor de equilíbrio; $U_n/2$, n , e γ são a barreira torcional, sua periodicidade e fase; ϵ_1 e ϵ_2 são as permissividades dielétrica relativa e em

vácuo, respectivamente; q_i é a carga elétrica parcial originada no átomo i ; finalmente, R_{ij} e r_{ij} correspondem aos parâmetros de *van der Waals* para os pares atômicos $\{ij\}$, obtidos da combinação das regras de Lorentz-Berthelot (equação 3.5).

$$\begin{aligned} \epsilon_{ij} &= \sqrt{(\epsilon_i \epsilon_j)} \\ R_{ij} &= R_i + R_j \end{aligned} \quad [3.5]$$

Ambos os componentes, o eletrostático e o de van der Waals, são considerados na parametrização dos termos torcionais. Entretanto, em alguns campos de força tais componentes são distinguidos entre interações onde os átomos estão conectados exatamente por 3 ligações químicas, os chamados termos 1-4 (figura 3.3). Esta distinção aparece na equação (4), onde os termos 1-4 são redimensionados pelos fatores $1/k_{vdw}^{1-4}$ e $1/k_{coulomb}^{1-4}$.

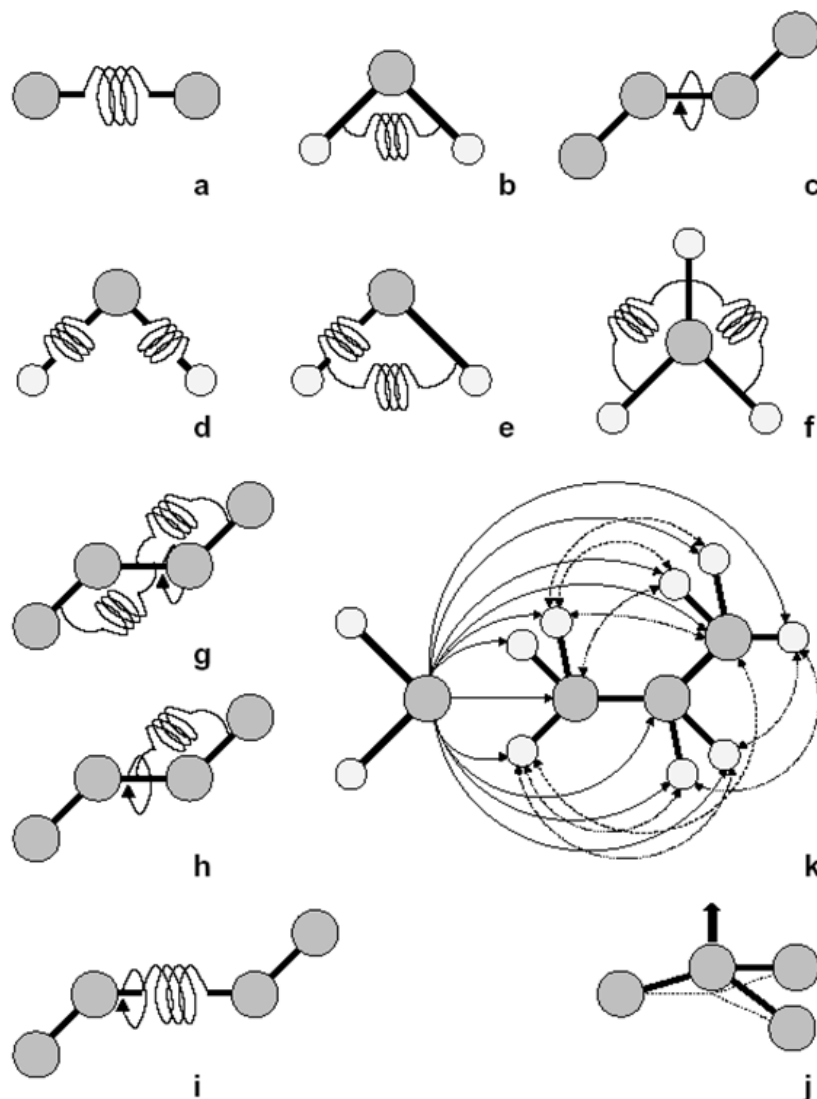


Figura 3.3: Ilustração dos vários termos considerados na função empírica de energia potencial. As contribuições **a-j** representam os movimentos torcionais do campo de força, dentre as quais, as representações **d-j** correspondem aos termos cruzados. Na letra **k**, as interações de van der Waals e as eletrostáticas são ilustradas para átomos não ligados quimicamente e as interações intra e intermoleculares são mostradas (Retirado da Tese de Treptow **k** W. de 2003⁷⁶).

3.1.3 EQUAÇÕES DO MOVIMENTO

Na dinâmica molecular clássica⁸⁰, a trajetória do sistema é gerada pela integração das equações de Newton para cada partícula i :

$$\begin{aligned} m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} &= \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) &= -\frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{aligned} \quad [3.6]$$

onde, $U(\mathbf{r}^N)$ é a energia potencial do sistema que depende apenas das coordenadas cartesianas das partículas $\{\mathbf{r}_j\}$. As equações em (3.6) são integradas numericamente utilizando-se um tempo de integração infinitesimal, δt (ordem de 1 a 2 fs), para assegurar a conservação da energia total do sistema.

Trajetórias exatas não são geradas durante longos períodos de tempo, considerando-se que as equações de Newton são resolvidas numericamente com um tempo de integração finito. A exatidão das soluções do movimento não é, entretanto, tão importante para assegurar a correta reprodução das propriedades termodinâmicas e dinâmicas do sistema. Para isso, o que realmente importa é o comportamento estatístico da trajetória. A reprodução correta das propriedades do sistema só é satisfeita se a propagação do movimento é feita por um integrador do tipo simplético^{81,82}. Um propagador deste tipo conserva a métrica invariante do espaço de fase, Γ . Deste modo, o erro associado a este propagador é convergente:

$$\lim_{(n \rightarrow \infty)} \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{k=1}^n \left| \frac{E(k\delta t) - E(0)}{E(0)} \right| \leq \varepsilon MD \quad [3.7]$$

n é o número de passos de integração durante a simulação, $E(0) \equiv H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N, 0)$ é a energia inicial do sistema equilibrado, εMD é o limite superior para conservação da energia, i.e 10^{-4} . A integração das equações de movimento não conduz, portanto, a um crescimento errático do erro associado à conservação da energia, o que, caso acontecesse, afetaria significativamente o comportamento estatístico da simulação em longos períodos de tempo.

3.1.4 INTEGRADORES DO MOVIMENTO

Muitos métodos de integração do movimento, como da equação 3.8, têm sido desenvolvidos. O princípio de tais métodos pode ser ilustrado por dois algoritmos bastante conhecidos e utilizados até então em simulação. O primeiro deles, e talvez o mais simples, é denominado de algoritmo de *Verlet*. Este algoritmo baseia-se nos três termos, $\{r_i(t), r_i(t-\delta t), a_i(t)\}$, onde $a_i(t) = \ddot{r}_i(t) = f_i(t)/m_i$ é a aceleração da partícula i . A variação da posição da partícula pode então ser escrita como:

$$r_i(t+\delta t) = 2r_i(t) - r_i(t-\delta t) + a_i(t)\delta t^2 \quad [3.8]$$

com um erro embutido de $O(\delta t^4)$. Esta equação é derivada da combinação da expansão de Taylor nas posições $t-\delta t$ e $t+\delta t$. Embora a velocidade seja dispensável para determinação da trajetória, ela é requerida para o cálculo da energia cinética $K(\mathbf{p})$ e da energia total $E = H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)$. Neste esquema, a velocidade é dada por:

$$v_i(t) = \frac{r_i(t+\delta t) - r_i(t-\delta t)}{2\delta t} \quad [3.9]$$

com erro associado de $O(\delta t^2)$.

3.1.5 AMOSTRAGEM ESTATÍSTICA

Durante a integração dos movimentos, a energia total do sistema deve ser conservada. No caso de volume constante, uma amostragem estatística micro-canônica é gerada pela simulação. Esta amostra (N, V, E) é normalmente denominada de Newtoniana em simulações de dinâmica. Em algumas situações é desejado, entretanto, que outras quantidades termodinâmicas, tais como temperatura e pressão, sejam independentes. Dessa forma, diferentes tipos de amostras termodinâmicas podem ser produzidas em dinâmica molecular.

3.1.6 SIMULAÇÕES À TEMPERATURA E PRESSÃO CONSTANTES

Vários métodos para simulação isotérmica têm sido propostos. No método denominado de acoplamento fraco (Berendsen *et al*, 1990⁷⁴), a temperatura instantânea $T_K(t)$, é mantida relaxada em relação a uma temperatura de referência T :

$$\frac{dT_K(t)}{dT} = \frac{T - T_K(t)}{\tau_T} \quad [3.10]$$

onde, τ_T representa precisamente o tempo de relaxamento associado às flutuações da temperatura. Neste caso, a energia cinética é modificada por uma quantidade ΔK , definida como:

$$\Delta K = \frac{1}{2}(\chi^2 - 1) N k_B T_K(t) \quad [3.11]$$

para um tempo de integração δt , onde χ é um fator de reescalonamento das velocidades (equação 3.12):

$$\chi = \left[1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left(\frac{T}{T_K(t)} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad [3.12]$$

Seguindo à ideia do que ocorre com o controle da temperatura o sistema também pode ser acoplado por um banho de pressão (Lindhäl *et al*, 2001⁶⁹).

O algoritmo de *Berendsen* recalcula as coordenadas dos vetores da caixa a cada passo de integração a partir de uma matriz μ , o que equivale a um relaxamento cinético de primeira ordem da pressão em relação a um valor referência de pressão P_0 :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad [3.13]$$

onde a matriz μ é dada por:

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{\Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad [3.14]$$

em que, i e j equivalem às dimensões cartesianas do sistema, P_{0ij} a pressão de referência e P_{ij} a pressão medida a cada instante. O fator β corresponde à compressibilidade isotérmica do sistema. Para a água, a 1 atm e 300 K, β equivale a $4,6 \times 10^{-5} \text{ Bar}^{-1}$.

3.1.7 PERFIL DE ENERGIA LIVRE: TRANSPORTE IÔNICO

Pela mecânica estatística, a energia livre de um dado estado do sistema, que para o caso do transporte assistido de uma espécie iônica através da direção normal de uma membrana, por um canal iônico, é dada por:

$$A(z) = A(0) - \frac{1}{\beta} \ln P(z) \quad [3.15]$$

onde, $\beta = k_B T$ é o fator temperatura, definido pela constante de Boltzmann (k_B) e a temperatura T . $P(z)$ é a densidade de probabilidade canônica de se encontrar o sistema no estado z e $A(0)$ é uma constante. A densidade de probabilidade é assim definida:

$$P(z) = \frac{\sum_i^n e^{-\beta U_i(z)}}{S} \quad [3.16]$$

sendo $e^{-\beta U_i(z)}$ o peso de Boltzmann para qualquer microestado do sistema, no estado z , com energia potencial $U_i(z)$. A função de partição S é escrita como a soma dos pesos de Boltzmann para todos os estados N do sistema (equação 3.17):

$$S = \sum_N \sum_i^n e^{-\beta U_i(z)} \quad [3.17]$$

Note que, as equações 3.15 a 3.17, não podem ser aplicadas na prática para a estimativa do perfil de energia livre. Essa limitação decorre do alto custo computacional envolvido na completa amostragem da energia potencial de todos os microestados para vários estados z de um sistema.

Para sobrepor essa limitação, métodos avançados de dinâmica molecular para cálculos de energia livre como o *Umbrella Sampling*^{83,84} e o *Adaptive Biasing Force*⁸⁵ são utilizados para potencializar a capacidade de amostragem do espaço de configurações de um sistema visando a otimização e a redução do custo computacional necessário para a estimativa de $A(z)$.

Em particular, o método *ABF*, do inglês *Adaptive-Biasing-Force*, determina o perfil de energia livre transmembrânico através da coordenada de reação (z) pela seguinte integração:

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} - \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln |J|}{\partial z} \right\rangle_z = -\langle F_z \rangle_z \quad [3.18]$$

onde $-\langle F_z \rangle_z$ é a força média coletada numa dada posição da coordenada de reação durante a simulação de dinâmica molecular. Essa equação corresponde ao conhecido esquema de integração termodinâmica:

$$\frac{dA(z)}{dz} = \left\langle \frac{\partial U(\mathbf{r}^N)}{\partial z} \right\rangle_z \quad [3.19]$$

contendo um termo explícito do Jacobiano ($|J|$) que é introduzido como uma correção do processo de transformação de coordenadas generalizadas para cartesianas, afim de assegurar a conservação da métrica do sistema.

Uma estimativa precisa da energia livre demanda uma amostragem uniforme através da coordenada de reação, o que é difícil de conseguir quando se tem sistemas muito complexos, por meio de simulações de dinâmica molecular. Essa limitação pode ser vencida pela utilização da metodologia *ABF* que aplica uma força iterativa, \mathbf{F}^{ABF} , que permite ao sistema sobrepor barreiras de energia livre durante a simulação. A estimativa utiliza uma média das forças aferidas instantaneamente:

$$\mathbf{F}^{ABF} = \vec{\nabla}_r A = -\langle F_z \rangle_z \nabla_r Z \quad [3.20]$$

onde, $\vec{\nabla}_r A$ é o gradiente da estimativa mais atual da energia livre em relação às coordenadas

cartesianas, \mathbf{r}^N . Enquanto a estimativa de $\langle F_z \rangle_z$ é aperfeiçoada durante a simulação, as forças se adaptam para sobrepujam exatamente a barreira de energia livre, promovendo uma amostragem uniforme ao longo da coordenada de reação via difusão do sistema em uma superfície de energia plana.

3.1.8 POTENCIAL ELETROSTÁTICO

Simulações atomísticas nos fornecem as posições instantâneas de cada átomo do sistema e como essas partículas carregam consigo uma carga parcial é possível então calcular para um dado sistema de configuração j , o potencial eletrostático $\varphi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$ em uma dada posição \mathbf{r} . A estimativa dos mapas tridimensionais do potencial eletrostático local das simulações são geradas a partir do método PME (*particle mesh ewald*) implementado no código de dinâmica molecular NAMD. Segundo esse esquema, o potencial é obtido por meio da solução da equação de Poisson:

$$\nabla^2 \varphi_j(\mathbf{r}, \Delta V) = -4\pi \sum_{i=1}^n \rho_i(\mathbf{r}) \quad [3.21]$$

onde ρ_i é a carga pontual aproximada por uma função Gaussiana esférica de espessura inversa (σ) cuja soma é feita sobre todos os átomos do sistema. Aqui consideraremos um *grid* de $1.5 \times 1.5 \times 1.5 \text{ \AA}^3$ e $\sigma = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$.

A média de $\varphi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$ no plano xy fornece o perfil do potencial eletrostático ao longo da direção transmembrânica, z . O perfil unidimensional pode ser derivado diretamente das simulações de *MD* como a integral dupla da distribuição das cargas de todos os átomos amostrados ao longo dos planos da membrana, $\rho(z)$, como $\varphi(z) - \varphi(0) = -\epsilon_0^{-1} \iint \rho(z'') dz'' dz'$. Servindo de referência, $\varphi(z)$ é definido como zero no eletrólito extracelular. Pelo presente protocolo, $\varphi(z)$ atinge valores constantes nas regiões aquosas do sistema (figura 3.6). A diferença entre os platôs entre as faces extra e intracelulares correspondem ao potencial transmembrânico, ΔV .

3.1.9 APLICAÇÃO DE POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO

Uma questão central dos estudos de canais iônicos é como aplicar corretamente um potencial eletrostático transmembrânico. Quando a membrana celular é submetida a uma diferença de voltagem, como nos experimentos *voltage clamp*, o potencial transmembrânico resulta de um desequilíbrio iônico

local oriundo do excesso de espécies iônicas positivas de um lado da membrana em contrapartida a um excesso de cargas negativas do outro lado da bicamada. Nos experimentos de *patch clamp*, eletrodos são plugados em ambos os lados da membrana em que o pulso de voltagem transmembrânica é longo o suficiente para gerar a reorganização dos eletrólitos e subsequente polarização da membrana. A correta aplicação do campo elétrico em simulações é peculiarmente desafiante devido às condições periódicas de contorno (*PBC*) num ensemble *NPT*. Sobre essas condições um desequilíbrio iônico não pode ser alcançado uma vez que há a comunicação entre o *bulk* superior do sistema original e o inferior da imagem especular nas direções $+z/-z$ e vice-versa, anulando assim a diferença de voltagem. Alguns métodos propõem a aplicação direta de um desequilíbrio de cargas e que evite os efeitos de contorno: i) um sistema de bicamada dupla em que o banho interno é separado do externo pela introdução de duas bicamadas; ii) aplicação de uma interface vácuo/água, introduzida por Treptow e colaboradores⁸⁶, em que a caixa de simulação é alongada na direção transmembrânica (z) de modo a desacoplar a célula original de suas imagens especulares permitindo assim a manutenção do desequilíbrio iônico entre os banhos interno e externo (figura 3.4).

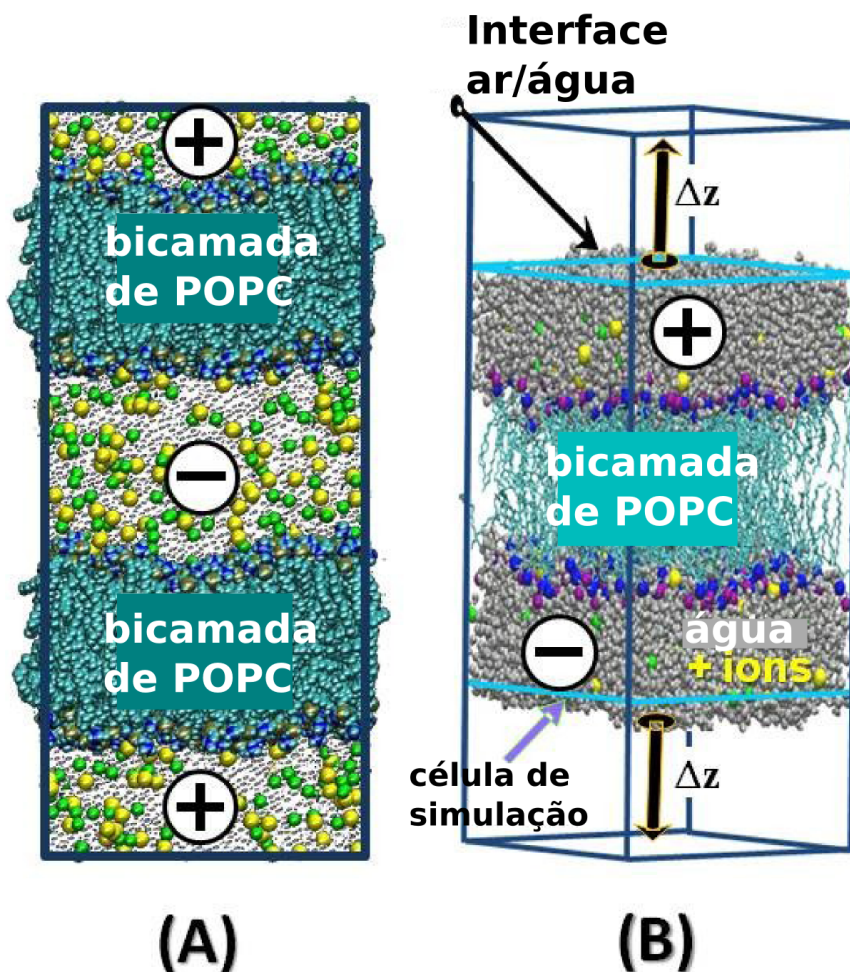


Figura 3.4. Configurações dos métodos para aplicação direta de potencial eletrostático transmembrânico via desequilíbrio iônico. **A:** O banho central é isolado do externo por duas bicamadas. **B:** As celas de simulação, contendo apenas uma bicamada, são isoladas entre si na direção z por uma interface vácuo/água. Essa separação é mantida pela simulação do sistema em ensemble *NVT* (volume constante). O desequilíbrio de cargas é aplicada entre os banhos interno e externo. Note que o fosfolipídio em questão é o POPC (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina). Modificado da Tese de Delemotte L. (2011)⁸⁷

Numa otimização do método ilustrado na figura 3.4-A, introduzida por Treptow e colaboradores^{46,86}, é necessário considerar apenas uma bicamada lipídica minimizando drasticamente o custo computacional da simulação devido à considerável redução do número de átomos do sistema, além da assimetria do sistema (figura 3.4-B). De acordo com esse protocolo de bicamada única, é realizado primeiramente uma simulação *MD* em ensemble *NPT* para equilibrar o sistema em uma dada concentração de eletrólito, afim de otimizar a relação área por fosfolipídio. Prosseguindo, uma interface vácuo/água é introduzida em ambas extremidades do sistema pela extensão da dimensão *z* da caixa de simulação. Os perfis do potencial eletrostático $\varphi(z)$ gerados a partir de simulações *MD* de uma bicamada pura de fosfolipídio POPC banhada por uma solução iônica de 1M de NaCl, com q_0 variando de 0 a $8e$ (calculados segundo tópico 3.1.8 e 3.1.12) estão representados na figura 3.5.

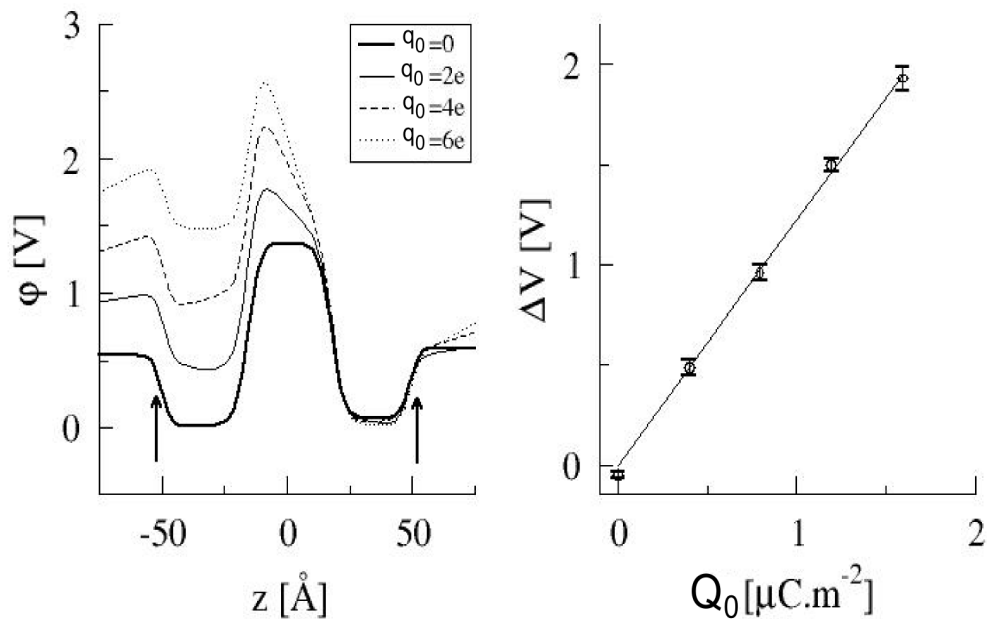


Figura 3.5. Painel esquerdo: Potencial eletrostático transmembrânico $\varphi(z)$ através de uma bicamada lipídica do tipo POPC para diferentes valores de q_0 em relação aos eletrólitos intra e extracelulares. Como referência o eletrólito superior é definido como zero. As setas indicam a região de interface vácuo/água. **Painel direito:** Diferença de voltagem aplicada ao sistema em função do desbalanço de cargas por unidade de área, Q_0 . Modificado da Tese de Delemotte L. de 2011⁸⁷

Para todas as simulações $\varphi(z)$ alcança regiões de platô nas regiões da água, além de variar entre os dois eletrólitos desacoplados. Como a membrana funciona como um capacitor, a separação das cargas dá origem ao potencial eletrostático transmembrânico em que Q_0 representa o desbalanço de

cargas por unidade de área e C a capacitância da membrana. Esse método permite quantificar a capacitância da bicamada via simulação computacional como o inverso do coeficiente angular da relação em função de Q_0 (veja detalhes a seguir em tópico 3.1.10) Para um sistema de membrana atomística típico de POPC é encontrado o valor de $C = 0.85 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ que está em concordância com valores experimentais de $\sim 1 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ tradicionalmente assumidos para bicamadas lipídicas.

3.1.10 MODELANDO VGCC SOBRE POTENCIAL ELETROSTÁTICO TRANSMEMBRÂNICO: Kv1.2

Em geral, o processo de desativação de *VGCC* ocorre em escalas de tempo superiores a $10 \mu\text{s}$ ⁸⁸. Embora essa escala de tempo ainda seja fora do alcance da nossa capacidade computacional, a transição aberto-fechado pode ser acelerada em simulações nas quais o canal é submetido a valores seis vezes maior de ΔV quando comparado ao valor experimental ($\sim 100 \text{ mV}$). Conforme apresentado no trabalho de Treptow e colaboradores⁴⁶, essa estratégia permite alcançar estágios intermediários do processo de desativação. Esse avanço metodológico permitiu desvendar novos detalhes microscópicos do complexo mecanismo de desativação dos canais Kv e Nav. Como ilustrado a seguir, o protocolo de desativação do Kv1.2, cujo sistema macromolecular é inserido numa bicamada fosfolipídica hidratada (~ 300 mil átomos), contendo toda a proteína (domínio intracelular + *TM*), e submetido à potenciais eletrostáticos transmembrânicos, ΔV (figura 3.6).

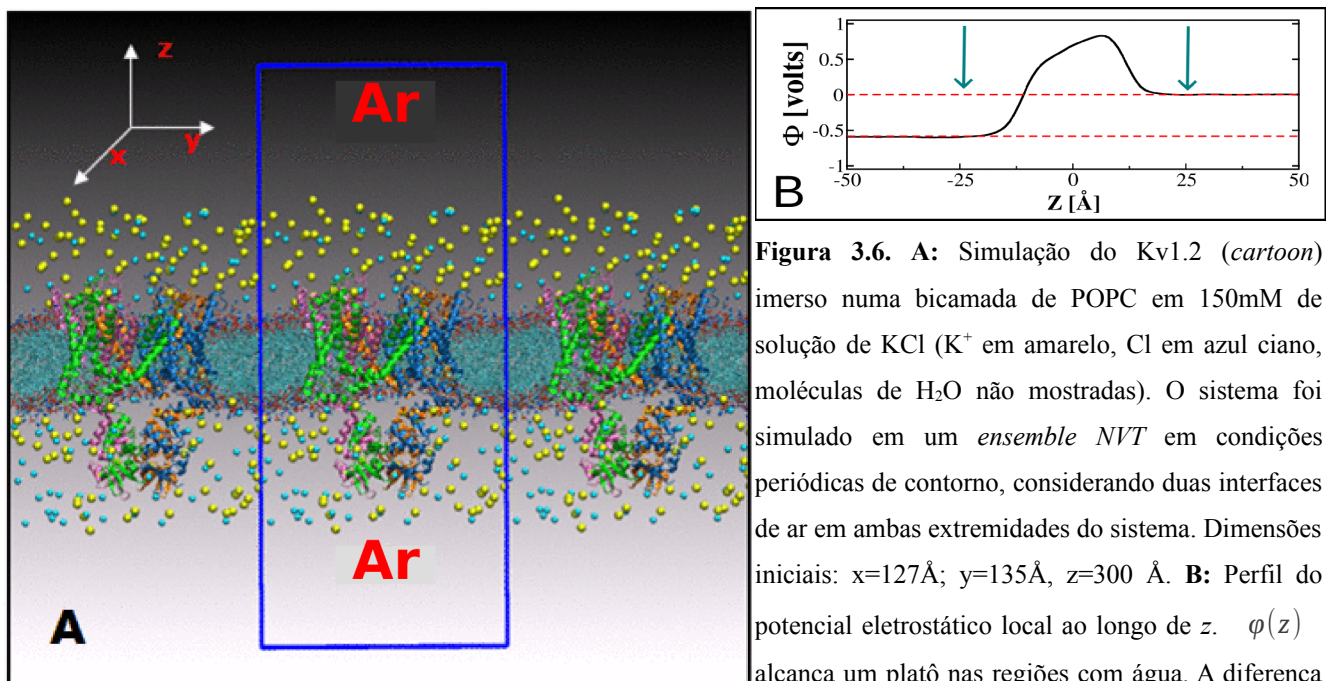


Figura 3.6. **A:** Simulação do Kv1.2 (*cartoon*) imerso numa bicamada de POPC em 150mM de solução de KCl (K^+ em amarelo, Cl^- em azul ciano, moléculas de H_2O não mostradas). O sistema foi simulado em um *ensemble NVT* em condições periódicas de contorno, considerando duas interfaces de ar em ambas extremidades do sistema. Dimensões iniciais: $x=127\text{\AA}$; $y=135\text{\AA}$, $z=300 \text{\AA}$. **B:** Perfil do potencial eletrostático local ao longo de z . $\phi(z)$ alcança um platô nas regiões com água. A diferença

entre os platôs corresponde à diferença de voltagem (ΔV) do *TM*.

3.1.11 CÁLCULO DA DISTÂNCIA ELÉTRICA

A grandeza física distância elétrica (δ_i^λ) que expressa o grau de acoplamento do potencial eletrostático local φ_i^λ , a cada carga pontual, a um dado ΔV , é descrita segundo a equação:

$$\delta_i^\lambda \equiv \frac{\partial}{\partial V} \varphi_i^\lambda \Big|_{V=0}. \quad [3.22]$$

Como φ_i^λ é devido à diferença de voltagem, este deve ser computado sem considerar as cargas que pertencem à proteína. Nos sistemas investigados, a equação [3.23] é resolvida para cada canal c , em cada conformação λ , por meio de duas simulações independentes (0 e 600 mV). O potencial eletrostático local é calculado para cada voltagem considerando-se a média entre 100 configurações do sistema amostrados ao longo de 1 ns de simulação:

$$\varphi_i^{c,\lambda} \equiv \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \varphi_j(\mathbf{r}, \Delta V) \quad [3.23]$$

onde \mathbf{r} é a posição da i -ésima carga da proteína. Dessa forma, a distância elétrica é estimada para um canal c , em cada conformação λ através de:

$$\delta^{c,\lambda} \equiv \frac{[\varphi^{c,\lambda}(r, \Delta V_2) - \varphi^{c,\lambda}(r, \Delta V_1)]}{(\Delta V_2 - \Delta V_1)} \quad [3.24]$$

levando em consideração à média aritmética em relação às 4 subunidades do canal ($\Delta V_1 = 0$ mV e $\Delta V_2 = 600$ mV).

3.1.12 MEDIDA DIRETA DE GATING CHARGE (Q)

Considerando um sistema do tipo canal-membrana, a diferença de voltagem ΔV através da bicamada lipídica é definida como $\Delta V = V_i - V_e$, em que V_i e V_e correspondem respectivamente às voltagens intra e extracelulares do sistema. No protocolo de desbalanço de cargas, ΔV está relacionado à desigualdade de cargas Q_0 entre os banhos de eletrólitos através de $\Delta V = C^{-1} Q_0$. Note que, Q_0 é o desbalanço de cargas q_0 por unidade de área A i.e,

$Q_0 = A^{-1} q_0$, e que C é a capacitância da membrana, que permanece constante para todo o sistema canal-membrana⁴⁶. A quantidade q_0 pode ser escrita como $q_0 = q_i - q_e$, em que q_i e q_e correspondem respectivamente à carga líquida dos banhos intra e extracelular. É válido ressaltar que q_0 resulta das contribuições das cargas da proteína e dos íons em solução $q_0 = q_0^{proteína} + q_0^{ion}$, e que portanto, podemos relacionar $q_0^{proteína}$ a ΔV através de $q_0^{proteína} = -q_0^{ion} + AC \Delta V$. Essa abordagem permite a quantificação da *gating charge* (Q) associada à duas conformações distintas do canal, i.e λ_1 e λ_2 , através da equação:

$$Q = -\left(\frac{1}{2}\right)[q_0^{proteína}(\lambda_2) - q_0^{proteína}(\lambda_1)] \quad [3.25]$$

onde $q_0^{proteína}(\lambda_2)$ e $q_0^{proteína}(\lambda_1)$ correspondem ao desbalanço de cargas devido àquelas pertencentes à proteína nas conformações λ_1 e λ_2 respectivamente.

3.1.13 MATRIZ DE CONTATOS ELETROSTÁTICOS DE VSD E PD

As conformações do *VSD* são descritas segundo uma matriz de distância $M = [r_{ij}]_{6 \times n}$, em que r_{ij} representa a distância entre os grupos carregados positivamente da S4 $j = \{R_1, \dots, R_n\}$ e grupos com carga negativa $i = \{B_1, \dots, B_6\}$ (detalhes vide resultados tópico 4, anexos I e II). Em detalhe, r_{ij} é a distância entre os centros geométricos dos grupos carregados ij representados pelas cadeias laterais carregadas (Arg) $^+H_3N=C_\zeta(NH_2)-N_\epsilon H-C_\delta H_2$, (no caso específico do Kv1.2 o resíduo de lisina $^+H_3N_\zeta-C_\epsilon H_2$ para o posição $j = R_5$); $^-OOC_\gamma-C_\beta H_2$ (Asp); $^-OOC_\delta-C_\gamma H_2$ (Glu) e os grupos fosforil (PO_4^-) dos lipídios da membrana. A matriz de *RMSD* (sigla em inglês para *root mean square deviation*) para cada conformação de um dado canal é calculado segundo a equação 3.26:

$$rmsd(t) = \frac{1}{6 \times n} \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^n \sqrt{[r_{ij}(t) - r_{ij}(0)]^2} \quad [3.26]$$

Os valores das coordenadas generalizadas dentro do espaço conformacional *VSD* vs *PD*, i.e $R = R(NavAb, VSD; t)$ e $P = R(NavAb, PD; t)$ (detalhes vide resultados tópico 4, anexos I e II), foram quantificados a partir das trajetórias de simulação pela equação 3.27:

$$R(\text{NavAb}, l; t) = \frac{[D(KR, l, KA, l) + D(\text{NavAb}, l, KR, l; t) - D(\text{NavAb}, l, KA, l; t)]}{2D(KR, l, KR, l)}$$

[3.27]

, onde $D(KR, l, KA, l)$ é o *RMSD* entre as matrizes de distância, de um dado domínio l , das conformações ativada/aberta (KA) e desativada/fechada (KR) do Kv1.2; $D(\text{NavAb}, l, KA, l; t)$ e $D(\text{NavAb}, l, KR, l; t)$ são respectivamente o *RMSD* entre as matrizes instantâneas (resolvidas no tempo) de um domínio l do canal NavAb e as matrizes distância KA e KR. Matrizes distância são definidas como $M_{ij}(\text{NavAb}, l; t) = r_{ij}(\text{NavAb}, l; t)$, onde l é um dado domínio do canal, i.e. ($l \in \{VSD, PD\}$), e r_{ij} é a distância entre os centros geométricos dos grupos positivamente carregados da S4 ($j \in \{R1, R2, \dots, R4\}$) e as cadeias laterais de resíduos polares ou carregados negativamente do VSD ($i \in \{B1, B2, \dots, B6\}$). Para o domínio do poro (PD) são considerados os resíduos que delimitam o domínio ($i, j \in \{F1, F2, F3\}$) em que r_{ij} é a distância média entre os átomos C_α entre pares de subunidades não adjacentes (i, j).

3.1.14 SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO

3.1.14.1 STEERED MOLECULAR DYNAMICS (SMD)

O objetivo central de simulações em que se aplica um potencial externo sobre os átomos do sistema, como *steered molecular dynamics*, é guiar as coordenadas atômicas de uma dada estrutura para aquelas da estrutura alvo, cujas as posições atômicas são conhecidas. Para tanto, forças externas, derivadas de um potencial do tipo harmônico, são empregadas sobre um conjunto de átomos da molécula que se quer transformar, de modo a guiá-los até as coordenadas atômicas finais de uma dada estrutura resultante. Nesse procedimento o potencial é imposto instantaneamente (estático) em que a estrutura de manipulação é rapidamente transformada na estrutura alvo. É importante ressaltar, que no código NAMD o potencial harmônico é do tipo $U(\mathbf{r}) = k(\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0)^2$, onde k é a constante de força, $\mathbf{r}(t)$ é a posição instantânea do átomo alvo e \mathbf{r}_0 sua posição de equilíbrio. Dessa forma, a força instantânea que é aplicada a cada átomo alvo equivale a $F(\mathbf{r}) = 2k(\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0)$. Note que, ao definir um dado valor de k à lista de átomos do arquivo de formato *protein data bank* (pdb), a força externa aplicada será do tipo $2k^{89}$. No caso específico deste trabalho, empregamos o *SMD*, como também *target molecular dynamics* (*TMD*, tópico a seguir), para guiar estruturas dos Kv e Nav, aqui investigados (vide resultados tópicos 4.1-4.4), até conformações resultantes de interesse. Um exemplo esquemático desse tipo de transformação está ilustrado na figura 3.7.

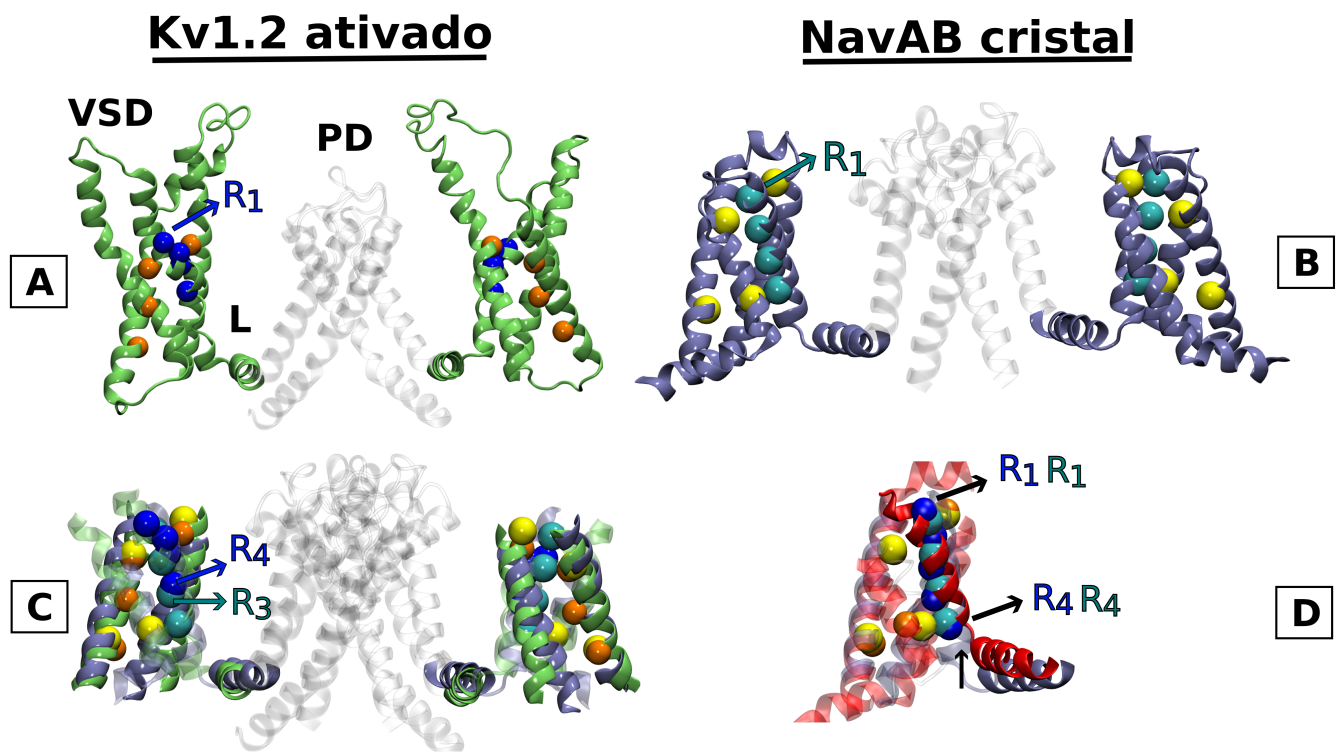


Figura 3.7. Ilustração esquemática de uma transformação de estrutura alvo via aplicação de um potencial externo estático (*SMD*) ou que varia no tempo (*TMD*). **A:** Vista frontal do canal Kv1.2 (*cartoon*) na conformação ativada, com detalhe para o *VSD* e *S4S5 linker* (verde), e o *PD* (transparente). Os átomos de carbono alfa dos resíduos ácidos e básicos estão representados respectivamente como esferas em laranja e azul. **B:** Ilustração análoga ao painel **A**, referente à estrutura cristalográfica do NavAb com *VSD* pré-ativado. **C:** Sobreposição estrutural dos *VSD* de ambos canais pela seleção de átomos referentes à cadeia principal dos resíduos ácidos. Note que os resíduos de arginina da S4 do canal Kv1.2 estão mais próximos à face extracelular que aqueles do NavAb. **D:** Sobreposição estrutural do *VSD* do NavAb cristalográfico antes (*cartoon* azul gelo) e depois (*cartoon* vermelho) da transformação. Note que os átomos de carbono alfa das argininas da S4 (azul) da estrutura em vermelho estão mais elevados em relação resíduos básicos da estrutura em azul gelo. Além disso, há uma considerável elevação do segmento L quando a estrutura cristalográfica do NavAb é guiada para o molde do Kv1.2 ativado.

3.1.14.2 TARGET MOLECULAR DYNAMICS (*TMD*)

No protocolo definido para *TMD*, uma determinada seleção de átomos da simulação é guiada para uma estrutura final pela ação de forças externas ao longo do tempo. A cada passo de simulação, o desvio estrutural (do inglês *root mean square deviation*, *RMSD*) entre as coordenadas atuais e a seleção alvo é computado. A força aplicada a cada átomo é dado pelo gradiente do potencial:

$$U_{TMD} = \frac{1}{2} \frac{k}{N} [RMSD(t) - RMSD^*(t)]^2 \quad [3.28]$$

onde $RMSD(t)$ corresponde à sobreposição estrutural instantânea entre as coordenadas dos átomos em transformação e as coordenadas da estrutura alvo. Note que a variável $RMSD^*(t)$ evolui linearmente ao longo do tempo, a partir do $RMSD$ inicial do primeiro passo de TMD até o $RMSD$ final do último passo de TMD . As forças derivadas de U_{TMD} são aplicadas apenas se o $RMSD(t)$ instantâneo está entre o valor inicial de $RMSD$ e $RMSD^*(t)$, em outras palavras, apenas enquanto o valor de $RMSD$ for diferente do $RMSD$ alvo. Isso implica que no início da transformação, quando os valores de $RMSD$ são maiores entre as estruturais atual e alvo, a força que aparece no sistema é maior; enquanto que no final da transformação a força sentida pelo sistema tende a zero, pois a estrutura atual já foi transformada na estrutura alvo. Note que, a constante de força k é dimensionada pelo número total de átomos do sistema. É válido ressaltar, que a vantagem de se utilizar o TMD é que a proteína pode concomitantemente à aplicação do potencial equilibrar com o sistema, que de certo modo permite minimizar eventuais distorções da estrutura devido a uma rápida aplicação de força externa. O contraponto desse método é que o código TMD faz com que a simulação fique muito mais lenta, além de requer extensos períodos para transformação convergir.

3.1.15 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional capaz de resolver os mínimos de interação entre um par ligante/receptor. Existem duas classes principais de métodos de *docking*: i) *docking* direto, ou manual, em que o próprio usuário posiciona o ligante em um dado modelo de receptor; ii) *docking* automatizado em que um algoritmo de busca irá identificar os sítios de menor energia de interação, pelo computo das interações não ligadas do par ligante/receptor, cujo código Autodock⁹⁰ é um exemplo dessa última categoria. A busca por sítios de ligação, bem como a quantificação da afinidade entre moléculas efetoras e receptores alvo é um difícil problema de otimização, que requer uma amostragem suficiente de todo o domínio de possibilidades de posição, orientação e rotação do ligante. Nesse caso, os algoritmos genéticos (sigla em inglês *GA*) cumprem o papel de busca global e tem sido aplicados a sistemas que sofrem de explosão combinatorial por conta do elevado grau de liberdade^{91,92}. No programa Autodock, um novo método de busca (*global-local*) é implementado, o *lamarckian genetic algorithm* (sigla em inglês *LGA*), em que configurações de baixa energia de interação são sucessivamente selecionadas em detrimento daquelas de maior energia. Outra

melhoria implementada nesse código foi o campo de força, que é calibrado a partir de afinidades experimentais conhecidas (tabela 3.1), e que calcula a energia livre de ligação (ΔG_b) de uma molécula efetora em um dado sítio do receptor. A partir de ΔG_b é possível recuperar constantes de dissociação (K_d) na ordem de nanomolar a milimolar⁹³.

Tabela 3.1. Complexos Ligante-Proteína usados para calibrar a função de energia empírica, com seus códigos PDB e constantes de inibição. *Modificado de Morris *et al*, 1998⁹⁰.

Complexo Ligante-Proteína	Código PDB	Log(K_i) ^a
Concanavalin A / α -methyl-D-mannopyranoside	4cna	2.00
Carboxypeptidase A / glycyL-L-tyrosine	3cpa	3.88
Carboxypeptidase A / phosphonate ZAA=P(O)F	6cpa	11.52
Cytochrome P-450 _{cam} / camphor	2cpp	6.07
Dihydrofolate reductase / methotrexate	4dfr	9.70
α -Thrombin / benzamidine	1dwb	2.92
Endothiapepsin / H-256	zer6	7.22
ε -Thrombin / MQPA	1etr	7.40
ε -Thrombin / NAPAP	1ets	8.52
ε -Thrombin / 4-TAPAP	1ett	6.19
FK506-binding protein (FKBP) / immunosuppressant FK506	1fkf	9.70
D-Galactose / D-glucose binding protein / galactose	2gbp	7.60
Hemagglutinin / sialic acid	4hmg	2.55
HIV-1 Protease / A78791	1hvj	10.46
HIV-1 Protease / MVT101	4hvp	6.15
HIV-1 Protease / acylpepstatine	5hvp	5.96
HIV-1 Protease / XK263	1hvr	9.51
Fatty-acid-binding protein / C ₁₅ COOH	2ifb	5.43
Myoglobin (ferric) / imidazole	1mbi	1.88
McPC603 / phosphocholine	2mcp	5.23
β -Trypsin / benzamidine	3ptb	4.74
Retinol-binding protein / retinol	1rbp	6.72
Thermolysin / Leu-hydroxylamine	4tln	3.72
Thermolysin / phosphoramidon	1tlp	7.55
Thermolysin / <i>n</i> -(1-carboxy-3-phenylpropyl)-Leu-Trp	1tmn	7.30
Thermolysin / Cbz-Phe- <i>p</i> -Leu-Ala (ZFP _{LA})	4tmn	10.19
Thermolysin / Cbz-Gly- <i>p</i> -Leu-Leu (ZGp _{LL})	5tmn	8.04
Purine nucleoside phosphorylase (PNP) / guanine	1ulb	5.30
Xylose isomerase / CB3717	2xis	5.82
Triose phosphate isomerase (TIM) / 2-phosphoglycolic acid (PGA)	2ypi	4.82

3.1.15.1 ALGORITMO GENÉTICO

Os algoritmos genéticos (*GA*) são baseados no formalismo evolucionista e genético⁹⁴. No caso do *docking* molecular, a ligação de uma molécula efetora em uma proteína pode ser definida pelo conjunto de parâmetros que descrevam a posição, orientação e torção do ligante em relação à macromolécula receptora. Cada um desses parâmetros correspondem às variáveis de estado do ligante, que no *GA* correspondem aos genes. Dessa forma, o conjunto de genes do ligante corresponde ao seu

genótipo, enquanto que a informação contida em cada gene, i.e as coordenadas atômicas, correspondem ao fenótipo. Desse modo, a energia de interação entre o ligante e o receptor é definida como o *fitness* e calculada segundo uma função de energia de ligação (equação 3.30). Pares aleatórios de indivíduos (ligante) são continuamente modificados via um processo de *crossover*, em que novos indivíduos herdam os genes da geração parental. Além disso, cada prole sofre mutações em que os valores contidos em cada gene são aleatoriamente modificados. Por fim, a seleção de determinada prole de uma dada geração é determinada pelo seu *fitness*: soluções de *docking* de baixa energia vão adiante, enquanto as de alta energia são negligenciadas (figura 3.8).

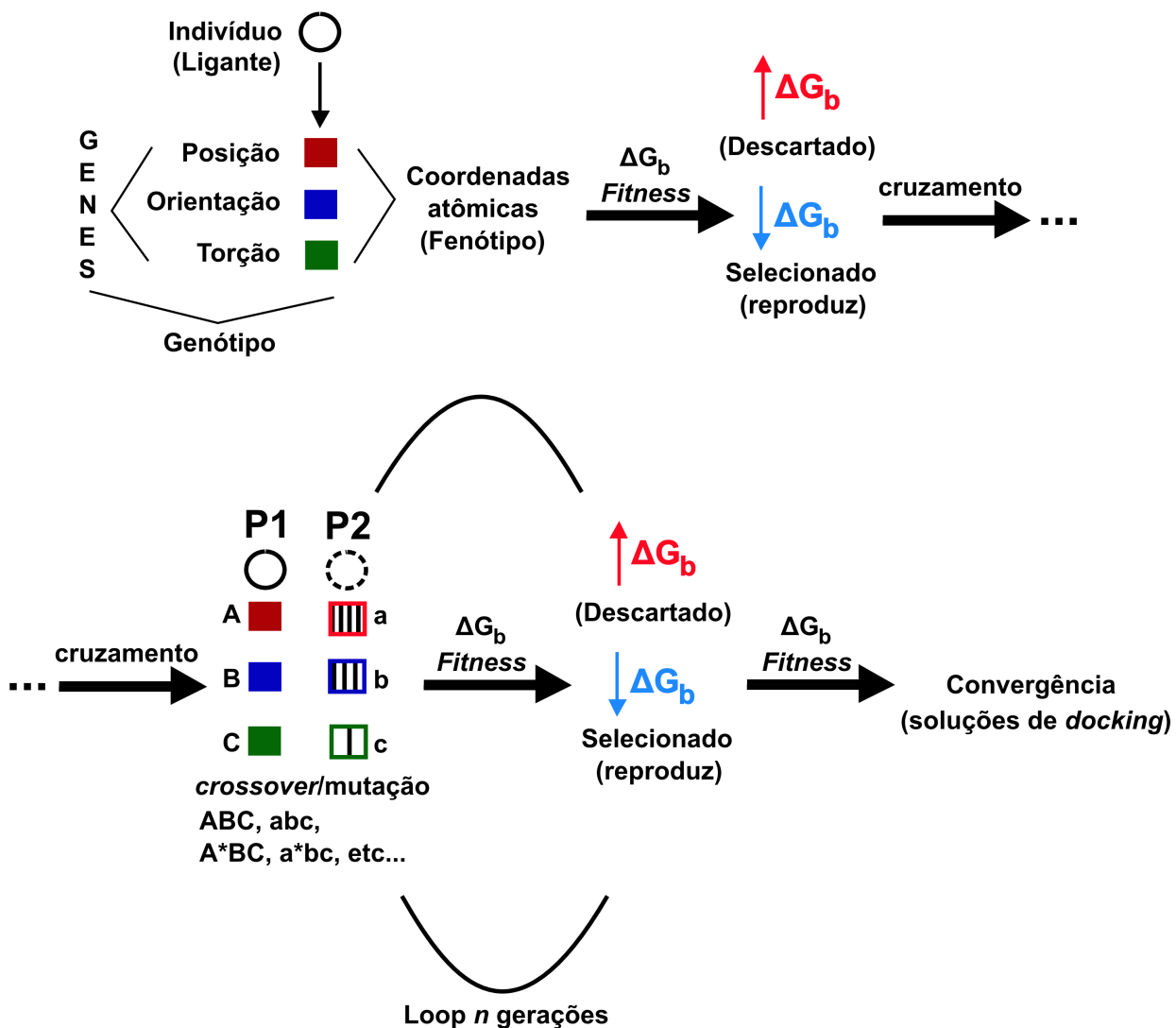


Figura 3.8. Esquema ilustrativo do processo de *docking* molecular executado pelo programa Autodock utilizando o formalismo do LGA.

3.1.15.2 FUNCIONAMENTO DO CÓDIGO

O algoritmo genético inicialmente gera uma população aleatória inicial de indivíduos (ligantes) cada um contendo valores diferenciados de translação (x, y e z) e orientação (ângulos entre as ligações atômicas variando de -180° a $+180^\circ$), uniformemente distribuídos dentro dos limites do *grid* a ser considerado. A criação de populações aleatórias iniciais é feita continuamente a cada geração, até que o número máximo de gerações, definido pelo usuário, seja alcançado. Aqui, uma geração consiste de cinco estágios sucessivos: avaliação dos *mapping* e *fitness*, seleção, *crossover*, mutação e seleção eletiva.

Mapping ou mapeamento armazena as informações do fenótipo de cada indivíduo da população gerada a partir de seus genótipos correspondentes, para que o *fitness* seja avaliado (a função *fitness* corresponde à soma das energias intermoleculares de interação entre ligante e receptor mais a energia intramolecular do ligante). A natureza físico-química da função de energia de interação é descrita adiante pela equação 3.30. Em prosseguimento, o evento de seleção decide quais dos indivíduos irão reproduzir, em que indivíduos com *fitness* acima da média deixarão um número de descendentes proporcionalmente maior, como mostra a equação 3.29:

$$n_0 = \frac{f_w - f_i}{f_w - \langle f \rangle} \quad [3.29]$$

onde n_0 é o número inteiro de descendentes derivado de cada indivíduo, f_i é o *fitness* de um indivíduo (energia de ligação); f_w é o *fitness* do pior indivíduo (maior energia); e $\langle f \rangle$ é a média do *fitness* da população. Como f_w será sempre maior que f_i e $\langle f \rangle$, exceto quando $f_i = f_w$, para indivíduos com *fitness* menor que a média, i.e. $f_i < \langle f \rangle$, o numerador da equação 3.29 será sempre maior que o denominador, determinando que esses indivíduos possam gerar proles, uma vez que geram pelo menos 1 descendente. O *crossover* e mutações são então realizados aleatoriamente entre os membros da população a uma dada taxa definida pelo usuário. Ao final, o parâmetro seleção eletiva determina quantos indivíduos sobrevivem automaticamente para a próxima geração. Dessa forma, a nova população derivada das etapas de seleção, *crossover* e mutação é ranqueada de acordo com seu *fitness*. O algoritmo genético itera sobre as várias gerações até que um dos critérios de parada é atingido, i.e. número total de gerações é alcançado ou a convergência do melhor *fitness*. Ao final desse processo o programa Autodock agrupa as soluções de *docking* em conjuntos distintos com desvio estrutural

semelhantes, e ranqueados pela energia livre de interação.

3.1.15.3 FUNÇÃO EMPÍRICA DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO

O estudo da estrutura molecular está subjacente à biologia molecular computacional. Existem vários métodos de mecânica e dinâmica molecular já bem estabelecidos na literatura como AMBER⁷⁹, CHARMM⁸⁹ e GROMOS⁸⁰. Muitos dos campos de força tradicionais modelam a energia de interação de sistemas moleculares a partir de termos de dispersão e repulsão, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, além do comprimento das ligações atômicas de ângulos de valência^{95,96}. Esses métodos são excelentes para se estudar os movimentos moleculares em relação ao tempo e o cálculo de energias livres de ligação pela perturbação do ligante, mas que requerem tempos de simulação computacional inviáveis de se alcançar. Especificamente, uma alternativa factível para o cálculo das afinidades são as conhecidas *scoring functions*, que contornam o problema de cálculo via força bruta dos métodos tradicionais de simulação empregando funções de energia livre calibradas a partir de constantes de ligação obtidas experimentalmente. A maioria dessas funções de energia potencial modela a energia livre de ligação adicionando termos entrópicos à equação geral da mecânica molecular:

$$\Delta G_b = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol} \quad [3.30]$$

onde os quatro primeiros termos da função de energia livre referem-se às contribuições típicas de mecânica molecular: dispersão/repulsão dos átomos, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas e ângulos diedrais. Já o termo ΔG_{tor} refere-se à restrição de rotâmeros internos do ligante, enquanto que ΔG_{sol} modela a dessolvatação da molécula efetora diante sua ligação ao receptor, uma vez que a entropia do solvente é alterada nas interfaces soluto-solvente⁹⁷. Dessa forma, a equação que descreve especificamente a energia livre de ligação (ΔG_b) do ligante ao receptor é dada por:

$$\begin{aligned} \Delta G_b = & \Delta G_{wdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{(r_{ij})^{12}} - \frac{B_{ij}}{(r_{ij})^6} \right) + \dots \\ & + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(\theta) \left(\frac{C_{ij}}{(r_{ij})^{12}} - \frac{D_{ij}}{(r_{ij})^{10}} + E_{hbond} \right) + \dots \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \dots \quad [3.31] \\
& + \Delta G_{tor} N_{tor} + \dots \\
& + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}
\end{aligned}$$

onde os cinco termos de ΔG do lado direito da igualdade são coeficientes empiricamente determinados por meio de análises de regressão linear a partir de um conjunto de afinidades conhecidas de complexos ligante-proteína como mostrado na tabela 3.1. Os somatórios da função de energia potencial são realizados sobre todos os pares atômicos de ligante (i) e proteína (j). As contribuições *in vacuo* incluem os três primeiros termos da igualdade: o potencial 12-6 de Leonnard-Jones sobre a dispersão/repulsão; o potencial direcional 12-10 sobre as ligações de hidrogênio, onde $E(\theta)$ é o parâmetro direcional do ângulo dessas ligações entre pares de átomos ij ; E_{hbond} é a estimativa média da energia de formação da ligação de hidrogênio entre moléculas de água e átomos polares; e o terceiro termo corresponde ao potencial eletrostático Coulombiano que computa as interações de átomos carregados. O termo N_{tor} é adicionado para modelar a perda de entropia conformacional do ligante mediante sua interação com o receptor.

Dentre todos os termos da equação 3.30 aquele referente à dessolvatação é o mais complicado de se computar. Para cada átomo i do ligante, volumes fragmentais de átomos j da proteína, que rodeiam o ligante, são ponderados por uma função exponencial, i.e. $e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}$, e então somados. Esse procedimento revela o percentual de volume ao redor de átomos i que é ocupado pelo volume de átomos j . Essa porcentagem é por sua vez ponderada por um parâmetro de solvatação S_i . O somatório do termo de dessolvatação é realizado sobre todos os pares ij . Esse método de dessolvatação pode ser resumido como o enterramento de átomos polares/apolares do complexo ligante-proteína⁹⁰.

A parametrização utilizada pelo programa *Autodock* para a quantificação das energias livre de ligação é derivada de uma extensa calibração entre as afinidades experimentais na forma de constantes de inibição (K_i) da tabela 3.1 e os termos da equação 3.30 (figura 3.9).

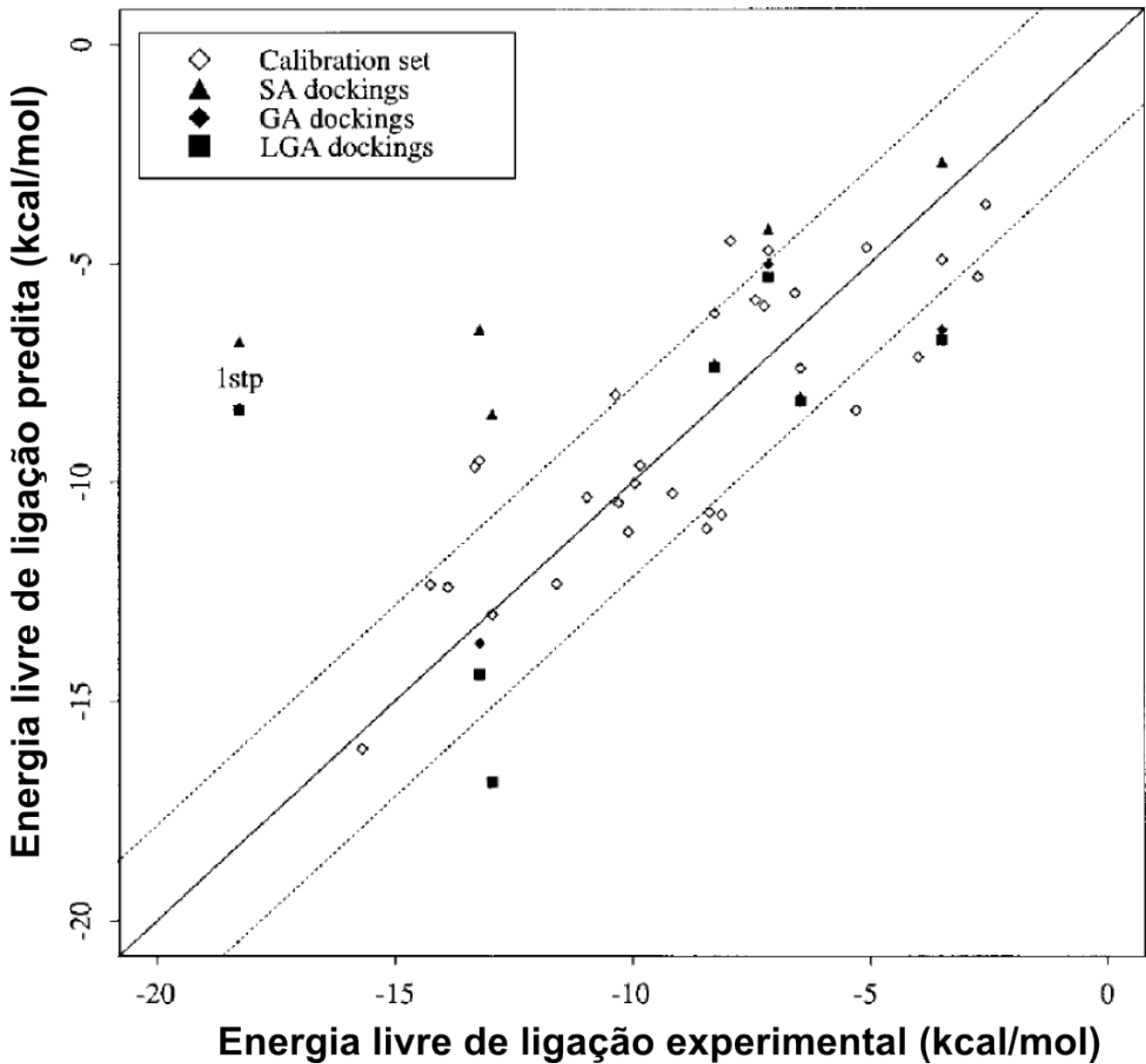


Figura 3.9. Calibração de resultados de *docking* comparando as energias livre de ligação preditas e experimentais. A linha sólida representa a perfeita sobreposição dos valores e as linhas tracejadas indicam as variações de energia em uma unidade de desvio padrão. Os métodos de *docking SA*, *GA* e *LGA* correspondem a *simulated annealing*, algoritmo genético e *lamarckian genetic algorithm* respectivamente (Modificado de Morris *et al*, 1998⁹⁰).

A conversão dos K_i experimentais para a construção do conjunto de afinidades experimentais (ΔG_{obs}), utilizado para calibrar a função de energia segue a equação a seguir:

$$\Delta G_{obs} = RT \ln K_i \quad [3.32]$$

onde R é a constante universal dos gases (1.987 cal/molK) e T é a temperatura ambiente do sistema (298.15 K). Note que, o sinal da equação 3.32 é positivo uma vez que K_i é definida para a dissociação do sistema, i.e $EI \leftrightarrow E + I$, enquanto que ΔG_{obs} é definido para o processo associação, i.e $E + I \leftrightarrow EI$, onde E significa enzima e I inibidor. De maneira análoga, a constante de dissociação fornecida pelo programa obedece à equação 3.33:

$$K_d = e^{\frac{\Delta G_b}{RT}} \quad [3.33]$$

onde ΔG_b é a variação de energia livre de ligação predita, que é negativa nos casos em que o ligante tem afinidade pelo receptor, i.e $K_d \rightarrow 0$ quando $\Delta G_b \leq 0$. Em outras palavras: a magnitude de K_d tende a zero quanto maior for a afinidade entre o complexo ligante-receptor (EI).

3.1.16 ESTRUTURA E TOPOLOGIA DOS MODELOS DE ANESTÉSICOS GERAIS: 1-BUTANOL E HALOTANO.

Os anestésicos voláteis e álcoois e cadeia alifática são compostos lipofílicos que afetam o transporte de íons através da membrana celular e são os principais agentes envolvidos no processo de anestesia geral⁵⁵. Como mencionado na introdução deste trabalho (tópico 1.10), os modelos de anestésicos gerais utilizados neste estudo foram os ligantes 1-butanol e halotano. É preciso ressaltar, que a estrutura atômica dessas moléculas anestésicas de alguma forma interage com os átomos dos canais iônicos, que implica na escala de grandeza fisiológica, no interrompimento da propagação de impulsos elétricos em células excitáveis. A figura 3.10 traz os detalhes das coordenadas atômicas e topologias de ambos anestésicos, que são requeridos para os experimentos *in-silico* de *docking* molecular aqui investigados.

```

A ATOM 1 C1 BTO 1 1.011 -0.634 -30.976 1.00 0.00 C
    ATOM 2 O1 BTO 1 2.358 -0.155 -30.922 1.00 0.00 O
    ATOM 3 C2 BTO 1 0.118 0.427 -31.636 1.00 0.00 C
    ATOM 4 C3 BTO 1 -1.198 0.695 -30.884 1.00 0.00 C
    ATOM 5 C4 BTO 1 -2.158 -0.496 -30.831 1.00 0.00 C

B * CHARMM topology for butanol
    * 03/2010 Werner Treptow & Cristiano Amaral
    27 1

    MASS 203 HOL 1.008000 H ! Nucleic acid phosphate hydroxy
    MASS 204 HAL2 1.008000 H ! alphatic proton
    MASS 205 HAL3 1.008000 H ! alphatic proton
    MASS 206 CTL2 12.011000 C ! carbon of methylene group (-CH2-)
    MASS 207 CTL3 12.011000 C ! carbon of methyl group (-CH3)
    MASS 208 OHL 15.999400 O ! Nucleic acid phosphate hydroxyl oxygen

    RESI BTOH 0.00 ! Butanol, adm jr. alkanes
    !
    !
    !
    !
    !
    GROUP
    ATOM C1 CTL2 0.05 ! H41 H31 H21 H11
    ATOM O1 OHL -0.66 ! | | | |
    ATOM HO1 HOL 0.43 ! H42--C4--C3--C2--C1--O1--HO1
    ATOM H11 HAL2 0.09 ! | | | |
    ATOM H12 HAL2 0.09 ! H43 H32 H22 H12
    GROUP
    ATOM C2 CTL2 -0.18 !
    ATOM H21 HAL2 0.09 !
    ATOM H22 HAL2 0.09 !
    GROUP
    ATOM C3 CTL2 -0.18 !
    ATOM H31 HAL2 0.09 !
    ATOM H32 HAL2 0.09 !
    GROUP
    ATOM C4 CTL3 -0.27 !
    ATOM H41 HAL3 0.09 !
    ATOM H42 HAL3 0.09 !
    ATOM H43 HAL3 0.09 !
    BOND C1 C2 C1 O1 C1 H11 C1 H12 O1 HO1
    BOND C2 H21 C2 H22 C2 C3 C3 H31 C3 H32
    BOND C3 C4 C4 H41 C4 H42 C4 H43
    AUTO ANGLES DIHE
    PATCHING FIRS NONE LAST NONE

    END

C HETATM 1 F1 HLT 1 3.030 -1.332 -29.249 0.53 61.31 F
    HETATM 2 C2 HLT 1 3.199 -1.436 -27.947 0.53 59.04 C
    HETATM 3 F2 HLT 1 3.374 -2.705 -27.622 0.53 59.33 F
    HETATM 4 F3 HLT 1 4.264 -0.718 -27.577 0.53 58.83 F
    HETATM 5 C1 HLT 1 1.973 -0.905 -27.278 0.53 59.49 C
    HETATM 6 BR HLT 1 2.033 0.963 -27.406 0.53 64.82 BR
    HETATM 7 CL HLT 1 0.585 -1.489 -28.168 0.53 55.00 CL

D *CHARMM topology file for halothane
    * Scharf D. Biophys J. 2000 February; 78(2): 982-993.
    19 1
    MASS 1 HH 1.00800 HH
    MASS 2 CH 12.0110 CH
    MASS 3 F1 18.9990 F1
    MASS 4 F2 18.9990 F2
    MASS 5 F3 18.9990 F3
    MASS 6 CLH 35.4530 ClH
    MASS 7 Br 79.9040 Br

    AUTOGENERATE angles dihedrals
    ! DEFAults for patching FIRSt and LAST residues
    DEFA FIRS NONE LAST NONE

    RESI LIG 0.0000

    GROU
    ATOM C1 CH 0.630
    ATOM C2 CH 0.25
    ATOM F1 F1 -0.210
    ATOM F2 F2 -0.210
    ATOM F3 F3 -0.210
    ATOM CLH CLH -0.170
    ATOM Br Br -0.150
    ATOM H HH 0.07

    BOND C1 F1 C1 F2 C1 F3 C1 C2 C2 H
    BOND C2 CLH C2 Br

    PATC FIRS NONE LAST NONE

```

Figura 3.10. Arquivo de coordenadas atômicas e topologia dos anestésicos gerais 1-butanol e halotano. **A:** Formato simplificado de um arquivo do repositório mundial de estruturas de proteínas (*Protein Data Bank*, pdb) referente ao ligante 1-butanol. **B:** Arquivo topologia do 1-butanol no formato CHARMM⁸⁹. Este arquivo indica o valor da massa (*MASS*) e carga padrão de cada átomo da molécula, além de definir a regra para a ligação covalente entre cada um dos átomos, que é definida dentro de *GROUP*. **C** e **D:** são respectivamente o arquivo .pdb e topologia para o halotano.

3.2 PROTOCOLOS DE SIMULAÇÃO

3.2.1 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

3.2.1.1 SIMULAÇÕES DE EQUILÍBRIO EM *ENSEMBLE* NPT

As etapas de equilibração dos sistemas Kv1.2, K-Shaw2, NavAb, NaChBac e NavRh foram executadas utilizando-se o código de dinâmica molecular NAMD⁹⁸. Condições periódicas de contorno (sigla em inglês *PBC*), foram aplicadas nos eixos x, y, e z, em um *ensemble* NPT (número de partículas, temperatura e pressão constantes). Em cada simulação foi empregada uma dinâmica de *Langevin* em que a temperatura do sistema foi fixada em 300 K pelo algoritmo Nosé-Hoover⁹⁹ e a pressão foi fixada em 1 atm. As ligações químicas entre os hidrogênios e os demais átomos do sistema foram restringidas a seu valor de equilíbrio. As interações de longo alcance (eletrostáticas) foram computadas pelo algoritmo *PME*, do inglês *Particle Mesh Ewald*¹⁰⁰ com raio de corte (*cut-off*) de 11 Å. O passo de integração foi de 2 fs. Os parâmetros de energia potencial, como comprimento das ligações covalentes, ângulos diedrais (ou de torção), interações não-covalentes (van der Waals e eletrostáticas), além das ligações de hidrogênio, foram computadas segundo o campo de força atomístico CHARMM22-CMAP para proteínas^{78,89}. Para os fosfolípidios do tipo POPC (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina) foi empregada uma representação de átomos unidos para os elementos de carbono da cadeia alifática segundo o campo de força CHARMM27¹⁰¹. O modelo que descreve as águas é o TIP3¹⁰².

3.2.1.2 CONDIÇÕES INICIAIS DOS SISTEMAS ATOMÍSTICOS

Kv1.2: Canal iônico Kv1.2 composto pelos domínios TM e T1 (vide resultados tópico 4.1) imerso numa bicamada de POPC contendo 213 moléculas de fosfolípido por monocamada, hidratada por 83390 moléculas de água, em 150mM de solução de KCl. Total de átomos: 305464. Dimensões iniciais do sistema: $x = 129.55$ Å; $y = 135.24$ Å; $z = 196.23$ Å.

K-Shaw2: Canal iônico K-Shaw2 (sistemas ativado/aberto e desativado/fechado) imerso numa bicamada POPC contendo 316 moléculas de fosfolípido por monocamada, hidratada por 26265 moléculas de água, com adição de contra-íons. Total de átomos: 122949. Dimensões iniciais do sistema: $x = 126.87$ Å; $y = 129.86$ Å; $z = 93.10$ Å.

NavAb: Canal iônico NavAb (NX e demais conformações) imerso numa bicamada POPC contendo 316 moléculas de fosfolípido por monocamada, hidratada por 41419 moléculas de água, em 150mM de solução NaCl. Total de átomos: 170287. Dimensões iniciais do sistema: $x = 132.28 \text{ \AA}$; $y = 130.01 \text{ \AA}$; $z = 111.33 \text{ \AA}$.

NaChBac: Canal iônico NaChBac (sistemas ativado/aberto e desativado/fechado) imerso numa bicamada POPC contendo 316 moléculas de fosfolípido por monocamada, hidratada por 27502 moléculas de água, com adição de contra-íons. Total de átomos: 128986. Dimensões iniciais do sistema: $x = 126.13 \text{ \AA}$; $y = 134.03 \text{ \AA}$; $z = 88.93 \text{ \AA}$.

NavRh: Canal iônico NavRh (ativado/fechado) imerso numa bicamada POPC contendo 316 moléculas de fosfolípido por monocamada, hidratada por 27502 moléculas de água, em 70mM de solução NaCl. Total de átomos: 156661. Dimensões iniciais do sistema: $x = 136.77 \text{ \AA}$; $y = 127.72 \text{ \AA}$; $z = 85.97 \text{ \AA}$.

Em todos os sistemas o canal é inicialmente equilibrado por 4ns com as coordenadas atômicas do esqueleto carbônico mantidas em torno da estrutura inicial por um potencial harmônico de ~ 1 kcal/mol por átomo. Esse procedimento assegura a adesão dos fosfolípidios à proteína sem que a estrutura do canal seja perturbada. Concomitantemente, as cavidades do *VSD* e *PD* são espontaneamente preenchidas por moléculas de água. A simulação é então estendida por mais 15ns sem aplicação de nenhum potencial externo.

3.2.1.3 SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO: APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO

Nas simulações com aplicação de campo elétrico, interfaces ar-água foram consideradas nas regiões intra e extracelulares estendendo-se o comprimento da caixa de simulação na direção transmembrânica (Figura 3.6, tópico 3.1.10); para os sistemas Kv1.2 $z = 300.00 \text{ \AA}$ e para os sistemas NavAb $z = 220.00 \text{ \AA}$. Esses sistemas foram simulados em um ensemble NVT em que o número de partículas, volume e temperatura são mantidos constantes. Aqui, o pistão e a opção *flexible cell* são desligados. É válido ressaltar que a densidade da água é preservada entre as interações intermoleculares e como, membrana e proteína estão suficientemente distantes da interface ar-água, os efeitos de borda dessa interface não os afetam. Prosseguindo, um potencial hiperpolarizado é aplicado ao canal (Figura 3.6, tópico 3.1.10) em que ΔV é imposto pela diferença líquida de cargas entre os solventes extra e

intracelulares desacoplados. Para uma situação em que existam 10 íons K^+ no banho extracelular e 9 íons K^+ no banho intracelular haverá uma carga líquida $q_0 = -2 e$ (vide tópico 3.1.12 para detalhes). Em geral, um $q_0 = -2 e$ resulta em um potencial de ~ -200 mV, mas que pode variar dependendo da conformação do *VSD* do canal. Como o conjugado membrana/proteína funciona como um condensador o desbalanço de carga q_0 entre os solventes desacoplados gera ΔV . Aqui, a corrente iônica através do filtro de seletividade foi inibida durante a simulação, pela imposição de um potencial harmônico que restringe a movimentação do filtro e portanto induz sua não-condutividade, permitindo a quantificação direta das *gating charges*, a um dado ΔV .

3.2.1.4 SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO: APLICAÇÃO DE POTENCIAL EXTERNO

i) Kv1.2

Partindo da estrutura cristalográfica do Kv1.2 equilibrada na membrana, com o *VSD* ativado e o *PD* aberto, uma longa simulação de ~ 2.2 μs com aplicação de ΔV foi empregada para revelar os estágios iniciais da desativação do canal. Ao final desta etapa uma conformação intermediária (estado γ) foi caracterizada e pela qual pode-se decodificar a regra de transição dos *gating residues* (R1-R4) dentro do *VSD*. As mudanças conformacionais subsequentes foram induzidas pela aplicação de um potencial harmônico que varia com o tempo, em que os grupos carregados dos resíduos básicos da S4, (Arg) $^+H_3N = C_\zeta(NH_2) - N_\epsilon H - C_\delta H_2$ e (Lys) $^+H_3N_\zeta - C_\epsilon H_2$ foram guiados em direção aos sítios de ligação, i.e os resíduos ácidos (Asp) $^-OOC_\gamma - C_\beta H_2$ e (Glu) $^-OOC_\delta - C_\gamma H_2$, bem como o grupamento fosforil (PO_4^-) do lipídio. A magnitude da força derivada do potencial foi de 1 kcal/mol.Å² por átomo com velocidade de 30 Å/ns. Todo esse procedimento de aplicação de uma força externa nos grupos carregados positivamente foi feito lentamente para evitar efeitos irreversíveis sobre o sistema. Nesse procedimento foram empregados ciclos sucessivos de simulações em que o potencial harmônico era ligado por 1ns e sequencialmente desligado por 1ns para devida equilibração do sistema.

ii) NavAb (VSD):

Conformações distintas do espaço de ativação do *VSD*, partindo da estrutura cristalográfica do canal NavAb (NX) equilibrada na membrana, foram investigadas pela aplicação de um potencial externo aos átomos do sensor de voltagem do canal bacteriano até um dado valor de coordenada generalizada $R = R(NavAb, VSD; t)$ (vide tópico 3.1.13). Uma vez o *VSD* estabilizado em um dado

valor de R , o sistema é equilibrado livre da ação de forças externas. Note que durante as etapas de transformação o relaxamento do PD não é restringido. Dessa forma, três trajetórias independentes foram amostradas para o NavAb: $R = 0.85 \pm 0.02$, $R = 0.38 \pm 0.06$, e $R = 0.14 \pm 0.01$, cujos valores são referentes à média sobre os quatro sensores de voltagem. As estruturas equilibradas resultantes são referidas como NX^{++} , NX^- e NX^+ respectivamente. Em detalhe, para a transformação da estrutura NX em NX^{++} foi realizada uma sobreposição estrutural entre a conformação inicial do NavAb e KA (vide resultados tópico 4.2, figura 4.9), considerando-se os átomos da cadeia principal dos sítios negativos (B_2 - B_5). Em prosseguimento, uma força externa de magnitude 4.5 kcal/mol.Å^2 a uma velocidade de 0.25 Å/ns é aplicada nos átomos $C\alpha$ das cadeias laterais dos resíduos carregados da S4 (R_1 - R_4) puxando-os em direção à estrutura KA. Durante esse processo as posições dos átomos $C\alpha$ dos sítios B_2 - B_5 de NX são fixados por um potencial harmônico de $\sim 1 \text{ kcal/mol}$ por átomo. O mesmo procedimento é adotado para trazer a estrutura NX para a conformação KR, cujos valores amostrados são $R = 0.38 \pm 0.06$ e $R = 0.14 \pm 0.01$ correspondendo respectivamente às conformações NX^- e NX^+ . Após a etapa inicial com aplicação de uma força externa, o potencial harmônico é gradativamente desligado começando pelo segmento S1 até chegar ao S6, durante 4ns. Em cada conformação amostrada, o regime de equilíbrio é alcançado após $\sim 30 \text{ ns}$ de simulação livre de forças externas.

iii) NavAb (PD):

Em duas simulações independentes a estruturas de PD fechadas NX e NX^{++} foram guiadas para a conformação de domínio do poro aberto, i.e $P \sim 0.9$, e então submetidas à equilibração livre de forças externas por $\sim 30 \text{ ns}$. As estruturas finais equilibradas oriundas dessas simulações foram nomeadas respectivamente como NX^{PO} e NX^O . Nessas etapas de transformação as conformações NX e NX^{++} foram sobrepostas à KA pela cadeia principal dos resíduos que delineiam o poro F_1 - F_3 (Tabela S1 do Anexo III), e então a estrutura dos canais NavAb foram puxadas até KA pela aplicação de uma força externa da ordem de 4.5 kcal/mol.Å^2 com velocidade de 0.25 Å/ns no átomos $C\alpha$ dos resíduos F_1 - F_3 . Durante esta etapa, ambos VSD e $S4S5$ -*linker* foram restringidos à suas posições iniciais. Assim como para a transformação do VSD , após PD ter alcançado um valor de $P \sim 0.9$ foram aplicadas as etapas de *annealing* ($\sim 4 \text{ ns}$) e equilibração livre de forças externas ($\sim 30 \text{ ns}$).

3.2.1.5 SIMULAÇÕES FORA DO EQUILÍBRIO: *ADAPTIVE BIASING FORCE* (ABF)

A metodologia *ABF* implementada no código *NAMD* permite que o sistema possa varrer automaticamente toda a coordenada de reação de interesse, uma vez calibradas as variáveis do programa. Além disso, o arquivo de saída da dinâmica informa diretamente, para cada posição da coordenada de reação, os valores da energia livre e da força média, além do número de pontos amostrados. A facilidade de se obter os resultados citados permite que o usuário controle satisfatoriamente a precisão do perfil de energia livre a ser aferido, uma vez que, para um maior número de amostragens, menor é a divergência da série de força média aferida e, portanto, maior a precisão da estimativa do perfil de energia livre (vide equação 3.20). Outra grande vantagem do *ABF* é poder levar o sistema a regiões da coordenada de reação que ainda estejam mal estimadas.

Os parâmetros utilizados para o cálculo do potencial de força média (sigla em inglês *PMF*) para o transporte de um íon de sódio através do *PD* parcialmente aberto do canal NaChBac foram: coordenada de reação = direção transmembrânica (z) ; limites inferior e superior da coordenada de reação $z_{\text{Min}} = 18.0 \text{ \AA}$ e $z_{\text{Max}} = 30.0 \text{ \AA}$ correspondendo respectivamente à entrada do filtro de seletividade e à porção C-terminal das hélices S6; $dx_i = 0,1 \text{ \AA}$ (janela de acumulação da força instantânea); constante de força aplicada à espécie iônica nos limites da coordenada de reação = 100 kcal/mol; número de pontos de estimativa da força (*fullsamples*) anterior à sua aplicação = 1000.

3.2.2 DOCKING MOLECULAR

i) Grid do cálculo de docking:

A caixa do *grid* utilizada para o *docking* dos anestésicos foi centrada sobre o centro de massa dos quatro S4S5-*linker* do canal, com dimensões $x = 40.0 \text{ \AA}$; $y = 40.0 \text{ \AA}$; e $z = 50.0 \text{ \AA}$ (figura 3.11). O número máximo de pontos alocados dentro de cada dimensão x , y e z do *grid* foi de respectivamente 126, 126 e 80. O espaçamento do *grid* foi de 0.45 \AA de aresta e o *smooth* foi de 0.5 \AA para a média das energias.

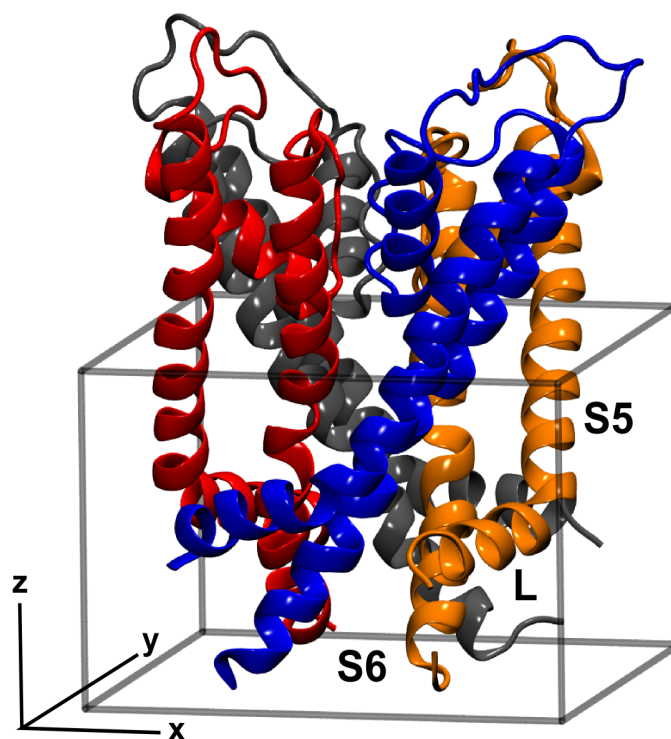


Figura 3.11. Visão esquemática do *grid* utilizado para o cálculo de *docking* molecular dos anestésicos gerais 1-butanol e halotano sobre os canais Kv1.2 e K-Shaw2. Note que a região considerada corresponde à interface dos segmentos S4S5-linker (L), S5 e S6, circundante à cavidade central do PD.

ii) Variáveis de docking:

Os parâmetros para *docking* dos anestésicos sobre os modelos de canais Kv foram: grau de liberdade de torção do ligante (*torsdof*) = 1; limite de desvio estrutural para agrupar as soluções de *docking* (*rmsd_tolerance*) = 0.5 Å; número de indivíduos na população (*ga_pop_size*) = 600; número máximo de estimativas de energia (*ga_num_evals*) = 2500000; número de gerações (*ga_num_generations*) = 27000; número de melhores sobreviventes para a próxima geração (*ga_elitism*) = 1; taxa de mutação de um gene (*ga_mutation_rate*) = 0.02; taxa de *crossover* (*ga_crossover_rate*) = 0.8; número de corridas do algoritmo LGA (*ga_run*) = 256. O programa utilizado para o *docking* molecular foi o Autodock versão 4.2⁹⁰.

iii) Seleção dos sítios de ligação:

Após a conclusão do *docking* molecular as soluções resultantes foram agrupadas em conjuntos de modo que era selecionado o ligante pertencente ao centro geométrico daquele conjunto. Prosseguindo, selecionava-se uma nuvem de soluções de *docking* condizente a todas as saídas que

estivessem a uma distância de até 4 Å do centro geométrico do conjunto em questão. Como o canal iônico é um homo-tetrâmero, vários sítios de ligação encontrados estão repetidos no espaço devido a essa simetria do arranjo das subunidades da proteína. Para tanto, particionamos o canal em quadrantes, como num ciclo trigonométrico, afim de agrupar sítios distintos daqueles repetidos (figura 3.12). Os detalhes atômicos dos sítios distintos e selecionados estão em resultados, tópico 4.4. Os sítios foram classificados no sentido anti-horário, partindo-se do 1º quadrante, até atingir o 4º quadrante. Por este procedimento, pudemos identificar 8 sítios distintos, i.e que se ligam sem repetição a segmentos dentro de uma mesma subunidade ou entre subunidades adjacentes. Como exemplo, se uma nuvem de saídas está ligada entre os segmentos L e S6 do 1ª quadrante (equivalente à subunidade um do canal), se o mesmo ocorrer em todos os outros quadrantes, este será nomeado como mesmo sítio. Os detalhes moleculares dos sítios classificados para os anestésicos estão representados nos resultados, figuras 4.24 e 4.25.

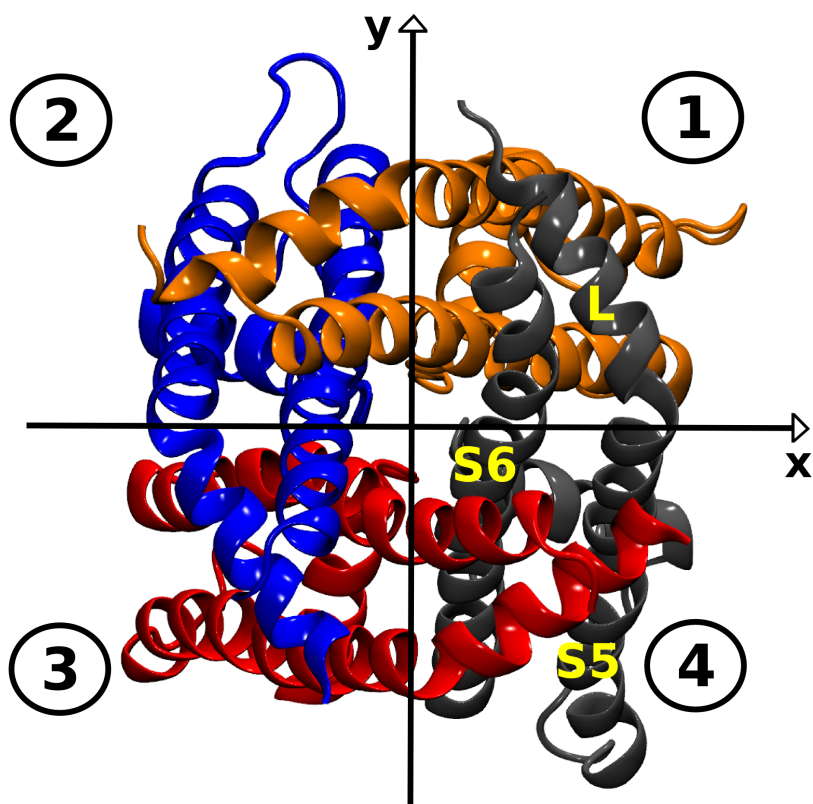


Figura 3.12. Particionamento da estrutura dos canais Kv para agrupamento espacial da nuvem de resultados de *docking*. Visão intracelular da entrada da cavidade central do PD. As quatro subunidades estão coloridas por cor com os segmentos S4S5 *linker* (L), S5 e S6 indicados em letras amarelas. O PD foi dividido em quadrantes no sentido anti-horário. Note que, devido à simetria do canal uma mesma região de ligação ao anestésico num quadrante ocorrerá também nos demais (vide resultados tópico 4.4).

iv) Cálculo das afinidades dos ligantes:

Considerando um parâmetro de desvio estrutural (*rmsd_tolerance*) de 0.5 Å para as soluções de *docking* obtivemos, respectivamente, um total de 1412, 1465 e 1511 de resultados para a ligação do 1-butanol nos canais K-Shaw2 (fechado), K-Shaw 2 (aberto) e Kv1.2 (fechado). Para o halotano os resultados respectivos foram 394, 477 e 353. As soluções de *docking* foram agrupadas em diferentes sítios (nomeados de 1 a 8) de acordo com sua localização específica na estrutura do canal (figura 3.12). A afinidade dos anestésicos a um dado sítio de ligação *i* foi quantificada segundo uma constante de ligação *B_i*:

$$B_i = \sum_{j=1}^N \frac{E_j \delta_{ij}}{Z} \quad [3.34]$$

onde E_j é a energia de uma solução de *docking* *j* e $z = \sum_{j=1}^N E_j$ é a soma das energias de todas as *N* soluções de *docking*. Note que, $\delta_{ij} = 1$ para todo *j* que pertença a um sítio *i* específico e $\delta_{ij} = 0$ para o caso contrário.

v) Em busca do sítio consenso: método da subtração

De modo a conhecer os sítios putativos de ligação à anestésico geral específicos da conformação fechada do canal K-Shaw2, cujo funcionamento é modulado por essa classe de ligantes, comparamos a afinidade de um mesmo ligante em um dado sítio *i* do canal K-Shaw2 (fechado) com o B_i de uma outra conformação ou canal *j* ($j \in \{Shaw2_{open}, Kv1.2_{closed}\}$) segundo a equação 35:

$$\Delta B_i = B_i(Shaw_{closed}) - B_i(j) \quad [3.35]$$

Resultados e Discussão

"... one step closer to the end of the
begining."

-Erik Lindahl.

4. Resultados e discussão

4.1 PROCESSO DE ATIVAÇÃO DO Kv1.2

Logo após a publicação em 2005 da primeira estrutura tridimensional do canal de potássio, de mamífero, dependente de voltagem da família *Shaker* (Kv1.2³⁸), estudos de simulação *MD* foram empregados para caracterizar o estado ativado/aberto desse canal na membrana (figura 4.1).

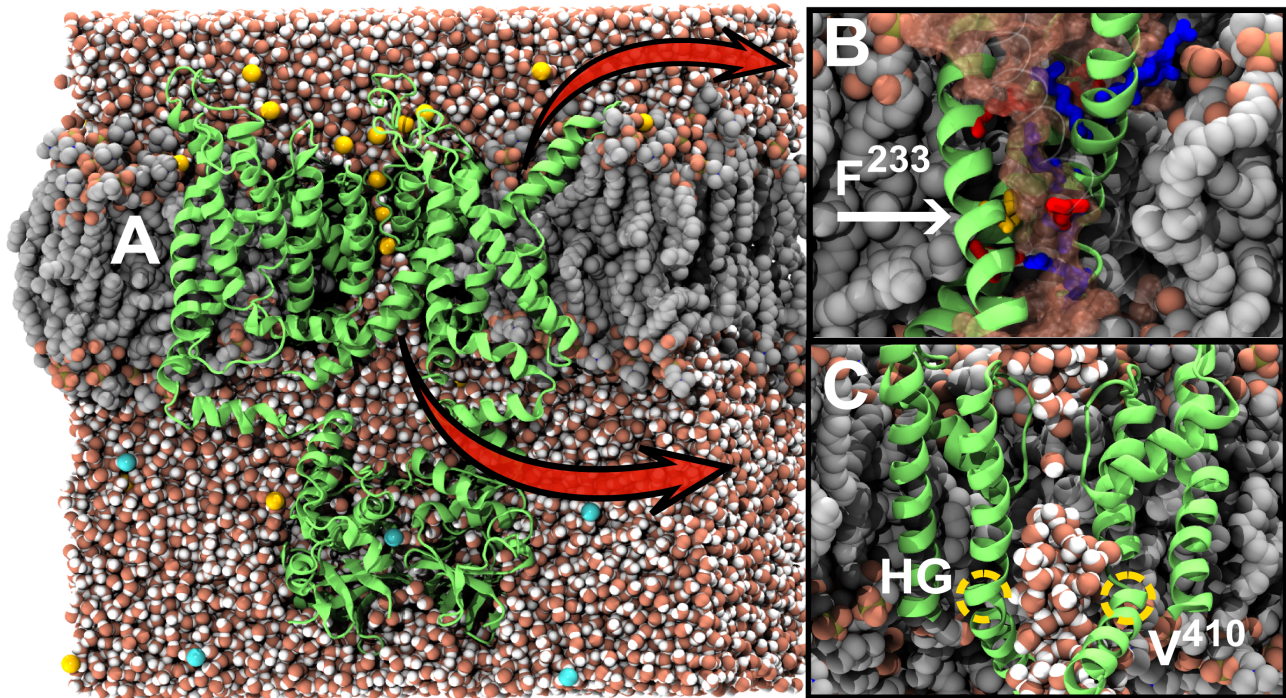


Figura 4.1. A: Vista frontal do canal Kv1.2 no estado ativado/aberto e equilibrado na membrana³⁹. A cadeia alifática dos fosfolipídios estão representadas como esferas cinzas. As moléculas e água são mostradas como esferas (oxigênio em vermelho claro). Os contra íons da solução são representados como esferas amarelas (íons K^+) e azuis ciano (íons Cl^-). Note os íons K^+ ocupando o filtro de seletividade iônica. B: Detalhe atômico do *VSD* ativado do Kv1.2. O resíduo conservado F^{233} está representado em amarelo. As águas de hidratação são representadas como uma superfície de acessibilidade ao solvente (vermelho claro). Resíduos básicos em azul e ácidos em vermelho. C: Detalhe molecular da hidratação do *PD*. A região do portão hidrofóbico ($HG = V^{410}$) está indicado em amarelo.

Esses trabalhos investigaram as propriedades eletrostáticas da proteína, i.e perfil de hidratação, perfil do campo eletrostático local (vide métodos tópicos 3.1.8 a 3.1.12) e focalização do campo elétrico (E). O conjunto de informações estruturais oriundos dos estudos de caracterização do estado

funcional ativado do *VSD* em membrana^{39,40}, foram requeridos para revelar os detalhes microscópicos subsequentes do processo de desativação do Kv1.2. Os resultados acerca da desativação do Kv1.2 alcançados pelo nosso grupo³⁷ determinou os detalhes atômicos desse processo partindo da conformação ativada do *VSD* do canal, adsorvido na membrana, e subjugado a uma diferença de potencial ΔV (Fig.3.6 vide metodologia tópico 3.1.10). Uma simulação de *MD* livre da ação de forças externas (do inglês *unbiased simulations*), com escala de tempo da ordem $\sim 2.2 \mu s$, foi requerida para detectar os estágios iniciais da desativação do *VSD* e caracterizar os intermediários desse processo (figura 4.2).

A medida de *gating charge* (Q) de canais *VGCC* é rotineiramente quantificada por experimentos de eletrofisiologia de alta resolução. Entretanto, a quantificação de Q em simulações computacionais é bastante recente na literatura^{43,44,103}. O método tradicional tem sido aplicado com sucesso em sistemas moleculares de canais *VGCC*, mas que entretanto, requer uma série de aproximações especialmente para o cálculo da distância elétrica. Curiosamente, a utilização da metodologia de desbalanço iônico desenvolvida por Treptow e colaboradores⁸⁶ permite calcular diretamente a carga transportada pela proteína através da capacitância da membrana polarizada⁴⁶. De fato, o canal responde à ΔV reorganizando os resíduos positivamente carregados da S4, sujeitos à ação do campo elétrico (E). Como o sistema membrana/canal é impermeável a íons, uma vez que o filtro de seletividade está artificialmente desativado durante a simulação, a reorganização dos *GQR* induz uma queda de voltagem no sistema que está diretamente relacionado à quantidade de Q transportada pela proteína. A vantagem de utilizar o método de desbalanço iônico é que neste, a única quantidade que precisa ser estimada é o potencial transmembrânico. Este por sua vez, é quantificado a partir de um perfil unidimensional de potencial elétrico em função da direção transmembrânica Z (vide metodologia tópicos 3.1.8 e 3.1.9). Para as condições utilizadas neste trabalho (tamanho do sistema, concentração iônica, vide metodologia tópico 3.1.10), ΔV pode ser estimado dentro de um erro de ~ 100 mV, que corresponde ao erro máximo de Q da ordem de ~ 0.3 carga elementar (e). De modo a caracterizar a resposta elétrica do sistema, a quantidade Q em relação ao tempo, i.e $Q(t)$, foi monitorada durante uma longa simulação de hiperpolarização. A figura 4.2 ilustra a variação de $Q(t)$ e indica uma intensa atividade elétrica do canal. A curva passa por três transições principais de *gating charge*, que é indicativo de transições conformacionais das *GQR*, sujeitas à força elétrica sobre o sistema devido à ΔV .

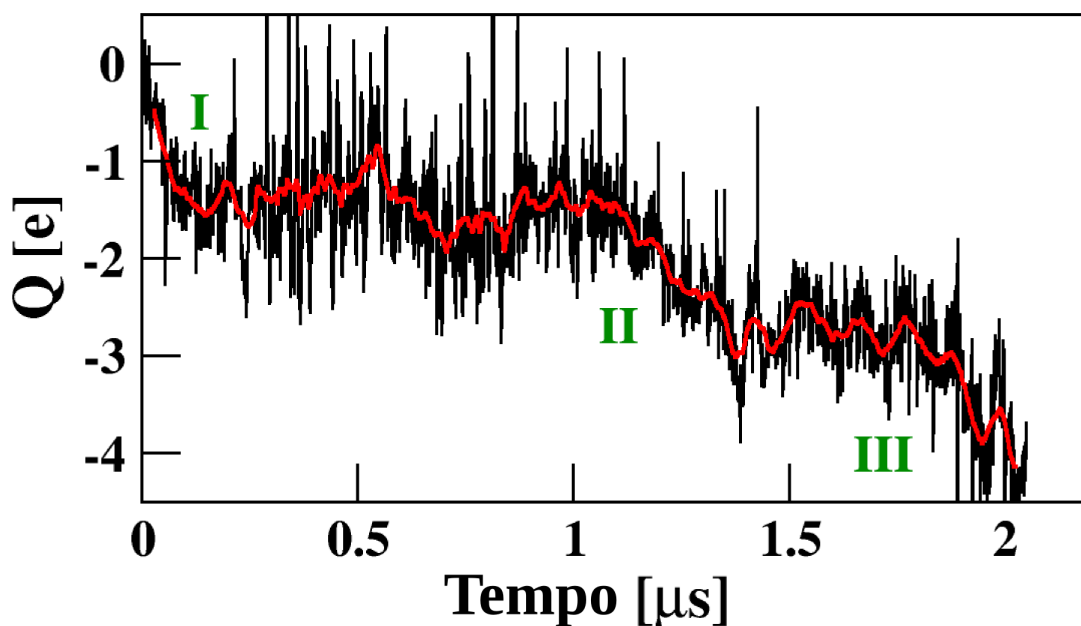


Figura 4.2. Evolução temporal da grandeza *gating charge*, i.e. $Q(t)$, durante 2.2 μs de uma simulação *MD* sobre ação de um campo elétrico oriundo do protocolo de desbalanço iônico. Note que, as transições principais do *VSD* da proteína, identificadas como I, II e III, são resultantes de uma queda de voltagem do sistema quando as cargas Q , dos resíduos carregados da hélice S4 do *VSD* do canal, são transportadas ao longo do campo elétrico transmembrânico.

Após observado essas transições de *gating charge* realizamos a caracterização estrutural das estruturas com *VSD* intermediários, ao longo do processo de desativação do canal. Em detalhe, durante esses três primeiros estágios o domínio do poro (*PD*) se mantém estável enquanto o domínio sensor de voltagem de todas as subunidades passam por transições estruturais que envolvem o movimento sequencial das *GQR* da hélice S4 através de uma rota bem definida em direção à face intracelular. Sob a ação de E , cada resíduo carregado da S4 desfaz uma interação eletrostática (*salt-bridge*) com o seu respectivo resíduo ácido, restabelecendo esse contato com o aminoácido negativo subsequente. A caracterização estrutural dos estados intermediários nos permitiu conhecer a regra de deslocamento das *GQR* dentro do *VSD* (figura 4.3).

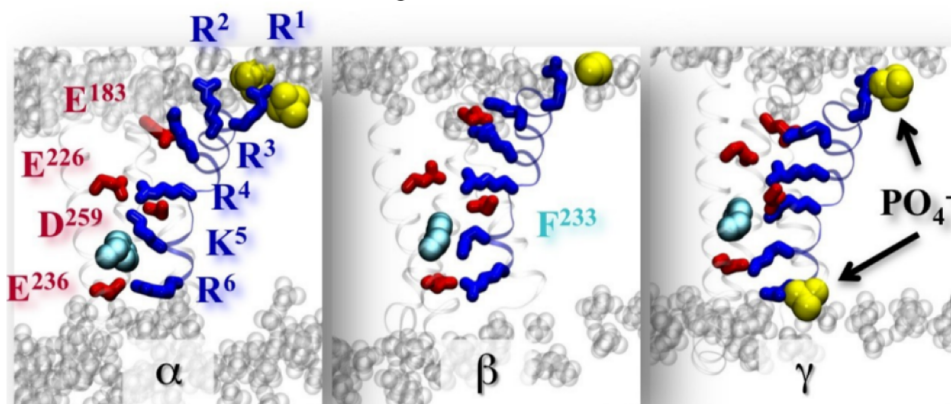
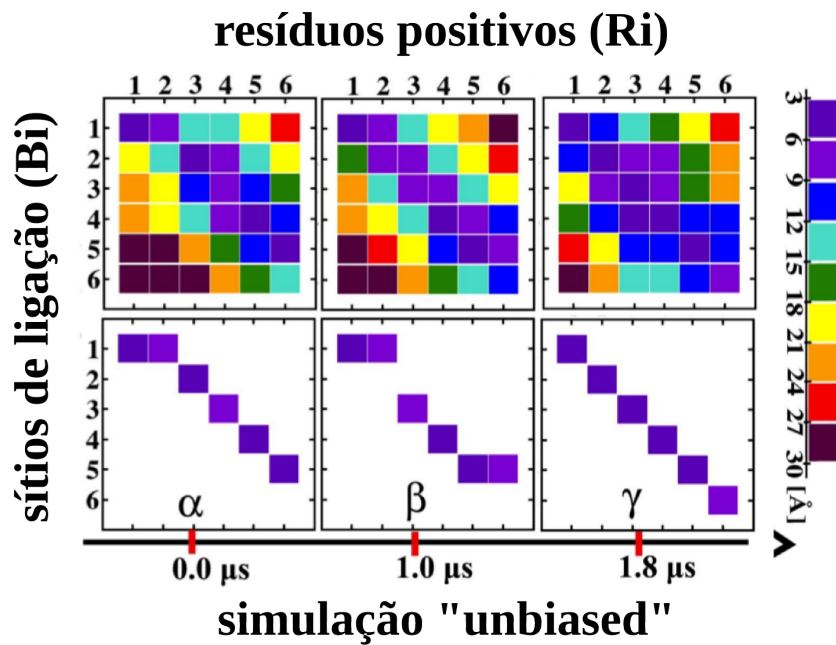


Figura 4.3. Painel superior: Conformações representativas do *VSD* (α , β , γ) obtidas das simulações *unbiased* foram caracterizadas pelas distâncias entre os grupos básicos da S4 (R_1 até R_6) e os grupos negativamente carregados (numerados de 1 a 6 para grupo PO_4^- extracelular, E^{183} , E^{226} , D^{259} , E^{236} , e grupo PO_4^- intracelular). As distâncias foram calculadas segundo tópico 3.1.13 da metodologia. As interações mais próximas da matriz são ressaltadas nos quadrados em roxo (distância entre os grupos de 3 a 9 Å). Perceba o movimento sequencial dos resíduos R_1 - R_6 em direção ao grupo fosforil intracelular. **Painel inferior:** Vista lateral evidenciando os detalhes moleculares do *VSD* em três configurações distintas destacando a posição dos resíduos básicos da S4 (bastões em azul) e os grupos negativamente carregados (bastões em vermelho). O resíduo conservado F^{233} da S2 é mostrado como esferas em azul ciano.

Durante a primeira transição de $Q(t)$, os quatro VSD relaxam para uma conformação metaestável denominada β (figura 4.4). Na transição subsequente, i.e *drop* II, novos rearranjos das ligações eletrostáticas ocorreram apenas na subunidade 1, que foi nomeado como estado γ . Por último, na terceira transição de $Q(t)$, i.e *drop* III, a mesma subunidade transitou para um estado ainda mais profundo de desativação do VSD que foi caracterizado como γ^+ . As mudanças conformacionais sequenciais do VSD de α até γ , que ocorreram especificamente na subunidade 1, fornecem uma coordenada de reação que descreve os primeiros eventos de transição do VSD durante o processo de desativação. Cada conformação do VSD é estabilizada por um número máximo de interações eletrostáticas entre os resíduos básicos da S4 e aqueles ácidos do restante do domínio (figura 4.3).

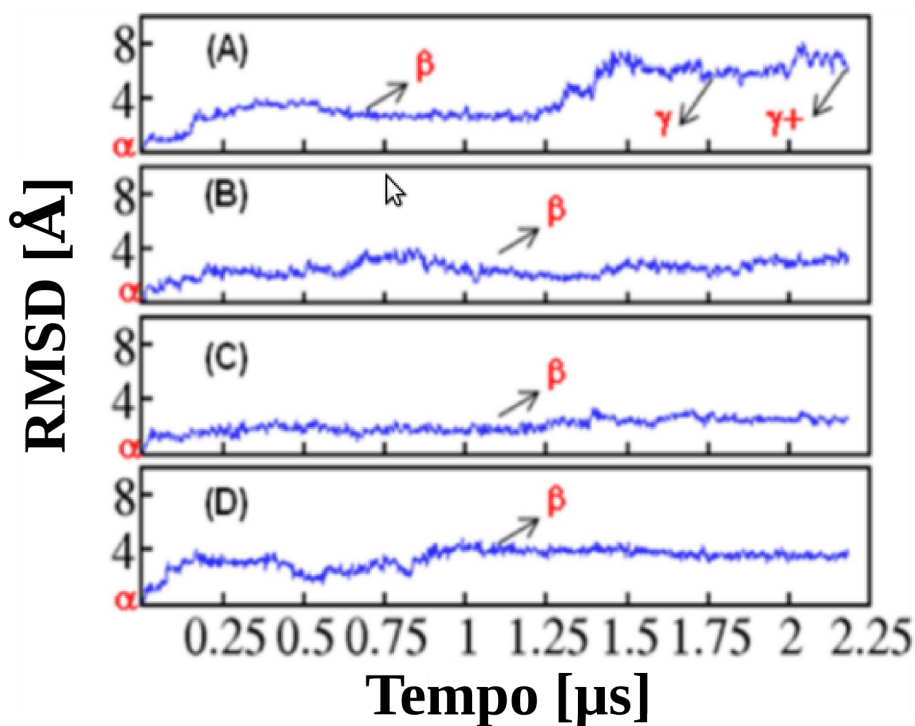


Figura 4.4. Perfis de desvio quadrático médio (do inglês *root mean square deviation RMSD*) do VSD das quatro subunidades de Kv1.2. Note que, em (A) o VSD da subunidade 1 passa por transições conformacionais significativas durante toda a trajetória de simulação MD , saindo de uma configuração α e chegando até γ^+ . As demais subunidades relaxam até o estado intermediário β e permanecem neste até o final da simulação.

Uma vez estabelecido a rota seguida pelo VSD ao longo da desativação, simulações de MD fora do equilíbrio, i.e pela aplicação de uma força externa a alguns átomos do sistema (do inglês *biased simulations*), através do método *steered dynamics* que é implementado no código de simulação NAMD (vide metodologia tópico 3.1.14), foram então empregadas para resolver os estágios finais desse

processo, em que os *GQR* foram direcionados a seguir a rota de contatos eletrostáticos até o estado desativado (figura 4.5).

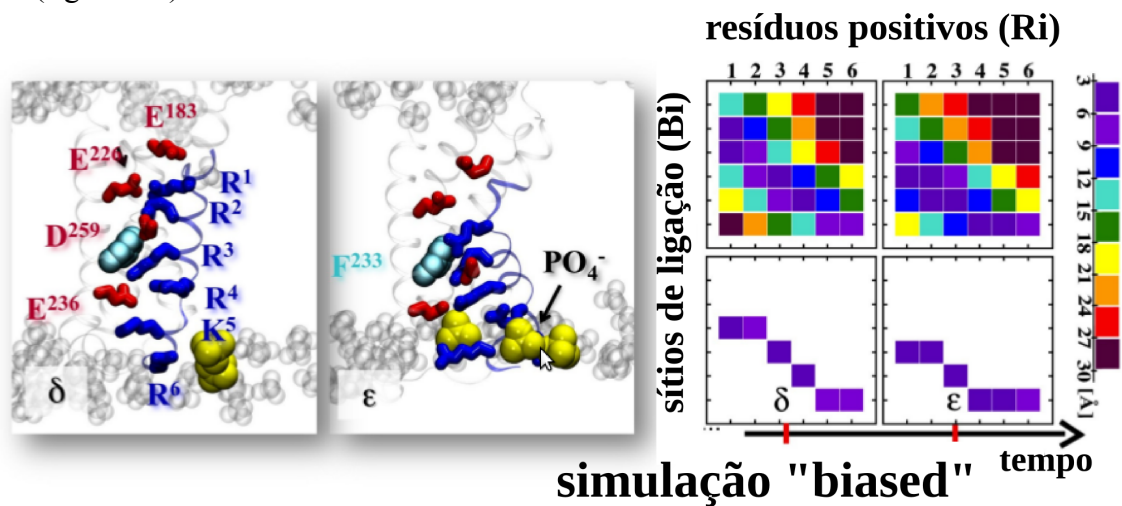


Figura 4.5. Painéis da esquerda e centro: Conformações representativas dos estados δ e ϵ obtidos pela aplicação de um potencial externo (simulação *biased*, vide metodologia tópico 3.1.14). **Painel da direita:** Matriz de contatos que mapeia a distância entre grupos carregados do *VSD* da proteína bem como de fosfolipídios intra e extracelulares. Os esquemas de cores seguem aqueles apresentados na figura 4.3.

A combinação dessas duas etapas de simulação, i.e. *unbiased* + *biased*, revelou os estados do *VSD* em distintas configurações de contatos eletrostáticos dos *GQR* na membrana: estado inicial ativado (α); três intermediários (β , γ e δ); e um estado final desativado ϵ . Durante o processo de desativação ~ -12.8 cargas elementares (e) foram transportadas pelo canal, em que a quantidade Q , calculada via contagem direta (Tabela 4.1) para cada transição conformacional do *VSD, foi respectivamente de $-0.45 e$ (α - β), $-4.35 e$ (β - γ), $5.3 e$ (γ - δ), e $2.7 e$ (δ - ϵ). Esse dado revela que a contribuição substancial para Q vem da hélice carregada S4 cujo intervalo de 12-14 e é encontrado para os modelos desativados de Kv1.2 em membrana.*

Tabela 4.1. Medida direta de Q para as conformações γ , δ e ϵ do *VSD* do canal Kv1.2.

Conformação	ΔV (Volts)	Área/lipídio (Å ²)	q_0^{ion} (e)*	$q_0^{proteína}$ (e)**	Q (e)***
α	-0.81 ± 0.05	16531.8	-36	28.5 ± 0.5	0.0
γ	-0.98 ± 0.05	17189.1	-48	37.3 ± 0.5	4.8 ± 0.3
δ	-0.95 ± 0.05	17196.7	-58	48.8 ± 0.5	10.1 ± 0.3
ϵ	-0.57 ± 0.05	16840.2	-60	54.6 ± 0.5	12.8 ± 0.3

* q_0^{ion} foi computado em relação ao centro da membrana.

** Capacitância da membrana $C = 0.9 \times 10^{-22} \text{ C.V}^{-1}.\text{Å}^{-2}$; ΔV corresponde à dif. de voltagem estimada sobre uma média retirada de 1ns de simulação.

** A quantidade Q total é computada segundo a eq. 3.25 considerando a conformação α como referência.

As simulações de *MD* aqui empregadas, identificaram que as propriedades elétricas inerentes ao funcionamento do *VSD*, i.e hidratação do domínio, morfologia e focalização do campo elétrico, se mantem praticamente inalteradas nas conformações intermediárias e desativada do *VSD*, em relação ao seu estado ativado funcional na membrana. Essas observações foram determinadas pela quantificação da grandeza física distância elétrica (sigla em inglês *ED*, δ_i^λ), que corresponde ao grau de acoplamento do potencial eletrostático local $\phi_i^\lambda(r_i)$ a que cada carga pontual q_i está sujeita, dado um ΔV ⁸⁷. A grandeza distância elétrica é analiticamente expressa como $\delta_i^\lambda \equiv \partial \phi_i^\lambda(r_i) / \partial V$, e vale ressaltar, que a análise do perfil de δ_i^λ em função da direção normal da membrana, i.e $\delta_i^\lambda(z)$, pode determinar a região de focalização de **E**. Os resultados aferidos para $\delta_i^\lambda(z)$ convergem para um comportamento sigmoide, para todas as conformações do Kv1.2, e indicam portanto, que **E** se mantém praticamente estático durante o processo de desativação (figura 4.6).

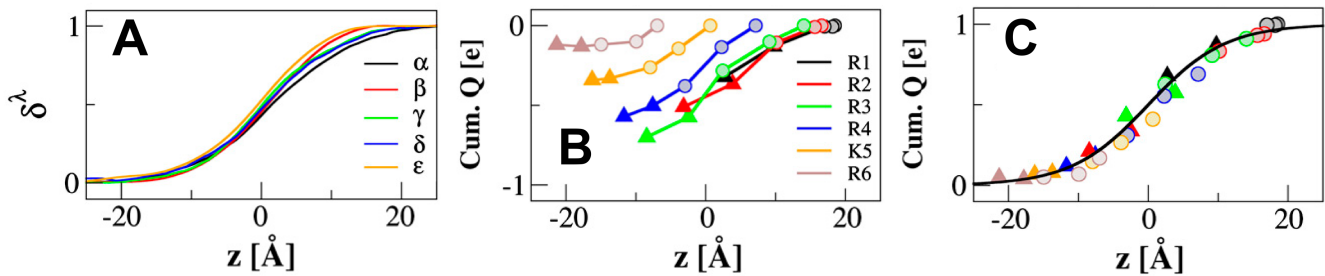


Figura 4.6 **A**: Distância elétrica em função da direção transmembrânica $\delta_i^\lambda(z)$ do *VSD* em cada conformação. **B**: *Gating charge* (Q) e a posição z dos resíduos básicos R₁-R₆ da hélice S4 das conformações α - ϵ do *VSD*. Os círculos representam os aminoácidos carregados positivamente que foram obtidos da simulação *MD unbiased* enquanto os triângulos são aqueles pertencentes às simulações *biased*. **C**: Curva de ativação geral (sigmoide) que descreve a dependência de Q à direção z .

Além disso, observou-se que o montante de ~70% de *gating charge* é transferido dentro de uma estreita janela de 20 Å em relação ao centro catalítico, um vez que **E** é maximamente focalizado nessa região, cujos deslocamentos dos *GQR* nas proximidades da F²³³ são responsáveis pelo transporte majoritário de Q ³⁷. Tomados em conjunto, esses resultados peculiares determinam que $\delta_i^\lambda(z)$ oferecem uma boa estimativa para a fração do campo elétrico a que cada resíduo está sujeito, e que varia significativamente apenas nas proximidades da região transmembrânica de maior focalização de **E**, indicativo portanto, de que essa propriedade independe da conformação do canal e sim da natureza elétrica do *VSD*. O conjunto desses resultados concorda com o modelo *sliding-helix* que vem sendo, na atualidade, aquele majoritariamente divulgado e aceito pela comunidade científica.

Atualmente existem alguns modelos para o estado fisiologicamente relevante do *VSD* desativado e com *PD* fechado em canais Kv (figura 4.7).

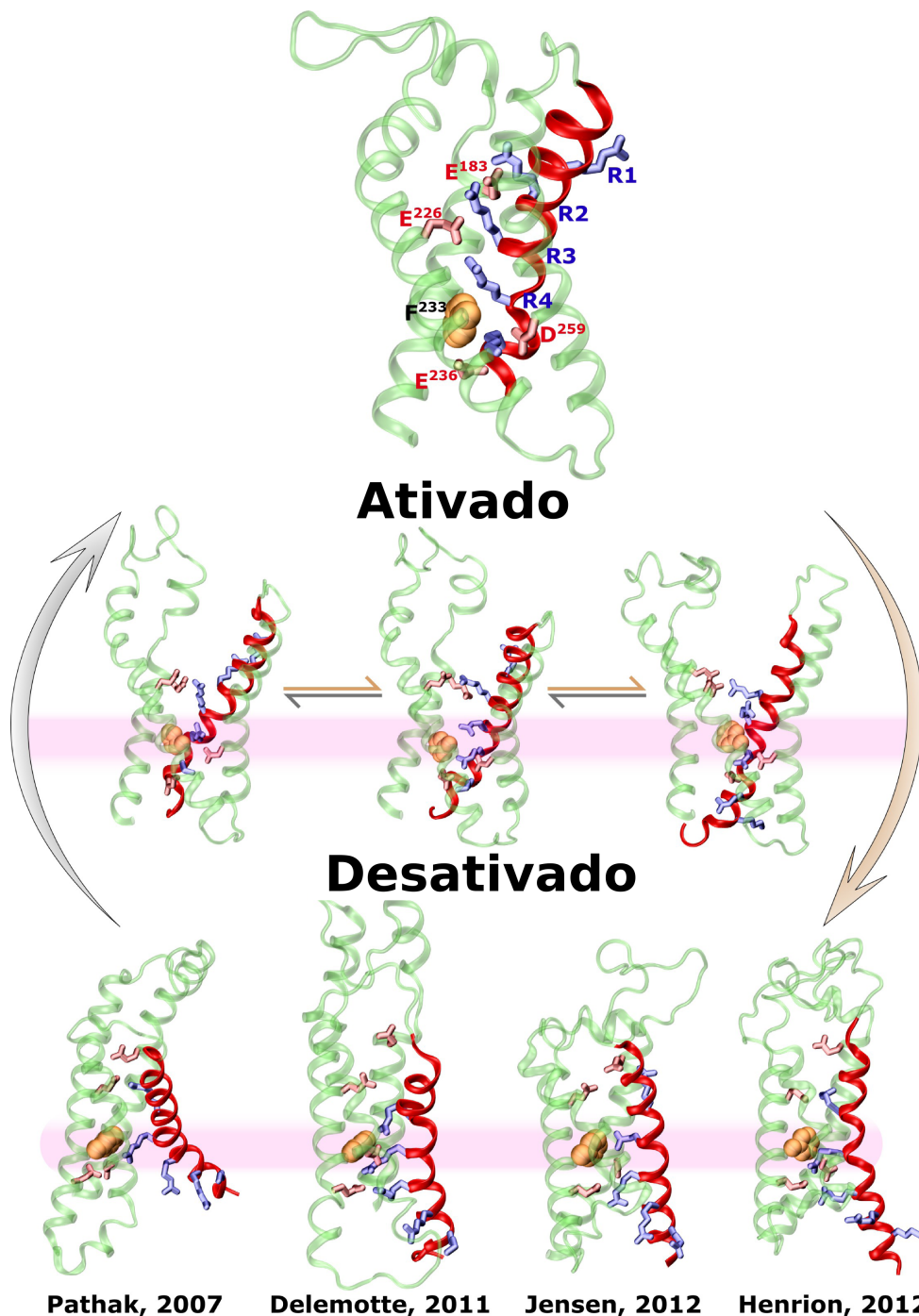


Figura 4.7. Detalhes moleculares das conformações ativada e desativada do *VSD*. S1-S3 (hélices verdes); S4 (hélice vermelha). **Superior:** *VSD* ativado do Kv1.2 equilibrado na membrana³⁹. **Centro:** três possíveis conformações intermediárias do *VSD* ao longo do caminho de ativação do canal. **Inferior:** Modelos do estado desativado do *VSD*. O deslocamento (da esquerda para direita) de $\sim 8 \text{ \AA}$, $\sim 15 \text{ \AA}$, $\sim 15 \text{ \AA}$ e $\sim 12 \text{ \AA}$ (C3) está associado a uma quantidade de *gating charge* (Q) que pertence ao intervalo experimental de 12-14 e (Modificado de Stock et al, 2013²¹).

No modelo de Pathak e colaboradores⁷² o centro de massa da hélice S4 está ~ 8 Å enterrado em direção à face intracelular em relação ao seu estado ativado. Nesse modelo, as interações eletrostáticas características do estado desativado ocorrem entre os resíduos R_1 e E^{226} (B_4), R_2 e o par E^{226} (B_4)/ D^{259} (B_5), além da R_3 estar ligeiramente inferior à B_5 . Já os modelos de Delemotte³⁷ e Jensen⁴⁵ revelam um maior deslocamento transmembrânico da S4, i.e. ~ 15 Å. Nestes últimos, a R_1 está enterrada profundamente dentro do *VSD* que satisfaz resultados experimentais mais atuais, os quais apontam a proximidade dos resíduos R_1 - R_4 ao centro catalítico representado pelo resíduo F^{233} (F^{290} no canal Kv1.2-Kv2.1 quimera)²⁸ onde os centros de massa dos aminoácidos positivo se encontram abaixo do centro da fenilalanina. O modelo proposto por Delemotte e colaboradores³⁷ mostra adicionalmente a interação da R_4 com o grupo PO_4^- intracelular. Finalmente, num modelo (C3) proposto por Henrion e colaboradores¹⁰⁴, o deslocamento da S4 é de ~ 12 Å em que os contatos eletrostáticos R_1 - E^{283} (E^{226} ou B_3 no Kv1.2) e R_2 - E^{293} (E^{236} ou B_5 no Kv1.2) estão situados respectivamente acima e abaixo do centro da F^{233} . No mesmo estudo, uma outra conformação do *VSD* (C4), apenas alcançada por meio de pulsos prolongados de hiperpolarização, foi considerada para reconciliar os resultados experimentais. No modelo C4, a hélice S4 está profundamente enterrada (~ 17 Å) o que favorece interações entre o par R_1 - E^{293} , todos abaixo do centro de massa do resíduo F^{290} (F^{233} no Kv1.2). Vale ressaltar, que o conjunto de estruturas supracitadas reconcilia muitos dos dados aferidos experimentalmente como sugerido por um recente estudo investigando a natureza consensual da maioria dos modelos do estado desativado de *VSD* atualmente disponíveis na literatura²⁰.

Desenvolver um entendimento geral sobre o mecanismo de ativação de canais VGCC no nível atômico molecular requer o conhecimento da estrutura das conformações ativada/desativada. Apesar de haver uma estrutura cristalográfica de alta resolução para o estado com *VSD* ativado e poro aberto para um canal iônico dependente de voltagem, ainda não existe até o presente momento o mesmo dado para o estado com *VSD* desativado e poro fechado. Esse cenário tem motivado inúmeros esforços da comunidade científica internacional, que utiliza a modelagem molecular avançada e as simulações computacionais, a contribuir com essa informação que falta. Os estudos computacionais tem utilizado diversas estratégias para investigar o problema como os modelos Rosetta¹⁰⁵, um método de dobramento de proteínas que utiliza bancos de sequencias e potenciais estatísticos, e as simulações de dinâmica molecular que permite a propagação da trajetória de um conjunto de átomos no tempo, a partir das equações Newtonianas clássicas do movimento, utilizando para isso um campo de força com tratamento explícito dos átomos do sistema. Notavelmente, apesar das inúmeras variações de metodologias computacionais empregadas, uma comparação atualizada da literatura dos resultados até

então de simulações computacionais revelam que finalmente está emergindo um consenso sobre o mecanismo de ativação de canais *VGCC*¹⁰⁶.

Até então, os modelos do estado desativado/fechado dos canais iônicos Kv ou foram refinados pela imposição de distâncias dos pares de resíduos dos *VSD*, consistentes com valores aferidos experimentalmente^{32,37,69,107}, ou então pela modelagem explícita das cadeias laterais seguindo experimentos que empregam mutações sítio dirigidas para formação de ligações dissulfeto, ou ligações metálicas pela imposição de metais de transição^{20,104}. Mais recentemente, Jensen e colaboradores⁴⁵, empregando uma simulação computacional revolucionária, da ordem de centenas de microssegundos, conseguiram observar a transição conformacional completa do canal Kv1.2 sobre a ação de uma diferença de voltagem transmembrânica. Assim como em simulações anteriores, potenciais hiperpolarizados de ~ -750 mV foram aplicados para reduzir o tempo requerido para a completa transição dos estado ativado/aberto para o desativado/fechado. Em uma das simulações, entretanto, a mesma transição foi observada empregando-se um potencial hiperpolarizado mais moderado de ~ 350 mV. Essa longa simulação computacional, cuja ordem de grandeza é três vezes superior à atual capacidade computacional dos principais grupos mundiais que utilizam simulações computacionais, revelou uma estrutura potencialmente relacionada ao estado desativado/fechado de um canal dependente de voltagem da família Kv, e que se reconcilia com outros modelos previamente publicados, obtidos por estratégias independentes^{32,37,44,69,72,103,104,107}. Esse resultado é particularmente animador uma vez que dá grande suporte aos resultados anteriores sobre a estrutura consenso de um canal *VGCC* na sua forma desativada (*resting state*).

Os estudos de *MD* até aqui apresentados na forma da caracterização de estados conformacionais do Kv1.2 ao longo do seu caminho de ativação, serviram de valiosa fonte estrutural para modelagem de outros canais membros da família *VGCC* como os Nav, a partir das estruturas cristalográficas de canais sódio que recentemente tem sido disponibilizadas na literatura^{66,108,109}. Além disso, o conjunto de resultados aqui apresentados contou com a parceria internacional dos pesquisadores Mounir Tarek e Michael L. Klein, investigadores principais, respectivamente da Universidade de Nancy (França) e *Temple University* (Filadélfia, EUA), e foi publicado no prestigioso jornal científico internacional *PNAS*³⁷. O artigo completo referente a este trabalho encontra-se no anexo I.

Anexo I

Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations

Lucie Delemotte^a, Mounir Tarek^{a,1}, Michael L. Klein^{b,1}, Cristiano Amaral^c, and Werner Treptow^{c,1}

^aEquipe de Chimie et Biochimie Théoriques, Unité Mixte de Recherche Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Nancy, 54506 Nancy, France; ^bInstitute of Computational and Molecular Science, Temple University, Philadelphia, PA 19122; and ^cLaboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília DF, Brasília City, 70910-900 Brazil

Contributed by Michael L. Klein, February 18, 2011 (sent for review December 21, 2010)

The response of a membrane-bound Kv1.2 ion channel to an applied transmembrane potential has been studied using molecular dynamics simulations. Channel deactivation is shown to involve three intermediate states of the voltage sensor domain (VSD), and concomitant movement of helix S4 charges 10–15 Å along the bilayer normal; the latter being enabled by zipper-like sequential pairing of S4 basic residues with neighboring VSD acidic residues and membrane-lipid head groups. During the observed sequential transitions S4 basic residues pass through the recently discovered charge transfer center with its conserved phenylalanine residue, F²³³. Analysis indicates that the local electric field within the VSD is focused near the F²³³ residue and that it remains essentially unaltered during the entire process. Overall, the present computations provide an atomistic description of VSD response to hyperpolarization, add support to the sliding helix model, and capture essential features inferred from a variety of recent experiments.

gating charge | S4 helix | voltage-gated channel

Voltage sensor domains (VSDs) are membrane-embedded constructs, which work as electrical devices responding to changes in the transmembrane (TM) voltage. They are ubiquitous to voltage-gated channels (VGCs) in which four of these units are attached to the main pore (1). During channel activation, the displacements of the charges tethered to the VSD give rise to transient “gating” currents, the time integral of which is the “gating charge” (GQR) translocated across the membrane capacitance. Phenomenological kinetic models devised to describe the time course of such currents are very diverse but all indicate that during VGC activation, the VSD undergoes a complex conformational change that encompasses many transitions (2–5).

Three main models have been proposed to rationalize the transfer of a large GQR across the low dielectric membrane in VGCs (6, 7). All are associated with the motion of S4, the conserved highly positively charged helix of the VSDs (8). In the *sliding helix* model (9, 10), the positively charged (basic) residues of the S4 segment form sequential ion pairs with acidic residues on neighboring TM segments and move a large distance perpendicular to the membrane plane. The *transporter* model derives from measurements of a focused electrical field within the membrane and suggests that during activation, the latter is reshaped. Accordingly, it is posited that S4 does not move its charges physically very far across the membrane (8). A third model was introduced following publication of the KvAP structure (11). Here, the position of the S3-S4 helical hairpin with respect to the pore domain suggested a gating mechanism in which the hairpin moves through the membrane in a *paddle*-like motion translocating S4 basic residues across the membrane, and reaching a TM position only in the activated state. Crystal structures of the Kv1.2 channel (12) and the Kv1.2-Kv2.1 paddle chimera (13) indicated later that the KvAP structure likely represented a nonnative state of the channel and its VSD (14). The newer structures also provided the opportunity to develop molecular

models of the VSD response, most of which have converged toward the *sliding helix* model with S4 motion of 5–10 Å (15). Although the latter is much larger than proposed in the transporter model, this S4 displacement is below the estimate from avidin binding experiments, which suggested that KvAP S4 amino acids move as much as 15–20 Å across the membrane (16). Recently, charge reversal mutagenesis (17) and disulfide locking (18) were used to probe pair interactions within the VSD of different VGCs. Also, mutations with natural and unnatural amino acids, electrophysiological recordings, and X-ray crystallography were combined to identify a *charge transfer center* that facilitates the movement of positively charged amino acids across the membrane field (19). This important work enabled a dissection of VSD movements and their relation to ion channel opening. These experiments demonstrated the existence of the sequential ion pair formation involving the S4 basic residues, an essential feature of the sliding helix model.

Here, we employ molecular dynamics (MD) simulations in atomic detail to investigate the structure of the VSD transition states of the Kv1.2 channel embedded in a lipid bilayer subjected to a hyperpolarized potential. The structure of the channel in its open conformation (VSD up state, α) has been thoroughly examined in previous MD simulations performed in the absence of a depolarized TM potential ($\Delta V = 0$ mV) (20). Here, an unconstrained MD simulation has been carried out on a Kv1.2 channel embedded in a 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) bilayer while being subjected to a hyperpolarized TM voltage, ΔV , applied via a charge imbalance protocol (21, 22) (Fig. S1). This 2.2- μ s MD trajectory starting from the up state, α , has uncovered the initial steps of the VSD response to ΔV , which involves two intermediate states (β , γ). Specifically, the VSD is observed to undergo transitions that involve a zipper-like motion of the six S4 basic residues (R1, R2, R3, R4, K5 and R6), in a sequential ion pairing with nearby VSD acidic residues and the membrane-lipid head groups. The final stages of the VSD response were uncovered by using biased-MD simulations, in which the S4 basic residues were constrained to move along the spontaneously initiated pathway until reaching the down state (ϵ) of the VSD. The combined MD simulations unveil and characterize five distinct states of the VSD that are involved in the deactivation process: the initial up state, α ; three intermediate states, β , γ , δ ; and the down state, ϵ .

Author contributions: M.T., M.L.K., and W.T. designed research; L.D., C.A., and W.T. performed research; L.D., C.A., and W.T. analyzed data; and L.D., M.T., M.L.K., and W.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: mounir.tarek@uhp-nancy.fr, mlklein@temple.edu, or treptow@unb.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1102724108/-DCSupplemental.

Results

Electrical Response. The electrical response of the system to a hyperpolarized potential ΔV was characterized by monitoring $Q(t)$, the total GQR associated with the displacement of all charges in the system with respect to the membrane capacitor. To do so, and as in electrophysiology experiments, the ionic current through the main alpha pore was inhibited throughout the MD simulations by imposing harmonic constraints on the selectivity filter backbone residues. Fig. 1 reports the variation of the GQR and indicates a substantial channel electrical activity: $Q(t)$ undergoes three major drops (I, II, and III) occurring approximately at $t = 0.2 \mu\text{s}$, $1.6 \mu\text{s}$, and $2.0 \mu\text{s}$, respectively, with associated gating charges $Q(t)$ approximately $-1.4 e$, $-1.3 e$, and $-1.0 e$ ($\pm 0.3 e$), respectively.

VSD Conformational States. Throughout the MD simulation the Kv1.2 pore domain remained very stable, but the VSD undergoes substantial conformational changes involving zipper-like motion of the salt pairing interactions. The modifications accounting for the largest $Q(t)$ variations (drops I to III in Fig. 1A) involved salt-bridge rearrangements within the VSDs as a result of the S4 basic residues moving from external to internal binding sites along the domain. These binding sites are specifically the acidic amino acids of segments S1 through S3 (E^{183} , E^{226} , D^{259} , and E^{236}) and the PO_4^- moieties of the lipid head groups of the outer and inner bilayer leaflets (Fig. 1C). In order to correlate the changes in $Q(t)$ during the unconstrained MD simulation with these ion pair rearrangements, we monitored the matrix of distances between the centers of the charged moieties of the S4 basic residues and those of the acidic countercharges (Fig. 1B), along with the rmsd of the salt pair distances for each conformation, calculated using Eq. S10 (Fig. S2). During the first $Q(t)$ drop, the four VSDs relaxed from the initial α -state toward a metastable β -state. The latter bears a strong similarity with the inter-

mediate kinetic state previously identified in independent work (22–24). In the subsequent $Q(t)$ drop (II), the VSD of subunit 1 underwent further salt-bridge rearrangements, which led to yet another state, called here γ , lasting for over $0.5 \mu\text{s}$. Then, in the third $Q(t)$ drop (III), the same VSD underwent yet another conformational change.

The sequential conformational changes, $\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$, of the VSDs, and especially that of subunit 1, provide a reaction pathway for the first transition events occurring in the voltage-sensing process. In the latter, each conformation α , β , and γ is stabilized by a maximum number of salt bridges between the S4 basic residues and negative residues of the VSD or PO_4^- moieties of the lipids (Fig. 1C and Fig. S3). To uncover the complete VSD response from the up state (α) to the down state (ϵ), biased MD was used to simultaneously drag all the charged moieties of the basic residues from a given binding site to the next along the downstream path (see *Materials and Methods*). Along the biased-MD trajectory between the γ and ϵ states, a fourth VSD conformation was identified, called here the δ -state, which is also characterized by a specific network of salt bridges (Fig. 1B and C). Equilibration MD runs, each spanning approximately 15 ns, confirmed the structural stability of these additional VSD structures, for which the distance matrix rmsd profile converged to a value $< 2.4 \text{ \AA}$ (Fig. S2). Together with β and γ , the conformation δ was therefore considered as yet another possible intermediate state of the VSD. The electrostatic network (Table S1) stabilizing the VSDs in ϵ agrees with electrophysiology experiments (25). The conformation in state ϵ bears strong similarities with the molecular models of the VSD down state of Kv1.2 that have been proposed previously (15, 26–28). However, the present model places R1 in a lower position. Indeed, whereas R1 was initially thought to be engaged in a salt bridge with E^{226} in the resting state, recent evidence has appeared, showing that R1 is likely lower (19). To further validate the resting state of the

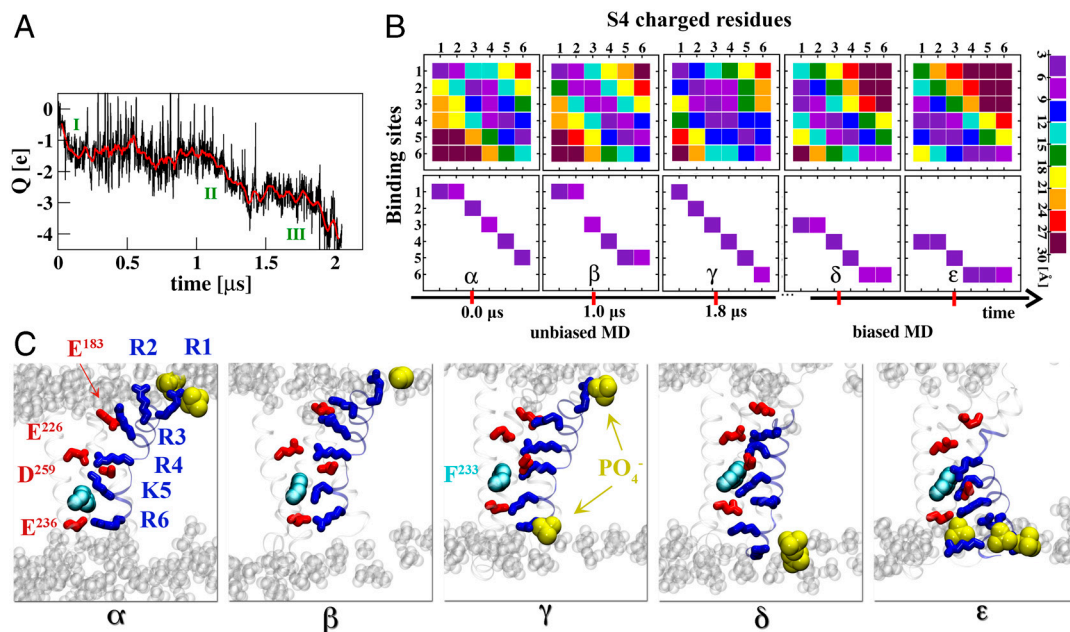


Fig. 1. Intermediate states of the VSD. (A) Evolution of the Kv1.2 channel gating charge, $Q(t)$, along the 2.2- μs unbiased MD trajectory. Major $Q(t)$ transitions are shown as I, II, and III. The standard error on each estimation of the TM voltage amounts to ± 50 mV. (B) Representative conformations (α , β , γ , δ , and ϵ) of the VSDs revealed during the unbiased and subsequent biased-MD simulations were characterized by monitoring the distances (cf. *SI Text*) between the S4 basic residues (numbered 1 to 6 for R1, R2, R3, R4, K5, and R6, respectively) and their binding sites (numbered 1 to 6 for top PO_4^- , E^{183} , E^{226} , D^{259} , E^{236} , and bottom PO_4^- , respectively). The distances were calculated between the geometrical centers of the side chain atoms $\text{H}_2\text{N} = \text{C}_\alpha(\text{NH}_2)\text{-N}$, $\text{H-C}_\beta\text{H}_2$ (Arg), $\text{H}_3\text{N-C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{H}_2$ (Lys), $\text{HOOC}_\gamma - \text{C}_\beta\text{H}_2$ (Asp), $\text{HOOC}_\delta - \text{C}_\gamma\text{H}_2$ (Glu), and the lipid phosphate group PO_4^- from a representative conformation and averaged over all four subunits of the channel. (Bottom) The closest interacting pairs are shown. Note the zipper-like motion in which, for successive transitions, the pairs involving S4 basic residues are formed with lower countercharges. (C) Molecular views of the VSDs in the five key conformations highlighting the position of the S4 basic residues (blue sticks) and the salt bridges they form with the acidic residues (red sticks) of the other VSD segments or with the lipid head group PO_4^- moieties (yellow). The highly conserved residue F^{233} of S2 is shown as cyan spheres.

VSD, we have evaluated the GQR associated with the transition from α to ϵ . The latter, most appropriate to compare with electrophysiology, is associated with the whole channel deactivation and amounts to $12.8 \pm 0.3 e$ (Table S2), which is in good agreement with values obtained for *Shaker*-like channels (12–14 e) (29–31). The position of S4 basic residues in ϵ were further checked by probing the effect of mutations of the arginines, R1 and R2. In agreement with electrophysiology experiments (32), only the mutation of R1 into an uncharged homologue led to the destabilization of the VSD and to the appearance of an omega leak current through the latter under hyperpolarized voltages (33).

S4 Displacement. The position of the geometrical center of the charged moieties [$H_2N = C_\alpha(NH_2)-N_\epsilon H-C_\delta H_2$ (Arg), $H_3N_\epsilon-C_\epsilon H_2$ (Lys)] (Fig. 2A) and of their C_α backbone atoms (Fig. 2B) with respect to the center of the bilayer show that during the $\alpha \rightarrow \epsilon$ transition, the S4 backbone atoms undergo a substantial downward translation, estimated in the range of 10–15 Å, as the charged moieties move between 15–20 Å across the membrane to satisfy their electrostatic interactions with the counter charges. We monitored additionally the rigid body motion of the backbone atoms of the segment comprising residues R²⁹⁴ (R1) through R³⁰³ (R4) of S4. The center of mass of this segment moves downward (approximately 12 Å) as the VSD undergoes the four transitions, between the end states (Fig. 2C). When viewed from the extracellular face of the membrane, this S4 motion is accompanied by a slight helical tilt (approximately 15°); i.e., in state ϵ , S4 becomes slightly more perpendicular to the bilayer compared to state α , as described in early FRET and luminescence resonance energy transfer experiments (34, 35), a moderate clockwise helical precession (approximately 45°) and a

significant counterclockwise helical twisting (approximately 90°) (Fig. 2D–F). In agreement with other molecular models, significant overall translation of S4 does not occur before the rotation of its top (24, 26, 36). In spite of significant TM displacement, the S4 side chains move relative to a rather static transfer center during the process (Fig. 2H).

Lipid Participation. Recent studies have pointed to the crucial role the charges of lipid head groups may play in modulating the gating of VGCs. The presence or absence of the PO_4^- groups was shown to have a dramatic influence on VGC function: The activation of K^+ VGCs may indeed be suppressed when the channels are embedded in bilayers formed by cationic lipids (37). Removal of the lipid head groups by enzymes also results in an immobilization of the VSD motion, thereby inhibiting VGC function (38, 39).

Here, as inferred from electrophysiology experiments, we show that lipids, and in particular their negatively charged PO_4^- head group moieties, provide countercharges for the S4 basic residues, during the gating process. Although earlier molecular models of the VSD (22, 24, 27) have shown that lipids from the upper and lower bilayer leaflets stabilize, respectively, the activated and resting states of the VSD, this study provides evidence that lipids also play this role in the intermediate states (Fig. 1C and Fig. S3).

Electrostatic Properties. The TM-electric field is by essence the driving force for the response to membrane polarization (Fig. 3). In the presence of a TM field, a number of protein tethered charges cross the field giving rise to the experimentally measured gating charge, Q . In the following, we use the five states of the VSDs to gain further insights on the molecular/electric properties of the domain accounting for Q . For a structure undergoing a general $\alpha \rightarrow \beta$ transition under ΔV , the gating charge Q may be linked (22, 40–43) to the variation of the free energy of the channel: $Q \cdot \Delta V = \Delta G(\beta, \Delta V) - \Delta G(\alpha, \Delta V)$, in which $\Delta G(\lambda, \Delta V) = G(\lambda, \Delta V) - G(\lambda, 0) = \Delta V \cdot \sum_i q_i \cdot \delta_i^\lambda$ is the excess free energy in each conformation, λ due to the applied potential ΔV . δ_i^λ is the so-called “electrical distance” of the residue, i . It accounts for the degree of coupling between the local electrostatic potential $\phi_i^\lambda(r_i)$ felt by q_i located at r_i and ΔV and is expressed as $\delta_i^\lambda \equiv \partial \phi_i^\lambda(r_i) / \partial V$.

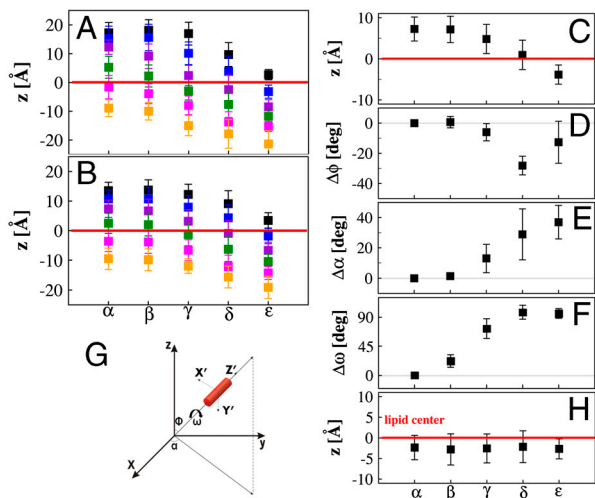


Fig. 2. Extent of S4 motion. (A and B) Positions of the S4 basic residues R1 (black) through R6 (orange) with respect to the membrane center ($z = 0$). (A) Positions of the geometrical center of the charged moieties. (B) Positions of the main-chain C_α atoms. (C to G) Rigid-body movements of the S4 segment along the $\alpha \rightarrow \epsilon$ transition. Only the backbone atoms of the S4 residues R1 through R4 were included in the calculation. (C) Position of the segment center of mass with respect to the membrane center ($z = 0$). (D) Tilt $\Delta\phi$ with respect to z , the bilayer normal. (E) Precession $\Delta\alpha$ around z , and (F) rotation $\Delta\omega$ about the helical main axis Z' calculated as $\Delta\phi_i = \phi_i - \phi_{\alpha i}$, $\Delta\alpha_i = \alpha_i - \alpha_{\alpha i}$, and $\Delta\omega_i = \omega_i - \omega_{\alpha i}$, where $i = \{\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon\}$. The S4 motions were determined after elimination of overall rotation and translation of the VSD structures, by fitting the gating charge binding sites (E¹⁸³, E²²⁶, D²⁵⁹, and E²³⁶) over the structures. (G) Coordinate systems and definition of various angles. (H) TM position (z) of the geometrical center of side chains of the charge transfer center residues (D²⁵⁹, E²³⁶, and F²³³) in each of the VSD conformational states. All the data were computed from the representative conformations considered in Fig. 1 and averaged over the four VSD subunits, with the error computed as the standard deviation from this average value.

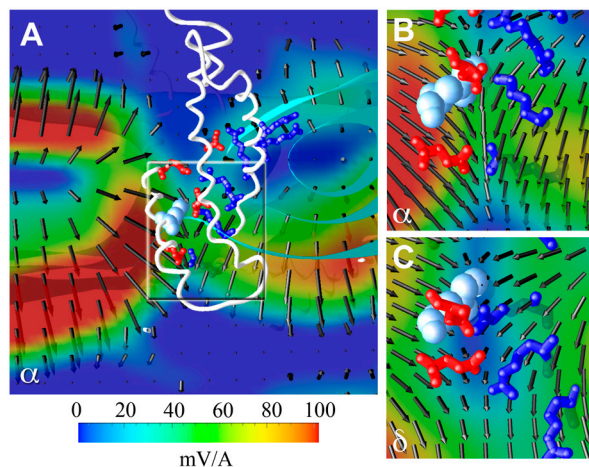


Fig. 3. Electric field maps under a hyperpolarized TM potential in representative VSD conformations α and δ . (A) A representative Kv1.2 (α) VSD is located in the center of the panel and for clarity, only its backbone atoms (white ribbons), the conserved F²³³ residues (cyan spheres) and the basic (blue sticks) and acidic (red sticks) residues of its TM domain are shown. The local electric field direction is shown as black arrows. Closeup view of the charge transfer center region in the α (B) and δ (C) states highlighting the electric field pointing downward and rationalizing the downward movement of the basic residues of S4.

experiments (16) than previous models (15). The molecular conformations of the identified transition states are therefore consistent with the sliding helix model. Importantly, the states identified in the present MD simulations agree with the recent proposal that the VSD transitions involve sequential passage of the S4 basic residues through a catalytic center involving the conserved F²³³ residue and based on this mechanism, it was posited that the VSD can adopt five conformational states (19).

Perhaps the most interesting feature revealed by the present MD study is in the analysis of the electrical activity of the channel and the finding that the cumulative gating charge transported by the S4 basic residues can be described by a unique function, which defines the electromechanical coupling mechanism that the VSD charges undergo. Although in agreement with previous phenomenological models this coupling results from a focused electric field within the domain, the shape and intensity of which is hardly modified during deactivation. Although final conformations of the sensor have been generated using biased-MD simulations, the ones resulting from the unbiased MD trajectory contained enough information to reconstruct such a coupling (Fig. 4F), which strengthens confidence in our findings.

The molecular mechanism underlying voltage sensing has remained a matter of debate. The present computational study favors the sliding helix model and provides a molecular description of three intermediate states of the VSD. Though the present results are specific to the VSD of the Kv1.2 channel, they likely can be generalized to other VGCs. When combined with electrophysiology measurements, they should allow a better characterization of the molecular mechanisms implicated in the S4 residue mutations that underlie certain channelopathies.

Materials and Methods

Molecular Dynamics. The MD simulations were carried out using the program NAMD2 (46), using now well-established simulation parameters (see *SI Text* for more information). The water molecules were described using the TIP3P model (47). The simulation used the CHARMM22-CMAP force field for the protein (48, 49) and CHARMM27 for the phospholipids (50). A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the POPC lipid molecules (51). The TM voltage was imposed by explicit ion dynamics, and the creation of air/water interfaces (21, 22). The ionic current through the main alpha pore was inhibited during the simulation by imposing harmonic constraints on the backbone atoms of the selectivity filter.

Biased-MD Simulation—Generation of States δ and ϵ . Further conformational change was triggered by applying “moving” harmonic constraints on the charged moieties of the S4 basic residues directed toward the charged group of the next binding sites (magnitude 1 kcal/mol/Å² and velocity of 0.00003 Å/fs) (cf. *SI Text* for details). The charged moieties correspond here to the side chain atoms H₂N = C_ε(NH₂)-N_ε-H-C_β-H₂ (Arg), H₃N_ε-C_ε-H₂ (Lys), HOOC-C_β-H₂ (Asp), HOOC_δ-C_γ-H₂ (Glu) and the lipid phosphate group, PO₄⁻. During this procedure, the C_α atom position of the protein’s negative binding site was fixed by “static” harmonic constraints. Moreover, to avoid spurious effects on the channel structure, this whole procedure was performed slowly, throughout successive cycles involving short MD runs (approximately 1 ns) with harmonic constraints turned on followed by equilibration (approximately 1 ns).

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported in part by the National Institutes for Health and performed using High-Performance Computing resources from Grand Equipement National de Calcul Intensif—Centre Informatique National de l’enseignement supérieur (Grant 2010-075137) and TeraGrid. W.T. thanks the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for support under Grant 141009/2009-8.

- Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer, Sunderland, MA), 2nd Ed.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol* 103:321–362.
- Schoppa NE, Sigworth FJ (1998) Activation of shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channel. *J Gen Physiol* 111:313–342.
- Baker OS, Larsson HP, Mannuzzu LM, Isacoff EY (1998) Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in Shaker K channel gating. *Neuron* 20:1283–1294.
- Sigg D, Bezanilla F, Stefani E (2003) Fast gating in the shaker K⁺ channel and the energy landscape of activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7611–7615.
- Blaustein RO, Miller C (2004) Shake, rattle or roll. *Nature* 427:499–500.
- Horn R (2000) Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* 39:15653–15658.
- Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 80:555–592.
- Catterall WA (1986) Voltage-dependent gating of sodium channels: Correlating structure and function. *Trends Neurosci* 9:7–20.
- Guy HR, Seetharamulu P (1998) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:508–512.
- Jiang Y, et al. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33–41.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897–903.
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376–382.
- Lee S-Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R (2005) Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15441–15446.
- Catterall WA (2010) Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67:915–928.
- Ruta V, Chen J, MacKinnon R (2005) Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123:463–475.
- Wu D, et al. (2010) State-dependent electrostatic interactions of S4 arginines with E1 in S2 during Kv7.1 activation. *J Gen Physiol* 135:595–606.
- DeCaen PG, Yarov-Yarovoy V, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA (2009) Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22498–22503.
- Tao X, Lee A, Limapichat W, Dougherty DA, MacKinnon R (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science* 328:67–73.
- Treptow W, Tarek M (2006) Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys J* 90:L64–L66.
- Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Phys Chem B* 112:5547–5550.
- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131:2107–2110.
- Nishizawa M, Nishizawa K (2008) Molecular dynamics simulation of Kv channel voltage sensor helix in a lipid membrane with applied electric field. *Biophys J* 95:1729–1744.
- Bjelkmar P, Niemelä P, Vattulainen I, Lindahl E (2009) Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel. *PLoS Comp Biol* 5:e1000289.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2005) Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* 45:379–388.
- Pathak MM, et al. (2007) Closing in on the resting state of the shaker K⁺ channel. *Neuron* 56:124–140.
- Khalili-Araghi F, et al. (2010) Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage activated potassium channel. *Biophys J* 98:1–10.
- Schow EV, Freites JA, Gogna K, White SH, Tobias DJ (2010) Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel. *Biophys J* 98:2857–2866.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ (1992) The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 255:1712–1715.
- Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16:1159–1167.
- Aggarwal SK, MacKinnon R (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the shaker K⁺ channel. *Neuron* 16:1169–1177.
- Gamal El-Din TM, Heldstab H, Lehmann C, Greeff NG (2010) Double gaps along shaker S4 demonstrate omega currents at three different closed states. *Channels* 4:93–100.
- Delemotte L, Treptow W, Klein ML, Tarek M (2010) Effect of sensor domain mutations on the properties of voltage-gated ion channels: molecular dynamics studies of the potassium channel Kv1.2. *Biophys J* 99:L72–L74.
- Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY (1999) Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402:813–817.
- Cha A, Ruben PC, George AL, Fujimoto E, Bezanilla F (1999) Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402:813–817.
- Campos FV, Chanda B, Roux B, Bezanilla F (2007) Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment in the closed state of Shaker K channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7904–7909.
- Schmidt D, Jiang Q, MacKinnon R (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444:775–779.
- Ramu Y, Xu Y, Lu Z (2006) Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* 442:696–699.
- Xu Y, Ramu Y, Lu Z (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451:826–830.
- Grabe M, Lecar H, Jan YN, Jan LY (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17640–17645.
- Jogini V, Roux B (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys J* 93:3070–3082.
- Stevens CF (1978) Interactions between intrinsic membrane protein and electric field. An approach to studying nerve excitability. *Biophys J* 22:295–306.
- Sigworth FJ (1994) Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27:1–40.

44. Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349:305–310.
45. Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436:852–856.
46. Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781–1802.
47. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79:926–935.
48. MacKerell AD, Jr, et al. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* 102:3586–3616.
49. MacKerell AD, Jr, Feig M, Brooks CL, III (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25:1400–1415.
50. Feller SE, MacKerell AD, Jr (2000) An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* 104:7510–7515.
51. Hénin J, Shinoda W, Klein ML (2008) United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J Phys Chem B* 112:7008–7015.

Supporting Information

Delemotte et al. 10.1073/pnas.1102724108

SI Text.

Molecular Dynamics (MD). The MD simulations were carried out using the program NAMD2 (1). Langevin dynamics was applied to keep the temperature (300 K) fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm (2). Short- and long-range forces were calculated every one and two time steps, respectively, with a time step of 2.0 fs. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach (3). The water molecules were described using the TIP3P model (4). The simulation used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein (5, 6) and CHARMM27 for the phospholipids (7). A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine lipid molecules (8). The transmembrane (TM) voltage was imposed by explicit ion dynamics, and the creation of air/water interfaces (9, 10). The simulation was performed on the SGI ALTIX ICE Machine JADE at the CINES supercomputer center.

Equilibrium Simulation of Kv1.2 Under Membrane-Hyperpolarization Conditions. In this contribution, we extended a previous MD simulation (11) of an all-atom model of Kv1.2 built on the basis of the X-ray crystal structure (12) of the channel. In this channel the S4 basic residues are R²⁹⁴, R²⁹⁷, R³⁰⁰, R³⁰³, K³⁰⁶, and R³⁰⁹, termed in the present manuscript as R1, R2, R3, R4, K5, and R6. Details for Kv1.2 modeling and construction of the macromolecular system can be found in the original paper. Briefly, the Kv1.2 channel, embedded in a fully hydrated lipid bilayer was relaxed for over 10 ns with no TM voltage applied. Here, the system was first equilibrated at approximately 150 mM KCl salt concentration using 3D periodic-boundary conditions at constant pressure (1 atm) and constant temperature (300 K). Air-water interfaces were then created at both sides of the electrolytes by extending the length of the original box in the direction perpendicular to the membrane (Fig. S1). Simulations were run at constant volume for further equilibration. Note that the density for bulk water is preserved through intermolecular interactions and that as long as the membrane (and protein) is far enough (approximately 25 Å) from the air/water interface, it is not affected by the latter (Fig. S1).

Next, we proceeded by considering a channel subjected to a hyperpolarized-TM potential (Fig. S1), in which the TM voltage ΔV is imposed by explicit ion dynamics (9). To do so a net charge imbalance q_0 between the upper and lower electrolytes was created by displacing an appropriate number of K⁺ ions from the lower to the upper electrolyte, keeping constant the overall concentration of the bulk phases. Because the membrane/channel system behaves as a condenser, the imbalance q_0 between the electrolytes creates ΔV (9). Here, the ionic current through the selectivity filter was inhibited during the simulation allowing for direct measurement of voltage-sensor gating charges from ΔV (see below).

Biased-MD Simulation—Generation of States δ and ϵ . Further conformational change was triggered by applying “moving” harmonic constraints on the charged moieties of the S4 basic residues [corresponding here to the side chain atoms H₂N = C_γ(NH₂)-N_εH-C_βH₂ (Arg) and H₃N_ε-C_εH₂ (Lys)] directed toward the charged group of the next binding sites [corresponding to HOOC_γ-C_βH₂ (Asp), HOOC_δ-C_γH₂ (Glu), and the lipid phos-

phate group PO₄⁻] with a magnitude of 1 kcal/mol/Å² and a velocity of 0.00003 Å/fs. More precisely, for state δ , R1 and R2 are pulled toward E²²⁶, R3 toward D²⁵⁹, R4 toward E²³⁶, and K5 and R6 toward the bottom layer PO₄⁻ groups. For state ϵ , R1 and R2 are pulled toward D²⁵⁹, R3 toward E²³⁶, and R4, K5, and R6 toward the bottom layer PO₄⁻ groups. During this procedure, the C_α atom position of the protein’s negative binding site was fixed by “static” harmonic constraints. Moreover, to avoid spurious effects on the channel structure, this whole procedure was performed slowly, throughout successive cycles involving short runs (approximately 1 ns) with harmonic constraints turned on followed by equilibration (approximately 1 ns) with harmonic constraints turned off. In order to characterize meaningful statistically averaged structural and electrical properties, we have generated Kv1.2 structures in which all the voltage sensor domains (VSDs) are in the same state. Starting from the channel conformation at $t = 1.8 \mu\text{s}$ of the *unbiased MD* simulation, in which only the VSD in the subunit 1 adopts the γ -state, we have, initially, dragged the VSD in the other channel subunits into this conformation using the procedure described above, thereby generating the channel construct with the four VSDs in state γ . Proceeding farther along the “reaction” pathway between γ and the resting state ϵ , we have generated another channel construct presenting the VSDs in the state δ , which was identified here as another stable VSD conformation. Each of the generated structures (γ , δ , and ϵ) was then equilibrated, during an approximately 15-ns MD trajectory, for subsequent structural and gating-charge analysis (Fig. S4).

Electrostatic Potential. For a given system configuration j , the electrostatic potential $\Phi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$ at position \mathbf{r} was computed using the PME method as implemented in NAMD (13). In this scheme, the potential is obtained by solving the Poisson’s equation:

$$\nabla^2 \Phi_j(\mathbf{r}, \Delta V) = -4\pi \sum_i \rho_i(\mathbf{r}), \quad [\text{S1}]$$

where ρ_i is the point charge approximated by a spherical Gaussian of inverse width σ and the sum running over all atoms in the system. We considered a grid of $1.5 \times 1.5 \times 1.5 \text{ \AA}^3$ and $\sigma = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$.

Direct Measure of Gating Charges. By considering a channel-membrane system, the time-dependent voltage difference $\Delta V(t)$ across the membrane is defined as

$$\Delta V(t) = V_{\text{int}}(t) - V_{\text{ext}}(t). \quad [\text{S2}]$$

$V_{\text{int}}(t)$ and $V_{\text{ext}}(t)$ are, respectively, the voltages of the internal and external membrane regions of the system at time t . Using the protocol adopted in the present MD simulations, the transmembrane voltage $\Delta V(t)$ is related to the charge imbalance $q_0(t)$ between the electrolytes through

$$\Delta V(t) = Q_0(t)/C, \quad [\text{S3}]$$

in which $Q_0(t)$ is the charge imbalance $q_0(t)$ per membrane area A , i.e., $Q_0(t) = q_0(t)/A$, and C is the membrane capacitance, which is constant for the channel/membrane system (10, 14), $q_0(t)$ is written as

$$q_0(t) = q_{\text{int}}(t) - q_{\text{ext}}(t), \quad [\text{S4}]$$

$q_{\text{int}}(t)$ and $q_{\text{ext}}(t)$ being, respectively, the net charge within the internal and external regions of the system. Note that $q_0(t)$ results from contributions of protein charges and of ions in solution $q_0(t) = q_0^{\text{protein}}(t) + q_0^{\text{ion}}(t)$. By combining this into Eq. S3, we can relate q_0^{protein} to $\Delta V(t)$ through

$$q_0^{\text{protein}}(t) = -q_0^{\text{ion}}(t) + AC\Delta V(t). \quad [\text{S5}]$$

This allows us to compute the gating charge associated with two (time-dependent) conformational states of the channel $\lambda_1(t)$ and $\lambda_2(t)$,

$$Q(t) = -\frac{1}{2} \cdot [q_0^{\text{protein}}(\lambda_2) - q_0^{\text{protein}}(\lambda_1)], \quad [\text{S6}]$$

with $q_0^{\text{protein}}(\lambda_1)$ and $q_0^{\text{protein}}(\lambda_2)$ being the charge imbalance due to protein charges in the λ_1 and λ_2 conformation, respectively.

Following this direct measurement protocol, we computed the gating charge associated with the VSD conformational changes taking place during the hyperpolarized MD simulation of Kv1.2 by considering the initial α -state of the channel as the reference structure. Note that in order to maintain $\Delta V(t) \sim -600$ mV throughout the simulation as in patch clamp measurements, the charge imbalance q_0^{ion} was periodically restored (by displacing ions between the two bulk regions). This contribution is subtracted when conducting the Q calculation. Using the same scheme, each of the equilibrated γ , δ , and ϵ channel conformations was simulated for approximately 1 ns (under ΔV) to estimate the gating charge associated with these states (Table S2).

Gating-Charge Energetics. The gating charge Q can be linked to the microscopic state of the channel through

$$Q = \frac{\Delta G(\lambda_2, \Delta V) - \Delta G(\lambda_1, \Delta V)}{\Delta V}, \quad [\text{S7}]$$

where ΔV is the TM potential. For each channel conformation (λ), $\Delta G(\lambda, \Delta V)$ is the excess free energy due to the applied voltage. It relates the conformation of the channel to δ_i^{λ} , the so-called “electrical” distance (15–18):

$$\Delta G(\lambda, \Delta V) = G(\lambda, \Delta V) - G(\lambda, 0) = \Delta V \cdot \sum_i q_i \cdot \delta_i^{\lambda} \quad [\text{S8}]$$

where $\lambda \equiv \{r_1 \dots r_N\}$ is the set of N atomic coordinates of the protein in a conformation λ , q_i is the i th-protein charge, and δ_i^{λ} is the “electrical distance” from q_i , which corresponds to the

fraction of field at this charge position. The quantity δ_i^{λ} is given by (16, 19)

$$\delta_i^{\lambda} \equiv \frac{\partial}{\partial V} \phi_i^{\lambda} \Big|_{V=0} \quad [\text{S9}]$$

and accounts for the degree of coupling between the local-electrostatic potential ϕ_i^{λ} and the TM potential. Note that ϕ_i^{λ} is the local-electrostatic potential (at the charge location) due to the TM voltage. It must be computed without consideration of the contribution of charges belonging to the protein (16, 17, 20).

Five equilibrated channel structures, each containing all four VSD subunits in one of the specific α , β , γ , δ , and ϵ conformations, were considered for computation of Q following this energetic formalism. α and β correspond to the conformations at $t = 0$ μs and $t = 1.0$ μs of the hyperpolarized simulation of Kv1.2, whereas γ , δ , and ϵ were chosen as the *equilibrium* structures resulting from the biased simulation. For matter of comparison, the five VSD structures are the same as those used in the direct measurement of Q . Here, Q was solved for a given channel conformation λ by considering two independent simulations under different TM potentials (see Fig. S4A). For each ΔV , the local electrostatic potential ϕ_i^{λ} was then calculated as an average over $n = 100$ system configurations sampled along 1 ns of simulation: $\phi_i^{\lambda} \equiv \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \Phi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$, where \mathbf{r} is the position of the i th-protein charge and $\Phi_j(\mathbf{r}, \Delta V)$ is the electrostatic potential. For a given conformation λ the electrical distances were estimated using $\delta^{\lambda} \equiv [\phi^{\lambda}(\mathbf{r}, \Delta V_2) - \phi^{\lambda}(\mathbf{r}, \Delta V_1)] / (\Delta V_2 - \Delta V_1)$ and averaged over the four monomers ($\Delta V_1 = 0$ mV and $\Delta V_2 = 600$ mV). Results are reported in Table S3.

Conformational Analysis of the VSD. We describe the VSD conformations by means of a distance matrix $M = [r_{ij}]_{6 \times 6}$, where r_{ij} is the distance between the charged moiety of a given S4 charge $j = \{\text{R}^{294}, \text{R}^{297}, \text{R}^{300}, \text{R}^{303}, \text{K}^{306}, \text{R}^{309}\}$ and the charge moiety of a given negatively charged group $i = \{\text{PO}_4^- (\text{outer}), \text{E}^{183}, \text{E}^{226}, \text{D}^{259}, \text{E}^{236}, \text{PO}_4^- (\text{inner})\}$. In detail, r_{ij} is the distance between the geometrical centers of the ij charged moieties, which correspond here to the side-chain atoms $\text{H}_2\text{N} = \text{C}_\gamma(\text{NH}_2)\text{-N}_\epsilon\text{H-C}_\delta\text{H}_2$ (Arg) and $\text{H}_3\text{N}_\zeta\text{-C}_\epsilon\text{H}_2$ (Lys), $\text{HOOC}_\gamma\text{-C}_\beta\text{H}_2$ (Asp), $\text{HOOC}_\delta\text{-C}_\gamma\text{H}_2$ (Glu), and the lipid phosphate group PO_4^- . The rmsd profile for the VSD conformation was calculated according to

$$\text{rmsd}(t) = \frac{1}{36} \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 \sqrt{|r_{ij}(t) - r_{ij}(0)|^2}. \quad [\text{S10}]$$

- Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781–1802.
- Izaguirre JA, Reich S, Skeel RD (1999) Longer time steps for molecular dynamics. *J Chem Phys* 110:9853–9864.
- Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald—An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98:10089–10092.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79:926–935.
- MacKerell AD, Jr, et al. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* 102:3586–3616.
- MacKerell AD, Jr, Feig M, Brooks CL, III (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25:1400–1415.
- Feller SE, MacKerell AD, Jr (2000) An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* 104:7510–7515.
- Hénin J, Shinoda W, Klein ML (2008) United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J Phys Chem B* 112:7008–7015.
- Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Phys Chem B* 112:5547–5550.
- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131:2107–2110.
- Treptow W, Tarek M (2006) Environment of the gating charges in the Kv1.2 *Shaker* potassium channel. *Biophys J* 90:L64–L66.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K^+ channel. *Science* 309:897–903.
- Aksimentiev A, Schulten K (2005) Imaging α -hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys J* 88:3745–3761.
- Stefani E, Toro L, Perozo E, Bezanilla F (1994) Gating of shaker K^+ channels: I Ionic and gating currents. *Biophys J* 66:996–1010.
- Sigworth FJ (1994) Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27:1–40.
- Roux B (1997) Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophys J* 73:2980–2989.
- Jogini V, Roux B (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K^+ channel in a membrane environment. *Biophys J* 93:3070–3082.
- Lecar H, Larsson HP, Grabe M (2003) Electrostatic model of S4 motion in voltage-gated ion channels. *Biophys J* 85:2854–2864.
- Islas LD, Sigworth FJ (2001) Electrostatic and the gating pore of *Shaker* potassium channels. *J Gen Physiol* 117:69–89.
- Grabe M, Lecar H, Jan YN, Jan LY (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17640–17645.

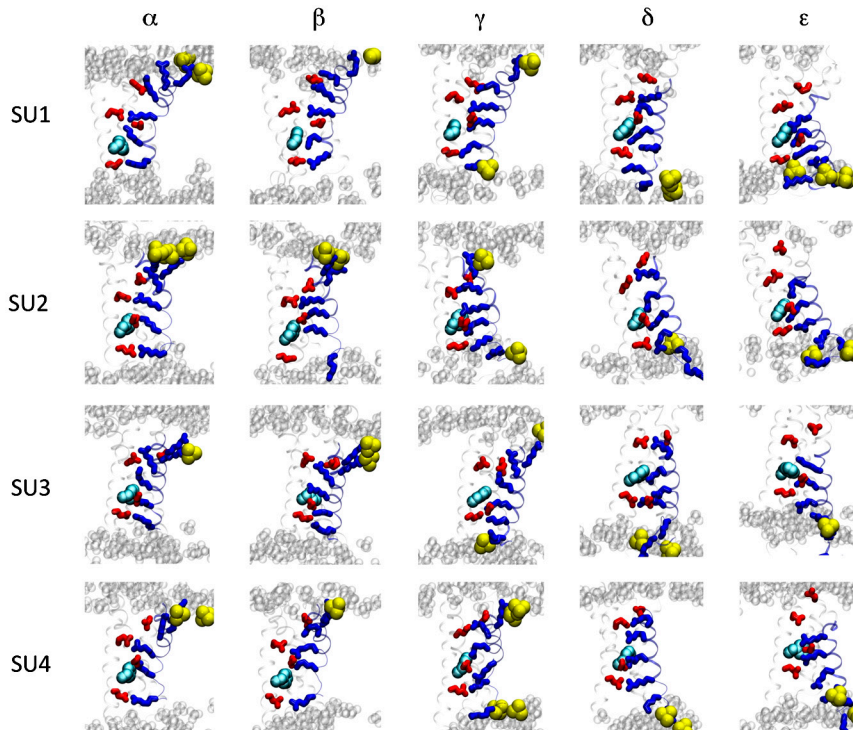


Fig. S3. Salt-bridge network in each Kv1.2 VSD subunit (coined SU1 through SU4) and in each conformation (α to ϵ). Basic residues are in blue and acidic residues in red. F^{233} is represented as cyan spheres. Lipid PO_4^- groups within 6 Å of the basic residues are shown in yellow, whereas the other lipid head groups are shown as transparent spheres.

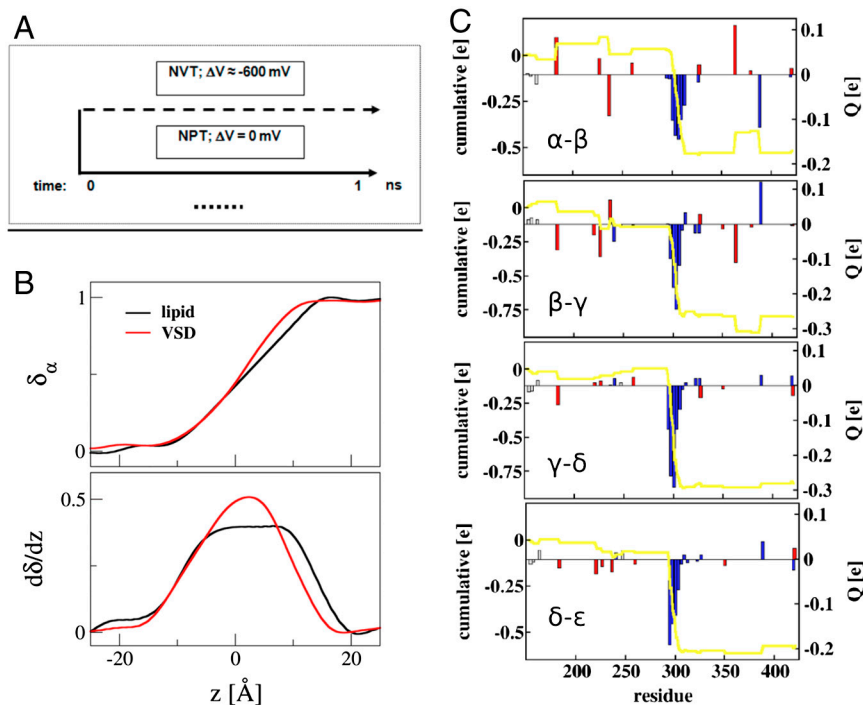


Fig. S4. (A) Simulation protocol used for calculation of the electrical distance δ_i^j . For both simulations, the conformational state of the channel was fixed by imposing harmonic constraints to its main-chain atoms. (B) Electrical distance profiles (*Top*) and derivative of the latter (*Bottom*) across the lipid zone (black line) and across the VSD (red line). Note the focalization of the electric field in the VSD when compared to the lipid. (C) Cumulative (line) and per residue (bars) gating charges calculated via the free energy formalism for the four $\alpha \rightarrow \beta$, $\beta \rightarrow \gamma$, $\gamma \rightarrow \delta$, $\delta \rightarrow \epsilon$ transitions.

Table S2. Direct measure of Q for the VSD conformations γ , δ , and ϵ

Conformations	ΔV (volts)	Lipid area (\AA^{-2})	q_0^{ion} (e)*	q_0^{protein} (e) [†]	Q (e) [‡]
α	-0.81 ± 0.05	16531.8	-36	28.5 ± 0.5	0.0
γ	-0.98 ± 0.05	17189.1	-48	37.3 ± 0.5	4.8 ± 0.3
δ	-0.95 ± 0.05	17196.7	-58	48.8 ± 0.5	10.1 ± 0.3
ϵ	-0.57 ± 0.05	16840.2	-60	54.6 ± 0.5	12.8 ± 0.3

* q_0^{ion} was computed relative to the center of the bilayer.

[†]Membrane capacitance $C = 0.9 \times 10^{-22} \text{ C}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$; ΔV corresponds to the voltage estimated from the average over a simulation-time window of approximately 1 ns.

[‡]The total Q was computed according to Eq. S6 and considering the α -state as a reference.

Table S3. Gating charges and cumulative free energy differences under $\Delta V = -100 \text{ mV}$ per subunit computed between α , β , γ , δ , and ϵ states

Transition	Direct measurement		Energetic formalism		S4 contribution	
	Q (e)	Cum. ΔG (kcal/mol)	Q (e)	Cum. ΔG (kcal/mol)	Q (e)	Cum. ΔG (kcal/mol)
α/β	-1.8	-1.74	-2.08	-2.0	-1.9	-1.83
β/γ	-3.4	-5.02	-3.24	-5.13	-2.56	-4.32
γ/δ	-4.8	-9.65	-3.36	-8.40	-3.4	-7.64
δ/ϵ	-2.8	-12.35	-2.52	-10.77	-2.04	-9.61

4.2 EXPLORANDO CONFORMAÇÕES DO NAVAB NA MEMBRANA

Apenas recentemente em 2011, a primeira estrutura cristalográfica de um canal de sódio dependente de voltagem, do organismo *Arcobacter butzleri* (NavAb), foi resolvida por difração de raios-X⁶⁶. A estrutura da proteína foi caracterizada com o *VSD* em um estado desconhecido (supostamente ativado) e com o domínio do poro fechado. Um estudo específico, empregando simulações de *MD* do NavAb na membrana, na escala de tempo de ~100ns, identificou que a estrutura do canal de fato se tratava de um estado reconhecido como pré-ativado, i.e uma conformação tal do *VSD* intermediária dentro do caminho de ativação do canal¹¹⁰. A estrutura do NavAb equilibrada na membrana, resultante da trajetória desse estudo, será doravante referida como NX. A estrutura atômica NX serve de valiosa fonte estrutural de alta resolução para estender o conhecimento acerca do funcionamento de membros menos conhecidos da família *VGCC* como os Nav e Cav. Entretanto, é importante salientar que até o momento a estrutura dos estados funcionais, fisiologicamente representativos ativado/aberto e desativado/fechado, de canais de sódio ainda não foram reveladas. Apesar de existirem variações estruturais locais, e de sequencia primária nos *VSD* de canais potássio (Kv) e de sódio (Nav), essas proteínas são amplamente distribuídas, em seus estados funcionais, em diversos organismos na natureza. Tal observação é indicativa de que, apesar de haver variações de sequencias entre os canais, existe uma arcabouço estrutural que confere uma elevada sensibilidade elétrica aos membros da superfamília *VGCC*. Nossa hipótese de base é que o conjunto de propriedades elétricas para o Kv1.2, previamente investigados pelo nosso grupo, está igualmente presente nos diversos membros da família *VGCC* (figura 4.8). Dessa forma, os estados conformacionais do Kv1.2, obtidos previamente pelo nosso grupo, contribuem para o presente trabalho como referências estruturais para explorar conformações de equilíbrio do NavAb ao longo do caminho de ativação, dada a relevante similaridade estrutural entre canais iônicos *VGCC*.

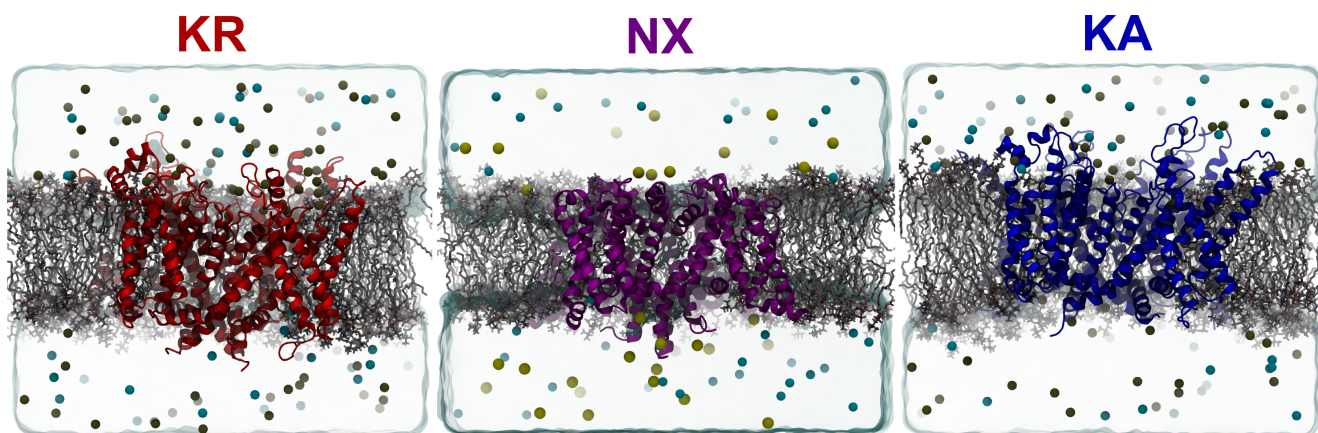


Figura 4.9. Visão frontal dos sistemas atomísticos hidratados em solução salina de KCl ou NaCl e equilibrados na membrana. **Esquerda:** Kv1.2 desativado/fechado (KR) Delemotte *et al*, 2011³⁷. **Centro:** NavAb cristalográfico pré-ativado com poro fechado Carnevale *et al*, 2011¹¹⁰. **Direita:** Kv1.2 ativado/aberto (KA) Treptow *et al*, 2006³⁹. Os detalhes das respectivas simulações se encontram nos artigos originais.

Conforme tal estratégia, a coordenada generalizada $R(\text{NavAb}, VSD) = R$ representa a distância conformacional do sensor de voltagem do NavAb aos VSD correspondentes do Kv1.2. Dessa forma, $R = 0$ e $R = 1$ são os extremos da coordenada, i.e uma conformação do VSD do NavAb que corresponde respectivamente aos KR e KA (figura 4.10). Segundo essa análise, a distância conformacional de NX é $R = 0.68 \pm 0.03$, que determina essa estrutura como um intermediário entre KA e KR. Além disso, considerando que a rede de contatos eletrostáticos entre os GQR e resíduos ácidos/polares de S1-S3 é um bom descritor de conformações do VSD ao longo do caminho de ativação, caracterizamos as conformações de VSD do NavAb através de uma matriz de distância entre os contatos eletrostáticos, $M(\text{NavAb}, VSD)$, do interior do sensor de voltagem (figura 4.11).

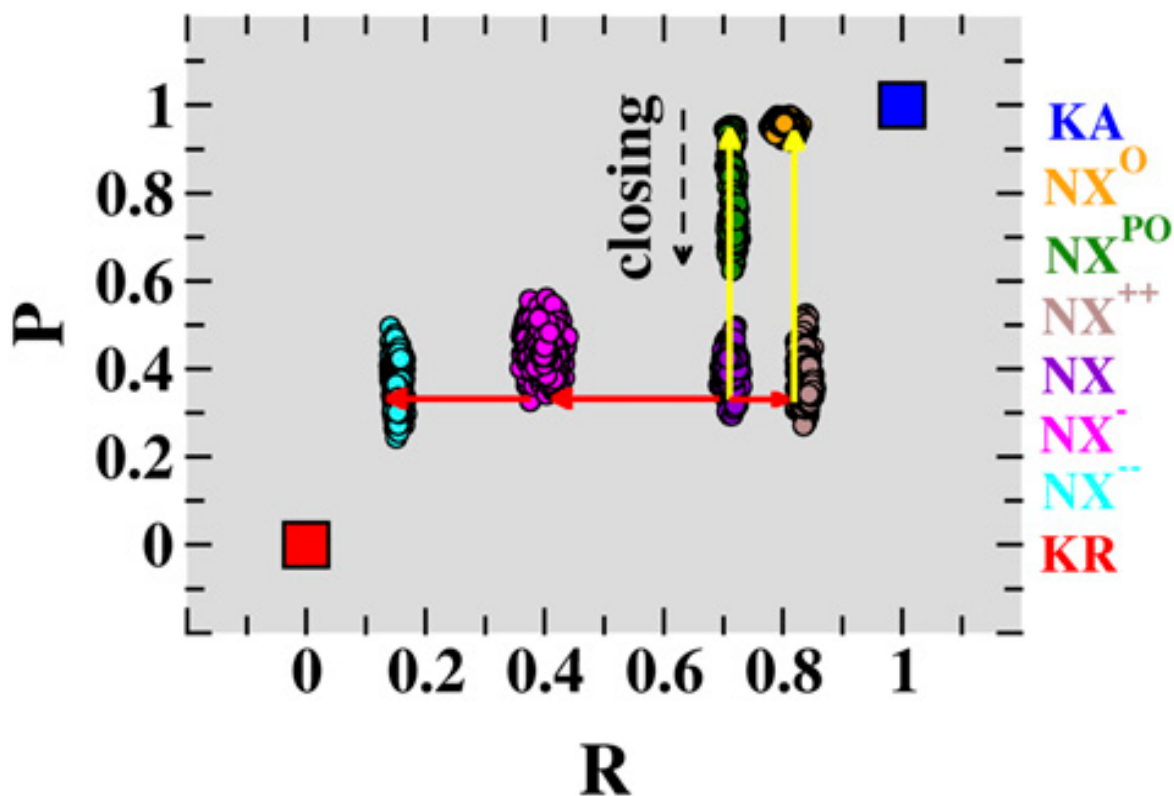


Figura 4.10. Conformações associadas à ativação do *VSD* e abertura do *PD* do NavAb. Os pontos do espaço conformacional, definido pelas coordenadas generalizadas $R(\text{NavAb}, VSD; t)$ e $P(\text{NavAb}, PD; t)$, representam trajetórias do equilíbrio, livre da ação de forças externas, das conformações NX^{++} , NX , NX^- , NX^{--} , NX^{PO} e NX^O do canal NavAb. Essas seis conformações correspondem a posições distintas ao longo do caminho de ativação do *VSD* (setas vermelhas) e da abertura do poro (setas amarelas). Nesses espaço, estão indicados as distâncias conformacionais correspondentes aos estados ativado/aberto (quadrado azul) e desativado/fechado (quadrado vermelho) do Kv1.2. A série temporal das coordenadas $R(\text{NavAb}, VSD; t)$ e $P(\text{NavAb}, PD; t)$, incluindo as etapas de transformação da estrutura *NX* (fora do equilíbrio) estão detalhadas na figura 4.12.

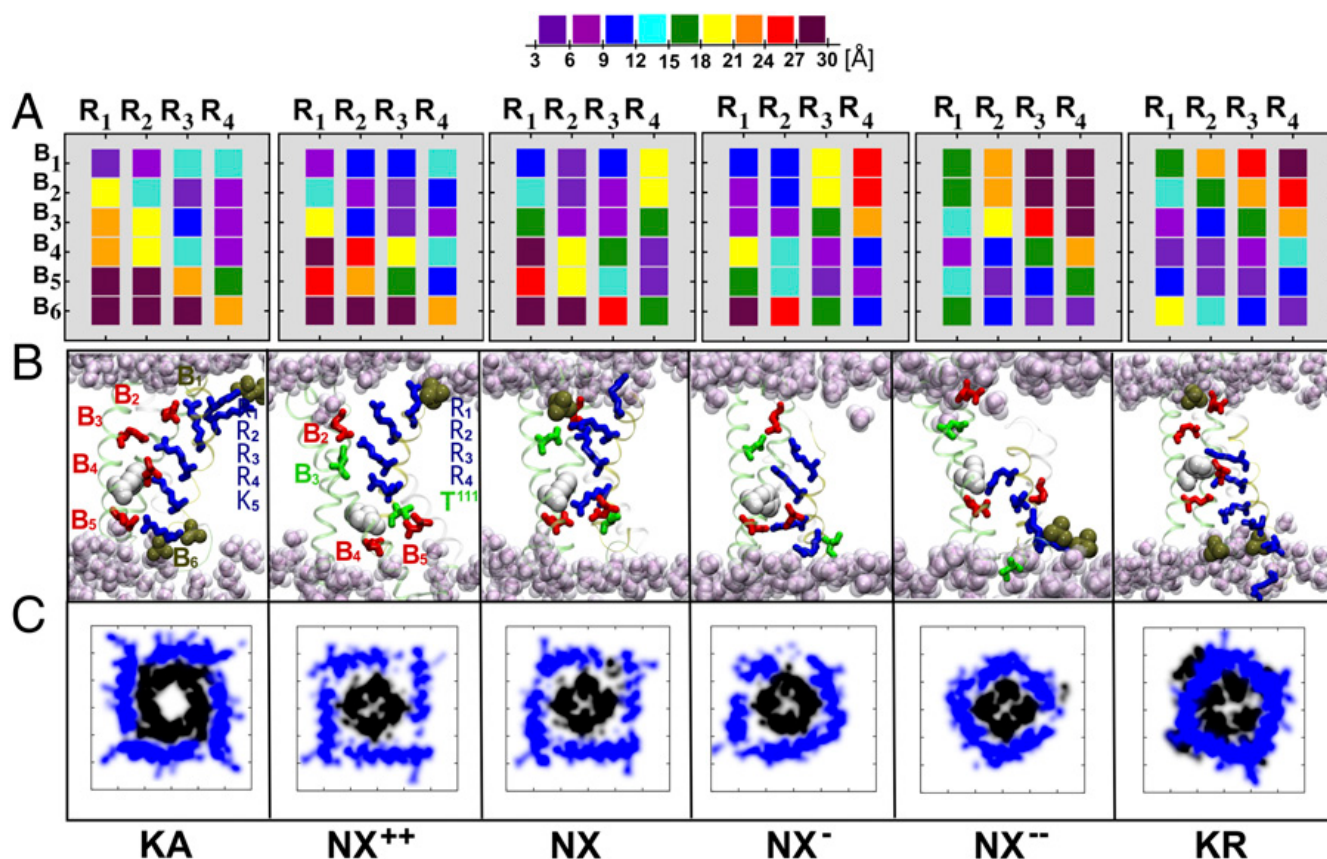


Figura 4.11. Conformações do *VSD* do NavAb. **A:** Matrix de distâncias M_{ij} (NavAb, *VSD*) das interações eletrostáticas entre os resíduos básicos da S4 (R_1 - R_4) e seus pares carregados negativamente (numerados de B_1 a B_6 correspondendo respectivamente ao grupo PO_4^- extracelular, E^{32} , N^{49} , E^{59} , D^{80} e PO_4^- intracelular) em cada conformação NX^{++} , NX , NX^- e NX^{--} . Por razões de comparação, as matrizes M_{ij} (Kv1.2, *VSD*) das conformações referência, i.e KA e KR do canal Kv1.2, são disponibilizadas. Os sítios negativos do Kv1.2 (B_1 - B_6) correspondem respectivamente ao grupo PO_4^- extracelular, E^{183} , E^{226} , E^{236} , D^{259} e PO_4^- intracelular. As matrizes distância são computadas como uma média sobre as quatro subunidades independentes dos canais. **B:** Detalhes atômicos do *VSD* dos canais NavAb e Kv1.2 destacando a posição dos resíduos básicos da S4 (bastões em azul) e as interações eletrostáticas/polares que formam com seus pares ácidos/polares (bastões vermelhos e verde) ao longo dos segmentos do *VSD* como também com os grupos fosforil do lipídico (cor de ocre). Note que, o centro catalítico do NavAb é formado pelos resíduos B_4 , B_5 e F^{56} (esfera em branco; F^{233} no Kv1.2), e ocupado sequencialmente ao longos das conformações NX^{++} até NX^{--} pelos resíduos T^{111} , R_4 , R_3 e R_2 . **C:** Diagramas de densidades atômicas para as conformações do NavAb e Kv1.2, descrevendo as posições do segmento S4S5-linker (segmento L, azul) e o conjunto de hélices S6 (preto) sobre um plano localizado na entrada intracelular do canal. A hélice L constribe os segmentos do poro nas conformações NX^- e NX^{--} , impedindo assim a abertura do *PD* dessas estruturas.

A partir da estrutura NX empregamos simulações de *MD* com aplicação de força externa (*biased simulations*) para amostrar conformações distintas do *VSD* do NavAb, com diferentes valores de R , buscando encontrar os estados ativado e desativado do canal. O procedimento se baseou na combinação de duas etapas de simulação *MD*, i.e *biased* seguido de equilibração *unbiased*, para

primeiramente guiar o *VSD*-NX até um dado valor de coordenada R, e então relaxar a estrutura resultante. Note que, durante a transformação do *VSD* o domínio do poro é mantido livre da aplicação de forças externas (*bias*) permitindo o *PD* relaxar junto com o sistema (figura 4.12).

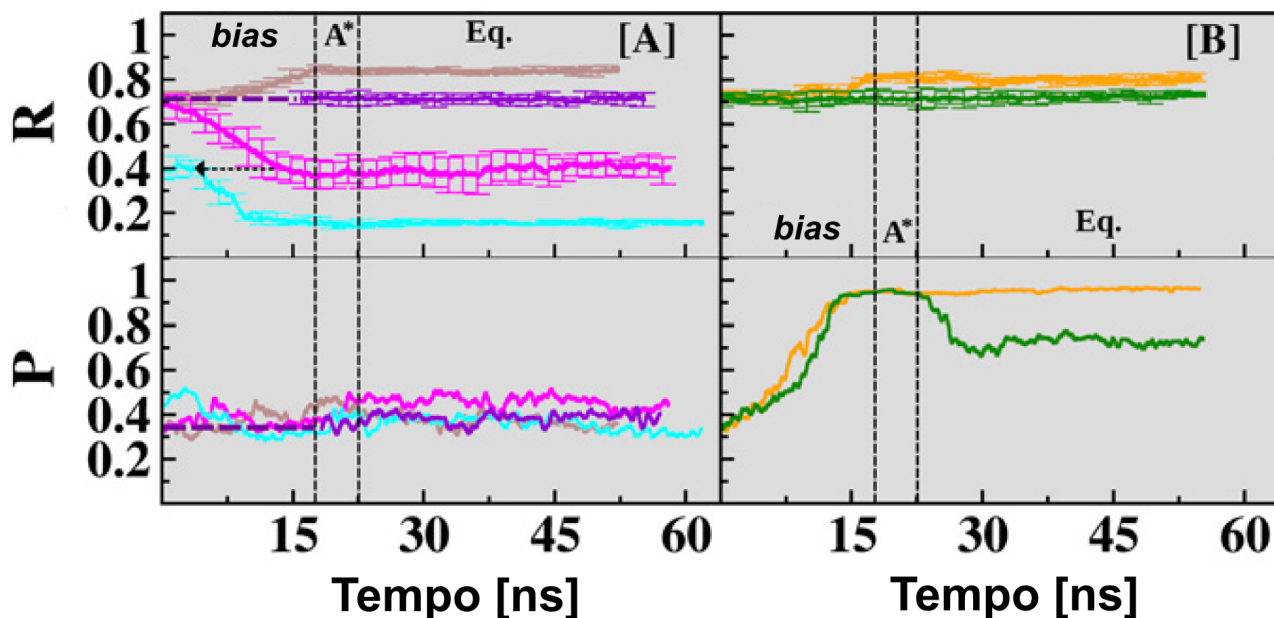


Figura 4.12. Conformações equilibradas na membrana do NavAb. **A:** Perfis de $R(\text{NavAb}, VSD; t) = R$ e $R(\text{NavAb}, PD; t) = P$ das trajetórias das conformações NX^{++} (marrom), NX (violeta), NX^- (lilás) e NX^{--} (ciano). Os termos *bias*, A^* e Eq. indicam respectivamente as etapas e aplicação de um potencial externo, *annealing* e equilíbrio dos sistemas. **B:** Como em **A**, as trajetórias de transformação até as conformações NX^O (laranja) e NX^{PO} (verde). Os perfis foram computados de acordo com a equação 3.27 e correspondem a uma média sobre as subunidades dos canais. Repare no relaxamento da curva *P* de NX^{PO} durante a estabilização que resulta num *PD* parcialmente aberto. O segmento de equilíbrio dos perfis no tempo são plotados como pontos no espaço matemático $\{R(\text{NavAb}, VSD), P(\text{NavAb}, PD)\}$ da figura 4.10.

Dessa forma, um total de três conformações foram amostradas em valores de $R = 0.85 \pm 0.02$; $R = 0.38 \pm 0.06$; e $R = 0.14 \pm 0.01$, que se referem respectivamente às conformações doravante mencionadas como NX^{++} , NX^- , NX^{--} . Os perfis de $R(t)$ indicam que as escalas de tempo da ordem de ~ 30 ns de estabilização, para as conformações geradas, são similares àquelas encontradas para o NX equilibrado. É válido reforçar, que em todas as simulações o domínio do poro permaneceu fechado. Cada uma das estruturas geradas, derivadas de NX , foram caracterizadas quanto ao padrão de contatos eletrostáticos de resíduos carregados dentro do *VSD*. Além disso, outra medida de desvio estrutural, como *RMSD*, foi empregada independentemente para quantificar a distância estrutural entre as estruturas referências, i.e KR e KA, em relação às conformações do NavAb.

As conformações do NavAb geradas até aqui foram então utilizadas para se computar a quantidade de *gating charge* (Q) de cada estrutura, seguindo o protocolo de medida direta¹¹¹ (vide metodologia tópico 3.1.12, equação 3.25). Valores típicos de Q^d , i.e medidas experimentais de Q , encontrados para a maioria de canais *VGCC*, pertencem ao intervalo de 12-15 cargas elementares (e)¹³⁻¹⁵. Utilizando a conformação NX^{++} como referência, os valores de Q encontrados foram de $-2.14 e$, $-8.32 e$, e $-12.08 e$ em relação, respectivamente, às conformações NX , NX^- , e NX^{--} (tabela 4.2).

Tabela 4.2. Medida direta de Q para as conformações NX^{++} , NX , NX^- , NX^{--} do canal NavAb.

Conformação	ΔV (Volts)	Área/lipídio (\AA^2)	q_0^{ion} (e)*	$q_0^{proteina}$ (e)**	Q (e)***
NX^{++}	-0.708 ± 0.05	17309.1	-14	6.35 ± 0.5	0.0
NX	-0.683 ± 0.05	17229.9	-18	10.63 ± 0.5	-2.14 ± 0.3
NX^-	-0.674 ± 0.05	16663.0	-30	22.99 ± 0.5	-8.32 ± 0.3
NX^{--}	-0.697 ± 0.05	17251.8	-38	30.50 ± 0.5	-12.08 ± 0.3

* q_0^{ion} foi computado em relação ao centro da membrana.

** Capacitância da membrana $C = 0.9 \times 10^{-22} \text{ C.V}^{-1}.\text{A}^{-2}$; ΔV corresponde à diferença de voltagem estimada sobre uma média retirada de 1ns de simulação.

*** A quantidade Q total é computada segundo a eq. 3.25 considerando a conformação NX^{++} como referência.

O sinal negativo implica que, relativo à NX^{++} , as demais estruturas de NavAb transferem carga no sentido intracelular através da capacitância da membrana. Essa análise indica que apenas o par NX^{++}/NX^{--} é capaz de transferir a quantidade de $\sim 12 e$, cujo valor é comparável ao Q^d experimental. Tomados em conjunto, esses resultados apontam as estruturas NX^{++} e NX^{--} como conformações do NavAb potencialmente relacionadas aos estados funcionais ativado e desativado respectivamente. Adicionalmente, o resultado acima classifica as conformações NX e NX^- como estruturas representativas de estados intermediários do *VSD* ao longo do caminho de ativação do canal, como já sugerido pelos valores de R calculados.

Até aqui, o domínio do poro encontra-se fechado em todas as estruturas equilibradas do NavAb. Como esperado, a diferença marcante entre as conformações geradas está na posição transmembrânica da S4 e no grau de acoplamento do segmento S4-S5 *linker* (L) ao poro do canal. Aparentemente, o segmento L restringe o movimento do conjunto de hélices S6 de maneira distinta para cada conformação do canal. Essa observação sugere que a propensão de abertura do *PD* aumenta à medida que constrição do poro, decorrente do acoplamento de L , diminui. Considerando o exposto, se comparado à conformação NX^{++} , a estrutura NX^- tem uma menor propensão de abertura do poro, entretanto tal observação não é óbvia para NX . Com o objetivo de testar essa hipótese, empregamos

simulações de *MD* adicionais, em que a rota de abertura do domínio do poro é descrita por uma coordenada generalizada $R(\text{NavAb}, PD) = P$, que traduz a distância conformacional do *PD* do NavAb às estruturas de referência KR (poro fechado) e KA (poro aberto), que correspondem respectivamente a $P = 0$ e $P = 1$. Note que, a conformação do *PD* é descrita segundo uma matriz de distâncias entre os átomos de C_α de três resíduos constitutivos do poro, e conservados entre toda a família *VGCC* (para identidade dos resíduos, veja a Tabela S1 do anexo II).

Partindo da estrutura NX, $P = 0.33$, duas trajetórias independentes foram geradas, em que: i) a proteína é direcionada simultaneamente para a estrutura do *VSD* ativado (NX^{++}) e para uma conformação de poro aberto ($P = 0.95$); ii) o canal é guiado apenas para uma conformação de poro aberto mantendo seu sensor de voltagem nas características de NX. É válido ressaltar, que durante todo o procedimento ii), apenas o poro é sujeito à ação de forças externas (*bias*), enquanto os segmentos *L* e *VSD* são liberados para equilibrar junto com o sistema. Na simulação i) o *VSD* resultante atinge um valor de $R = 0.84$ e $P = 0.95$, o que caracteriza essa estrutura equilibrada final como uma estrutura de NavAb com poro aberto e *VSD* ativado, doravante mencionada como NX^0 . Nessa última estrutura, a raio de abertura do *PD* é de ~ 3.0 Å que, comparado ao KA, é largo o suficiente para permitir a hidratação da cavidade central do canal e subsequente condução iônica (figura 4.13).

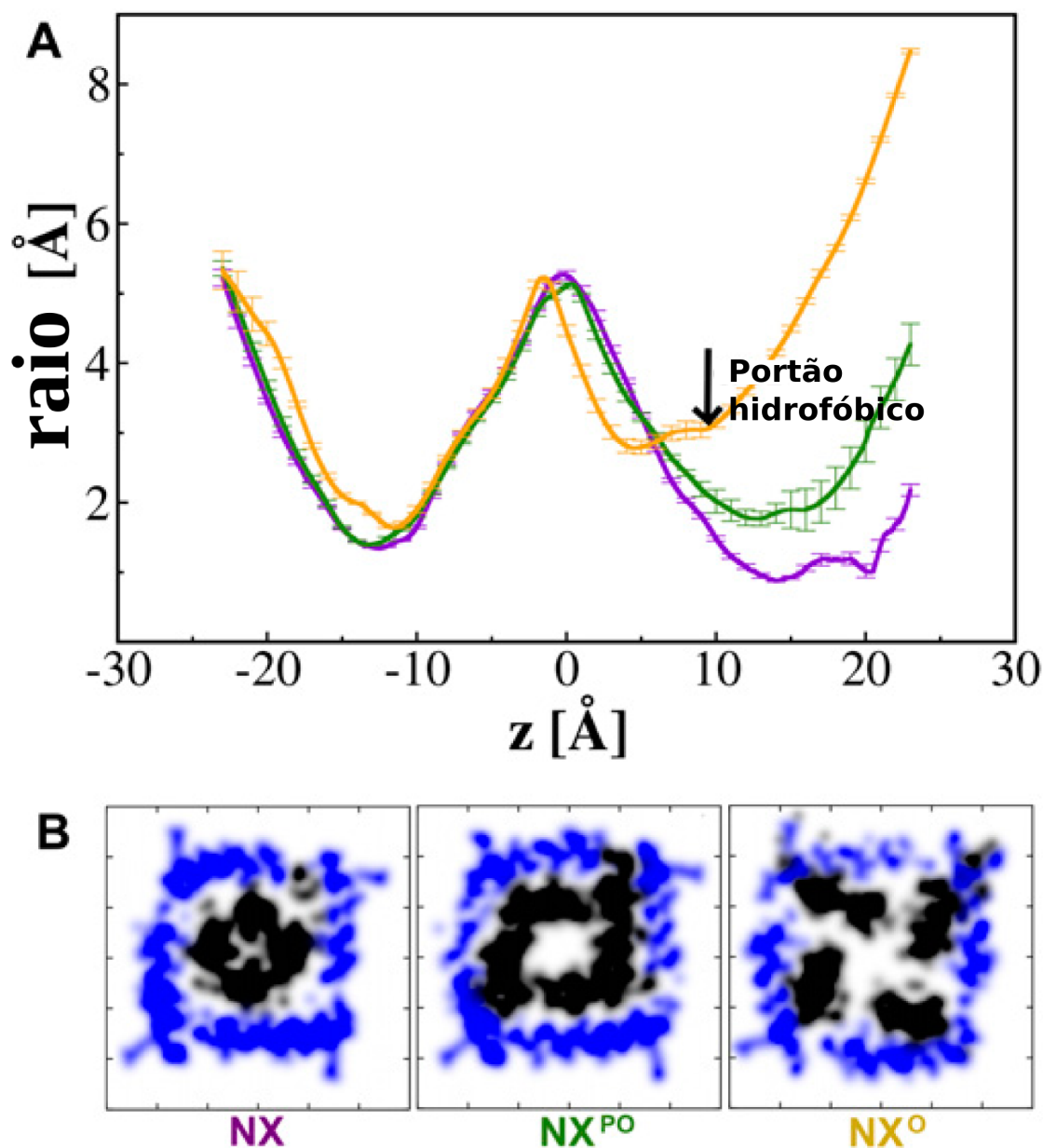


Figura 4.13. **A:** Perfis do raio do *PD* ao longo do caminho de permeação iônica das conformações *NX*, *NX^{PO}* e *NX^O*. As curvas correspondem a uma média sobre o último nanossegundo de equilíbrio. O raio na região mais restringida do poro indica que o portão hidrofóbico está fechado, parcialmente aberto e aberto para as conformações *NX*, *NX^{PO}* e *NX^O* respectivamente. Note que a dimensão do raio de abertura da região do portão hidrofóbico para a conformação *NX^O* é consideravelmente superior daqueles de *NX* e *NX^{PO}*. **B:** Densidade atômica das referidas conformações projetadas sobre um plano na região intracelular da entrada do canal.

De fato, numa simulação de *MD* independente, e sobre a aplicação de ΔV transmembrânica, observamos a condução de íons Na^+ através de *NX^O* (vídeo S1 do anexo II). Em contrapartida, na equilíbrio da estrutura com poro aberto e *VSD* nas características de *NX*, o *PD* não se mantém

estável e retorna para uma conformação parcialmente aberta, evidenciado pelo recuo dos valores de P em relação aos valores iniciais (figura 4.12). A estrutura equilibrada final dessa simulação é denominada de NX^{PO} , pois exibe o PD numa conformação intermediária cujo raio de abertura é de ~ 2.0 Å. Apesar de permitir a hidratação parcial do domínio, essa conformação não é compatível com a condução iônica, como indicado por um trabalho recente de MD investigando um canal de sódio semelhante, o NaChBac¹¹². As estruturas equilibradas NX^O e NX^{PO} são consideravelmente distintas quanto à estrutura de seus PD , indicativo que há uma maior propensão à abertura do poro para conformações do tipo NX^{++} em detrimento de NX . É válido reforçar, que apesar da etapa fora do equilíbrio (simulação *biased*) depender fortemente da escolha das estruturas de referência, o passo seguinte de equilibração, livre da aplicação de forças externas, permite caracterizar configurações independentes do canal. Aliado a isso, as medidas de Q concorrentemente sugerem que as estruturas do VSD de NX^{++} e NX^{-} estão potencialmente relacionadas aos estados ativados e desativados de NavAb.

Enquanto o manuscrito referente a esse segmento do trabalho estava sendo preparado a estrutura cristalográfica do canal de sódio NavRh do organismo *Alphaproteo-bacterium* HIMB114, um ortólogo do canal bacteriano NaChBac, foi resolvida a 3.05 Å de resolução, com o VSD completamente ativado e o poro fechado¹⁰⁸. De modo a comparar as estruturas obtidas do NavAb com a recente estrutura cristalográfica realizamos uma nova simulação MD para equilibrar o NavRh na membrana. Como esperado a estrutura equilibrada do NavRh apresenta alta similaridade estrutural de VSD com a conformação NX^{++} do NavAb. Especificamente, os GQR da $S4$ de ambas estruturas ocupam o bolsão hidratado imediatamente superior ao centro catalítico do VSD e formam uma rede de interações eletrostáticas extremamente similar como evidenciado pela proximidade dos valores de $R(\text{NavAb}, \text{VSD}) = R$: $R_{\text{NavAb}} = 0.85 \pm 0.02$ e $R_{\text{NavRh}} = 0.86 \pm 0.01$. Adicionalmente, os valores de $RMSD$ de 2.47 ± 0.99 e 2.55 ± 0.29 em relação, respectivamente, à cadeia principal da $S4$ e VSD dão suporte à observação de similaridade estrutural entre os canais (tabela 4.3).

Tabela 4.3. *RMSD* (Å) entre as conformações do NavAb e as estruturas de referência KA, KR, além do canal NavRh.

Ref.	NX ⁺⁺		NX		NX ⁻		NX ⁻⁻	
	S4	VSD	S4	VSD	S4	VSD	S4	VSD
NavRh	2.47 ± 0.99	2.55 ± 0.29	3.93 ± 0.12	3.25 ± 0.86	11.26 ± 1.46	6.08 ± 0.66	20.07 ± 1.21	10.43 ± 0.72
KA	3.59 ± 0.71	3.99 ± 0.17	4.48 ± 0.21	4.76 ± 0.10	8.36 ± 1.03	5.73 ± 0.20	16.74 ± 1.21	9.01 ± 0.49
KR	16.93 ± 0.94	9.19 ± 0.38	16.10 ± 0.64	9.00 ± 0.30	7.99 ± 1.62	5.98 ± 0.94	5.13 ± 0.92	4.11 ± 0.74

Os valores de *RMSD* foram estimados sobre os deslocamentos da cadeia principal de S4 e *VSD*. A sobreposição das estruturas é feita pelos seus respectivos resíduos ácidos (B2-B5) e o *RMSD* calculado como uma média sobre as quatro subunidades de cada canal.

O cenário geral que emerge desses resultados, sobre a ativação do NavAb, sugere que a S4 se deslocada de 8 a 15 Å ao longo da direção transmembrânica, em que a hélice S4 da conformação NX⁻⁻ está 15.4 Å mais enterrada na direção intracelular comparada ao mesmo segmento da conformação NX⁺⁺, resultado consistente com os estudos do Kv1.2. Além disso, as transições sequenciais do *VSD* do NavAb, através das conformações NX⁺⁺ e NX⁻, ocorrem por meio de interações eletrostáticas dos resíduos carregados dentro do sensor de voltagem como resultado da translação vertical em relação à membrana da hélice S4. Essas transições sequenciais são acompanhadas pelo cruzamento dos resíduos da S4, i.e T¹¹¹, R₄, R₃, e R₂, através do centro catalítico (video 2 do material suplementar de anexo II).

As simulações atomísticas explorando conformações do NavAb ao longo da rota de abertura do *PD* revela que o segmento *L* do canal, quando o *VSD* se encontra na conformação NX, restringe o conjunto de hélices S6 induzindo o domínio do poro para um estado parcialmente aberto, caracterizado como NX^{PO}. Apenas na estrutura NX^O, cujo o *VSD* é similar àquele encontrado em NX⁺⁺, o poro encontra-se consideravelmente estável na conformação aberta. Mais recentemente, a terceira estrutura cristalográfica de um canal de sódio, em menos de um ano, pertencente ao organismo *Magnetococcus sp.* (NavMs), foi disponibilizada na literatura¹⁰⁹. Essa estrutura foi resolvida a 3.5 Å de resolução e determinada com o domínio do poro na conformação aberta. O *PD* das estruturas NX^O e NavMs são estruturalmente similares como indicado pelos valores de *RMSD* e arranjo do conjunto de hélices S6 que delineiam o *PD* (figura 4.14).

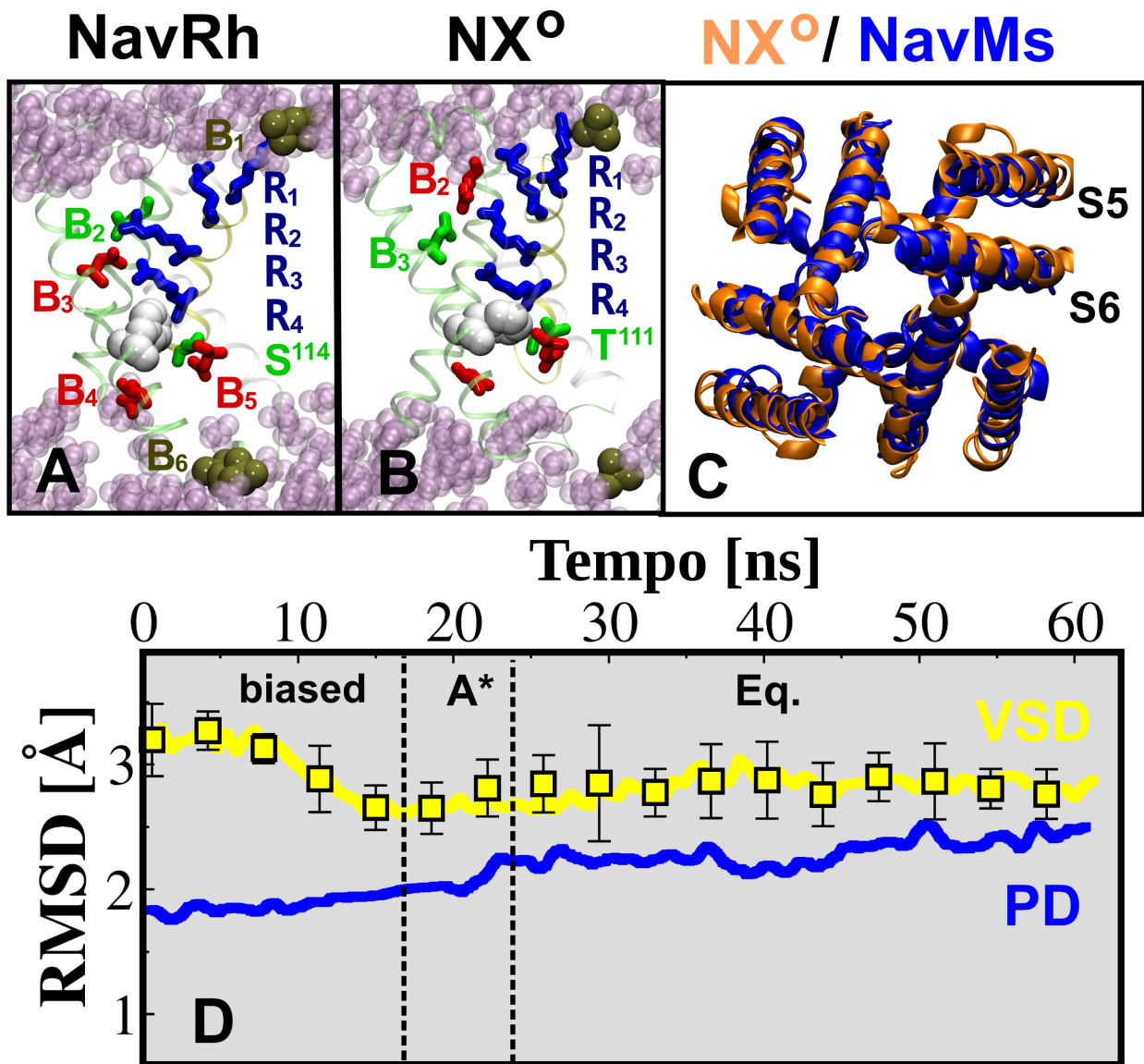


Figura 4.14. A e B: Detalhes estruturais dos *VSD* da conformação NX^0 e da estrutura equilibrada do canal NavRh com destaque para a posição dos *GQR* (bastões azuis) e as interações eletrostáticas/polares com os resíduos ácidos/polares (bastões vermelhos e verdes) e o grupo PO_4^- dos fosfolípidios (ocre). O resíduo altamente conservado Phe (esferas em branco) é mostrado em ambas estruturas. C: Superposição estrutural do *PD* de NX^0 (laranja) e NavMs (azul). D: Perfis de *RMSD* dos segmentos *VSD* (amarelo) e *PD* (azul) de NX^0 . O desvio estrutural da cadeia principal de ambos os domínios são calculados em relação às estruturas NavRh e NavMs respectivamente; as barras de erro para o *VSD* são calculadas a partir das 4 subunidades do canal.

Um estudo recente³² indicou a existência de um acoplamento energético significativo entre os resíduos T¹¹⁰ e D⁶⁰ do estado desativado do canal procarioto NaChBac. Entre as nossas conformações de NavAb, aquela que melhor explica esse dado experimental é a NX⁻, cuja a distância dos C_β entre o par E⁹⁶ e N⁴⁹ (B₃) é 11.01 ± 1.71 Å. Entretanto, os nossos resultados suportam adicionalmente a existência de um estado ainda mais profundo do *VSD* dentro do caminho de desativação que é a conformação NX⁻. Neste, os átomos C_β do par E⁹⁶ e N⁴⁹ (B₃) estão distantes 11.38 ± 0.93 Å entre si. Dessa forma, duas conformações oriundas dos nossos estudos satisfazem a condição experimental para o estado desativado do *VSD*. Entretanto, percebemos claramente a natureza não condutora das conformações NX⁻ e NX⁻ dado a baixa probabilidade de abertura do *PD* dessas estruturas. Ainda mais recente, um estudo aplicando a ligação de íons metálicos a resíduos carregados do *VSD* puderam mapear a rede interações do sensor de voltagem de canais Kv¹⁰⁴. Neste trabalho, é sugerido que conformações do tipo NX⁻ podem ser distinguíveis de outras estruturas não condutoras medindo-se distâncias de resíduos ácidos mais enterrados em relação S4, em comparação com o sítio B₃, que está posicionado no topo da hélice S2 (figura 4.15). De fato, apenas na conformação NX⁻ o resíduo E⁹⁶ encontram-se em proximidade de (8.66 ± 0.51 Å) ao aminoácido N²⁵ (hélice S1), em que este último está ~ 10 Å mais enterrado em comparação ao sítio N⁴⁹ (B₃). Os resíduos correspondentes num canal Kv da família *Shaker* formam espontaneamente ligação metálicas e também dissulfídicas sobre ação de potenciais hiperpolarizados, o que sugere uma interação próxima de resíduos mais enterrados no estado desativado¹¹³. O conjunto de resultados mencionados da literatura dão suporte aos nossos dados que sugerem que o *VSD* da conformação NX⁻ está relacionada com o estado desativado do sensor de voltagem.

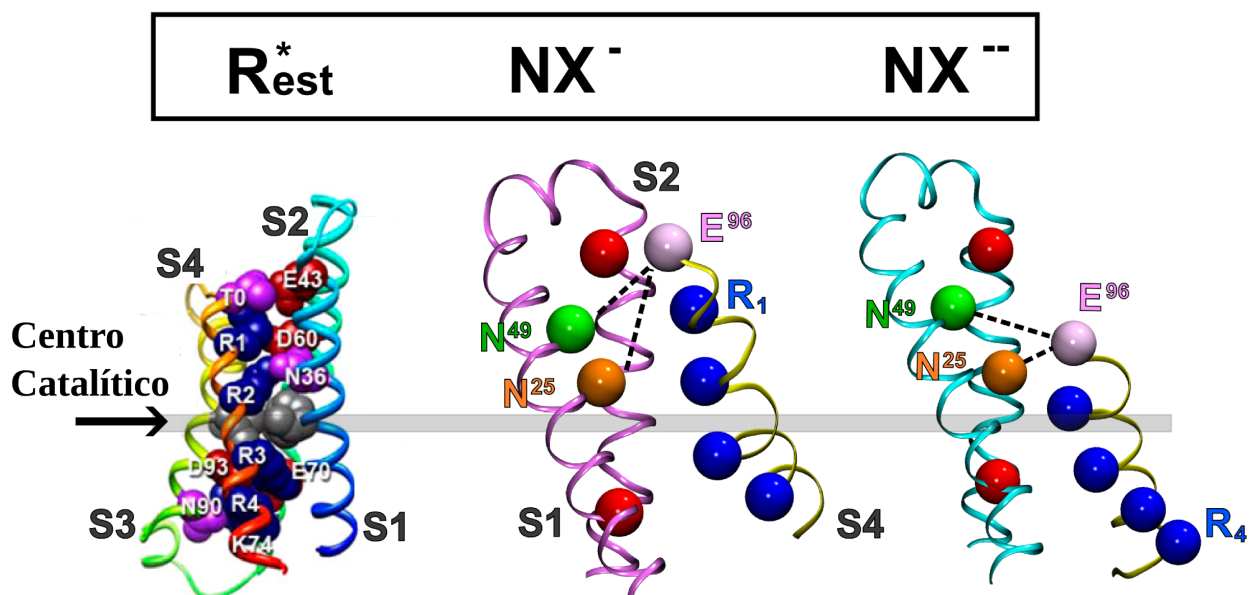


Figura 4.15. Ilustrações em *cartoon* do modelo Rest*³² para o estado desativado do VSD do canal bacteriano NaChBac, e as conformações NX⁻ e NX^{- -} do NavAb. Detalhes dos resíduos chave (esferas) da rede de interações eletrostáticas que caracterizam um dado estado do sensor de voltagem. No canal NavAb estão destacadas as posições dos átomos C_β dos resíduos E⁹⁶ (rosa), R₁, R₂, R₃, e R₄ (azul), N²⁵ (laranja), N⁴⁹ (verde), E³² (superior em vermelho), e E⁵⁹ (inferior em vermelho) das hélices S1, S2 e S4. Por clareza da imagem o segmento S3 do NavAb não é mostrado. As linhas tracejadas destacam as distâncias entre os pares E⁹⁶/N⁴⁹ e E⁹⁶/N²⁵ nas conformações NX⁻ e NX^{- -}. Note que em NX^{- -} a distância entre o par E⁹⁶/N²⁵ é ~ 10 Å menor em comparação à NX⁻. No canal NaChBac as hélices S1-S4 estão coloridas individualmente. A cadeia lateral dos resíduos indicados em Rest* estão representadas por esferas de van der Waals. No NaChBac os resíduos D⁶⁰ e N³⁶ correspondem respectivamente aos aminoácidos N⁴⁹ e N²⁵ do NavAb. Note que, na estrutura Rest* apenas os resíduos R₃ e R₄ cruzam o centro catalítico indicado pela seta (resíduo Phe em esferas cinza), e que portanto, essa configuração está mais relacionada à conformação NX⁻ que NX^{- -}.

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados apontam a estruturas NX⁰ e NX^{- -} como configurações potencialmente representativas dos estados fisiológicos funcionais, i.e ativado/aberto e desativado/fechado, do canal iônico NavAb. Esse resultado é particularmente interessante para o desenvolvimento uma nova gama de estudos como a ligação dependente da conformação de anestésicos gerais e locais à canais membros da superfamília VGCC. O conjunto de resultados sobre as conformações do NavAb foi publicado no prestigioso jornal científico internacional *PNAS*¹¹⁴ e encontra-se no anexo II. Além disso, o trabalho foi escolhido como tema do jornal para ser comentado pelo pesquisador Dr. Erik Lindahl, um dos especialistas mundiais em simulações de canais iônicos transmembrânicos¹¹⁵.

Anexo II

Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations

Cristiano Amaral^a, Vincenzo Carnevale^b, Michael L. Klein^{b,1}, and Werner Treptow^{a,b,1}

^aLaboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF 70910-900, Brasília, Brazil; and ^bInstitute for Computational Molecular Science, Temple University, Philadelphia, PA 19122

Contributed by Michael L. Klein, October 17, 2012 (sent for review September 13, 2012)

The X-ray structure of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb has been reported in a conformation with a closed conduction pore. Comparison between this structure and the activated-open and resting-closed structures of the voltage-gated Kv1.2 potassium channel suggests that the voltage-sensor domains (VSDs) of the reported structure are not fully activated. Using the aforementioned structures of Kv1.2 as templates, molecular dynamics simulations are used to identify analogous functional conformations of NavAb. Specifically, starting from the NavAb crystal structure, conformations of the membrane-bound channel are sampled along likely pathways for activation of the VSD and opening of the pore domain. Gating charge computations suggest that a structural rearrangement comparable to that occurring between activated-open and resting-closed states is required to explain experimental values of the gating charge, thereby confirming that the reported VSD structure is likely an intermediate along the channel activation pathway. Our observation that the X-ray structure exhibits a low pore domain-opening propensity further supports this notion. The present molecular dynamics study also identifies conformations of NavAb that are seemingly related to the resting-closed and activated-open states. Our findings are consistent with recent structural and functional studies of the orthologous channels NavRh, NaChBac, and NavMs and offer possible structures for the functionally relevant conformations of NavAb.

voltage-gated cation channels | ion channel activation mechanism

Voltage-gated cation channels (VGCCs) are membrane-embedded protein pores that allow the selective flow of specific ions across the cell membrane in response to an external voltage stimulus. This remarkable property, which relies on a pore-gating mechanism, enables these channels to perform as critical devices in a number of electrically mediated biological processes including cellular secretion, hormone regulation, electric signaling in neurons, and contraction in excitable muscle cells (1). The superfamily of VGCCs includes the Na⁺, Ca²⁺, K⁺, and nonselective cationic channels, denoted Nav, Cav, Kv, and HCN channels, respectively. VGCCs are either tetrameric or pseudotetrameric with each subunit consisting of six transmembrane (TM) helices, conventionally denoted S1–S6. The helix bundle formed by segments S1–S4 constitutes the voltage-sensor domain (VSD) that triggers the closed–open transition of the conduction pore in response to TM voltage variations. The pore domain (PD) is composed of helices S5 and S6. Charge displacement across the membrane entailed by the conformational transition of the VSD, known as the gating charge (Q), results essentially from the motion of the S4 helix, which is positively charged and contains four to seven basic amino acids, mostly arginines. Gating charges have been measured for a variety of channels, as discussed extensively in recent reviews (2, 3).

In 2005, the MacKinnon group reported an X-ray crystal structure of the mammalian Kv1.2 channel in an “activated-open state” (KA), thereby providing the first structural template to decipher key aspects of VGCC function at the atomic level (4).

Following early molecular dynamics (MD) simulations aimed at characterizing the structural details of the channel embedded in a lipid bilayer (5, 6), several atomistic models for the physiologically relevant deactivated or “resting-closed state” (KR) of Kv1.2 were proposed (7–12). For all of these models, the structure-based measurements of Q [12–14 units of electron charge (e)] were found to be in excellent agreement with experimental estimates for Shaker-like channels (13). Structural analyses of these models demonstrated a remarkably consensual explanation of experimental data (14). The picture of activation emerging from these studies on Kv1.2 provides support to the sliding-helix model (15, 16), which posits that, during activation, S4 moves along the TM direction by sliding through a protein-lined pathway. The motion of S4 results in a total displacement of 8–15 Å and is assisted by the formation and breaking of conformation-dependent salt bridges between the basic amino acids of S4 and negatively charged moieties located on neighboring VSD segments and on the lipid head groups. The functional relevance of this motion relies on the resulting displacement of the S4–S5 linker, the physical connector between S4 and the PD, which surrounds the conduction pore and, in the resting state, acts as a restraining cuff holding the intracellular gate closed.

In 2011, the X-ray structure of a voltage-gated sodium channel from the bacterium *Arcobacter butzleri*, NavAb, was resolved at 2.7 Å (17). This structure featured a closed PD and the four VSDs seemingly activated. The latter was interpreted as representative of the pre-open state of the channel or, in other words, a metastable (intermediate) structure along the pathway connecting the resting-closed state to the activated-open state. Consistently, recent MD simulations of the channel embedded in a lipid membrane have shown structural stability on timescales of ~100 ns (18). Importantly, the NavAb structure provides a high-resolution template for enhancing our knowledge on Na⁺ and related Ca²⁺ channels, for which much less is known. However, there remains a pressing need to relate the reported NavAb X-ray structure to specific functional states of the channel. Given the significant degree of structural similarity shared by members of the VGCC family, more extensive studies on Kv channels are a resource for providing insight into this issue.

Our starting point is the well-understood KA and KR structures of Kv1.2 equilibrated in a lipid bilayer, which correspond to the activated-open (5) and resting-closed (10) conformations, respectively. These structural models are used here as the targets

Author contributions: V.C., M.L.K., and W.T. designed research; C.A., V.C., and W.T. performed research; C.A., V.C., and W.T. analyzed data; and C.A., V.C., M.L.K., and W.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

See Commentary on page 21186.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: mike.klein@temple.edu or treptow@unb.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1218087109/-DCSupplemental.

of a set of MD simulations, which begin with the NavAb X-ray structure that has been equilibrated in a lipid bilayer (18). Our aim is to sample selected conformations along the pathways for VSD activation and PD opening of NavAb. In so doing, we characterize these conformations by computing the value of Q and the PD-opening propensity. Anticipating our results, we find that structural rearrangements of the NavAb VSD comparable to those occurring between the Kv1.2 reference structures (KR and KA) are able to account for the experimental value of Q (13, 19). Furthermore, compared with the KA structure, the VSD conformation in the NavAb X-ray structure seems to restrict PD opening such that it can be only partially open, which agrees with previous findings showing that intermediate states of Shaker-like Kv channels are likely to be nonconductive (20). Importantly, our work has enabled us to identify channel conformations likely to be related to the resting-closed and activated-open states of NavAb. Notably, the VSD of the latter conformation is structurally similar to the corresponding domain of a recently published X-ray crystal structure for the orthologous channel NavRh (21), whereas our activated-open PD is strikingly similar to that very recently reported for NavMs (22).

Results

In previous MD simulation studies, we investigated atomic models of KA (5) and KR (10) built on the basis of the X-ray crystal structure of Kv1.2 (4). Details of these MD simulations are in the original papers. Briefly, each of these Kv1.2 channel conformations was embedded in a lipid bilayer hydrated by an ~ 100 mM KCl solution, and an MD trajectory was carried out for ~ 15 ns at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm), assuming neutral pH and no applied TM electrostatic potential. The structures for KA and KR obtained at the end of the MD simulations are used here as the reference membrane-equilibrated structures of Kv1.2. Recently, we carried out an ~ 100 -ns MD trajectory on the X-ray crystal structure of NavAb (18) embedded in a lipid membrane using the same MD protocol as adopted for Kv1.2 (10). The conformation obtained at the end of the latter trajectory provides a structure of NavAb, hereafter referred to as NX. Superposition of NX onto the KA and KR structures reveals that the NX PD is similar to that of KR. However, the position of the NX S4 helix, relative to the bilayer center, is in-between that of KA and KR.

Sampling VSD Activated and Resting Conformations. The VSD structures for KA and KR were used as reference points to parametrically describe the activation pathway of NavAb in terms of a generalized coordinate, $R(\text{NavAb}, \text{VSD}) = R$, that reports the conformational distance of the NavAb VSD from the corresponding Kv reference points. Thus, $R = 0$ and $R = 1$ are end points on the VSD activation path corresponding to KR and KA, respectively. Several findings, for both Kv and Nav channels, support the notion that the network of salt bridges provides an unambiguous descriptor of VSD conformations along the activation path (23–25). Thus, we characterize a given VSD conformation via a distance matrix, $M(\text{NavAb}, \text{VSD})$, mapping the domain electrostatic interactions, specifically the matrix of distances between the VSD-charged S4 residues (R_1 to R_4) and VSD acidic residues plus lipid phosphate groups (B_1 to B_6). Table S1 gives the identity and numbering of these residues/groups for VGCCs considered in this study.

In this framework, the conformational distance of structure NX averaged over the four VSD subunits is $R = 0.68 \pm 0.03$, which quantifies the intermediate nature of VSD with respect to KA and KR. Starting from NX, we applied biased MD simulations to sample NavAb conformations with differing values of R , seeking possible activated and resting conformations of this channel (Fig. 1). The procedure consisted of combining a biased and an equilibrium MD simulation to first drive the NX VSD toward a given value of the generalized coordinate, R , and then

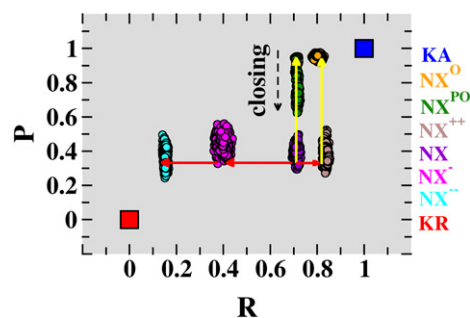


Fig. 1. Conformations associated with voltage-sensor domain activation and pore-domain opening of NavAb. The present unconstrained MD trajectories for membrane-equilibrated NavAb conformations NX^- , NX^- , NX , NX^{++} , NX^{PO} , and NX^O are shown as projections onto a conformational distance space, defined by the generalized coordinates $R(\text{NavAb}, \text{VSD}; t)$ and $P(\text{NavAb}, \text{PD}; t)$. These six conformations correspond to distinct positions along the VSD-activation (red arrows) and PD-opening (yellow arrows) pathways of NavAb. The conformational distance positions corresponding to the activated-open (blue square) and resting-closed (red square) conformations of Kv1.2 are also indicated. The time series of $R(\text{NavAb}, \text{VSD}; t)$ and $P(\text{NavAb}, \text{PD}; t)$, including the biased and equilibrium phases of the simulations, are presented in Fig. S1.

relaxing the resulting structure at that R value without constraints (Fig. S1A). Importantly, the pore domain was *unconstrained* in all phases of the MD protocol. In total, three independent trajectories were generated, sampling channel conformations at $R = 0.85 \pm 0.02$, 0.38 ± 0.06 , and 0.14 ± 0.01 (averaged over four VSD subunits), hereafter referred to as conformations NX^{++} , NX^- , and NX^- , respectively. These specific R values, above and below the value for NX ($R = 0.68 \pm 0.03$), were chosen aiming to sample channel conformations distinct from the NavAb crystal structure in both directions of the activation path. The $R(t)$ profiles for these MD runs and for the equilibrium trajectory of NX indicate that within the timescale of these simulations (~ 30 ns), the structural relaxation of the conformations NX^{++} , NX^- , and NX^- is similar to that of the crystal structure (Fig. S1A). Together, these findings suggest that NX^{++} , NX^- , and NX^- , along with NX , can be envisaged as possible milestones marking the activation pathway of NavAb. Notably, in all of these MD simulations the PD remained closed, in a similar conformation to that in the crystal structure.

Each of the above-mentioned simulations of NavAb features a distinct set of electrostatic interactions in the VSD, as easily visualized by dissection of their salt-bridge interactions (Fig. 2). Here, a given VSD ion pair arginine (R)–B was considered to form a salt bridge for distances < 9 Å. In the particular case of site B_3 of NavAb, hydrogen bonds rather than salt bridges are considered, as this site involves an asparagine instead of the glutamate observed in Kv1.2. In NX^{++} , R_1 to R_4 are exposed to the extracellular milieu, forming salt bridges or hydrogen bonds with binding sites B_1 , B_2 , and B_3 , in an arrangement that closely resembles the KA structure (Fig. 2). By contrast, in NX^- , the S4 residues are paired with sites B_4 , B_5 , and B_6 (Fig. 2 and Table S1) near the intracellular entrance of the domain, which resembles the structure of KR. The VSD structures of NX and NX^- present intermediate salt-bridge arrangements such that the sequence NX^- , NX^- , NX , and NX^{++} indeed suggests an activation pathway, with the so-called catalytic center occupied sequentially by the S4 residues R_2 , R_3 , R_4 , and T^{111} , respectively (Fig. 2). Recall that this center, which is located at an occluded site in the domain formed by B_4 , B_5 , and F^{56} (F^{233} in Kv1.2), has been suggested to catalyze the sequential transfer of the S4 basic residues across the membrane during activation (26). In this respect, NX^- and NX^{++} are similar to KR and KA, with R_2 and K^{306} from Kv1.2 (corresponding to T^{111} in NavAb) occupying the

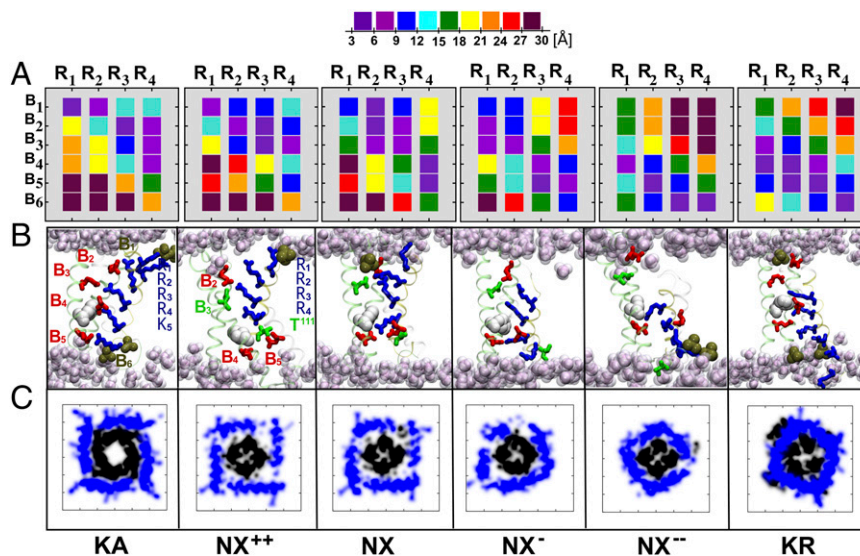


Fig. 2. Voltage-sensor conformations of NavAb. (A) Distance matrices M_{ij} (NavAb, VSD) mapping the domain electrostatic interactions between the S4 basic residues (numbered R_1 to R_4) and their binding sites [numbered B_1 to B_6 for (Upper) PO_4^- , E^{32} , N^{49} , E^{59} , and D^{80} and (Lower) PO_4^- , respectively] in each of the VSD conformations NX^{++} , NX , NX^- , and NX^{--} . For the purpose of comparison, the reference, distance matrices M_{ij} (Kv1.2, VSD) for Kv1.2 in the KA and KR conformations are also depicted; Kv1.2 binding sites are numbered B_1 to B_6 for (Upper) PO_4^- , E^{183} , E^{226} , E^{236} , and D^{259} and (Lower) PO_4^- , respectively. Distance matrices are computed by averaging over the four independent subunits. (B) Snapshots of the VSD for the NavAb and Kv1.2 conformations, highlighting the position of the S4 basic residues (blue sticks) and the salt bridges/hydrogen bonds they form with the acidic/polar residues (red/green sticks) of other VSD segments or with lipid phosphate moieties (ochre). Note that the NavAb “catalytic center,” formed by B_4 , B_5 , and F^{56} (white; F^{233} in Kv1.2), is occupied by the S4 residues R^2 , R^3 , R^4 , and T^{111} . (C) Atomic-density plots for the selected NavAb and Kv1.2 conformations, depicting the positions of the S4–S5 linkers (blue) and S6 helices (black) at the membrane plane placed at the intracellular entrance of the channel. The S4–S5 linker constrains the bundle-crossing region of S6 in the conformations NX^- and NX^{--} , thereby prohibiting pore opening in these structures.

catalytic site in KR and KA, respectively. Furthermore, aside from the salt-bridge arrangement, other measures of structural distance, for example the rmsd, also highlight the structural similarity between NX^{--} and KR and NX^{++} and KA (Table S2).

Measurement of the Gating Charge. Following the direct measurement protocol (27) (*SI Materials and Methods* and Fig. S2), the generated NavAb conformations with distinct R values were then subjected to structure-based Q measurements to identify a pair of VSD structures most likely corresponding to the active and resting states, that is, with a Q value comparable to Q^A , the experimental gating charge. Typically, estimates of Q^A range from 12 to 15 e (13, 19), as measured for a variety of VGCCs. Using NX^{++} as the reference conformation, the computed Q for the structure pairs NX^{++}/NX^{++} , NX^{++}/NX , NX^{++}/NX^- , and NX^{++}/NX^{--} are, respectively, 0.0, -2.14 , -8.32 , and -12.08 e (Table S3); the negative sign implies that, relative to NX^{++} , the set of VSD conformations transfers charge inwardly ($-$) across the membrane capacitance. This analysis indicates unambiguously that only the conformation pair NX^{++}/NX^{--} results in a value of Q (~ 12 e) comparable to the experimental, Q^A . Therefore, NX^{++} and NX^{--} are potential active and resting conformations, respectively. As a consequence, NX and NX^- are putative intermediates on the activation path, as already suggested by their R values. Importantly, given a certain displacement of the basic residues of S4 along the TM direction, the value of Q depends strongly on the local electrostatic field. In light of this, it is remarkable that, despite differences in primary structure between the VSDs of NavAb and Kv1.2 (e.g., number of charged S4 residues and binding sites), the computed Q associated with the activated–resting transition is about the same (~ 12 e) for both channels. This observation raises the intriguing hypothesis that sensitivity to variations in the TM potential, being directly subject to evolutionary pressure, may be more conserved than the VSD sequence itself. As a consequence, typical VSDs are expected to transfer

approximately three elementary units of charge, and thus the activation mechanism may be insensitive to minor structural variations.

Sampling Open-Pore Conformations. The membrane-equilibrated structures NX^{++} , NX , NX^- , and NX^{--} all feature a closed pore. As expected from their distinct VSD conformations, major structural differences among them relate to the positions of S4 and the S4–S5 linker. In NX^{--} , S4 is positioned near the intracellular face and the S4–S5 linker is in close contact with the pore. Relative to NX^{--} , the S4 helix in NX^- , NX , and NX^{++} is, respectively, displaced by 6.5, 13.7, and 15.4 Å in the outward direction along the normal to the membrane, in such a way that the linker is gradually moved apart (detached) from the PD (Fig. 2); in the NX^{++} structure, the linker is displaced laterally by 3.45 Å from the reference position in NX^{--} . Seemingly, the S4–S5 linkers constrain the motion of the S6 bundle to a different extent in each conformation, thereby implying that the PD-opening propensity can be finely modulated by the VSD conformation; in other words, the PD-opening propensity increases as the constraint on the closed pore imposed by the linker is released. In this respect, compared with NX^{++} , NX^{--} and NX^- show a lower PD-opening propensity, but this is less clear for NX . To test this hypothesis, we performed additional MD simulations to probe the PD-opening propensity for different VSD conformations. Following the previous framework, the PD-opening route was described in terms of the generalized coordinate, R (NavAb, PD) = P, which reports the conformational distance of the NavAb PD from the reference conformations in KA and KR, featuring, respectively, an open and closed PD. Here, the PD conformation was described by means of a matrix of distances between the C_α atoms of three PD-lining S6-bundle residues (F_1 to F_3), highly conserved over the entire family of VGCCs and forming the hydrophobic gate along the ionic permeation pathway (Table S1). Here, $P = 0$

and $P = 1$ correspond to PD conformations of KR and KA, respectively.

Starting from the membrane-equilibrated NX structure ($P = 0.33$), we have generated two independent MD trajectories in which first the protein is driven simultaneously toward a conformation with the VSD activated and the PD open ($P \sim 0.95$), and second, the starting structure is guided only to an open-PD conformation. During the procedure where only the PD is biased, the VSD and the S4–S5 linker are left unconstrained. At the end of both independent transformations, the structures were then subjected to an unbiased MD run without any constraints (*Materials and Methods*). For the simulation biased toward NX^{++} , the R value of 0.84 agrees with the previous VSD transformation (Fig. S1B). In addition, the distribution of P values is centered at 0.95, indicating PD stability throughout the trajectory (Fig. 1). It is worth noting that both R and P values were computed from the equilibrium part of the MD trajectory. Consistent with its P value, the final equilibrated structure obtained from this simulation, hereafter referred to as NX^O , exhibits an open PD, as demonstrated by analysis of the PD volume (28).

In NX^O , Ile²¹⁷ constitutes the major constraining element along the permeation pathway, delineating a hydrophobic constriction with a PD radius of ~ 3.0 Å which, compared with KA (29), is large enough to allow full hydration of the permeation pathway and ion conduction. Indeed, in a short independent MD simulation performed in the presence of a TM voltage potential, we observe permeation of Na⁺ ions through the lumen of NX^O (Movie S1). In contrast, in an MD simulation with the VSD in the NX conformation, the target PD structure was not stable, and relaxed into an intermediate configuration, as shown by the drift from the initial biased P value (dashed black arrow in Fig. 1). The final equilibrated structure resulting from this simulation, NX^{PO} , exhibits a partially open PD conformation, in which the Met²²¹ constrains the PD radius at ~ 2.0 Å. Although large enough to allow partial hydration, this conformation does not allow ion conduction, as indicated by a recent investigation on the orthologous channel, NaChBac (30). The equilibrated PD structures are significantly different, suggesting a larger PD-opening propensity for NX^{++} compared with NX. Moreover, as seen in Fig. S3, the selectivity filter radius in the NX^O conformation is slightly larger than in NX^{PO} and NX^{++} , suggesting that the selectivity filter in the crystal structure may be different from that of an active conformation of the channel. Additional studies are required to clarify whether these structural differences have functional relevance or originate from an incomplete sampling of the structural fluctuations of the channel or possibly an experimental artifact (e.g., low temperature or bicelle environment). Finally, note that, in Kv1.2, the existence of two hinge points along S6—the first corresponding to a conserved glycine residue at the N terminus of the segment and the second to the well-known Pro-Val-Pro motif—favor a kinked helical structure for the segment in the open conformation of the channel (KA). In contrast, for NavAb, the S6 flexibility seems to rely primarily on Pro²⁰⁰ at the N terminus, and thus S6 adopts a tilted (nonkinked) helical structure in the open conformation of NavAb (NX^O). This difference is reflected in the atomic-density plots, which show a distinct pattern of occupancy at the membrane plane on the intracellular side of the channel (Fig. 2 and Fig. S3).

Discussion

Owing to the structural similarity among members of the large family of VGCCs, both the voltage-sensing process and the gating mechanism are expected to be common features, analogous to that unveiled for Kv1.2. Indeed, results from site-directed spin labeling and EPR spectroscopy support the notion that the VSD of NaChBac, and particularly its voltage-sensing pathway, may be similar to that of several K⁺ channels (31). Here, under this working hypothesis, structural models (KA and

KR) of Kv1.2 were used to drive biased and equilibrium MD simulations that explored the conformational space of NavAb. Importantly, although in our strategy the biasing phase depends strongly on the chosen templates, relaxation potentially allows discovery of independent configurations. Gating-charge measurements then suggest the VSD structure in NX^{++} and NX^{--} as conformations potentially related to the activated and resting states of this channel.

While this manuscript was in preparation, the X-ray structure of NavRh, an NaChBac ortholog from the marine *Alphaproteobacterium* HIMB114, was solved at 3.05-Å resolution showing the VSD in a depolarized (active) conformation but with a closed PD structure (21). To compare the NavAb conformations against NavRh, we performed an additional MD simulation to relax the NavRh in a membrane. Although moderate to substantially different from NX, NX^- , and NX^{--} , the VSD conformation in the relaxed NavRh structure bears strong similarity to the domain in NX^{++} (Fig. 3). Specifically, the S4 gating charges occupy the aqueous cleft lying above the occluded site on the extracellular side in the VSD of both structures, forming a similar salt-bridge arrangement as indicated by their conformational distances, namely $R_{Ab} = 0.85 \pm 0.02$ and $R_{Rh} = 0.86 \pm 0.01$. Rmsd values of 2.47 ± 0.99 Å and 2.55 ± 0.29 , computed for the main-chain atoms of S4 and VSD, respectively, further indicate their structural similarity (Table S2). Moreover, a recent investigation of the orthologous bacterial channel, NaChBac (25), has provided an extensive set of state-dependent interactions between residues in S1 and S2, and the gating residues of S4, based on analysis of disulfide locking of cysteine double mutants. The latter study shows that the NaChBac residues R¹²² (R₄) and D⁶⁰ (B₃) interact in the active conformation of the VSD, providing unambiguous structural information. Among the NavAb VSD conformations, this constraint is best satisfied by NX^{++} , in which the average distance between the C_β atoms of R₄ and N⁴⁹ (B₃) is 10.70 ± 0.33 Å, consistent with their probed propensity of interacting in the active state of the channel (Fig. S4 and Table S4).

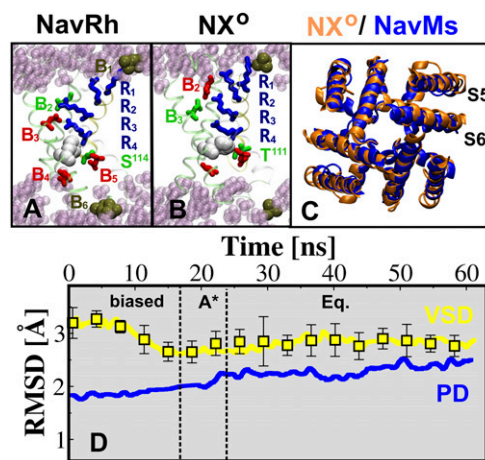


Fig. 3. (A and B) Snapshots of the VSD of NavAb NX^O and NavRh, highlighting the position of the S4 basic residues (blue sticks) and the salt bridges/hydrogen bonds they form with the acidic/polar residues (red/green sticks) of other VSD segments or with the lipid phosphate moieties (ocre). The highly conserved Phe residue (white), forming the catalytic center, is shown for both structures. (C) Structural superposition of the PD of NX^O (orange) and NavMs (blue). (D) Rmsd profiles of selected segments of NavAb NX^O , VSD (yellow), and PD (blue). The rms deviations of the backbone atoms for the VSD and PD are calculated with respect to the X-ray structure of NavRh and NavMs, respectively; for the VSD, the acidic/polar binding sites within the VSD were superposed and the average over the four subunits is reported, with associated error bars.

Taken together, these findings give strong support to the notion that the VSD conformation in NX^{++} is fully activated.

A recent study (25) suggested the existence of significant energetic coupling between T^{110} and D^{60} (B_3) in the resting state of NavChBac. Among our NavAb structures, NX^- , with a distance of 11.01 ± 1.71 Å between the C_β atoms of residues E^{96} and N^{49} (B_3), best explains the experimental observation. However, our analysis also supports the notion that a deeper NX^{--} -like conformation of the VSD is likely to exist in the resting state of the channel. In the latter, the C_β atoms in the pair of residues E^{96} and N^{49} (B_3) are 11.38 ± 0.93 Å apart. Thus, from the perspective of the present work, two conformations are consistent with the experiment (25). However, we note the nonconductive nature of NX^- and NX^{--} , as suggested by their low PD-opening propensities. Very recent metal-ion bridge experiments have tracked the VSD cycle in the Kv channel (12). The latter work suggests that NX^{--} -like conformations could be distinguishable from other nonconductive structures by considering deeper sites, rather than B_3 , which is positioned at the top of S2, to probe the conformation-dependent interactions of S4 (Fig. S4). Indeed, only NX^{--} shows E^{96} in close proximity (8.66 ± 0.51 Å) to N^{25} in S1, which is inwardly positioned ~ 10 Å away from the site of N^{49} (B_3) (Table S4); the corresponding residues in the Shaker channel spontaneously form disulfide and metal bridges at hyperpolarized potentials, suggesting their close proximity in the resting state (32). All of this corroborates our finding that the VSD of NX^{--} is likely related to the resting conformation.

As mentioned above, presently there is an activated-open X-ray crystal structure of Kv1.2 and several proposed molecular models for the resting-closed state of the channel. Specifically, in the model by Pathak et al. (7), S4 is ~ 8 Å inwardly positioned relative to the activated state. The models by Delemotte et al. (10) and Jensen et al. (11), although agreeing with the former model, show a larger vertical inward displacement of S4 relative to the activated state, namely ~ 15 Å. Very recently, Henrion et al. (12) proposed a resting-state model (they call C3) for which the up-down S4 displacement is ~ 12 Å. In the same study, another VS conformation (C4), in which S4 is more deeply located within the domain (~ 17 Å), was further considered to match the experimental data; this latter conformation is, however, thought to be reached solely under enduring hyperpolarized pulses. Thus, the picture of activation emerging from these structural studies suggests that S4 moves about 8–15 Å in the TM direction. It is noteworthy that here, relative to NX^{++} , the S4 helix in NX^{--} is displaced by 15.4 Å in the inward direction, which is consistent with the previous studies on Kv1.2. Furthermore, the sequential VS conformational transitions on passing from NX^{++} to NX^{--} involve a sliding motion of the salt-pairing interactions as a result of the S4 basic residues moving from external to internal binding sites along the domain; the sequential transitions are, respectively, accompanied by the motion of one of the S4 residues, T^{111} , R_4 , R_3 , and R_2 , across the catalytic center (Movie S2).

Our findings are consistent with recent experiments demonstrating the existence of sequential S4 salt-bridge pairing during the activation process (23–25) and with previous MD simulations studies on the intermediates states of the VSD in Kv1.2 (10). Importantly, in this scenario, the conformational transition from NX^{++} to NX^- thus corresponds to an early stage of the deactivation process of NavAb (21). Indeed, although an intermediate, the net value of Q associated with NX^{++}/NX^- was found to correspond to only $\sim 20\%$ of Q^A , suggesting that the X-ray structure is functionally closer to the active than to the resting conformation. In agreement with findings of a recent computational investigation (33), we observe that some of the residues of S4 populate the 3_{10} -helix conformation in a significant fraction of the molecular configurations sampled along the trajectory (Fig. S5). The α - to 3_{10} -helix transition has been proposed to facilitate the sliding of S4

through the constrained region, and therefore different residues are expected to be in the 3_{10} conformation in different activation states. Our analysis of the secondary structure content of S4 suggests that, despite a significant degree of heterogeneity among the four subunits, the region populating the 3_{10} conformation moves from the N to the C terminus of S4 on passing from the resting to the activated state, thereby providing support to the picture of a moving helix transitioning from α to 3_{10} as it crosses a constriction.

MD simulations exploring channel conformations along the PD-opening pathway reveal that the NX VSD constrains the pore up to a partially open state, as observed in the NX^{PO} structure. Only for NX^O , which exhibits four NX^{++} VSDs in the activated conformation, is the pore structure remarkably stable in the open conformation. Very recently, the X-ray structure of an ortholog of NavAb, namely NavMs, has been determined at 3.5 Å in a micelle-embedded open-PD conformation (22). The PDs of NX^O and NavMs show significant structural similarity, as indicated by the small rmsd values and, most importantly, by the highly similar arrangements of the helices in the S6 bundle (Fig. 3 C and D). Thus, we conclude that NX^O and NX^{--} are likely to be reasonable representations of the activated-open and resting-closed states of NavAb.

Materials and Methods

Conformational Analysis of VSD and PD. We describe the instantaneous conformation of the VSD and PD by means of a distance matrix, $M_{ij}(NavAb, l; t) = r_{ij}(NavAb, l; t)$, where l is the domain considered ($l \in \{VSD, PD\}$) and r_{ij} is the distance between the geometrical centers of the charged moiety of a given S4 residue ($j \in \{R_1, R_2, \dots, R_4\}$) and the charged moiety of a given negatively charged or polar group ($i \in \{B_1, B_2, \dots, B_6\}$). For the PD distance matrix, we consider three PD-lining residues in the S6-helix bundle ($i, j \in \{F_1, F_2, F_3\}$); r_{ij} is the C_α - C_α average distance between nonadjacent subunit (i, j) pairs. Table S1 presents the identities of the (i, j) sets for the NavAb, NavRh, and Kv1.2 channels.

By describing the conformations of KA and KR in Kv1.2 as $M_{ij}(KA, l; t) = r_{ij}(KA, l; t)$ and $M_{ij}(KR, l; t) = r_{ij}(KR, l; t)$, respectively, we define the conformational distance $R(NavAb, l; t)$ of NavAb from the Kv-reference structures as follows:

$$R(NavAb, l; t) = [D(KR, l, KA, l) + D(NavAb, l, KR, l; t) - D(NavAb, l, KA, l; t)]/2 \times D(KR, l, KA, l). \quad [1]$$

Here, $D(KR, l, KA, l)$ is the rmsd between the distance matrices of domain l in KA and KR. $D(NavAb, l, KR, l; t)$ and $D(NavAb, l, KA, l; t)$ are the rms deviations between the instantaneous distance matrix of domain l in NavAb and the corresponding matrices of KA and KR, respectively. Note that $R(NavAb, l; t) = 0.5$ for NavAb conformations with equivalent deviations from the reference conformations; otherwise, $R(NavAb, l; t)$ tends to 0 and 1 in the limits of NavAb conformations identical to KR and KA, respectively.

Sampling Selected VSD and PD Conformations. The present procedure consisted of applying a biased and an equilibrium MD simulation to the membrane-bound NavAb structure, NX , to guide it to a given R value and then relaxing the structure at that conformational distance without constraints. Note the PD structure is also unconstrained. Three independent trajectories were generated, sampling NavAb conformations at $R = 0.85 \pm 0.02$, 0.38 ± 0.06 , and 0.14 ± 0.01 (average values over the four VSD subunits). The final membrane-equilibrated structures obtained from these simulations are referred to as NX^{++} , NX^- , and NX^{--} , respectively. In two additional independent MD simulations, the PD-closed structures NX and NX^{++} were first biased toward an open-PD conformation ($P \sim 0.9$) and then submitted to relaxation without any constraints. The final membrane-equilibrated structures obtained from these MD runs are labeled NX^{PO} and NX^O , respectively. For details, see [SI Materials and Methods](#).

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported in part by National Institutes of Health Grant NIGMS P-01 55876 and the Commonwealth of Pennsylvania. The computations were performed using resources from XSEDE (www.xsede.org/high-performance-computing) Grant MCA935020. W.T. thanks the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for support under Grants 470406/2011-9 and 141009/2009-8.

- Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer, Sunderland, MA), 2nd Ed.
- Bezanilla F (2005) The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends Biochem Sci* 30(4):166–168.
- Catterall WA (2010) Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67(6):915–928.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309(5736):897–903.
- Treptow W, Tarek M (2006) Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys J* 90(9):L64–L66.
- Jogini V, Roux B (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys J* 93(9):3070–3082.
- Pathak MM, et al. (2007) Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron* 56(1):124–140.
- Nishizawa M, Nishizawa K (2009) Coupling of S4 helix translocation and S6 gating analyzed by molecular-dynamics simulations of mutated Kv channels. *Biophys J* 97(1):90–100.
- Khalili-Araghi F, et al. (2010) Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel. *Biophys J* 98(10):2189–2198.
- Delemotte L, Tarek M, Klein ML, Amaral C, Treptow W (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(15):6109–6114.
- Jensen MØ, et al. (2012) Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336(6078):229–233.
- Henrion U, et al. (2012) Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:8552–8557.
- Aggarwal SK, MacKinnon R (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16(6):1169–1177.
- Vargas E, Bezanilla F, Roux B (2011) In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron* 72(5):713–720.
- Catterall WA (1986) Voltage-dependent gating of sodium channels: Correlating structure and function. *Trends Neurosci* 9:7–10.
- Guy HR, Seetharamulu P (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(2):508–512.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475(7356):353–358.
- Carnevale V, Treptow W, Klein ML (2011) Sodium ion binding sites and hydration in the lumen of a bacterial ion channel from molecular dynamics simulations. *J Phys Chem Lett* 2(19):2504–2508.
- Kuzmenkin A, Bezanilla F, Correa AM (2004) Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: Voltage-dependent charge movement and gating currents. *J Gen Physiol* 124(4):349–356.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol* 103(2):321–362.
- Zhang X, et al. (2012) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486(7401):130–134.
- McCusker EC, et al. (2012) Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat Commun*, 3: Article 1102.
- DeCaen PG, Yarov-Yarovoy V, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA (2009) Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(52):22498–22503.
- Wu D, et al. (2010) State-dependent electrostatic interactions of S4 arginines with E1 in S2 during Kv7.1 activation. *J Gen Physiol* 135(6):595–606.
- Yarov-Yarovoy V, et al. (2012) Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(2):E93–E102.
- Tao X, Lee A, Limapichat W, Dougherty DA, MacKinnon R (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science* 328(5974):67–73.
- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131(6):2107–2109.
- Smart OS, Goodfellow JM, Wallace BA (1993) The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys J* 65(6):2455–2460.
- Treptow W, Tarek M (2006) Molecular restraints in the permeation pathway of ion channels. *Biophys J* 91(3):L26–L28.
- Barber AF, et al. (2012) Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim Biophys Acta* 1818(9):2120–2125.
- Chakrapani S, Sompornpisut P, Intharathep P, Roux B, Perozo E (2010) The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(12):5435–5440.
- Campos FV, Chanda B, Roux B, Bezanilla F (2007) Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(19):7904–7909.
- Schwaiger CS, Bjelkmar P, Hess B, Lindahl E (2011) 3₁₀-Helix conformation facilitates the transition of a voltage sensor S4 segment toward the down state. *Biophys J* 100(6):1446–1454.

Supporting Information

Amaral et al. 10.1073/pnas.1218087109

SI Materials and Methods

Molecular Dynamics Protocol. The molecular dynamics (MD) simulations were carried out using the program NAMD2 (1). Langevin dynamics was applied to keep the temperature (300 K) fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm (2). Short- and long-range forces were calculated every 1 and 2 time steps, respectively, with a time step of 2.0 fs. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach (3), and the water molecules were described using the TIP3P model (4). The simulation used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein (5) and the all-atom CHARMM36 force field for the phospholipids (6).

Simulating NavAb Structures Under Hyperpolarized-Membrane Conditions. With the purpose of performing structure-based gating-charge measurements (see below), each of the membrane-equilibrated NavAb structures NX^{++} , NX , NX^{-} , and NX^{--} was simulated under hyperpolarized-membrane conditions using a charge-imbalance protocol (7). In this scheme, the channel-membrane system is bathed in ~ 100 mM NaCl salt concentration and air-water interfaces are then created at both sides of the membrane by extending the length of the simulation box in the direction perpendicular to the membrane. After a short equilibration of 1 ns run at constant volume, a transmembrane (TM) potential, ΔV , is imposed on the system by displacing Na^{+} ions from one aqueous compartment to the other, while keeping the overall concentration of the bulk phases constant. Because the channel-membrane system behaves as a condenser, the imbalance q_0 between the electrolytes creates ΔV (Fig. S2). Production runs were performed at constant volume.

Electrostatic Potential. For a given system configuration j , the electrostatic potential $\Phi_j(\vec{r}, \Delta V)$ at position \vec{r} was computed using the PME method as implemented in NAMD (8). In this scheme, the potential is obtained by solving Poisson's equation,

$$\nabla^2 \Phi_j(\vec{r}, \Delta V) = -4\pi \sum_i \rho_i(\vec{r}), \quad [S1]$$

where ρ_i is the point charge approximated by a spherical Gaussian of inverse width σ_i and the summation runs over all atoms in the system. We considered a grid of $1.5 \times 1.5 \times 1.5 \text{ \AA}^3$ and $\sigma = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$.

Direct Measurement of Gating Charges. For a channel-membrane system, the voltage difference ΔV across the membrane is defined as $\Delta V = V_i - V_e$, with V_i and V_e , respectively, as the voltages of the internal and external membrane regions. In the present protocol, ΔV is related to the charge imbalance, q_0 , between the electrolytes through $\Delta V = C^{-1} Q_0$. Here, Q_0 is the charge imbalance q_0 per membrane area A , that is, $Q_0 = A^{-1} q_0$. The quantity C is the membrane capacitance, which is constant for the channel-membrane system (9, 10), and q_0 can be written as $q_0 = q_i - q_e$, with q_i and q_e being, respectively, the net charge within the internal and external regions of the system. Note that q_0 results from contributions from protein charges and ions in solution, $q_0 = q_0^{protein} + q_0^{ion}$ and, accordingly, we can relate $q_0^{protein}$ to ΔV through $q_0^{protein} = -q_0^{ion} + AC\Delta V$. This allows us to compute the gating charge (Q) associated with two conformational states of the channel λ_1 and λ_2 as

$$Q = -\frac{1}{2} [q_0^{protein}(\lambda_2) - q_0^{protein}(\lambda_1)] \quad [S2]$$

with $q_0^{protein}(\lambda_2)$ and $q_0^{protein}(\lambda_1)$ being the charge imbalance due to protein charges in the λ_1 and λ_2 conformations, respectively.

Here, for each of the membrane-bound NavAb structures NX^{++} , NX , NX^{-} , and NX^{--} , the electrostatic potential, $\Phi_j(\vec{r}, \Delta V)$, was calculated as an average over $n = 100$ system configurations sampled along 1 ns of a hyperpolarized-membrane simulation, that is,

$$\Phi(\vec{r}, \Delta V) = \frac{1}{100} \sum_{j=1}^{100} \Phi_j(\vec{r}, \Delta V). \quad [S3]$$

The average of $\Phi_j(\vec{r}, \Delta V)$ over x and y provides the electrostatic potential profile Φ_z along the membrane normal (Fig. S2), and the difference between the Φ_z values at the two electrolyte regions of the systems provides the estimate of ΔV ; as a reference, Φ_z was set to zero in the upper electrolyte. Finally, by considering Eq. S2, we compute the gating charge associated with each of the NavAb structures by considering the channel conformation NX^{++} as the reference structure (Table S3). Here, we compute q_0^{ion} relative to the center of the bilayer and consider the membrane capacitance estimated for a channel-membrane system, that is, $C = 0.9 \times 10^{-22} \text{ C} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ (9); ΔV corresponds to the voltage estimated from the average over a simulation time window of 1 ns.

Conformational Analysis of Voltage-Sensor Domains and Pore Domains.

The values of the two generalized coordinates, R (*NavAb*, *VSD*; t) = R and R (*NavAb*, *PD*; t) = P were computed along the MD trajectory using the formula

$$R(\text{NavAb}, l; t) = [D(KR, l, KA, l) + D(\text{NavAb}, l, KR, l; t) - D(\text{NavAb}, l, KA, l; t)] / 2 D(KR, l, KR, l), \quad [S4]$$

where $D(KR, l, KA, l)$ is the rmsd between the distance matrices of domain l in the activated-open (KA) and resting-closed (KR) structures. $D(\text{NavAb}, l, KR, l; t)$ and $D(\text{NavAb}, l, KA, l; t)$ are the rms deviations between the instantaneous distance matrix of domain l in NavAb and the corresponding matrices of KA and KR, respectively. Distance matrices are defined as $M_{ij}(\text{NavAb}, l; t) = r_{ij}(\text{NavAb}, l; t)$, where l is the domain considered ($l \in \{VSD, PD\}$) and r_{ij} is the distance between the geometrical centers of the charged moiety of a given S4 residue ($j \in \{R_1, R_2, \dots, R_4\}$) and the charged moiety of a given negatively charged or polar group ($i \in \{B_1, B_2, \dots, B_6\}$). For the pore-domain (PD) distance matrix, we consider three PD-lining residues in the S6-helix bundle ($i, j \in \{F_1, F_2, F_3\}$); r_{ij} is the C_{α} - C_{α} average distance between nonadjacent subunit (i, j) pairs.

Sampling Selected Voltage-Sensor Domain Conformations. The present procedure consisted of applying a biased and an equilibrium MD simulation to the membrane-bound NavAb structure, NX , to guide it to a given R value and then relaxing the structure at that conformational distance without constraints. Note that the PD structure is also unconstrained. Three independent trajectories were generated, sampling NavAb conformations at $R = 0.85 \pm 0.02$, 0.38 ± 0.06 , and 0.14 ± 0.01 [average values over the four voltage-sensor domain (VSD) subunits]. The final membrane-equilibrated structures obtained from these simulations

are referred to as NX^{++} , NX^{-} , and NX^{--} , respectively. In detail, the biasing part of the MD simulation sampling the NavAb conformation at $R = 0.85 \pm 0.02$ was accomplished as follows. The voltage sensors of NX and KA were first superposed, taking into consideration the main-chain atoms of the binding sites B_2 through B_5 . A set of harmonic constraints, with a magnitude of $4.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ and a velocity of $0.25 \text{ \AA}/\text{ns}$, was then applied on the C_{α} and the side-chain atoms $H_2N = C_{\alpha}(NH_2)-N_{\epsilon}H-C_{\delta}H_2$ of the S4 basic residues of NX, pulling the four VSDs toward KA until the channel reached the target conformational distance; the C_{α} atom positions of the protein's negatively charged binding sites B_2 through B_5 were fixed by harmonic constraints during the procedure. By pulling the NX VSD structures toward KR, we followed the same protocol to sample the NavAb conformation at $R = 0.38 \pm 0.06$ and 0.14 ± 0.01 . After the initial biasing step, the harmonic constraints are slowly released (over ~ 4 ns) from the N to the C terminus of the protein. The equilibrium regime was achieved after relaxation of the channel structure for ~ 30 ns, without any applied constraints (Fig. S1).

Sampling Selected PD Conformations. In two independent MD simulations, the PD-closed structures NX and NX^{++} were first biased toward an open-PD conformation ($P \sim 0.9$) and then submitted to relaxation without any constraints for ~ 30 ns. The final membrane-equilibrated structures obtained from these MD runs are labeled NX^{PO} and NX^O , respectively. In these simulations, by considering the main-chain atoms of residues F_1 through F_3 (Table S1) of NX and NX^{++} superposed on KA, the structure of NavAb was pulled toward KA by applying harmonic constraints ($4.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ and $0.25 \text{ \AA}/\text{ns}$) on the C_{α} atoms of residues F_1 through F_3 , while constraining the VSD and the S4–S5 linker at their reference NX or NX^{++} configuration; each pulling procedure lasted until the target conformational distance

of ~ 0.9 was reached. After the initial step, the channel was equilibrated following the same protocol as for sampling NavAb conformations along R, that is, annealing (~ 4 ns) plus unconstrained equilibration (~ 30 ns).

Structural Analysis of PD. We analyzed the pore-radius profiles of the final structures resulting from the equilibration runs for NX^O and NX^{PO} . As expected, NX^{PO} shows an intermediate character compared with NX^O and NX. Indeed, the radius of the pore at the constriction region is ~ 1.0 , ~ 2.0 , and 3.0 \AA for NX, NX^{PO} , and NX^O , respectively. Importantly, the constriction results from the close proximity of different residues in NX^{PO} and NX^O ; the major constraining element is Met²²¹ for the former and Ile²¹⁷ for the latter.

Secondary Structure Content of the S4 Segment. To detect possible α - to 3_{10} -helix transitions in S4 occurring along the activation pathway, we analyzed the secondary structure content of the segment spanning residues 96–112 using STRIDE (11). Relative occupancies of each of the secondary structure states defined in STRIDE were computed by taking the average over the four subunits and over the molecular configurations sampled along the equilibrium part of the trajectory. Interestingly, the secondary structure content is significantly different across the states: in the central and C-terminal regions of S4, the 3_{10} -helix content is larger in NX^{++} than in NX, and almost absent in NX^{-} and NX^{--} . These results are consistent with those previously obtained for Kv1.2, which shows a larger 3_{10} -helix propensity only in the C-terminal region of S4 in the activated conformation. Transition to the resting-state conformation during deactivation causes S4 to refold into an α -helix. Importantly, all of the resting-state models of Kv1.2 proposed so far show S4 in an α -helix conformation.

- Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26 (16):1781–1802.
- Izaguirre JA, Reich S, Skeel RD (1999) Longer time steps for molecular dynamics. *J Chem Phys* 110(20):9853–9864.
- Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98(12):10089–10092.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79(2):926–935.
- MacKerell AD, Jr., Feig M, Brooks CL III (2004) Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J Am Chem Soc* 126(3):698–699.
- Klauda JB, et al. (2010) Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types. *J Phys Chem B* 114(23):7830–7843.
- Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Phys Chem B* 112(18):5547–5550.
- Aksimentiev A, Schulten K (2005) Imaging α -hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys J* 88 (6):3745–3761.
- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131(6):2107–2109.
- Stefani E, Toro L, Perozo E, Bezanilla F (1994) Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys J* 66(4):996–1010.
- Frishman D, Argos P (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23(4):566–579.

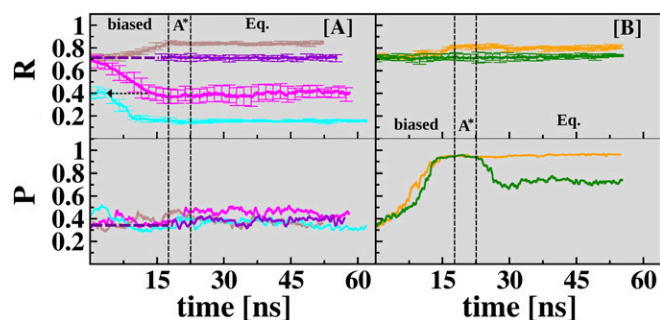


Fig. S1. Membrane-equilibrated conformations of NavAb. (A) R ($NavAb, VSD; t$) = R and R ($NavAb, PD; t$) = P profiles for the MD trajectories of the membrane-equilibrated NavAb conformations NX^{++} (brown), NX (violet), NX^{-} (magenta), and NX^{-} (cyan). Labels: biased, A^* , and Eq. indicate, respectively, the biased, annealing, and equilibration phases of the MD trajectories. (B) As in A for the NavAb conformations NX^O (orange) and NX^{PO} (green). The profiles are computed according to Eq. 1; R profiles are averaged over the four channel subunits. Note the significant relaxation of P in the simulation, yielding the partially open channel structure, NX^{PO} . The equilibrium portion of the profiles is plotted in Fig. 1 to represent the projection of the MD trajectories onto the conformation-distance space $\{R(NavAb, VSD), P(NavAb, PD)\}$.

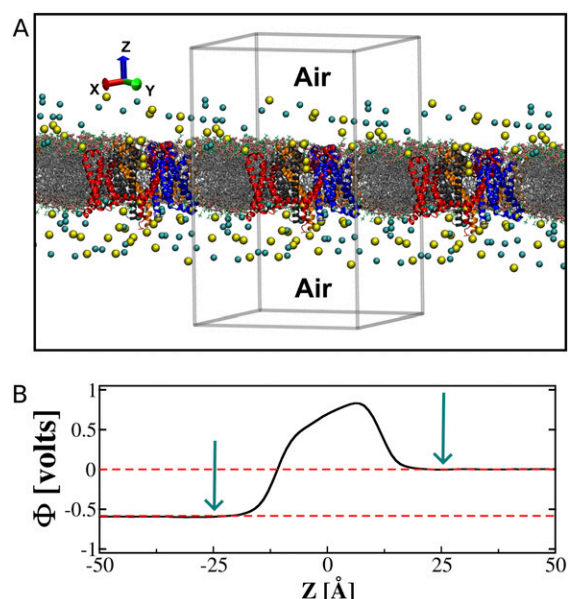


Fig. S2. Charge-imbalance simulation protocol enabling the application of a TM potential. (A) Cartoon illustrating a typical simulation setup of the channel embedded in a POPC (1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) bilayer (licorice), surrounded by a 100 mM NaCl solution (Na in yellow, Cl in cyan, and water removed for visual clarity) and delimited by a pair of air-water interfaces along the z direction. The dimensions of the simulation box (gray) are $x = 130 \text{ \AA}$, $y = 130 \text{ \AA}$, and $z = 300 \text{ \AA}$. (B) Electrostatic potential profile along the bilayer normal, z of the channel-membrane system at hyperpolarized potentials. Φ_z is the average of $\Phi(r, \Delta V)$ over x and y coordinates. As a reference, Φ_z is set to zero in the upper electrolyte. In the present protocol, Φ_z shows plateau values in the aqueous regions (arrows). The red dashed lines define the applied voltage across the membrane bilayer. The difference between the plateau values at the two electrolytes corresponds to the TM potential ΔV .

Table S1. Residues/groups considered for computation of the VSD and PD distance matrices

Channel	R ₁ , ..., R ₄ *	B ₁ , ..., B ₆ *	F ₁ , ..., F ₃
Kv1.2	R ²⁹⁴ , R ²⁹⁷ , R ³⁰⁰ , R ³⁰³	PO ₄ ⁻ (outer), E ¹⁸³ , E ²²⁶ , D ²⁵⁹ , E ²³⁶ , PO ₄ ⁻ (inner)	I ⁴⁰² , V ⁴⁰⁶ , V ⁴¹⁰
NavAb	R ⁹⁹ , R ¹⁰² , R ¹⁰⁵ , R ¹⁰⁸	PO ₄ ⁻ (outer), E ³² , N ⁴⁹ , E ⁵⁹ , D ⁸⁰ , PO ₄ ⁻ (inner)	M ²⁰⁹ , V ²¹³ , I ²¹⁷
NavRh	R ¹⁰² , R ¹⁰⁵ , R ¹⁰⁸ , R ¹¹¹	PO ₄ ⁻ (outer), N ²⁵ , D ⁴⁸ , E ⁵⁸ , D ⁸¹ , PO ₄ ⁻ (inner)	I ²¹¹ , V ²¹⁵ , L ²¹⁹

*For computation of the r_{ij} distances in the voltage-sensor distance matrix, the ij moieties correspond to the side-chain atoms H₂N = C_γ(NH₂)—N_εH—C_δH₂ (Arg), —OOC_γ—C_βH₂ (Asp), H₂N_{δ2}O_{δ1}C_δ—C_βH₂ (Asn), —OOC_δ—C_γH₂ (Glu), and the lipid phosphate group PO₄⁻.

Table S2. Rmsd (Å) between NavAb and the reference structures KA, KR, and NavRh

Reference	NX ⁺⁺		NX		NX ⁻		NX ⁻⁻	
	S4	VSD	S4	VSD	S4	VSD	S4	VSD
NavRh	2.47 ± 0.99	2.55 ± 0.29	3.93 ± 0.12	3.25 ± 0.86	11.26 ± 1.46	6.08 ± 0.66	20.07 ± 1.21	10.43 ± 0.72
KA	3.59 ± 0.71	3.99 ± 0.17	4.48 ± 0.21	4.76 ± 0.10	8.36 ± 1.03	5.73 ± 0.20	16.74 ± 1.21	9.01 ± 0.49
KR	16.93 ± 0.94	9.19 ± 0.38	16.10 ± 0.64	9.00 ± 0.30	7.99 ± 1.62	5.98 ± 0.94	5.13 ± 0.92	4.11 ± 0.74

The rmsd values are estimates of the overall displacement of backbone segments of S4 and VSD. The rmsd values are calculated by superposing the acidic/polar binding sites within the VSD and are presented as averages over the four subunits.

Table S3. Direct measure of Q for the VSD conformations NX⁺⁺, NX, NX⁻, and NX⁻⁻

Conformations	ΔV (volts)	Lipid area (Å ²)	q_0^{ion} (e)*	$q_0^{protein}$ (e) [†]	Q (e) [‡]
NX ⁺⁺	-0.708	17309.1	-14	6.35	0
NX	-0.683	17229.9	-18	10.63	-2.14
NX ⁻	-0.674	16663.0	-30	22.99	-8.32
NX ⁻⁻	-0.697	17251.8	-38	30.50	-12.08

* q_0^{ion} was computed relative to the center of the bilayer.

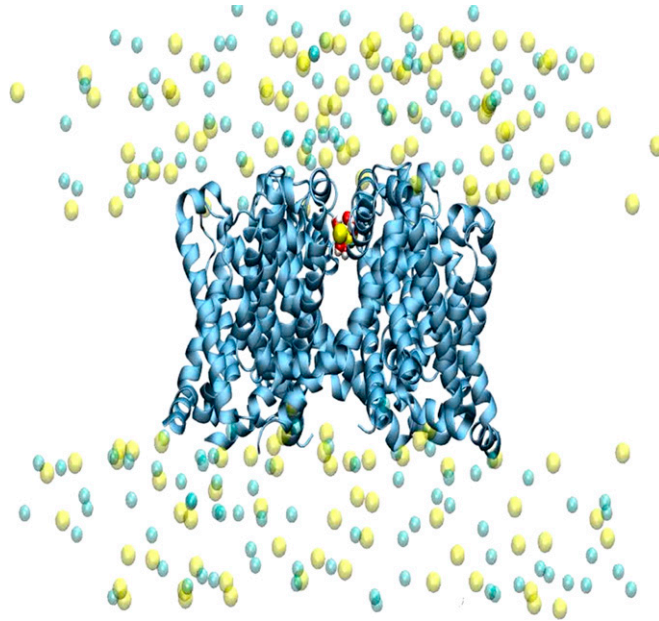
[†]Membrane capacitance $C = 0.9 \times 10^{-22} \text{ C}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$; ΔV corresponds to the voltage estimated from the average over a simulation-time window of 1 ns.

[‡]Q was computed according to Eq. S2 and considering NX⁺⁺ as a reference.

Table S4. NavAb interatomic C_β—C_β average distances (Å) between S4 residues (E96 and R₁ to R₄) and the polar binding sites N25 and N49 from segments S1 and S2

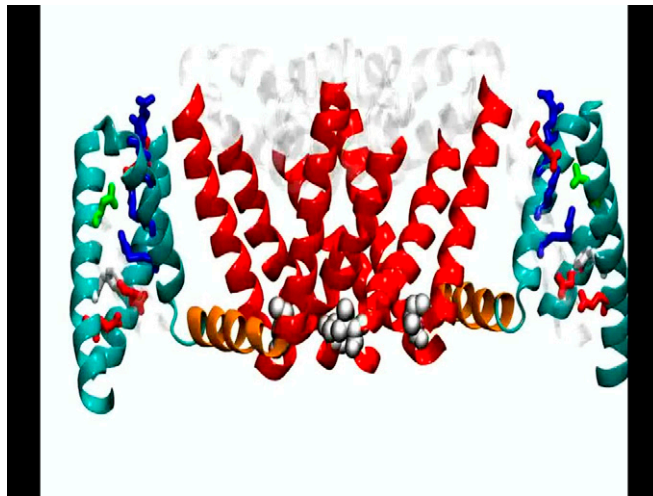
Residue pairs	NX ⁺⁺	NX	NX ⁻	NX ⁻⁻
E ⁹⁶ -N ²⁵	24.11 ± 1.22 (22.65)	22.57 ± 0.43 (21.87)	13.87 ± 1.24 (12.25)	8.66 ± 0.51 (8.06)
R ₁ -N ²⁵	19.53 ± 0.96 (18.18)	17.16 ± 0.73 (16.11)	9.47 ± 0.82 (8.65)	8.88 ± 0.88 (7.68)
R ₂ -N ²⁵	13.74 ± 1.03 (12.01)	11.69 ± 0.78 (10.61)	7.67 ± 1.11 (6.40)	13.31 ± 1.11 (11.90)
R ₃ -N ²⁵	9.45 ± 0.26 (9.14)	6.49 ± 0.26 (6.05)	10.38 ± 1.50 (8.44)	18.56 ± 1.26 (16.86)
R ₄ -N ²⁵	9.74 ± 0.54 (8.93)	8.36 ± 0.55 (7.72)	14.89 ± 1.99 (11.71)	22.78 ± 1.31 (20.95)
E ⁹⁶ -N ⁴⁹	18.96 ± 1.32 (17.24)	19.69 ± 0.33 (19.13)	11.00 ± 1.70 (8.96)	11.38 ± 0.93 (10.15)
R ₁ -N ⁴⁹	15.60 ± 1.11 (14.40)	14.14 ± 1.04 (12.47)	10.32 ± 1.33 (8.21)	13.98 ± 1.07 (12.67)
R ₂ -N ⁴⁹	10.49 ± 0.82 (9.56)	10.02 ± 0.95 (8.89)	9.98 ± 2.05 (6.48)	19.21 ± 1.23 (17.52)
R ₃ -N ⁴⁹	7.91 ± 0.61 (7.38)	9.08 ± 0.45 (8.62)	15.29 ± 1.46 (13.65)	24.62 ± 1.19 (23.08)
R ₄ -N ⁴⁹	10.40 ± 0.53 (9.97)	13.70 ± 0.49 (13.03)	20.47 ± 1.38 (19.06)	29.32 ± 1.13 (27.86)

Pair distances are presented as averages over the four subunits; their minimum values are shown in parentheses.



Movie S1. Short MD simulation under hyperpolarized-transmembrane conditions. The movie shows a conduction event of a fully hydrated Na^+ ion across the open activation gate of NavAb.

[Movie S1](#)



Movie S2. Sequential transitions of the NavAb sampled conformations from the activated-open (NX^{O}) to the resting-closed state ($\text{NX}^{\text{-}}$) of the channel. Only two subunits are shown for clarity. The VSD (cyan), S4–S5 linker (orange), and PD (red) are represented as cartoons; S4 arginines (blue), polar/acidic binding sites (green/red), and catalytic center residue F^{56} (white) are represented as sticks. The atoms of the hydrophobic gate residues I^{217} are rendered as silver spheres. Note the sequential slide of S4 arginines across the residue F^{56} and the hydrophobic collapse of residue I^{217} .

[Movie S2](#)

4.3 MOVIMENTOS DE ABERTURA DO PORO DE CANAIS VGCC: MODELO DO CANAL DE SÓDIO BACTERIANO NaChBac

Canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são os responsáveis pela fase de subida do potencial de ação em células excitáveis, principalmente nos neurônios e cardiomiócitos, em que exercem um papel crucial no funcionamento do disparo da transmissão nervosa e no ritmo cardíaco. É válido ressaltar, que algumas mutações nesses canais implicam em uma série de doenças em humanos como paralisias, epilepsia e dor neuropática crônica¹¹⁶. Além disso, canais Nav são alvos de moléculas alvo como anestésicos locais e gerais, além de antiarrítmicos¹¹⁷, que sabidamente se ligam em algum lugar próximo à região do domínio do poro (*PD*) desses canais¹¹⁸⁻¹²⁰. A ligação de muitas dessas drogas são dependentes da conformação dos Nav, de modo que conhecer as estruturas dos estados fisiológicos e funcionais desses canais, no nível atômico-molecular, permitirá desvendar os detalhes moleculares requeridos para o entendimento do princípio da anestesia geral e local, bem como o efeito de mutações genéticas que causam doenças em humanos.

Como provável ancestral de canais eucarióticos de Nav e Cav, o NaChBac compartilha das características estruturais envolvidas no processo de ativação de seus correspondentes em mamíferos¹²¹. Experimentalmente, o processo de ativação dos canais Nav tem recebido bastante atenção nas últimas décadas²⁷. Entretanto, uma investigação estrutural mais aprofundada tem sido limitada devido às dimensões do canal de sódio de mamífero, em que apenas o domínio do poro consiste de vinte e quatro segmentos de hélices transmembrânicas. A fascinante descoberta dos canais Nav bacterianos, que são homo tetraméricos, em que cada subunidade contém apenas seis hélices, forneceu uma enorme oportunidade para se investigar o mecanismo de ativação de canais Nav e a caracterização estrutural da família baseada em homologia à estruturas cristalográficas de canais *VGCC* atualmente disponíveis¹²²⁻¹²⁴. Neste trabalho, empregamos simulações de dinâmica molecular (*MD*) do canal bacteriano NaChBac (*Bacillus halodurans*) embebido na membrana, e modelado a partir da estrutura cristalográfica do canal de sódio NavAb, e suas conformações caracterizadas no trabalho de Amaral e colaboradores¹¹⁴ (figura 4.16). Nosso foco principal de investigação foi a caracterização estrutural das propriedades dos segmentos S6 do poro em diferentes conformações do canal. Em conformidade, apresentamos resultados advindos de três estruturas distintas que diferem entre si quanto à abertura do portão hidrofóbico do poro, bem como a posição transmembrânica da hélice carregada S4.



Brevemente, nossos estudos apontam que movimentos de dobradiça em redor de resíduos específicos de glicina das hélices S6 são fundamentais para modulação do formato da cavidade central do PD. Especificamente, uma região de dobradiça referente ao resíduo G²¹⁹ está relacionado à abertura do poro. Além disso, um conjunto de resíduos de fenilalanina se compactam na região do portão hidrofóbico, que é virtualmente a entrada do poro da face intracelular, e que na conformação fechada do poro dificultam e impossibilitam a hidratação do lúmen do PD e conseqüentemente a difusão dos íons Na⁺. **Figura 4.16.** Alinhamento de sequência primária dos canais NaChBac e NavAb. Os sombreados negros e cinza indicam respectivamente a identidade e similaridade entre os resíduos. Os quadros em vermelho indicam as regiões do NaChBac que não foram incluídas na modelagem por homologia. Quadros em azul indicam a porção C-terminal do NavAb que não foi cristalizada. O alinhamento foi obtido via uma matriz blosum62 (Smith-Waterman¹²⁵).

Três modelos do canal NaChBac foram gerados a partir do molde estrutural do NavAb, com o VSD em três estágio distintos de ativação, cada um deles exibindo uma rede de contatos eletrostáticos bem definidos entre os resíduos básicos da S4 e seus sítios ácidos ou polares das hélices S1-S3. As características principais que diferem os três estados aqui investigados podem ser resumidas a seguir: i) canal com poro fechado e VSD num estágio intermediário de ativação, i.e com o mesmo padrão encontrado na estrutura cristalográfica do NavAb (NX); ii) canal com poro aberto, mas com VSD num estágio inicial de ativação, i.e próximo do *resting-state* (NX⁻); iii) canal com VSD ativado, mas com poro parcialmente aberto. O detalhe atômico do VSD desses três modelos estão representados na figura 4.17.

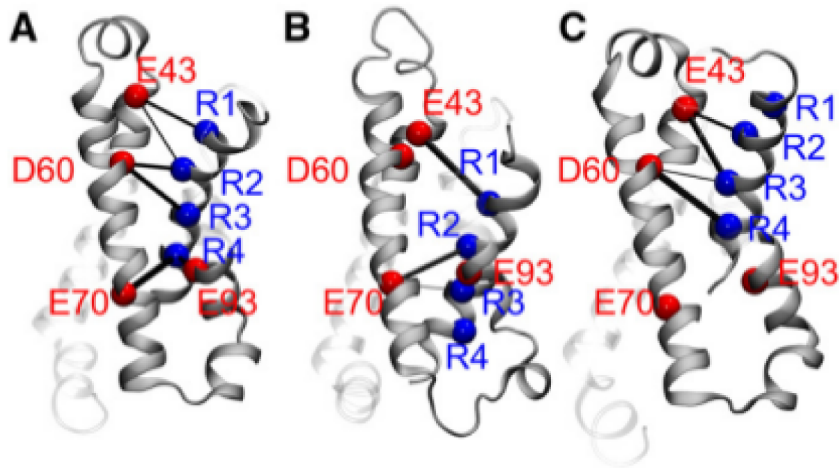
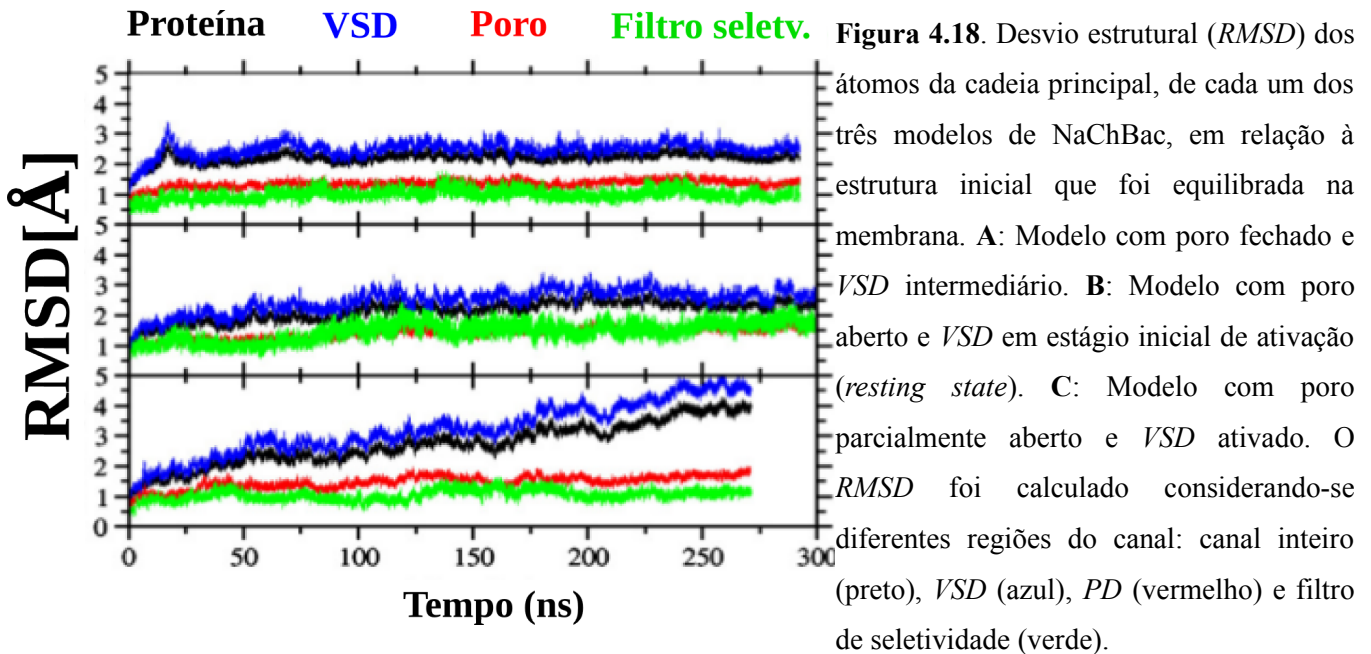


Figura 4.17. Visão molecular lateral da rede de interações eletrostáticas (carbono alfa dos resíduos ácidos e básicos representados, respectivamente, como esferas vermelhas e azuis) do *VSD* (*cartoon* cinza) dos modelos de NaChBac equilibrados na membrana. **A:** Modelo com poro fechado e *VSD* intermediário. **B:** Modelo com poro aberto e *VSD* em estágio inicial de ativação (*resting state*). **C:** Modelo com poro parcialmente aberto e *VSD* ativado.

Em todos os modelos equilibrados, o desvio estrutural (*RMSD*) de todo o canal (*VSD + PD*) está dentro do intervalo de 1.5 a 4 Å (figura 4.18), valor típico de desvios estruturais encontrados em equilibrações anteriores de canais iônicos transmembrânicos^{126,127}.



Por meio da análise comparativa dos modelos equilibrados de NaChBac, identificamos movimentos de quebra da hélice S6 em posições de resíduos putativos de glicina, que proporcionam a mobilidade do segmento helicoidal que então modula o formato do lúmen da cavidade central do canal. A presença de dois resíduos conservados de glicina confere às hélices S6 uma flexibilidade conformacional nas posições dos resíduos G^{219} e G^{229} , indicativo de um mecanismo de controle da abertura/fechamento do *PD* em que estes resíduos atuam como dobradiças das hélices terminais (figura 4.19). Notavelmente, o ângulo que se faz na hélice S6, na posição 219 da sequência proteica, muda consideravelmente entre as conformações aberta e fechada. O resíduo G^{219} define um ângulo de dobradiça que aparece entre os segmentos de hélice à montante (resíduos 210-218) e à jusante (220-228) do aminoácido G^{219} . Este ângulo aumenta de 10° para 20° do modelo de poro fechado para o poro aberto (figura 4.20).

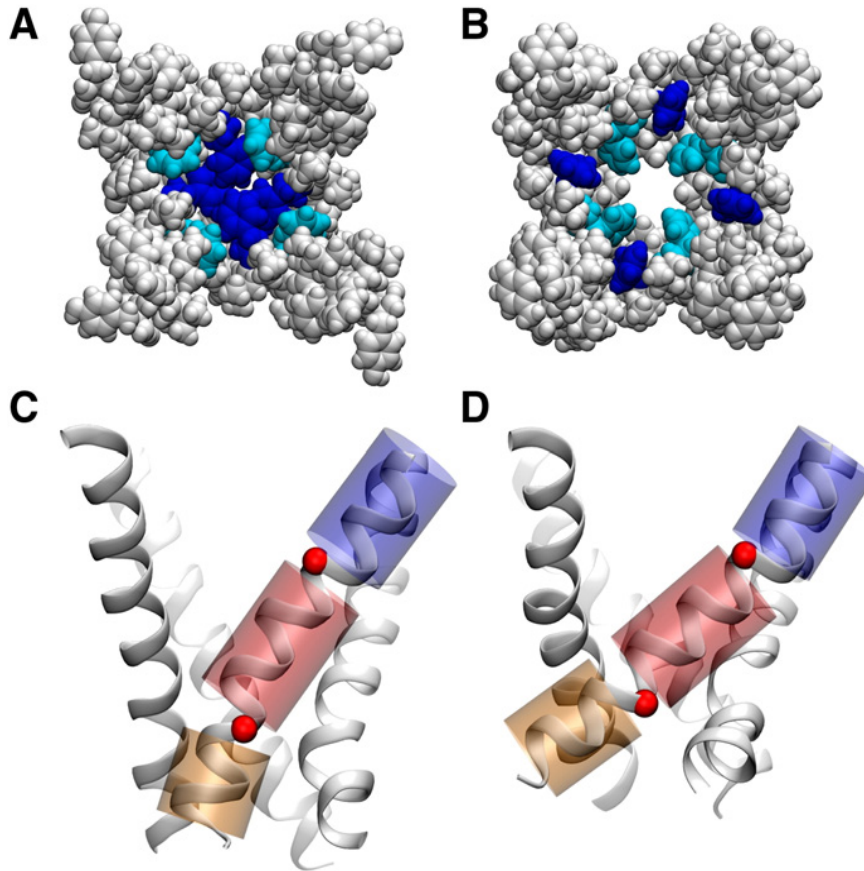


Figura 4.19. Conformações do *PD* do canal NaChBac durante o caminho de ativação em que apenas o conjunto de hélices S6 estão representados (por clareza). **A e B:** Representação por esferas de van der Waals da cavidade central do canal respectivamente nos estados fechado e parcialmente aberto. Os grupos F^{224} e F^{227} são mostrados respectivamente em azul escuro e azul ciano. **C e D:** Representação em *cartoon* do conjunto de segmentos S6 com destaque para os movimentos de dobradiça em torno dos resíduos G^{219} e G^{229} (esferas em vermelho) promovendo a torção da S6 em três

partes distintas (cone sombreado azul, vermelho claro e bege) para os estados fechado e parcialmente aberto respectivamente.

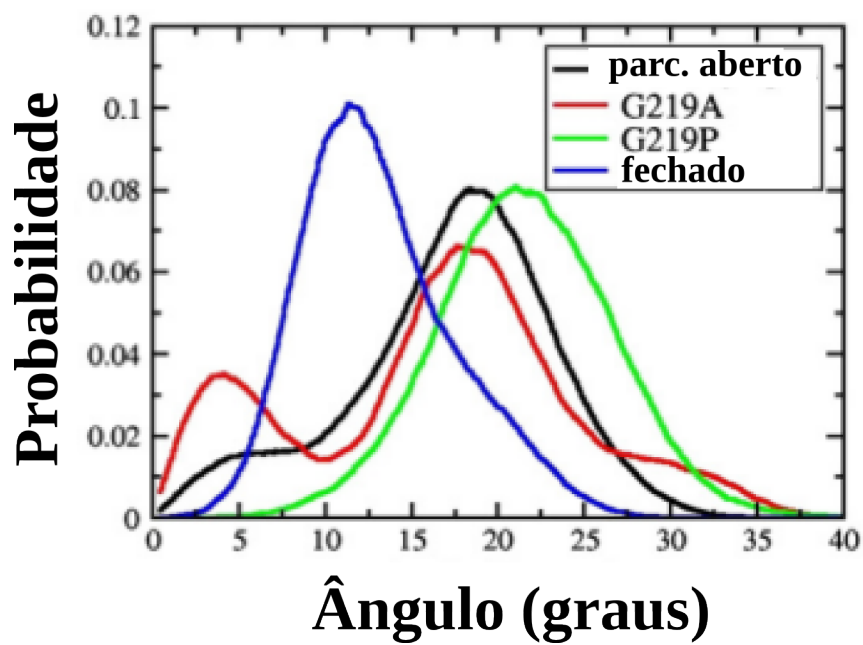


Figura 4.20. Distribuição de probabilidades dos ângulos de dobradiça do resíduo G^{219} das hélices S6 para as modelos de poro fechado (curva azul), modelo de poro parcialmente aberto (curva preta) e para as mutações do poro parcialmente aberto, i.e mutantes G219A (curva vermelha) e G219P (curva verde). Os ângulos foram medidos entre os segmentos de hélices S6 separados pelo resíduo G^{219} : segmentos 210-218 e 220-228 da proteína.

Simulações adicionais de *MD*, empregando mutações individuais, i.e G219A e G219P, foram realizadas para investigar os efeitos dessas modificações na propensão de dobra e flexibilidade dos segmentos S6. A mutação que causa a maior alteração no sistema é de fato aquela em que há substituição do resíduo de glicina por prolina: comparado ao modelo selvagem (sigla em inglês *WT*), há um deslocamento significativo para valores maiores de ângulo de torção no canal mutado (figura 4.20). Como esperado, a mutação pontual menos drástica (G219A) resulta numa menor discrepância do ângulo de torção entre os modelos mutado e *WT*. Apesar de apresentar uma menor valor de probabilidade em relação à *WT*, a distribuição é bastante similar àquela encontrada no modelo *WT*, indicativo de que a mutação do resíduo de glicina por alanina não afeta drasticamente a estrutura geral do conjunto de hélices S6.

Outra diferença estrutural marcante entre as conformações do poro recai sobre os resíduos que foram o chamado portão hidrofóbico. Na conformação fechada o lúmen do poro, logo abaixo do filtro de seletividade, está completamente hidratado e desconectado do ambiente aquoso do meio intracelular devido à presença de um conjunto de resíduos de fenilalanina das hélices S6, i.e F^{224} e F^{227} , que constituem o portão hidrofóbico em si (figura 4.19, painéis A e B). No modelo de NaChBac com *PD*

fechado a cadeia lateral desses resíduos hidrofóbicos estão projetadas para o centro da cavidade central, formando interações não ligadas do tipo van der Waals que ocluem a passagem do poro. De modo contrário, nos modelos de poro aberto, as cadeias laterais dos resíduos F²²⁴ estão direcionadas para a região entre subunidades de hélices S6 ao invés de estarem voltadas para o lúmen do poro. Quando o poro está na conformação aberta, o arranjo espacial dos resíduos aromáticos permite a hidratação plena da cavidade central do poro, que é uma das características requeridas para a condução iônica pelo canal.

De maneira a investigar a influência dos aminoácidos aromáticos do portão hidrofóbico na condução iônica calculamos o perfil de energia livre do transporte de um íon Na⁺ da cavida central do *PD* para o meio intracelular (os detalhes do método estão no tópico 3.1.7). O perfil de energia livre associado à condução de íons Na⁺ através do portão hidrofóbico do modelo de poro aberto de NaChBac corresponde a uma barreira energética de ~15 kcal/mol (figura 4.21), indicativo de que, embora permeante aos íons sódio, a estrutura não está completamente aberta para o transporte difusivo. Esse dado surpreendente reforça a ideia de que o modelo de NaChBac em que a conformação do *PD* dos é tida como aberta, na verdade é representativa de um estado intermediário de abertura do poro. É válido ressaltar, que a barreira de energia livre calculada para as estruturas parcialmente abertas é menor comparada àquelas encontradas para a passagem não assistida de íons por bicamadas lipídicas (~50 kcal/mol³⁹).

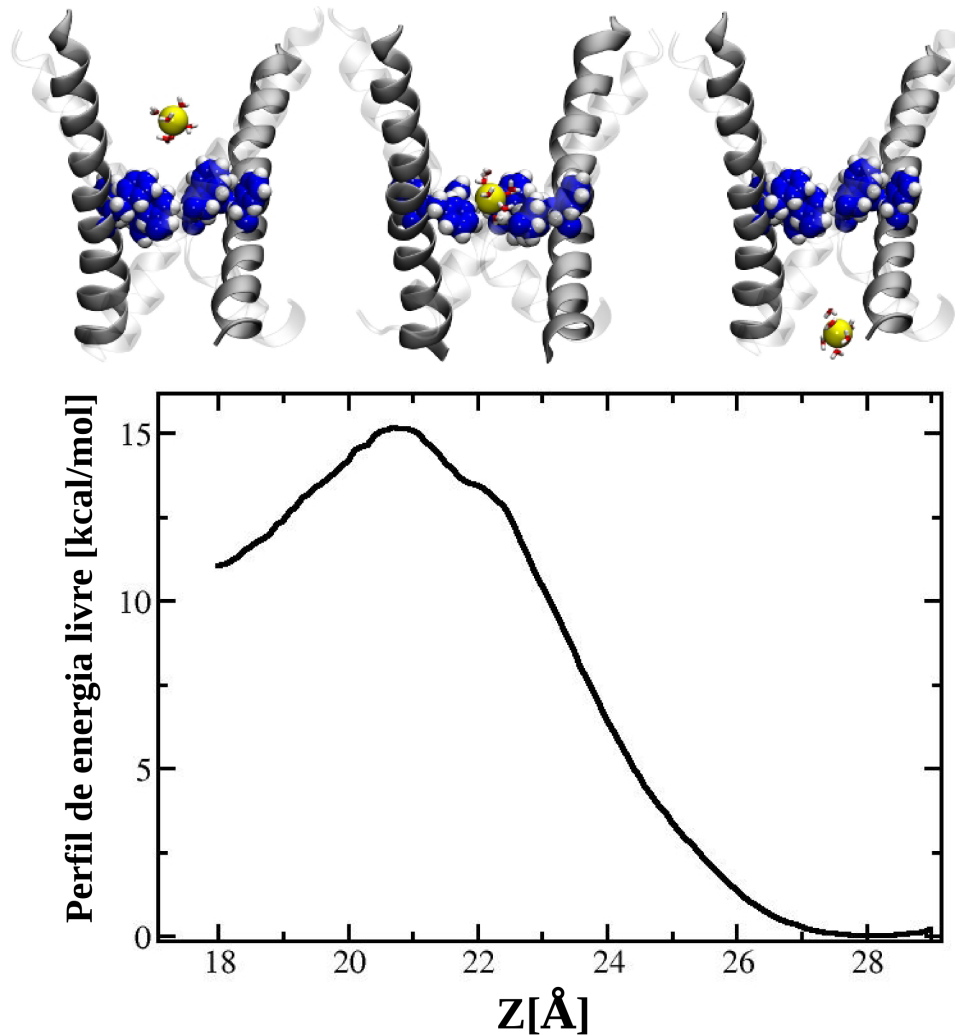


Figura 4.21. Perfil de energia livre para o transporte de um íon Na^+ através do portão hidrofóbico do *PD* na conformação parcialmente aberta. A curva é uma função da direção transmembrânica (z), cuja origem é definida para o centro geométrico do filtro de seletividade em que a direção positiva indica o meio intracelular. Configurações selecionadas ao longo da coordenada de reação estão representadas em cartoon na parte superior da figura onde os resíduos F^{224} , F^{227} e o íon Na^+ são representados com esferas. A camada de solvatação mais próxima da espécie iônica é mostrada como traços com o oxigênio em vermelho. Note que, o íon mantém sua referida camada de solvatação ao longo de todo o percurso em direção à face intracelular¹¹².

O conjunto de resultados aqui apresentados contou com a parceria internacional dos pesquisadores Vincenzo Carnevale e Michael L. Klein, pesquisadores da *Temple University* (Filadelfia, Estados Unidos), e foi publicado no jornal científico internacional *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA)¹¹². O artigo completo encontra-se no anexo III.

ANEXO III



Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel

Annika F. Barber^{a,1}, Vincenzo Carnevale^{b,*}, S.G. Raju^{b,1}, Cristiano Amaral^c,
Werner Treptow^c, Michael L. Klein^b

^a Department of Neuroscience and Graduate Program in Cell and Developmental Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA

^b Institute for Computational Molecular Science, College of Science & Technology, Temple University, Philadelphia, PA 19122-6078, USA

^c Laboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento Biologia Celular, Universidade de Brasília, BR-70910-900 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2011

Received in revised form 11 April 2012

Accepted 2 May 2012

Available online 9 May 2012

Keywords:

Voltage gated

Sodium channel

Gating

NaChBac

Bacterial channel

ABSTRACT

Computational methods and experimental data are used to provide structural models for NaChBac, the homo-tetrameric voltage-gated sodium channel from the bacterium *Bacillus halodurans*, with a closed and partially open pore domain. Molecular dynamic (MD) simulations on membrane-bound homo-tetrameric NaChBac structures, each comprising six helical transmembrane segments (labeled S1 through S6), reveal that the shape of the lumen, which is defined by the bundle of four alpha-helical S6 segments, is modulated by hinge bending motions around the S6 glycine residues. Mutation of these glycine residues into proline and alanine affects, respectively, the structure and conformational flexibility of the S6 bundle. In the closed channel conformation, a cluster of stacked phenylalanine residues from the four S6 helices hinders diffusion of water molecules and Na⁺ ions. Activation of the voltage sensor domains causes destabilization of the aforementioned cluster of phenylalanines, leading to a more open structure. The conformational change involving the phenylalanine cluster promotes a kink in S6, suggesting that channel gating likely results from the combined action of hinge-bending motions of the S6 bundle and concerted reorientation of the aromatic phenylalanine side-chains.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Voltage-gated sodium channels (VGSCs) are responsible for the rising phase of the action potential in excitable cells, most notably in neurons and cardiac myocytes, where they play a critical role in neuronal firing and cardiac rhythm. Importantly, mutations in VGSC subunits have been implicated in an array of diseases including: paralysis, myotonia, epilepsy, arrhythmia and chronic neuropathic pain [1]. Notably, VGSCs are targets for drug molecules, including local anesthetics, painkillers, anticonvulsants and antiarrhythmics [2], which bind to sites in the VGSC pore domain [3–5]. Moreover, many of these drugs show use-dependence, which reflects channel conformational dependent access to the relevant binding sites [6–9]. Accordingly, elucidating the functional conformations of the channel pore domain will allow a deeper understanding of the roles of VGSCs in physiology and disease.

Activation and inactivation are key voltage-dependent processes by which channels control ion conduction during the rising phase of the action potential. VGSCs preferentially adopt a non-conductive

resting (closed) conformation at hyperpolarized transmembrane (TM) potentials. In response to membrane depolarization, VGSCs switch to their active (open) conformation, exhibiting high Na⁺ ion conductance. Voltage-dependent activation is mediated by TM voltage sensor (VS) domains, each comprised four helical segments (S1 to S4). The VS is mechanically coupled to the pore domain (S5 and S6) via a linker region (S4–S5 linker). During activation, the S4 helix undergoes a conformational transition resulting in a net displacement towards the extracellular side of the membrane. During this process, a set of conserved arginines in S4 is involved in a sequential breaking and formation of salt bridges with the acidic residues of neighboring TM segments [10–17]. This conformational transition of the VS changes the position of the linker, which, in turn, induces a rearrangement of the S5 and S6 helical regions. Specifically, this process affects the structure of the helix bundle lining the pore and formed by four S6 helices from different subunits. Ultimately, the displacement of the linker results in the opening of the activation gate, a hydrophobic constriction region located at the crossing point of the four S6 segments [18–21]. Studies on NaChBac have postulated a mechanism, likely preserved in several VGSCs [22,23], in which this opening of the activation gate requires the S6 helix to form a kink at a conserved glycine [24,25]. As a probable ancestor of eukaryotic Na⁺ and Ca²⁺ channels [26], NaChBac shares features of activation and gating with the mammalian counterparts. Interestingly, NaChBac also shows

* Corresponding author. Tel.: +1 215 204 4214.

E-mail address: vincenzo.carnevale@temple.edu (V. Carnevale).

¹ Contributed equally.

sensitivity to mammalian VGSC inhibitors such as the local anesthetic etidocaine and the general anesthetic isoflurane [25,27].

Experimentally, activation and gating of VGSCs have received much attention [28]. However, thus far structural investigations have been limited by the size of the mammalian Na⁺ channel pore-forming alpha subunit, which consists of twenty-four TM helices forming a pseudo-tetrameric structure. The discovery of homotetrameric bacterial VGSCs, each with just six TM helices [24,29,30] has provided an avenue for investigating VGSC gating behavior and structural characterization based on homology to known crystal structures of other tetrameric channels [31–33].

Here, we report a series of molecular dynamic (MD) studies on atomistic structural models of membrane-bound NaChBac based on the NavAb crystal structure. Our main focus of investigation is the characterization of structural properties of the TM S6-segment in different conformations of the channel. Accordingly, we present results on three channel conformations differing by the degree of openness at the activation gate and by the position of the VS-S4 helix.

Our modeling reveals that hinge bending motions around two S6-glycine residues of the channel are the key to modulating the shape of the main channel lumen. Specifically, a kink in S6 at G219 is related to pore opening; and another kink in S6, at G229, seems to favor the closure of the gate. In particular, a cluster of stacked phenylalanine residues in the crossing bundle of S6 helices, which hinder diffusion of water molecules and Na⁺ ions in the closed pore domain experimental VGSC structure, is critical for the gating process, working together as a major hydrophobic gate on the ionic permeation pathway. Overall, the present MD study identifies the S6-glycines as the crucial molecular hinge points, accounting for the bending motions of the S6 segment, which are associated with VS activation leading to channel opening. We thus hypothesize that these S6-glycines are key players in the mechanism of pore opening and closing during the voltage-gating process.

2. Methods

2.1. Modeling the closed conformation

A structural model for NaChBac in a closed conformation was built starting from the X-ray crystal structure of NavAb (PDB ID: 3RVY), which was crystallized in a closed-pore conformation with the four VS domains partially activated. The VGSCs, NaChBac and NavAb are closely related, sharing significant levels of sequence identity (~37%) (Fig. S1). Ten residues at the N-terminus of NaChBac are not present in NavAb and were not included in the model. Five additional residues at the C-terminal region of NaChBac, predicted to be in an alpha-helical configuration by PSIPRED [34] and not resolved in the X-ray structure of NavAb, were added to the structure. We used MODELLERv9 [35] to generate the NaChBac structural homology model.

After energy minimization, the model for NaChBac in a closed conformation was embedded in a fully hydrated lipid bilayer for subsequent equilibration by MD simulation. The homotetrameric channel was inserted at the center of a 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) lipid patch. To generate the initial configuration, a set of conserved aromatic side-chains was used as a guide to delimit the TM region of the bilayer. The macromolecular system contained a total of ~162,000 atoms, including NaChBac, 434 lipid molecules, 28173 water molecules and 232 ions in solution. Two Na⁺ ions were initially placed in the channel SF, at sites HFS and IN (Fig. 1), in agreement with a previous computational study of NavAb showing double occupancy of the filter by Na⁺ ions [36]. All charged amino acids were simulated in their fully ionized state (pH = 7.0).

The membrane-bound channel system was relaxed following two consecutive steps: (i) membrane equilibration for ~10.0 ns with the channel backbone coordinates restrained around their starting structure

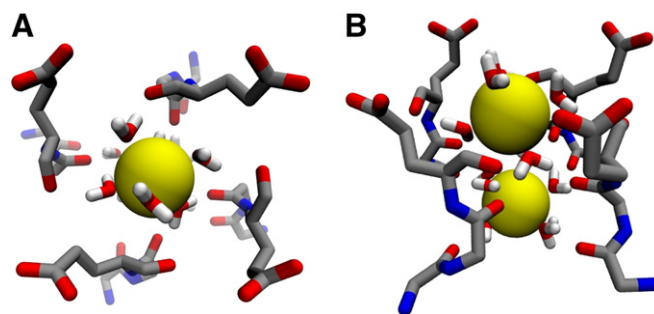


Fig. 1. Structure of the selectivity filter with two solvated Na⁺ ions: (A) upper view from the outer vestibule; (B) side-view. Main chain groups from residues Thr189, Leu190 and Glu191 and the side-chain of Glu191 plus water molecules are shown in stick representation, while Na⁺ ions are rendered as yellow spheres.

with a harmonic force constant of 1 kcal/mol/Å². This procedure ensured a uniform and tight distribution of lipid molecules around the protein without perturbing the initial conformation; and (ii) 0.3 μs relaxation of the full channel system by means of unconstrained MD simulation. Starting from the relaxed structure of the wild type (WT), additional unconstrained MD simulations were performed on two mutants, G219P and G219A. For each mutant a trajectory of 0.15 μs was collected for subsequent analysis.

2.2. Modeling the early-activated-open conformation

Starting from the closed structure of NaChBac, we generated the pre-open conformation of the channel by means of a steered-MD protocol, which mimics the iris-like dilation mechanism recently proposed for pore opening of the channel [37]. In our protocol, the S6-helical bundle was splayed apart by applying time-dependent harmonic potentials (force constant of 5 kcal/mol/Å²) along 16 inter-subunit distances, defined between the C-alpha atoms of the four pore-lining S6 residues F224, I228, I231 and R234. The time-dependent restraints were applied over a 40 ns MD run until the inter-subunit distances approximated the corresponding ones in the open structure of Kv1.2/2.1. After these restraints were satisfied, solvation of the channel lumen and free diffusion of Na⁺ ions across the activation gate were observed. We then launched a restraint-free 0.300 μs MD trajectory for the membrane-bound channel, which allowed extensive assessment of the structural properties of the channel in a “pre-open” conformation.

2.3. Modeling the activated-partially-open conformation

Starting from the structure of the closed conformation of NaChBac, a model of the activated conformation was built via a steered-MD approach. Harmonic restraints were applied to the center of mass of the voltage-sensing S4 helix and the equilibrium position was shifted over time so as to induce a 6-Å rigid-body motion of the helix over an MD trajectory spanning 70 ns. The choice of a 6-Å displacement is based on an a priori inspection of the VS domain of Kv1.2–2.1. To preserve the alpha-helical conformation and prevent unfolding of the S4 helix, additional restraints were applied to all the main-chain H-bonds within the helical segment, which spans from residues 110 to 126. The total displacement of S4 is the minimal distance allowing interaction between R4 and D60, a salt-bridge shown to be present in the fully activated state [37]. To explore the effect of a depolarizing potential on this partially activated conformation, an additional 0.270 μs MD trajectory was sampled with an imposed TM potential of 1 V, which was applied through the addition of an external uniform electrostatic field.

2.4. Molecular dynamic simulations

All MD simulations used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein and CHARMM27 for the phospholipids [38,39]. A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the POPC lipid molecules [40]. The water molecules were described using the TIP3P model [41,42]. Periodic boundary conditions were employed for all of the MD simulations and the electrostatic potential was evaluated using the particle-mesh Ewald method [43]. The lengths of all bonds containing hydrogen were constrained with the SHAKE algorithm [44]. The system was maintained at a temperature of 300 K and pressure of 1 atm using the Langevin thermostat and barostat methods as implemented in the MD code NAMD2.7 [45], which was used for the simulations with a 2.0 fs time step.

2.5. Free-energy calculations

The free-energy profile or potential of mean force (PMF) of ion conduction was calculated using the adaptive-biasing-force (ABF) method implemented in NAMD [42,46]. Here, we followed a similar strategy previously described to compute the free energy associated with the ion conduction through voltage-gated potassium channels [21]. In brief, the reaction coordinate for conduction through the activation gate was defined as the distance between the ion and the geometric center of the TLESW motif at the selectivity filter. For the early-activated-open conformation, the translocation of the ion follows a path of length 15 Å, ranging from the cytoplasmic entrance of the pore to the entrance of the central cavity, located immediately above the residue F224. The free-energy profile was calculated by means of independent MD runs, each exploring a 5-Å section of the reaction coordinate.

3. Results and discussion

Three models of NaChBac were built on the basis of the recently determined X-ray crystal structure of the closely related NavAb channel [47] presenting the VS in different stages of activation [12–17], each exhibiting a well-defined electrostatic network between basic amino acids of the helical S4-segment and the acidic binding sites within the domain (Fig. 2). Of note are two salt-bridges (R2-E43 and R3-D60) and the 3_{10} -helix conformation of the S4 segment encompassing R3 and R4, which have been shown to be the structural determinants of at least one of the activated conformations of the VSD [37]. Remarkably, the cavities, called fenestrations, which connect the pore lumen to the hydrophobic region of the lipid bilayer are present

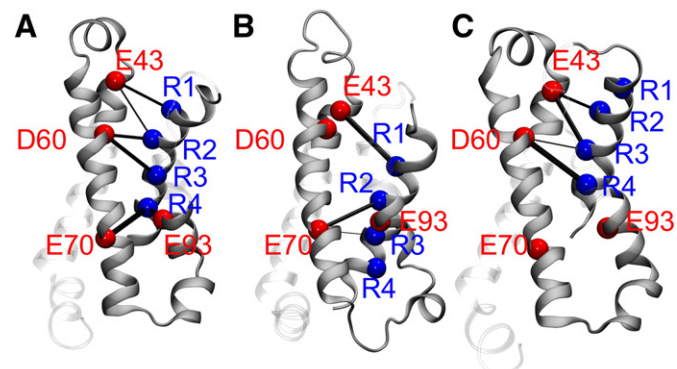


Fig. 2. Shown are the patterns of salt-bridges in the voltage-sensing domain (VSD) of NaChBac for selected conformations of the channel: (A) closed; (B) early-activated-open; and (C) activated-partially-open (see text). The C-alpha atoms of the arginines and the acidic residues of the VSD are shown as blue and red spheres, respectively. The thickness of the black cylinders reflects the relative occurrence of each salt-bridge along the MD simulation trajectory.

in all the conformations explored along the MD trajectories and do not experience significant structural rearrangements. In contrast, the main-pore regions differ considerably in the degree of openness of the ionic-conduction pathway with the pore ranging from a closed to an open conformation.

For all models, the root mean square deviation (RMSD) values for the whole channel as well as for the VS and pore domains range from 1.5 to 4 Å (Fig. 3), which is typical of the structural drift quantified in previous MD simulation studies of ion channels [48,49]. The activated-partially-open conformation has the largest RMSD due to the relaxation of the VS on removal of the constraints. To further evaluate the model we compared interatomic distances for 9 specific residue pairs in the final membrane-equilibrated structure of the early-activated-open conformation (Table S1) to distances estimated from luminescence resonance energy transfer (LRET) measurements for these pairs [31]. We found variations of less than 5.4 Å, a result consistent with previously published models of NaChBac [26,33].

The major structural differences between the conformations of the pore domain are found in the pore-lining S6 helices. In the closed conformation, below the SF, the channel pore features a large hydrated central cavity, disconnected from the intracellular aqueous environment by a cluster of S6-phenylalanine residues, F224 and F227, located at the activation gate region (Fig. 4A–B). These phenylalanine side chains project into the channel lumen, producing inter-subunit stacking interactions, thereby occluding the pore. In contrast, in the early-activated-open conformation, the F224 side chains are buried in the inter-subunit helical interface rather than being stacked in the lumen, and pairs of F227 side chains interact in an “edge-face” conformation (Fig. 4A–B). The latter arrangement of the phenylalanine cluster allows hydration of the activation gate, a key structural modification required for ionic transportation [21]. The free-energy profile associated with conduction of Na^+ through the activation gate of the early-activated-open conformation shows an energy barrier of ~15 kcal/mol (Fig. S2), indicating that, although the permeant Na^+ ion retains an almost intact shell of solvation, the structure is not fully open for diffusive transport. However, this barrier is significantly smaller than the energy cost (~50 kcal/mol) estimated for ion translocation across the closed gate of homologous voltage-gated K^+ channels [21] suggesting the early-activated-open conformation as an intermediate partially open structure on the closed-to-open transition pathway of NaChBac.

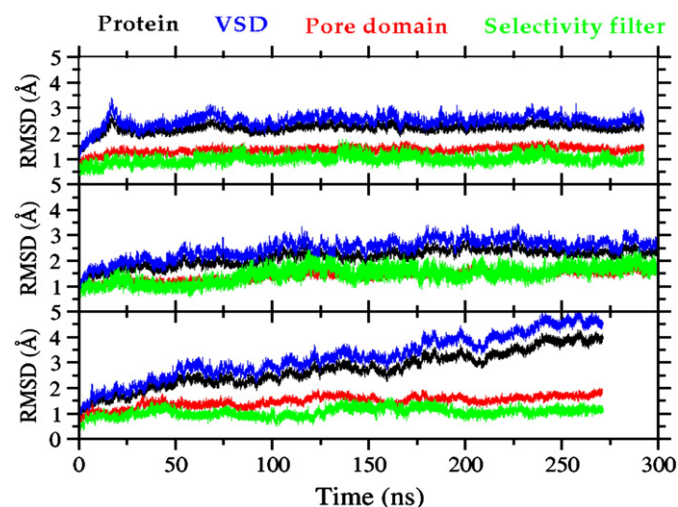


Fig. 3. Root mean square deviation (RMSD) of the backbone atoms from the initial structure employed in the MD simulation plotted as a function of time for: (A) closed; (B) early-activated-open; and (C) activated-partially-open conformations, respectively (see text). The RMSD is shown separately for different regions of the channel: entire channel (black), voltage-sensing domains (blue), pore domain (red), and selectivity filter (green).

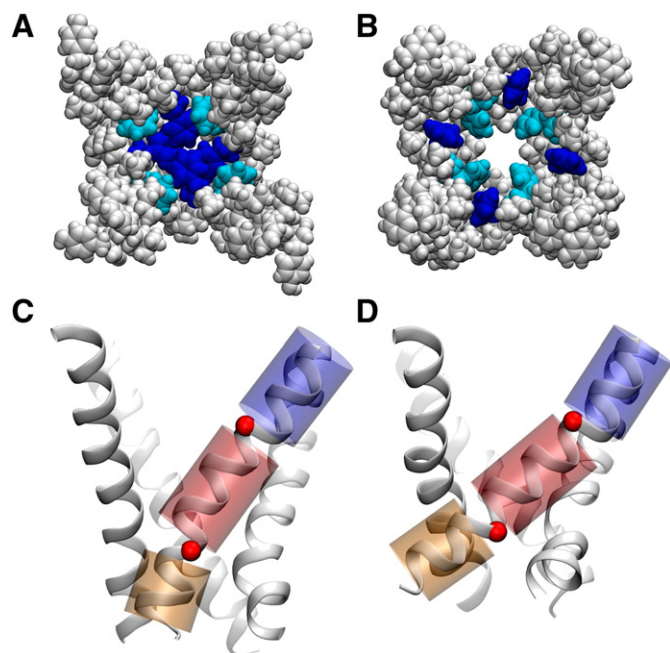


Fig. 4. Conformations of the NaChBac pore domain along the activation pathway as determined in the present study, with only the S6-helix bundle shown for clarity. Upper panels: (A, B) space-filling representation of the channel lumen for the closed and activated-partially-open conformations, respectively. Phenyl groups Phe224 and Phe227 are shown in blue and cyan, respectively. Bottom panels: (C, D) cartoon representation of the S6-helix bundle highlighting the hinge-bending motions around residues G219 and G229 (red spheres) involving the three helical regions (blue, red, and orange) for the closed and activated-partially-open conformations, respectively.

The presence of two glycine residues endows the S6-helix with conformational flexibility at positions 219 and 229 and suggests a mechanism underlying pore domain gating transitions in which these glycine residues act as hinges and decouple the motions of the three resulting helical regions (Fig. 4C–D). Notably the angle at position 219 is considerably different between the two conformations (Fig. 5). On passing from closed- to open-pore, the kink angle between the two helical segments upstream and downstream of G219 (residues 210–218 and 220–228) changes from an average value of 10° to 20° (Fig. 5). The opposite behavior is observed for the kink angle at position 229 (defined as the angle between the helical regions 218–228 and 230–240), for which a more pronounced kink is

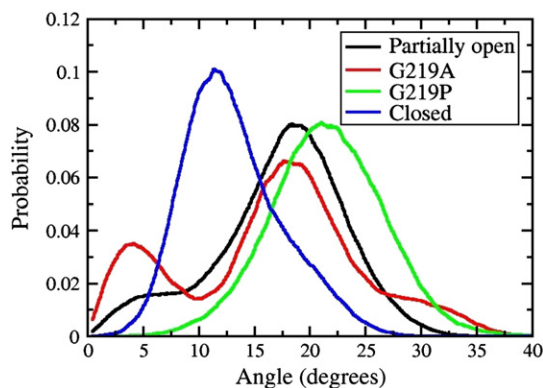


Fig. 5. Probability distributions of S6 kink angles around G219 (A) and G229 (B) for the activated-partially-open (black) and closed (blue) conformations, along with results for the mutants G219A (red) and G219P (green). The angles are measured between the helical segments adjacent to the glycine residues: segments 210–218 and 220–228 for G219 and 218–228 and 230–240 for G229.

found in this case for the closed conformation: 20° and 10° , for closed and open, respectively.

The rigid-body motions of these helical S6-segments modulate the packing at the inter-subunit interfaces, which in turn, determine the shape of the pore. Indeed an increased tilt of the C-term region of S6 allows the four S6 helices to be splayed apart, which results in an expansion of the constriction region located at the phenylalanine cluster (Fig. 4A–B). Therefore a stable kink at position 219 is seemingly the structural determinant of the *open* state. Moreover, this structural feature is consistent with mutagenesis data [24] showing that the G219A mutant, with decreased flexibility at position 219, inactivates faster than the WT. The data suggest that a significant destabilization of the *open* state can be achieved by decreasing the propensity of S6 for kinked configurations. Furthermore, independent experimental studies have shown that mutation of G219 into proline stabilizes a kinked S6-segment, and therefore the *open* conformation [25].

Additional independent MD simulations were performed on the G219P and G219A mutants to characterize the effect of these mutations on the kink propensity and bending flexibility of the S6-segment. The most dramatic effect is observed for the proline mutant: compared to the WT, where the distribution of kink angles shifts significantly toward larger values (Fig. 5). Furthermore, configurations featuring angles smaller than 10° are never explored. As expected, the less perturbing mutation of glycine into alanine results in smaller differences compared to the WT: two peaks are apparent in the distribution around 5° and 20° , respectively corresponding to the straight and kinked configurations (Fig. 5). Despite showing a slightly decreased probability for kinked configurations, the distribution is very similar to that of the WT, suggesting that mutation of glycine into alanine at position 219 does not dramatically affect the overall structure of the S6 bundle and that the increased rate of inactivation may result from the slightly decreased conformational flexibility.

To further characterize the role of the phenylalanine cluster, we investigated the early events of the gating transition. To this end, we have modeled a conformation featuring fully activated VS domains and monitored the response of the pore over a time-scale of $0.270 \mu\text{s}$. Simulations were started from the closed-pore configuration and S4 helix was moved to the fully activated state (as described in Ref. [37]) by means of steered MD. As expected, the most relevant structural rearrangement occurs at the S4–S5 linker, where the helical region of the linker is displaced by 6 \AA along the normal to the membrane surface (Fig. 6). As a result, the steric constraints on the bundle-crossing region of S6 are weaker than in the early-activated state and in-plane movements of the C-term region of S6 are less restricted. It is worth noting that this configuration of the S4–S5 linker is coupled to a conformational change in the S6 bundle. Specifically, an increased tilt of the N-term region of S6 allows the helices to be splayed apart without the need for a kink at position 219. Although the S6 bundle was not able to reach the fully open conformation over the relatively short MD time-scale, a significant rearrangement was observed in the phenylalanine cluster: rather than being stacked in the pore-lumen, the bulky aromatic side-chains are found, on average, to be buried in the helix–helix interfaces in configurations remarkably similar to those found in the early-activated-open state.

The major consequence of the above-mentioned rearrangement is the inability of the cluster of phenylalanines to act as a hydrophobic seal preventing waters, and thus solvated ions, from traversing the bundle cross. Over the course of simulation we observe sufficient opening to allow water flux in the presence of a TM potential. This change in hydration can be seen in Fig. 7 in which the intermittent formation of water wires spanning the entire pore is highlighted by the presence of density in the -7 \AA to -15 \AA region. The ability of water molecules to occupy this section of the pore suggests that hydration of the hydrophobic constriction region may be the early response to activation leading to destabilization of the closed conformation and inducing, ultimately, the conformational transition to the fully open state.

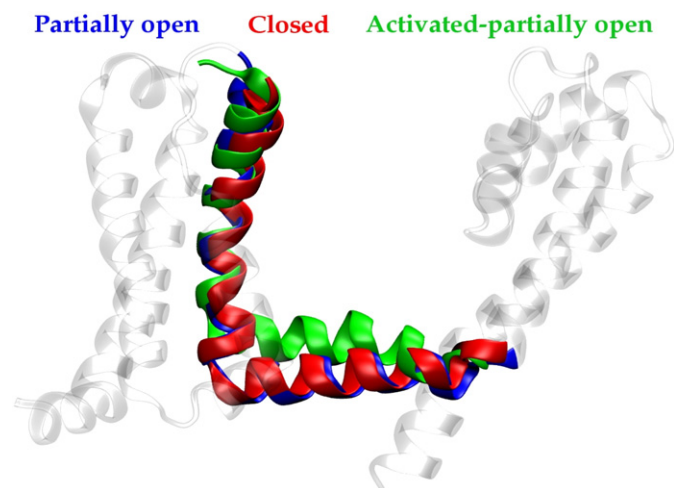


Fig. 6. Shown is a superposition of structures of the NaChBac S4–S5 linker for closed (red), early-activated-open (blue) and activated-partially-open (green) conformations (see text), highlighting the displacement of the linker along the direction normal to the membrane.

In light of our observations, the following activation scheme can be envisioned for NaChBac: in response to VS activation, the S4–S5 linker cuff is displaced along the normal to the membrane; this movement increases the tilt of the coupled C-term regions of S6 helices and thus induces an expansion of the bundle. A flexible hinge movement at G219 facilitates this conformational transition and results in an opening of the pore.

4. Conclusions

The bacterial Na⁺ channel NaChBac is evolutionarily related to eukaryotic Na⁺ channels and [26,29] has been the subject of extensive experimental and computational investigations [10,12–14,17,24,25,31–33,50,51] aimed at revealing general mechanistic aspects of gating in VGSCs. The structural rearrangement of the pore domain during the gating process is one of the most significant issues to be addressed due to the role of the pore in binding a number of clinically relevant drugs. The present computational study builds upon extensive experimental data and previously derived models of NaChBac gating [12–14,17,52] to reveal

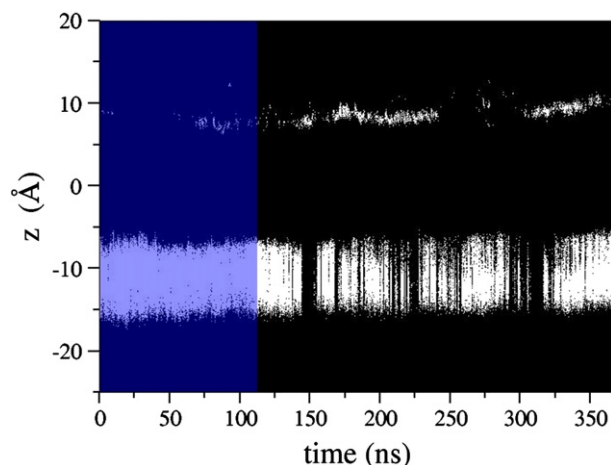


Fig. 7. Shown are the positions of water oxygen atoms projected onto the membrane normal (*Z*). Blue shading highlights the portion of the MD trajectory sampled before an external electrostatic field was applied. Under the electric field, the frequency of wetting/dewetting transitions at the hydrophobic gate (located approximately between -7 Å and -15 Å) increases dramatically.

significant conformational changes in the S6 pore-lining helix bundle during gating.

By comparing structural models of the closed, early-activated-open, and activated-partially-open conformations of the channel, we identify hinge-bending motions around two glycine residues in S6, which are able to modulate the shape of the channel lumen along the activation pathway. Specifically, starting from the closed state, a tilt of the C-term region of S6 allows pore opening and induces the formation of a kink at position 219; full activation of the VS domains entails a structural rearrangement of the linker, which, in turn, is coupled to tilting of the N-term region of S6 and a relaxation from the kinked to the unknicked state. Significantly, a cluster of stacked phenylalanine residues in the pore, which hinder diffusion of water molecules and Na⁺ ions in the resting and activated-closed states, undergoes a structural rearrangement upon expansion of the S6 helical bundle in the open state. This scheme is in agreement with previous structural descriptions of hydrophobic-gate controlled mechanisms of ion conduction in other channels [53–57].

In addition to creating structural models of NaChBac that will be useful for investigating interactions with commonly used VGSC-modulatory drugs, our findings suggest interesting features of the pore domain that merit experimental investigation: the function of gate phenylalanines, the nature of VS-gate coupling, and the role of fenestrations in gating and drug access to internal sites. The hydrophobic seal formed by phenylalanines is not found in the NavAb crystal structure and thus also demands further experimental investigation. Mutation of these residues could cause shifts in voltage dependence by changing the ease of opening the gate. Additionally, mutation to charged residues could create constitutively open or closed channels. How the movement of these phenylalanines is energetically coupled to VS conformational changes can also be explored by mutational analysis.

The fenestrations found in the NavAb crystal structure are preserved in the NaChBac homology model in all of the explored conformations. These fenestrations have not been seen in other tetrameric channel crystal structures, but may play a role in allowing pore domain flexibility necessary for gating and could also provide an access path for drugs. Mutations that occlude the fenestrations would permit investigation of whether they are necessary for gating and the observation that they are permanently open in all the conformations examined reinforces the hypothesis that small drugs could reach internal sites via fenestrations. Further investigation of drug access pathways through fenestrations and a search for fenestration-like formations in mammalian VGSC sequences via further modeling and electrophysiological experimentation will be necessary to determine whether they represent the “lipophilic” pathway proposed by Hille [6,9].

Given that the action of VGSC modulating drugs is known to shift the relative stability of specific gating conformations [3,4,27,58–64] our structures will enable further computational investigations, which will likely shed light on the nature of drug binding modalities in NaChBac as well as the more general issue of the mechanism of drug-sensitivity of VGSCs.

Acknowledgements

We are grateful for support from the National Institutes of Health, and the Commonwealth of Pennsylvania. We also thank Manuel Covarrubias for very useful scientific discussion. A.F.B. acknowledges the National Institutes of Health (grants NIH-NIAAA T32 AA007463 and NIH-NINDS F31 NS077689) for financial support. The National Science Foundation supported this work through XSEDE resources provided by the National Institute for Computational Sciences (grant TG-MCA93S020).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.002>.

References

- [1] A.L. George, Inherited disorders of voltage-gated sodium channels, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1990–1999.
- [2] J.J. Clare, S.N. Tate, M. Nobbs, M.A. Romanos, Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets, *Drug Discov. Today* 5 (2000) 506–520.
- [3] D.S. Ragsdale, J.C. McPhee, T. Scheuer, W.A. Catterall, Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics, *Science* 265 (1994) 1724–1728.
- [4] D.S. Ragsdale, J.C. McPhee, T. Scheuer, W.A. Catterall, Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9270–9275.
- [5] V. Yarov-Yarovoy, J.C. McPhee, D. Idsvoog, C. Pate, T. Scheuer, W.A. Catterall, Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 35393–35401.
- [6] B. Hille, Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction, *J. Gen. Physiol.* 69 (1977) 497–515.
- [7] G.R. Strichartz, The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine, *J. Gen. Physiol.* 62 (1973) 37–57.
- [8] K.R. Courtney, Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195 (1975) 225–236.
- [9] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland, Mass., 2001.
- [10] A. Kuzmenkin, F. Bezanilla, A.M. Correa, Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 349–356.
- [11] J. Blanchet, S. Pilote, M. Chahine, Acidic residues on the voltage-sensor domain determine the activation of the NaChBac sodium channel, *Biophys. J.* 92 (2007) 3513–3523.
- [12] P.G. DeCaen, V. Yarov-Yarovoy, Y. Zhao, T. Scheuer, W.A. Catterall, Disulfide locking a sodium channel voltage sensor reveals ion pair formation during activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 15142–15147.
- [13] P.G. DeCaen, V. Yarov-Yarovoy, E.M. Sharp, T. Scheuer, W.A. Catterall, Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 22498–22503.
- [14] T. Paldi, M. Gurevitz, Coupling between residues on S4 and S1 defines the voltage-sensor resting conformation in NaChBac, *Biophys. J.* 99 (2010) 456–463.
- [15] W.A. Catterall, Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology, *Neuron* 67 (2010) 915–928.
- [16] T. Shimomura, K. Irie, H. Nagura, T. Imai, Y. Fujiyoshi, Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 7409–7417.
- [17] P.G. DeCaen, V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer, W.A. Catterall, Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na⁺ channel voltage sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 18825–18830.
- [18] D.A. Doyle, J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* 280 (1998) 69.
- [19] C. Townsend, R. Horn, Interaction between the pore and a fast gate of the cardiac sodium channel, *J. Gen. Physiol.* 113 (1999) 321–332.
- [20] C.C. Kuo, S.Y. Liao, Facilitation of recovery from inactivation by external Na⁺ and location of the activation gate in neuronal Na⁺ channels, *J. Neurosci.* 20 (2000) 5639–5646.
- [21] W. Treptow, M. Tarek, Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel, *Biophys. J.* 90 (2006) L64–L66.
- [22] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature* 423 (2003) 33–41.
- [23] S.M. Webster, D. Del Camino, J.P. Dekker, G. Yellen, Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges, *Nature* 428 (2004) 864–868.
- [24] K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura, Y. Fujiyoshi, Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3685–3694.
- [25] Y. Zhao, T. Scheuer, W.A. Catterall, Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 17873–17878.
- [26] K. Charalambous, B.A. Wallace, NaChBac: the long lost sodium channel ancestor, *Biochemistry* 50 (2011) 6742–6752.
- [27] W. OuYang, H.C. Hemmings, Isoform-selective effects of isoflurane on voltage-gated Na⁺ channels, *Anesthesiology* 107 (2007) 91–98.
- [28] W.A. Catterall, From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron* 26 (2000) 13–25.
- [29] D. Ren, B. Navarro, H. Xu, L. Yue, Q. Shi, D.E. Clapham, A prokaryotic voltage-gated sodium channel, *Science* 294 (2001) 2372–2375.
- [30] R. Koishi, H. Xu, D. Ren, B. Navarro, B.W. Spiller, Q. Shi, D.E. Clapham, A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9532–9538.
- [31] J. Richardson, R. Blunck, P. Ge, P.R. Selvin, F. Bezanilla, D.M. Papazian, A.M. Correa, Distance measurements reveal a common topology of prokaryotic voltage-gated ion channels in the lipid bilayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 15865–15870.
- [32] Y. Shafir, S.R. Durell, H.R. Guy, Models of the structure and gating mechanisms of the pore domain of the NaChBac ion channel, *Biophys. J.* 95 (2008) 3650–3662.
- [33] Y. Shafir, S.R. Durell, H.R. Guy, Models of voltage-dependent conformational changes in NaChBac channels, *Biophys. J.* 95 (2008) 3663–3676.
- [34] D.T. Jones, Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 195–202.
- [35] A. Fiser, A. Sali, Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models, *Methods Enzymol.* 374 (2003) 461–491.
- [36] V. Carnevale, W. Treptow, M.L. Klein, Sodium ion binding sites and hydration in the lumen of a bacterial ion channel from molecular dynamic simulations, *J. Phys. Chem. Lett.* 109 (2011) E93–E102.
- [37] V. Yarov-Yarovoy, P.G. DeCaen, R.E. Westenbroek, C.Y. Pan, T. Scheuer, D. Baker, W.A. Catterall, Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2 (2011) 2504–2508.
- [38] A.D. MacKerell, N. Banavali, N. Foloppe, Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids, *Biopolymers* 56 (2000) 257–265.
- [39] A.D. MacKerell, M. Feig, C.L. Brooks, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamic simulations, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1400–1415.
- [40] J. Héning, W. Shinoda, M.L. Klein, United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 7008–7015.
- [41] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926.
- [42] E. Darve, D. Rodríguez-Gómez, A. Pohorille, Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations, *J. Chem. Phys.* 128 (2008) 144120.
- [43] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577.
- [44] J.P. Ryckaert, G. Ciccoliti, H.J.C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.* 23 (1977) 327–341.
- [45] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1781–1802.
- [46] J. Henin, G. Fiorin, C. Chipot, M.L. Klein, Exploring multidimensional free energy landscapes using time-dependent biases on collective variables, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2009) 35–47.
- [47] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, The crystal structure of a voltage-gated sodium channel, *Nature* 475 (2011) 353–358.
- [48] S. Berneche, B. Roux, Molecular dynamics of the KcsA K⁺ channel in a bilayer membrane, *Biophys. J.* 78 (2000) 2900–2917.
- [49] I.H. Shrivastava, M.S.P. Sansom, Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer, *Biophys. J.* 78 (2000) 557–570.
- [50] E. Pavlov, C. Bladen, R. Winkfein, C. Diao, P. Dhaliwal, R.J. French, The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel, *Biophys. J.* 89 (2005) 232–242.
- [51] L. Yue, B. Navarro, D. Ren, A. Ramos, D.E. Clapham, The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac, *J. Gen. Physiol.* 120 (2002) 845.
- [52] S. Chakrapani, P. Somporapisit, P. Intharathep, B. Roux, E. Perozo, The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 5435–5440.
- [53] T. Kitaguchi, M. Sukhareva, K.J. Swartz, Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 319–332.
- [54] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, The open pore conformation of potassium channels, *Nature* 417 (2002) 523–526.
- [55] J.N. Bright, I.H. Shrivastava, F.S. Cordes, M.S. Sansom, Conformational dynamics of helix S6 from Shaker potassium channel: simulation studies, *Biopolymers* 64 (2002) 303–313.
- [56] S.A. Spronk, D.E. Elmore, D.A. Dougherty, Voltage-dependent hydration and conduction properties of the hydrophobic pore of the mechanosensitive channel of small conductance, *Biophys. J.* 90 (2006) 3555–3569.
- [57] B. Corry, An energy-efficient gating mechanism in the acetylcholine receptor channel suggested by molecular and Brownian dynamics, *Biophys. J.* 90 (2006) 799–810.
- [58] M. Shiraishi, R.A. Harris, Effects of alcohols and anesthetics on recombinant voltage-gated Na⁺ channels, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 987–994.
- [59] W. Ouyang, T.Y. Jih, T.T. Zhang, A.M. Correa, H.C. Hemmings, Isoflurane inhibits NaChBac, a prokaryotic voltage-gated sodium channel, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322 (2007) 1076–1083.
- [60] H.C. Hemmings, Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics, *Br. J. Anaesth.* 103 (2009) 61–69.
- [61] S.D. Dib-Hajj, J.A. Black, S.G. Waxman, Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain, *Pain Med.* 10 (2009) 1260–1269.
- [62] M. Mantegazza, G. Curia, G. Biagini, D.S. Ragsdale, M. Avoli, Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders, *Lancet Neurol.* 9 (2010) 413–424.
- [63] C.J. Cohen, Targeting voltage-gated sodium channels for treating neuropathic and inflammatory pain, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2011) 1715–1719.
- [64] S. Mahdavi, S. Gharibzadeh, B. Ranjbar, M. Javan, Voltage-gated sodium channel gating modifiers: valuable targets for multiple sclerosis treatment, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 23 (2011) E17.

Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel

Annika F. Barber, Vincenzo Carnevale, S.G. Raju, Cristiano Amaral, Werner Treptow, and Michael L. Klein

Supplementary Information



Figure S1. Sequence alignment of NaChBac and NavAb. Black and grey shading indicates identity and similarity, respectively. Red boxes indicate regions of NaChBac that were not included in the homology model. Blue box indicates the C-terminal region of NavAb that was not crystallized. The alignment was obtained via local alignment (Smith-Waterman) using the blosum62 substitution matrix, with a penalty of 12 for opening and 3 for extending the gaps.

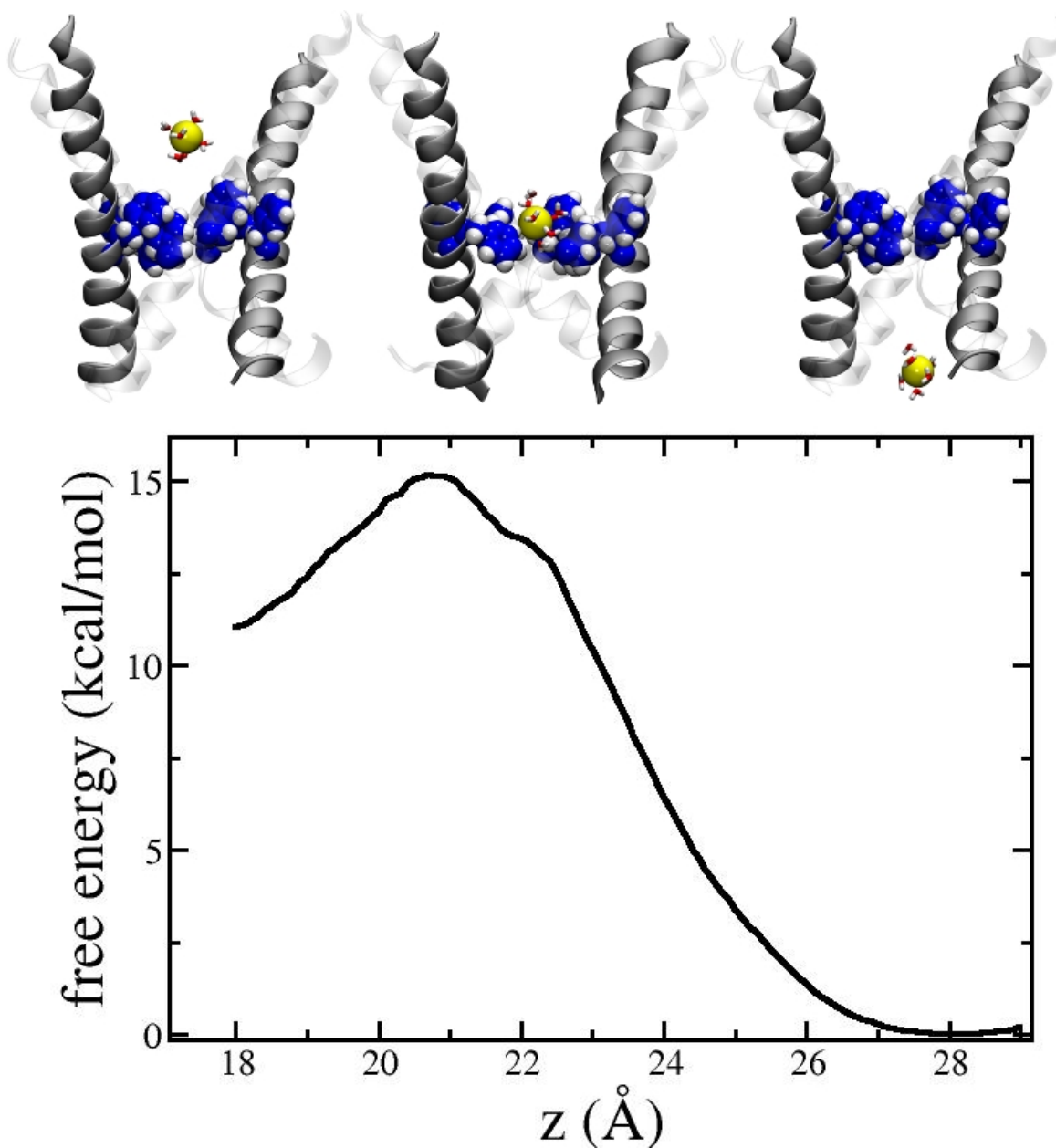


Figure S2. Free-energy profile of a Na⁺ ion conduction through the activation gate of the early-activated open conformation. The free-energy is plotted as a function of the displacement of the ion along the direction normal to the membrane plane; the origin of the x-axis is the geometric center of the selectivity filter and the positive direction describes a displacement from the selectivity filter towards the intracellular side of the S6 bundle. A set of selected configurations along this pathway are shown in the cartoons in the upper panel, where F224, F227, and the permeant Na⁺ ion along with its first solvation shell are rendered using a *ball-and-stick* representation. Note that the Na⁺ ion retains an almost complete first shell of solvation along the entire pathway.

Table S1. Average distances between selected residues in adjacent subunits.

Acceptor Residue Number	Avg. LRET Distance	Avg. Distance Open State (final 100 ns)
25	30.0	58.3
40	28.3	45.8
43	28.0	48.6
88	48.7	43.4
98	47.8	57.9
109	51.5	50.2
112	45.3	51.7
114	47.9	41.6
118	54.9	42.7
120	43.2	42.9
123	44.5	41.1
124	50.2	36.6
125	48.6	43.3
126	40.7	45.7
127	43.2	39.8
128	42.3	39.1
129	50.3	33.4
130	48.3	34.4
208	29.6	27.7
231	31.4	11.8

For each residue, the distance is calculated between C-beta atoms and compared to the corresponding distance inferred from LRET experiments [7]. Green and yellow shadings highlight deviations of less than 5.0 Å and 5.3 Å, respectively.

4.4 DOCKING MOLECULAR DE MODELOS DE ANESTÉSICOS GERAIS: ESTUDOS COM Kv

As descobertas acumuladas durante as últimas décadas sobre a interação ligante/proteína permitiram consolidar a noção de que existem sítios de interação de anestésicos gerais aos receptores proteicos, em que canais iônicos despertam interesse farmacológico dado sua relevância em inúmeros processos fisiológicos. Vários canais da superfamília *VGCC* tem seu funcionamento modulado por anestésicos gerais em doses clínicas relevantes. Atualmente, pondera-se que a modulação dos canais iônicos, no nível molecular, ocorra pela ligação direta de moléculas efetoras, e que pode explicar os princípios da anestesia geral como também os efeitos colaterais da administração dessas drogas. Entretanto, apesar dessa hipótese ter ganhado força nos últimos anos, devido à confirmação da existência de sítios discretos para ligação de anestésicos gerais em canais iônicos a partir de estruturas atomísticas resolvidas por cristalografia de raios-X¹²⁸⁻¹³⁰, as bases estruturais da modulação dessas proteínas ainda não foram completamente compreendidas.

Trabalhos anteriores, investigando a ação de diferentes classes de moléculas anestésicas como os n-álcoois e os anestésicos inaláveis (haloalcanos), sugerem que essas moléculas efetoras atuam na modulação dos canais *VGCC* por estabilizar o estado fechado desses canais, interagindo com sítios putativos do receptor. Como demonstrado em⁷³ o canal iônico de *Drosophilla sp.* da família Kv (K-Shaw2) pode ser reversivelmente inibido por n-álcoois de cadeia média (etanol-hexanol) além de anestésicos inaláveis (halotano e isoflurano) em concentrações clinicamente relevantes. Vale ressaltar que diferentemente da maioria dos canais Kv, que são insensíveis à ação de anestésicos gerais, o funcionamento do canal K-Shaw2 é modulado quando exposto à essa classe de ligantes. Esses estudos adicionalmente indicam que o segmento de ligação S4-S5-linker (*L*) está relacionado à sensibilidade dos canais iônicos às moléculas anestésicas supracitadas^{56,57,131}. Em conjunto, os resultados atualizados da literatura sugerem a existência de uma cavidade anfifílica em canais Kv para ligação de anestésicos, que é formada por duas regiões responsáveis pela ativação desses canais: o segmento *L*, e a porção C-terminal do conjunto de hélices S6 do domínio do poro^{56,132,133}. Apesar dos estudos desenvolvidos até o momento, os locais específicos dos sítios putativos de ligação à anestésicos gerais em *VGCC* ainda não foram completamente mapeados.

No presente trabalho propomos a hipótese de que a inibição do K-Shaw2 por n-álcoois e anestésicos voláteis é determinada pela presença de sítios alostéricos ao longo do canal, i.e bolsões específicos de ligação aos anestésicos localizados em redor do receptor, e portanto fora da cavidade central da proteína. Para testar esse hipótese, nossa contribuição específica para o trabalho foi mapear os sítios de ligação à anestésicos gerais em canais iônicos Kv. Essa estratégia foi desenvolvida nas seguintes etapas: i) modelagem das estruturas aberta e fechada do canal iônico K-Shaw2, a partir das estruturas obtidas pelo nosso grupo do Kv1.2³⁷ (figura 4.22); ii) equilíbrio dos modelos resultantes na membrana através de simulações explícitas de MD (figura 4.23); iii) mapeamento e classificação de sítios putativos de ligação à anestésicos gerais nos modelos equilibrados de Kv, através do *docking* molecular, utilizando como modelo de moléculas efetoras os ligantes 1-butanol e halotano (figuras 4.24 e 4.25).

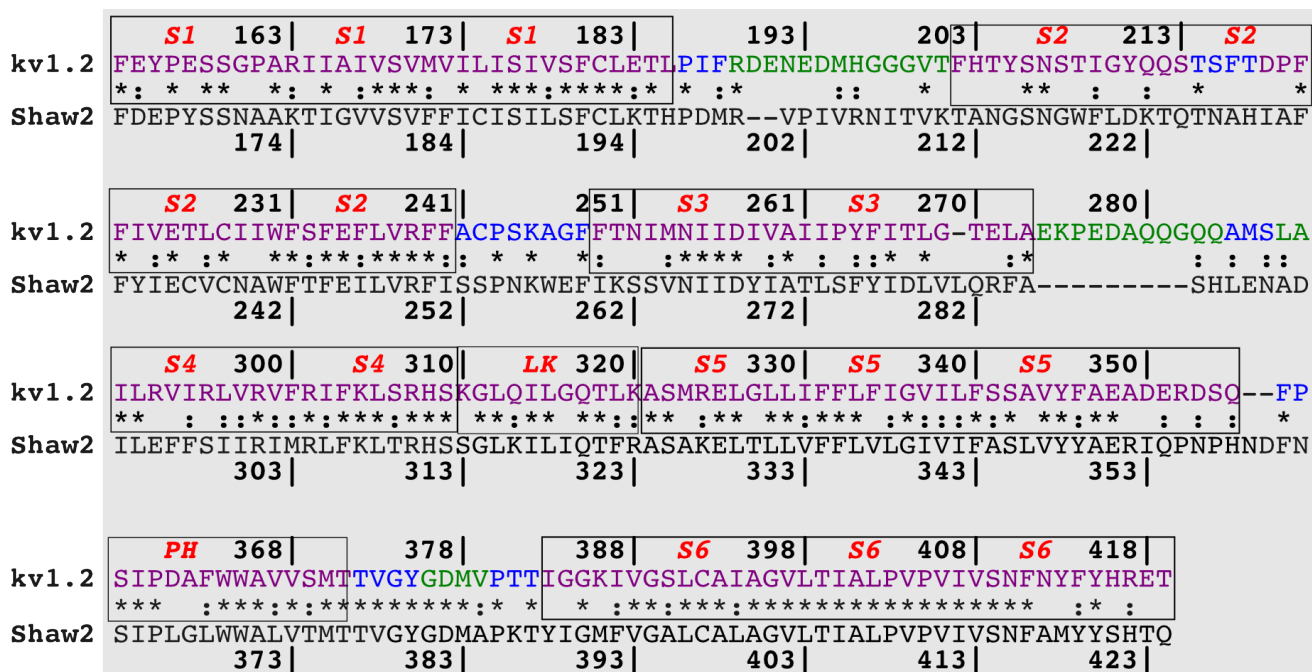


Figura 4.22. Alinhamento da estrutura primária dos canais iônicos Kv1.2 e K-Shaw2. A sequência de aminoácidos do Kv1.2 está colorida de acordo com sua estrutura secundária, i.e α -hélices em lilás; *coils* em verde e *turns* em azul. As caixas em destaque marcam o tamanho dos segmentos de hélices do canal. Note que no alinhamento estrutural, as regiões de *gap* foram inseridas em motivos não estruturados como *coils* e *turns* para maximizar a conservação estrutural do modelo à estrutura de referência. As proteínas compartilham de 52.4% de identidade e 84.6% de similaridade (Alinhamento realizado pelo programa Clustaw2 em <http://www.uniprot.org/?tab=align>).

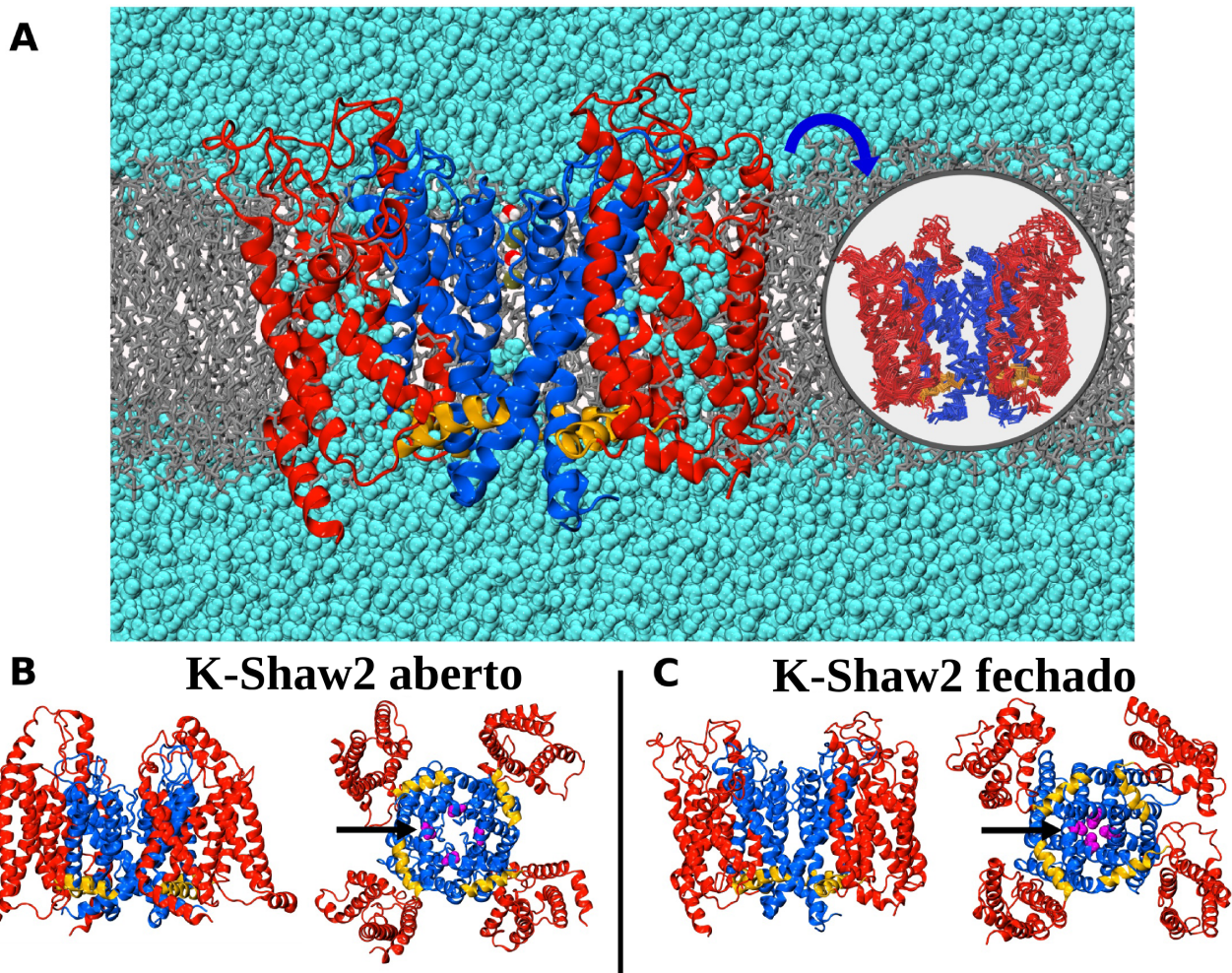


Figura 4.23. Equilibração do canal K-Shaw2 na membrana. **A:** Sistema atomístico contendo o canal K-Shaw2 representado em *cartoon* (vermelho para *VSD*; laranja para *S4S5-linker*; azul para o *PD*) adsorvido numa membrana hidratada (esferas em azul ciano) de fosfolipídios POPC (bastões cinza). Os íons potássio (esferas cor de ocre) e duas moléculas de água estão representadas como esferas no filtro de seletividade. *Inset:* sobreposição de dez estruturas da bacia de equilíbrio como estratégia para considerar a flexibilidade do canal. **B e C:** Estruturas aberta e fechada de K-Shaw2 equilibradas na membrana. Note que o resíduo V⁴⁰⁹(rosa) é o portão hidrofóbico que controla a condução iônica.

Os modelos do canal K-Shaw2 (aberto e fechado), bem com a estrutura fechada do Kv1.2, foram submetidas à experimentos *in-silico* de *docking* molecular. Brevemente, essa técnica consiste em resolver os mínimos de interação entre moléculas de ligantes e o receptor alvo, pelo computo das interações não ligadas do tipo *van der Waals* (*VDW*) e Coulombianas (vide metodologia tópico 3.1.15). Aqui, os ligantes 1-butanol e halotano foram docados, individualmente, contra dez estruturas de cada isoforma de Kv, amostradas a partir da bacia de equilíbrio referentes aos instantes finais da equilibração

desses canais. O objetivo dessa estratégia foi incluir a flexibilidade do receptor para composição do espaço total de soluções de ligantes sobre os canais. A partir do espaço total de soluções de *docking* encontradas, os sítios distinguíveis foram totalizados em 8 sítios distintos e numerados de 1 a 8 para ambos os ligantes testados contra os canais Kv. Os detalhes sobre a classificação dos sítios encontram-se no tópico 3.2.2 da metodologia. Surpreendentemente, com exceção do sítio 6, todos os outros sítios encontrados se sobrepuseram tanto para halotano quanto para 1-butanol (figuras 4.24 e 4.25).

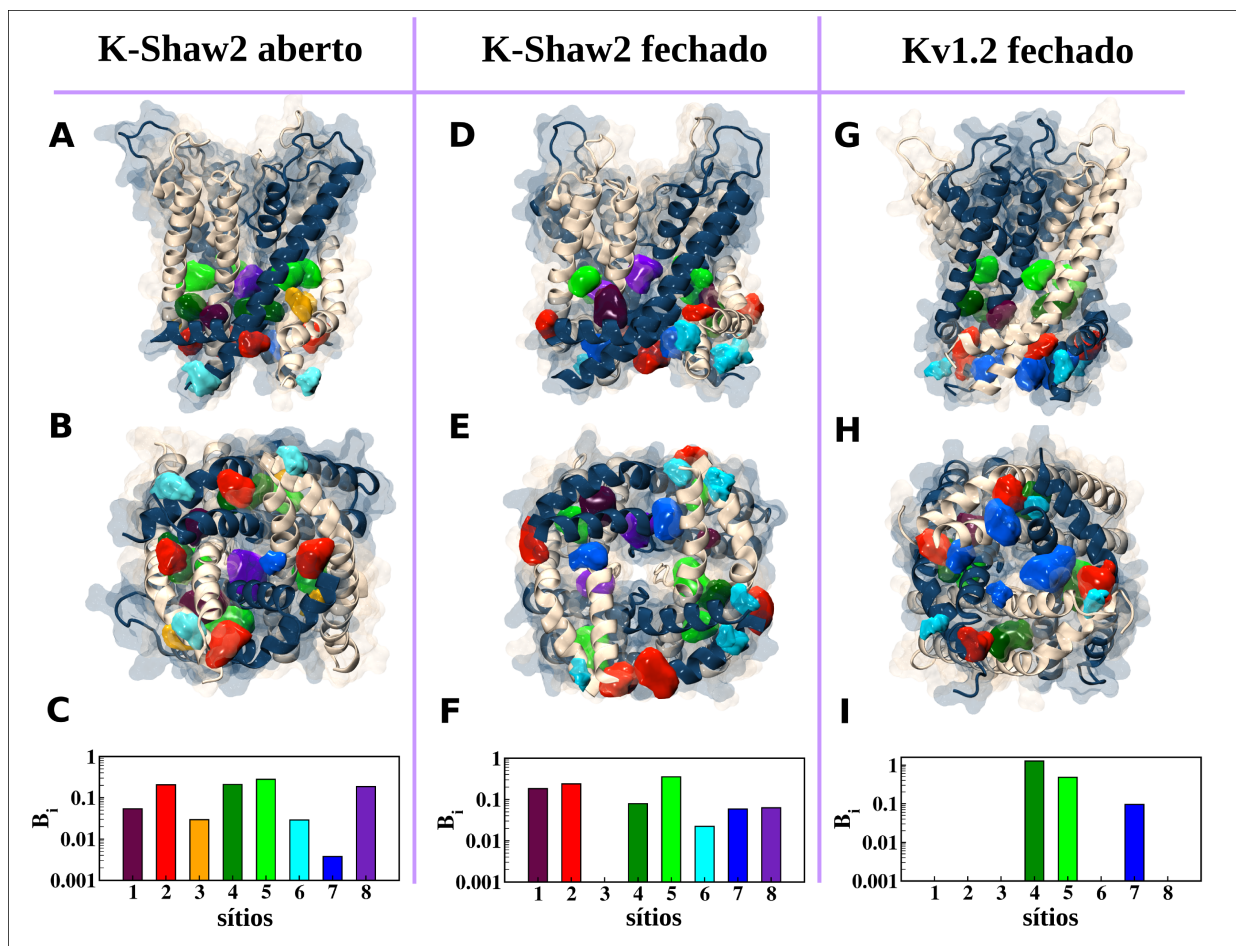


Figura 4.24. *Docking* molecular do 1-butanol. Vistas laterais (A) e intracelulares (B) da estrutura fechada do K-Shaw2, em que são mostrados o S4S5-linker (LK) e PD (S5 e S6). O canal representado corresponde a uma estrutura média de 10 conformações dos últimos 5 ns de estabilização. As manchas coloridas representam a densidade de ocupância do ligante para um dado sítio calculado pelo *docking*. Os sítios de ligação ao álcool foram classificados em 8 grupos distintos, de acordo com suas localizações específicas na estrutura do receptor: **sítio 1** (cor de malva) o ligante está ancorado em uma interface entre um segmento L e S6 (de uma mesma subunidade) e uma S6 adjacente; **sítio 2** (vermelho) o ligante interage com um L e S6 intra subunidade e uma S5 adjacente; **sítio 3** (laranja) o anestésico se liga a um L e uma S5/S6 adjacentes; os **sítios 4** (verde escuro) e **5** (verde claro) são formados por segmentos intra subunidades S5 e S6; **sítio 6** (azul ciano) acomoda o ligante entre um L e a porção C-terminal de uma S6 intra subunidade; **sítio 7** (azul) é configurado pelas regiões terminais de S6; e o **sítio 8** (violeta) é localizado dentro da cavidade central do canal. A constante de ligação em cada receptor é mostrada em C. (D, E, F) *idem* para a conformação aberta do K-Shaw2. (G, H, I) *idem* para o estado fechado do Kv1.2. Um dado sítio com $B_i = 0$, significa que o ligante não possui afinidade por aquele sítio, *i.e* nenhuma solução de *docking* foi encontrada para aquele sítio específico.

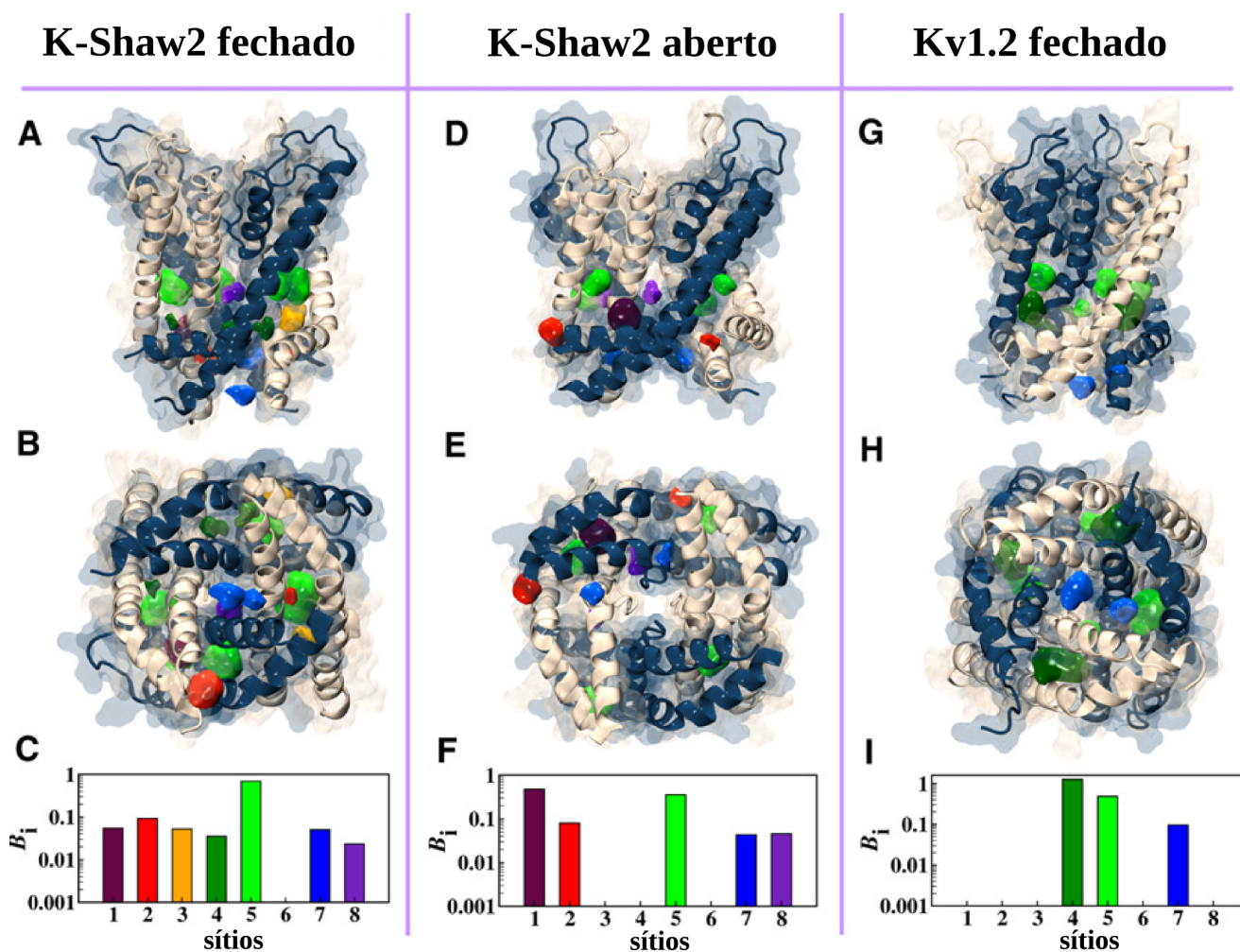


Figura 4.25. *Docking* molecular do halotano. Vistas laterais (A) e intracelulares (B) da estrutura fechada do K-Shaw2, em que são mostrados o S4S5-linker (LK) e PD (S5 e S6). O canal representado corresponde a uma estrutura média de 10 conformações dos últimos 5 ns de equilíbrio. As manchas coloridas representam a densidade de ocupância do ligante para um dado sítio calculado pelo *docking*. Os sítios de ligação ao anestésico volátil foram classificados em 8 grupos distintos, de acordo com suas localizações específicas na estrutura do receptor. Para maiores detalhes sobre a identidade dos sítios veja figura 4.24.

Uma vez obtido o mapa total de ligação para ambos anestésicos, precisávamos determinar quais desses sítios mapeados eram candidatos à ter impacto funcional sobre os Kv investigados. Considerando que apenas o K-Shaw2 é sensível a anestésicos gerais em doses clinicamente relevantes, e que essa classe de moléculas bloqueia a condução iônica por estabilizarem seu estado fechado (não condutivo), realizamos a subtração dos sítios encontrados para separar soluções de *docking* pertencentes à estrutura fechada do K-Shaw2 contra àquelas ligadas aos canais K-Shaw2 aberto e Kv1.2 fechado (vide metodologia tópico 3.2.2). Por meio dessa seleção, os sítios identificados para ligação do 1-butanol ao K-Shaw2 fechado foram os sítios 3,4,6, e 8; enquanto que os sítios de ligação do halotano para o mesmo canal foram os 2,3 e 5. Dessa forma, o sítio 3 emerge como candidato à sítio

putativo de ligação de anestésicos gerais sobre o K-Shaw2 fechado.

De modo surpreendente, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do sítio 3, que estão em proximidade de contato com os ligantes (figura 4.26 e Tabela 4.4), não correspondem àquelas que causam maior impacto funcional, como mostra os experimentos de mutação Ala/Val (*alanine scanning*) realizado pelo grupo colaborador deste trabalho (vide os resultados do anexo IV). Ao contrário, a alteração de resíduos distantes dos sítios próximos ao sítio 3, como os aminoácidos Y⁴¹⁹ e Y⁴²⁰, determinaram grande impacto na afinidade dos anestésicos ao K-Shaw2 portando essas mutações. Esse resultado aparentemente contraditório sugere que as mutações por alanina podem não ser suficientes para introduzir uma perturbação significativa à estrutura do sítio de ligação à molécula efetora, dado as dimensões da cadeia lateral deste resíduo de aminoácido. Desse modo, o ligante poderia adotar estados de ligação alternativos de baixa energia dentro do sítio portando a mutação por alanina. Além disso, mutações de resíduos distantes dos sítios de ligação, mas que são responsáveis por manter a estrutura dos mesmos, podem determinar o desaparecimento do bolsão de interação ao anestésico, contribuindo para perda de afinidade do ligante teste pelo canal alvo, como observado experimentalmente. Tomadas em conjunto, essas observações nos levam a indagar sobre uma “hipótese estrutural” em que resíduos de aminoácidos que contribuam para a estabilização de sítios alostéricos ao longo do canal, são preponderantes para a afinidade de ligantes alvo em relação aos que interagem diretamente com as moléculas efetoras. Novos estudos empregando um ciclo alternativo de mutações (e.g. *tryptophan scanning*), que seja capaz de introduzir perturbações estruturais sobre os sítios putativos e regiões responsáveis pela estabilização dos mesmos, serão requeridos para investigar essa hipótese.

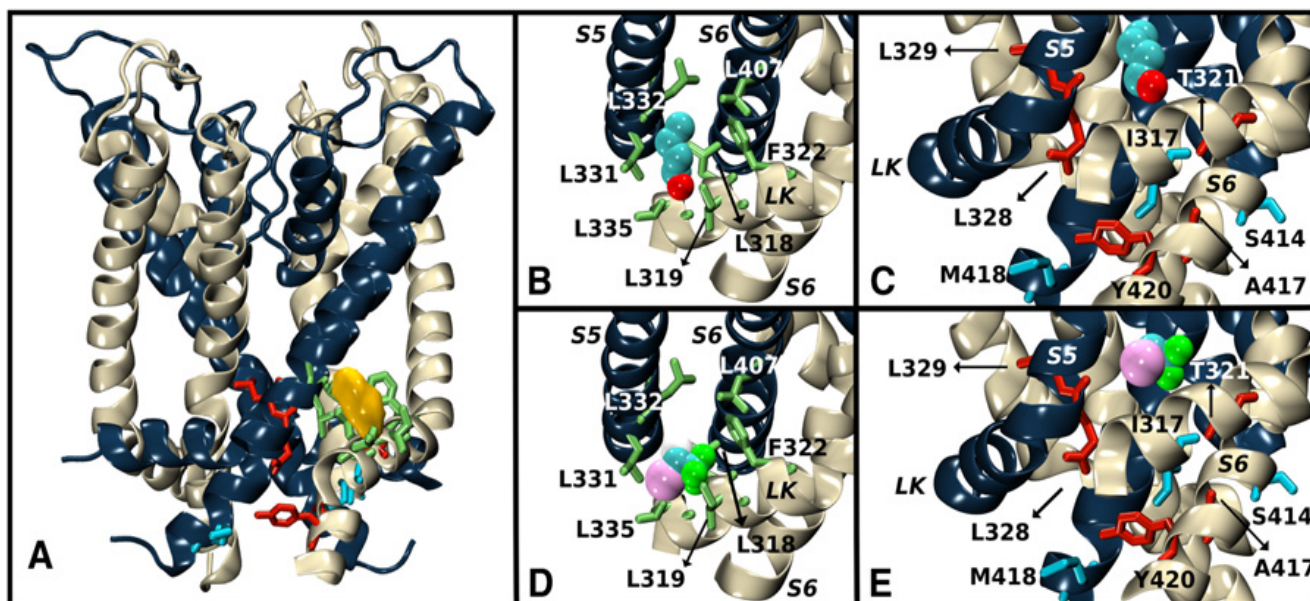


Figura 4.26. Conformação média equilibrada do estado fechado do canal K-Shaw2 ligado aos anestésicos. **A:** Visão lateral do esqueleto carbônico (cartoon) do K-Shaw2. A nuvem de densidade (amarelo) ilustra o 1-butanol ligado ao sítio 3. Resíduos distantes no máximo ~ 4.5 Å do ligante são representados em bastões verdes. (tabela 4.4). **B:** Detalhe atômico do 1-butanol no sítio 3. **C:** Proximidade do álcool aos sítios cuja mutação Ala/Val desfavorece a afinidade do ligante (bastões vermelhos) e o contrário (bastões em azul claro). **D e E:** mesma legenda de B e C considerando o anestésico halotano.

Tabela 4.4. Resíduos distantes no máximo ~ 4.5 Å de cada ligante pertencentes aos sítios 1-8.

Ligante	Sítio	S4-S5 linker	S5	S6
1-Butanol	3	L ³¹⁵ L ³¹⁸ I ³¹⁹ F ³²²	L ³³¹ L ³³² F ³³⁵	L ⁴⁰⁷
	6	K ³¹⁶ Q ³²⁰	-	Y ⁴¹⁹ T ⁴²³
	8	-	-	V ⁴⁰⁹
Halotano	2	I ³¹⁷	K ³²⁷ E ³²⁸	V ⁴¹¹ S ⁴¹⁴ N ⁴¹⁵ F ⁴¹⁶ Y ⁴²⁰
	3	L ³¹⁵ L ³¹⁸ I ³¹⁹ F ³²²	L ³²² F ³³⁵	L ⁴⁰⁷
	5	-	L ³³² V ³³³ L ³³⁶	V ⁴⁰² L ⁴⁰³ T ⁴⁰⁴ L ⁴⁰⁷ P ⁴⁰⁸

Os resultados teóricos aqui apresentados, i.e a modelagem molecular do canal K-Shaw2 a partir das estruturas de referência obtidas dos estudos de desativação do Kv1.2, a equilibração e validação desses modelos na membrana, o *docking* molecular dos anestésicos gerais, e o cálculo das energias livre de ligação dos anestésicos gerais nos canais Kv, foram publicados no jornal internacional *Biophysical Journal* no ano de 2011⁷³, em colaboração com o grupo experimentalista liderado pelo Dr. Manuel Covarrubias da Universidade da Thomas Jefferson, Estados Unidos.

ANEXO IV

Molecular Mapping of General Anesthetic Sites in a Voltage-Gated Ion Channel

Annika F. Barber,^{†‡§} Qiansheng Liang,^{†‡} Cristiano Amaral,[¶] Werner Treptow,[¶] and Manuel Covarrubias^{†‡§*}

[†]Department of Neuroscience, [‡]Farber Institute for Neuroscience, and [§]Graduate Program in Cell and Developmental Biology, Jefferson Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania; and [¶]Laboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília DF, Brasil

ABSTRACT Several voltage-gated ion channels are modulated by clinically relevant doses of general anesthetics. However, the structural basis of this modulation is not well understood. Previous work suggested that n-alcohols and inhaled anesthetics stabilize the closed state of the Shaw2 voltage-gated (Kv) channel (K-Shaw2) by directly interacting with a discrete channel site. We hypothesize that the inhibition of K-Shaw2 channels by general anesthetics is governed by interactions between binding and effector sites involving components of the channel's activation gate. To investigate this hypothesis, we applied Ala/Val scanning mutagenesis to the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment, and conducted electrophysiological analysis to evaluate the energetic impact of the mutations on the inhibition of the K-Shaw2 channel by 1-butanol and halothane. These analyses identified residues that determine an apparent binding cooperativity and residue pairs that act in concert to modulate gating upon anesthetic binding. In some instances, due to their critical location, key residues also influence channel gating. Complementing these results, molecular dynamics simulations and *in silico* docking experiments helped us visualize possible anesthetic sites and interactions. We conclude that the inhibition of K-Shaw2 by general anesthetics results from allosteric interactions between distinct but contiguous binding and effector sites involving inter- and intrasubunit interfaces.

INTRODUCTION

Discoveries made over the past two decades support the notion that proteins contain relatively specific general anesthetic sites, with ion channels perhaps being the most physiologically relevant (1–5). Ligand-gated, voltage-gated, and nongated ion channels are among the best-known targets. Thus, it is hypothesized that direct modulation of diverse ion channels by general anesthetics may explain distinct physiological end points of anesthesia and common side effects of general anesthetics (2,3). Although this hypothesis has gained recognition in recent years, and crystallographic studies are confirming the presence of discrete general anesthetic sites in ion channels (6), several fundamental questions remain unanswered. What common structural features of protein cavities permit the interaction of general anesthetics with diverse and structurally distinct ion channels? What are the structural bases of the link between cavity occupancy and functional modulation by anesthetics? Answering these questions is a key step toward understanding the molecular mechanisms of general anesthesia and designing anesthetics with fewer side effects and higher therapeutic indices.

We previously demonstrated that the voltage-gated K⁺ (Kv) channel Shaw2 (K-Shaw2) is rapidly and reversibly inhibited by clinically relevant anesthetic doses of short- and medium-chain n-alcohols (C2-C6) and inhaled anesthetics (halothane and isoflurane) (7–11). In particular, we showed that halothane and 1-butanol (1-BuOH) share a putative

binding site in the channel (7), and that n-alcohols stabilize the closed state(s) (9). Related studies have also shown that the S4-S5 linker is sufficient and necessary to confer modulation by n-alcohols and general anesthetics, and that the α -helicity of this linker is critical for the modulatory action (7,9,12–14). Moreover, the second proline in the PVP motif of the S6 segment (P410) is also unique because the mutation P410A switches the modulatory response from inhibition to potentiation (12,15). These studies led to the notion of an amphiphilic anesthetic cavity involving two key components of the activation machinery of Kv channels: the S4-S5 linker and the distal part of the S6 segment. Interactions between these regions are the basis of the electromechanical coupling underlying voltage-dependent gating of voltage-gated ion channels (16–18). Although these studies generally support the contributions of the K-Shaw2 activation gate to general anesthetic action, systematic molecular mapping is necessary to locate the sites of action. We hypothesize that the inhibition of K-Shaw2 channels by n-alcohols and inhaled anesthetics is governed by the allosteric cross talk between binding and effector sites at the channel's activation gate. These sites may overlap or exhibit distinct locations.

To test this hypothesis, we investigated the actions of 1-BuOH and halothane by combining systematic Ala/Val scanning mutagenesis (Fig. 1), electrophysiological evaluation of dose-response relations, and molecular modeling. These experiments revealed that the apparent binding cooperativity depends on critical interacting residues in the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment (Fig. 1), which in some instances also influence the energetics of anesthetic

Submitted May 31, 2011, and accepted for publication August 15, 2011.

*Correspondence: manuel.covarrubias@jefferson.edu

Editor: Eduardo Perozo.

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/10/1613/10 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.08.026

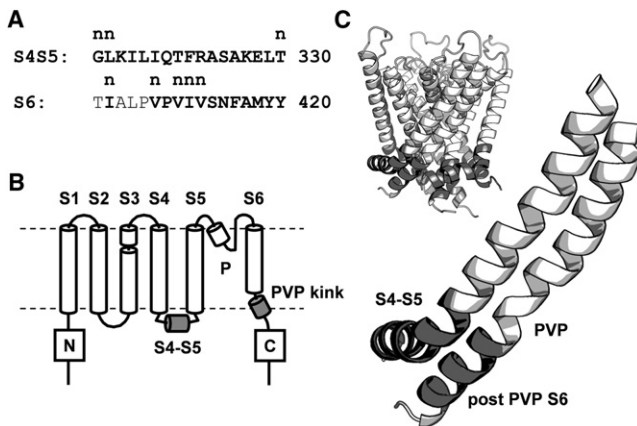


FIGURE 1 Topology and structure of the S4-S5 linker and S6 segment in the K-Shaw2 channel, with the Ala/Val scan region highlighted in gray in *B* and *C*. (*A*) Sequences of the S4-S5 linker and S6 segment (mutated residues shown in bold). A lowercase “n” above the sequence indicates nonexpressing mutants; numbers indicate the number of the final residue in each segment. (*B*) K-Shaw2 exhibits classical Kv channel membrane topology with six TM segments and intracellular termini. The first four membrane-spanning segments form the voltage sensor, and the last two segments form the pore domain. (*C*) Structural model of the S4-S5 linker and the S6 segment of K-Shaw2. The inset depicts a tetrameric model of the K-Shaw2 pore domain, including the S4-S5 linkers. This homology model was created by MD simulation (Supporting Material).

action and voltage-dependent gating. Additional observations demonstrated significant nonadditive energetic interactions between residue pairs possibly acting as anesthetic effector sites. Complementing these results, molecular dynamics (MD) simulations and in silico docking experiments yielded a plausible atomistic map displaying distinct but contiguous binding and effector sites formed by the moving parts of the channel’s activation gate. This study sets the stage to investigate the molecular mechanisms underlying the relevant modulation of voltage-gated Na^+ , Ca^+ , and nonselective cation channels by general anesthetics (19–25).

MATERIALS AND METHODS

Experimental details about the Ala/Val scanning mutagenesis, heterologous expression, electrophysiology, MD simulations, and in silico docking are described in the Supporting Material, which includes a summary of definitions (Table S1).

RESULTS

Anesthetic dose-inhibition relations of wild-type and mutant K-Shaw2

To map the contributions of individual residue side chains to putative anesthetic binding and effector sites in K-Shaw2 and the resulting inhibition, we applied Ala/Val scanning mutagenesis to the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment, and functional characterization in *Xenopus* oocytes under two-electrode voltage-clamp conditions (Supporting

Material). These regions were chosen because 1), they play central roles in Kv channel gating, and general anesthetics influence K-Shaw2 gating; and 2), previous work has demonstrated the importance of these regions in the modulation of K-Shaw2 by general anesthetics. As shown previously, both n-alcohols (e.g., 1-BuOH) and halothane inhibit wild-type K-Shaw2 currents in a reversible and dose-dependent manner (Fig. 2, *A* and *B*). Assuming that the Hill equation describes the average dose-response curves (Supporting Material), we obtained best-fit parameters of $K_{0.5} = 11.2$ mM and $n_H = 1.6$ for 1-BuOH, and $K_{0.5} = 0.26$ mM and $n_H = 1.2$ for halothane (Fig. 2 *B*, Table S2, and Supporting Material). These values are comparable to those previously reported and indicate that K-Shaw2 is sensitive to clinically relevant doses of halothane (minimum alveolar concentration = 0.25 mM). Because 1-BuOH is significantly less volatile than halothane, and these drugs share a putative binding site in K-Shaw2 (7), we first used 1-BuOH as a tool to probe the inhibition of all mutants (Table S2). This

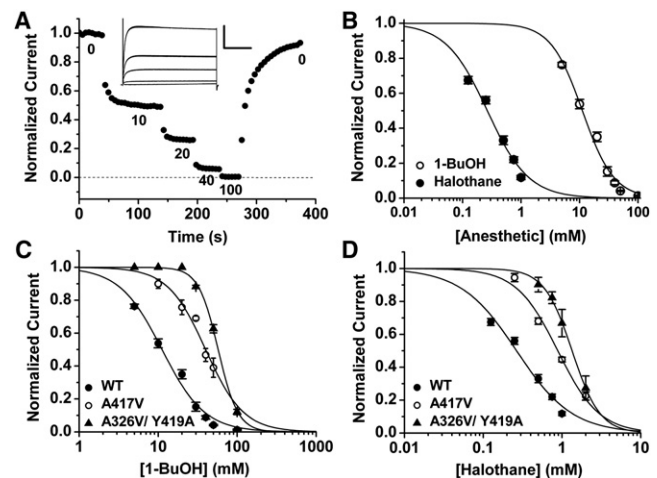


FIGURE 2 Dose-inhibition analysis of the wild-type K-Shaw2 channel and representative Ala/Val mutants. (*A*) Normalized current versus time plot of wild-type K-Shaw2. Upon application of increasingly higher doses of 1-BuOH (mM), there is an incremental inhibition of the current. This inhibition reaches equilibrium and is reversible upon washout. The inset shows the whole-oocyte K-Shaw2 currents corresponding to the experiment shown in the main panel evoked by a step from -100 to $+60$ mV; scale for inset indicates $4 \mu\text{A}$ (y axis) and 100 ms (x axis). All mutants were subjected to this experimental strategy. (*B*) Semilogarithmic plots of normalized current versus anesthetic concentration for wild-type K-Shaw2. The solid lines depict the best Hill equation fits, which yielded the following parameters for halothane: $K_{0.5} = 0.26$ mM, $n_H = 1.2$; and the following best-fit parameters for 1-BuOH: $K_{0.5} = 11.2$ mM, $n_H = 1.6$. (*C*) The effects of Ala/Val mutations on the 1-BuOH dose-inhibition relation. A417V shifted the relation to the right ($K_{0.5} = 39.4$ mM, $n_H = 1.7$) and the double mutation A326V/Y419A caused an even larger shift and increased the apparent cooperativity ($K_{0.5} = 57.7$ mM, $n_H = 3.4$). (*D*) The effects of Ala/Val mutations on the halothane dose-inhibition relation. A417V showed a rightward shift ($K_{0.5} = 0.88$, $n_H = 1.7$), and the double mutation A326V/Y419A exhibited an even larger shift ($K_{0.5} = 1.34$, $n_H = 2.5$). In all cases (*B–D*), the points represent the average of 4–45 independent determinations.

initial screening allowed us to select mutants for subsequent investigation with halothane. Several single S4-S5 linker mutations had modest but significant effects on the $K_{0.5}$; Q320A, T321V, F322A, and L329A increased it, whereas S325A and A326V decreased it. By contrast, most mutations in the post-PVP S6 segment (A417V, M418A, Y419A, and Y420A) increased the $K_{0.5}$ to a greater extent (e.g., Fig. 2 C). Several mutations had a relatively modest impact on the n_H , which typically remained between 1.4 and 2. However, a few yielded larger changes. The n_H -values of T321V, E328A, and L329A in the S4-S5 linker, and Y420A in S6 are reduced (1.2, 1.2, 1.2, and 1.1, respectively), whereas the n_H -values of K316A, S414A, and M418A are increased (2.1, 2.1, and 2.2, respectively). Relative to single mutations, the impact of double mutations on $K_{0.5}$ and n_H is generally larger. Although one double mutation within the S4-S5 linker (Q320A/A326V) affected the 1-BuOH response significantly, even larger changes were caused by paired mutations across the putative interface between the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment (e.g., Fig. 2 C and Table S2). The $K_{0.5}$ -values for Q320A/A326V, Q320A/A417V, Q320A/M418A, Q320A/Y420A, A326V/A417V, and A326V/Y419A are 32, 47, 22, 48, 94, and 58 mM, respectively. The n_H -values for A326V/A417V and A326V/Y419A are 4.5 and 3.4, respectively, and thus are the largest of the entire scan. Nevertheless, across the entire scan, there is no significant correlation between $K_{0.5}$ and n_H (Fig. S1 B).

We next examined the properties of the halothane dose-response curve for a group of selected single and double mutants with significantly altered responses to 1-BuOH (Fig. 2 D and Table S3). The $K_{0.5}$ -values of Q320A, A326V, A417V, and Y420A are clearly increased (0.5, 1.2, 0.9, and 1 mM, respectively), and the n_H -values are modestly changed for Q320A, S325A, A326V, A417V,

and Y419A (1.6, 1, 1.6, 1.6, and 1, respectively). Three double mutations have a more profound impact on the $K_{0.5}$ of halothane: Q320A/A326V, Q320A/Y420A, and A326V/A417V yielded 1.8, 1.4, and $\gg 4$ mM, respectively. Essentially, A326V/A417V is insensitive to halothane, and whereas the n_H for Q320A/A326V is 2.8, that of A326V/A417V is 1.8. As for 1-BuOH, there was no significant correlation between the $K_{0.5}$ - and n_H -values of halothane (Fig. S1 B). Nevertheless, consistent with the presence of overlapping sites for 1-BuOH and halothane in K-Shaw2, the overall impact of the mutations on the $K_{0.5}$ for these anesthetics is similar (e.g., compare Fig. 2, C and D), hence there is a significant correlation between the $K_{0.5}$ -values of 1-BuOH and halothane (Fig. S1). These results add new support to the notion of a general anesthetic action involving the interface between the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment of K-Shaw2.

Energetic impact of mutations on the modulation of K-Shaw2 by general anesthetics

To evaluate the energetic impact of all mutations on the modulation of K-Shaw2 by the anesthetics, we used the parameters derived from the analysis of dose-response curves to calculate the apparent free-energy change ($\Delta G = n_H RT \ln K_{0.5}$; Supporting Material). The Hill coefficient (n_H), which is >1 in the wild-type and changes significantly in several mutants (Table S2 and Table S3), scales the free-energy change. Then, we defined $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{MUT}} - \Delta G_{\text{WT}}$. For 1-BuOH, the absolute impact of 12/15 single S4-S5 linker mutations is relatively small or modest (≤ 1 kcal/mol; Fig. 3 A and Table S2). However, the $\Delta\Delta G$ of the remaining three mutants (E328A, L329A, and T321V) is significantly larger and unfavorable (+1.4, +1.5, and +1.5 kcal/mol, respectively). The energetic impact of

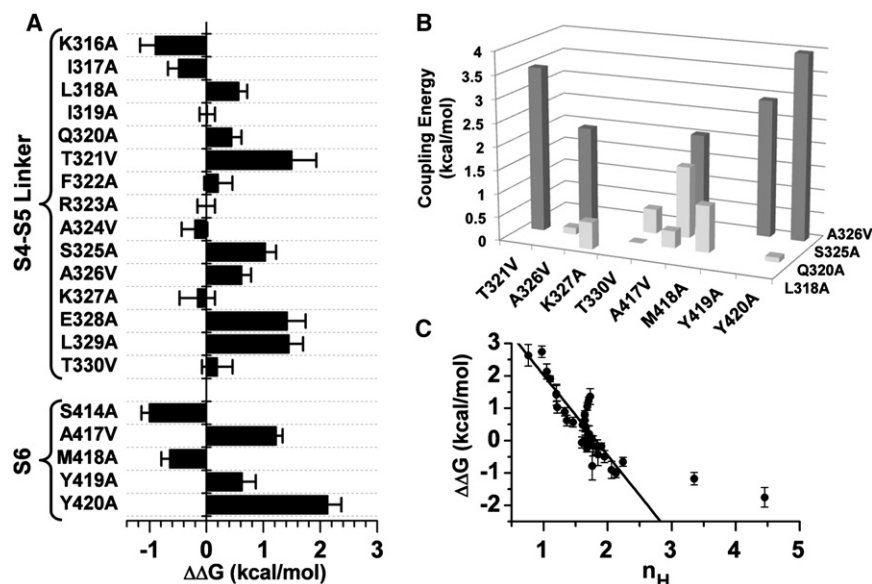


FIGURE 3 Energetic impact of Ala/Val mutations on the modulation of K-Shaw2 by 1-BuOH. (A) Apparent free-energy changes induced by single S4-S5 and S6 mutations. These changes are calculated relative to the wild-type apparent free-energy change as indicated in the main text. (B) Absolute coupling energies for double K-Shaw2 mutants; note that A326V appears on both axes due to intra-S4-S5 mutations. DMCA was used to calculate these energies as described in Table S1. Dark gray bars depict coupling energies > 2 kcal/mol. (C) Scatter plot of $\Delta\Delta G$ versus n_H . The line is the best-fit linear regression ($R^2 = 0.75$). Two outliers with high n_H -values were excluded from the regression analysis. These mutants exhibit very low 1-BuOH sensitivities, and very high doses were not investigated, which limited the estimation of the Hill equation parameters (Table S1).

single S6 mutations is also modest, but in two instances it is >1 kcal/mol (+1.2 and +2.1 kcal/mol for A417V and Y420A, respectively). In addition, single and double mutations that change the n_H have the most significant energetic impact. To further examine this interaction, we plotted the $\Delta\Delta G$ of all single and double mutants against the n_H and found a significant correlation (Fig. 3 C). In contrast, $\Delta\Delta G$ and $K_{0.5}$ are not correlated (Fig. S1 C). We then examined selected double mutants, including the S4-S5 linker and S6 mutations, that significantly affected n_H and/or $K_{0.5}$ (e.g., Q320A, T321V, S325A, A326V, T330V, M418A, A417V, Y419A and Y420A; Table S2), and applied double-mutant cycle analysis (DMCA) to investigate the additivity of the energetic impacts of the mutations (Fig. 3 B; Table S2). This approach can help identify putative anesthetic effector sites. In this context, effector sites are residues that directly or allosterically interact with each other to control how the anesthetic perturbs gating upon interaction with a binding site. The coupling energies of 7/13 double mutants (Q320A/T321V, Q320A/M418A, S325A/A326V, S325A/A417V, A326V/A417V, A326V/Y419A, and A326V/Y420A) are substantial (−3.5, 1, −2.1, −1.5, −2, −2.9, and −4 kcal/mol, respectively).

Overall, the thermodynamic analysis indicates that specific residues in the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment may play significant structural roles in determining the action of general anesthetics on K-Shaw2. Furthermore, the DMCA results suggest that direct or indirect interactions between residue pairs (Q320A/T321V, S325A/A326V, A326V/A417V, A326V/Y419A, and A326V/Y420A) are especially critical, and the energetic impact of the mutations on anesthetic action is closely tied to changes in the apparent cooperativity (n_H) of anesthetic action. To visualize the key residues on the channel structure, we created

an atomic membrane equilibrated MD model of K-Shaw2 (Supporting Material) and mapped the energetic effects ($\Delta\Delta G$) of the mutations (Fig. S2). This map reveals distinct interfacial patches involving relatively high-impact residues in the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment.

Based on the effects of mutations on the Hill equation parameters for 1-BuOH, we also investigated the energetic impact of selected single and double mutations on the interaction between halothane and K-Shaw2 (Fig. 4 A; Table S3). Despite some significant changes in the Hill equation parameters, the $\Delta\Delta G$ values of individual S4-S5 linker and S6 mutants (e.g., Q320A, S325A, A326V, A417V, M418A, Y419A, and Y420A) are relatively small (−1.2, +1.1, −0.5, −0.9, −1.1, +1.2, and −0.1 kcal/mol). Nevertheless, the coupling energies of 5/6 double mutants tested with halothane and subjected to DMCA are substantial (Fig. 4 B). Q320A/A326V, S325A/A326V, S325A/A417V, and A326V/Y419A yield 2.8, 2.6, 2.8, and 4.3 kcal/mol, respectively, and A326V/A417V, which virtually eliminates the inhibition by halothane, has an even larger coupling energy ($\gg 4$ kcal/mol). Moreover, as found for 1-BuOH, $\Delta\Delta G$ and n_H are highly correlated (Fig. 4 C). In general, the results obtained with halothane corroborate the significance of residues in the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment as important players in the interaction of K-Shaw2 with general anesthetics.

Interplay between voltage-dependent gating and general anesthetic action

The S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment play critical roles in the electrochemical coupling that underlies voltage-dependent gating (16–18). To assess whether the effects of mutations on the inhibition by 1-BuOH and halothane are

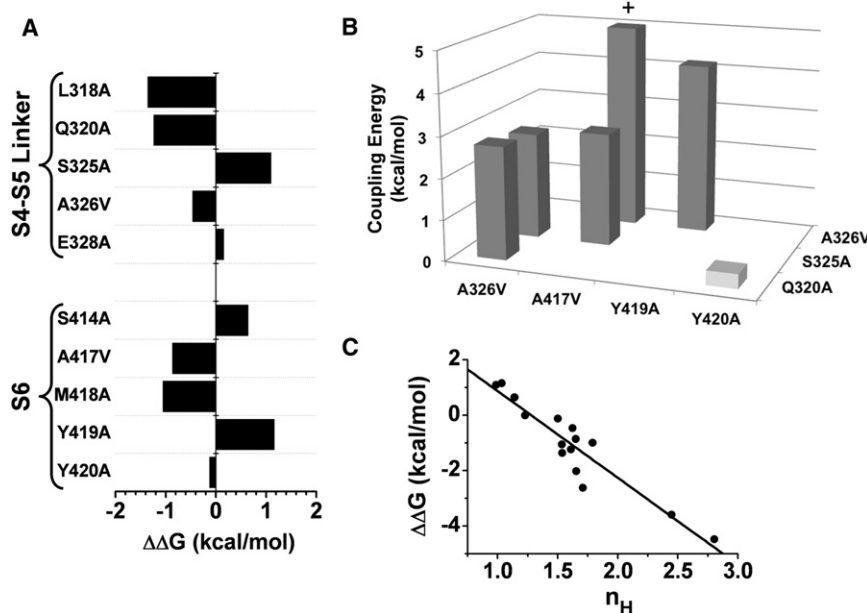


FIGURE 4 Energetic impact of Ala/Val mutations on the modulation of K-Shaw2 by halothane. (A) Apparent free-energy changes induced by single S4-S5 and S6 mutations (see legend to Fig. 3 for additional information). (B) Absolute coupling energies for double K-Shaw2 mutants (see legend to Fig. 3). The + sign above the tallest bar indicates that the coupling energy is estimated to be $\gg 5$ kcal/mol. (C) Scatter plot of $\Delta\Delta G$ versus n_H . The line is the best-fit linear regression ($R^2 = 0.87$).

byproducts of possible gating effects, we measured the shift in activation voltage (ΔV), time to 50% activation ($T_{0.5}$), and degree of inactivation at the end of a 400-ms pulse to +70 mV (I_{400}/I_{peak} ; Supporting Material and Table S4). If anesthetics preferentially interact with resting/closed K-Shaw2 channels, the energetics of anesthetic action would be proportional to the relative stability of the closed conformation(s). Accordingly, some mutants (E328A, L329A, A417V, Q320A/A326V, and Q320A/A417V) exhibit relatively large leftward shifts (>5 mV) in voltage-dependent activation (i.e., a relative destabilization of closed states) and corresponding positive $\Delta\Delta G$ values (>1 kcal/mol) calculated from experiments at a fixed voltage that most likely does not saturate the open probability (Supporting Material and Table S4).

These results suggest that any other mutation(s) whose main effect would be to shift voltage-dependent gating might also secondarily affect anesthetic action in other Kv channels, and the inhibition by the anesthetics might exhibit state dependence. To test these premises, we exploited the triple ILT mutation (V369I, I372L, and S376T) in the voltage sensor of ShakerB channels, which confers a depolarized K-Shaw2-like activation phenotype (26). Relative to the wild-type counterpart, the activation curve of the ShakerB-ILT mutant exhibits a dramatic rightward shift of +123 mV, demonstrating a strong relative stabilization of the channel's closed state(s) (Fig. S3 A). Despite this large change, the ShakerB-ILT mutant is resistant to 1-BuOH ($K_{0.5} = 47$ mM, $n_H = 1.4$; Fig. S3 C) when tested at a strongly depolarized voltage (+100 mV) corresponding to ~50% activation. Testing it at less depolarized voltages (+70 to +80) modestly increases the inhibition to a maximum of ~70% at 50 mM 1-BuOH (Fig. S3 B). Interest-

ingly, ShakerB wild-type yields similar anesthetic resistance ($K_{0.5} = 57$ mM, $n_H = 1.5$; Fig. S3 C) and state-dependent inhibition despite its normal voltage dependence (Fig. S4 A). Thus, the inhibition is maximal at voltages where channels may populate closed-activated states, and becomes weaker as the open state becomes progressively more represented. Nevertheless, the maximal inhibition of mutant and wild-type ShakerB channels does not match that of K-Shaw2, which is also state-dependent but nearly complete (96%) at 50 mM 1-BuOH and over a voltage range where the inhibition increases to a maximum and levels off (Fig. 2 and Fig. S4 C).

In the light of these results, we made two additional predictions: First, the converse triple VIS mutation (I302V, L304I, and T308S) in K-Shaw2 (K-Shaw2-VIS) may exhibit left-shifted voltage-dependent activation and a concomitant decrease in the apparent anesthetic affinity. Accordingly, voltage-dependent activation of the K-Shaw2-VIS mutant is somewhat leftward shifted ($\Delta V = -20$ mV) and is slightly less sensitive to 1-BuOH than the wild-type counterpart ($K_{0.5} = 19$ mM, $n_H = 1.5$; Fig. S3 C). Second, the nongated K-Shaw2 P410D mutant may become insensitive to general anesthetics. This mutation targets the second P in the PVP motif, rendering K-Shaw2 constitutively open (27). Thus, the current-voltage relation of K-Shaw2 P410D is approximately linear and displays a reversal potential consistent with a conductance highly selective for K⁺ (Fig. 5, A and B). Moreover, as an extreme example of state-dependent inhibition, the P410D mutant is highly resistant to general anesthetics (Fig. 5 C). Relative to wild-type K-Shaw2, P410D is 22 times less sensitive to 1-BuOH ($K_{0.5} = 250$ mM) and 23 times less sensitive to halothane ($K_{0.5} = 6.1$ mM). This result also confirms

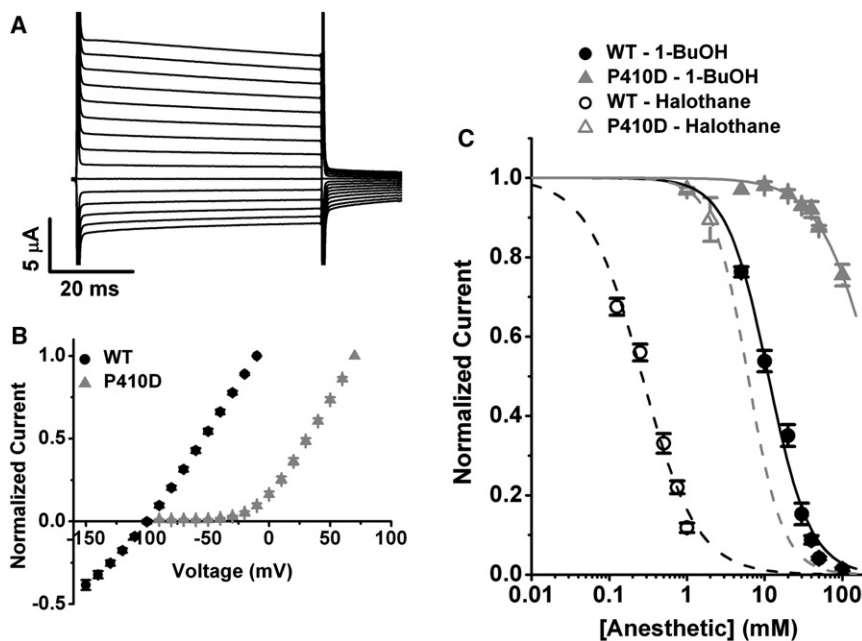


FIGURE 5 General anesthetic action on the constitutively open K-Shaw2 P410D mutant channel. (A) P410D currents evoked from a holding voltage of -100 mV by voltage steps ranging from -150 to 0 mV at 10 -mV intervals. (B) Comparison of normalized current-voltage relations from wild-type and the P410D mutant. The current of the constitutively open P410D mutant reverses polarity at -98 mV, as expected for a K⁺-selective Kv channel. (C) Comparison of the 1-BuOH and halothane dose-inhibition plots from wild-type and the P410D mutant. For the P410D mutant, the dashed and solid gray lines are the best Hill equation fits with the following parameters for 1-BuOH: $K_{0.5} = 250$ mM, $n_H = 1.2$; and the following best-fit parameters for halothane: $K_{0.5} = 6.1$ mM, $n_H = 1.9$. Wild-type data are replotted from Fig. 2.

previous conclusions that general anesthetics do not significantly affect the properties of the open state at the unitary level (9).

Although the examples described above clearly link voltage-dependent gating to the modulation of K-Shaw2 by general anesthetics, there is no systematic general correlation between the energetic impact of all Ala/Val mutations and the gating properties of the K-Shaw2 channel (Fig. S1 and Table S4). Only in a few of the cases mentioned above (~15% of mutants) did this correlation become apparent. In a larger number of cases (45%), activation gating changes are not associated with significant changes in the energetic impact of the mutations, and in some others the effects are inversely related (T321V, Q320A/Y420A, A326V/A417V, and A326V/Y419A). Thus, mutations that affect gating may also affect anesthetic action because the inhibition is gating-state-dependent; however, the lack of a general relationship suggests that many mutations in the investigated regions primarily influence binding and/or effector sites of general anesthetics in K-Shaw2.

Modeling the K-Shaw2 structures in the open and closed states

To investigate putative general anesthetic binding sites at the atomic level, we first created full-atomistic structural models for the transmembrane domain (TM) of K-Shaw2 by means of comparative protein modeling (28). Models of the resting-closed and activated-open states of K-Shaw2 were based on previously reported modeling of the homologous ShakerB-like Kv1.2 channel (Supporting Material). The K-Shaw2 models were equilibrated in a fully hydrated phospholipid membrane by an ~18 ns MD simulation. In each of the channel subunits in the tetrameric channel, the TM remained stable in its starting resting-closed or activated-open conformations throughout the simulations (Fig. S5). In the MD run, the root mean-square deviation values for the whole TM domain, as well as for segments S1–S6 and the S4–S5 linker, range from 1.0 to 3.0 Å (Fig. S6), which agrees with the structural drift quantified in previous simulation studies of KcsA (29) and other K⁺ channels (30,31). The good stereochemical quality of the relaxed K-Shaw2 structures was confirmed by further Procheck analyses (32).

In silico docking of 1-BuOH and halothane onto K-Shaw2

Whereas the resting closed state of K-Shaw2 is preferentially sensitive to general anesthetics (see above), Kv1.2 is resistant. High anesthetic doses (50 mM 1-BuOH or 2 mM halothane) inhibit this channel by ≤20% (data not shown). We exploited these differences to identify likely general anesthetic cavities in membrane-equilibrated atomistic models of K-Shaw2 (closed and open) and Kv1.2

(closed). We subjected each isoform and conformation to in silico docking by probing the binding of both 1-BuOH and halothane to 10 equilibrium structures to account for the influence of molecular flexibility on ligand binding (Supporting Material). Then, we used a subtraction method to resolve unique 1-BuOH and halothane docking sites on the K-Shaw2 closed structure (Supporting Material). To carry out this strategy, we first estimated the effective molecular binding constant (B_i) of the ligand for a given binding site i on the receptor structures. We computed B_i as the ligand energy-weighted binding probability by considering the entire space of docking solutions. We then compared the affinity of the ligand for a given site on the K-Shaw2 closed conformation with that of the K-Shaw2 open conformation and the Kv1.2 closed conformation by quantifying the difference between the effective molecular binding constants:

$$\Delta B_i = B_i(\text{Shaw}_{\text{closed}}) - B_i(j) \text{ for } j = \{\text{Shaw}_{\text{open}}, \text{Kv1.2}_{\text{closed}}\}.$$

The in silico docking analyses revealed that 1-BuOH binds to K-Shaw2 (closed and open) and Kv1.2 (closed) at multiple sites with a diverse range of binding affinities (Fig. S7). Specifically, 1-BuOH binds to eight distinct locations on the K-Shaw2 closed structure (hereafter called sites 1–8). The calculation also shows that 1-BuOH binds to the K-Shaw2 open conformation through all of these sites except site 3. Despite a similar pattern for the interaction with the channel in both conformations, 1-BuOH interacts with the closed K-Shaw2 conformation with enhanced affinities in sites 3, 4, 6, and 8. Compared with the Kv1.2 closed structure, sites 3, 6, and 8 in the closed K-Shaw2 channel also exhibit higher affinity. Further docking calculations demonstrate that halothane binding sites on the K-Shaw2 closed structure overlap with all sites determined for 1-BuOH but site 6 (Fig. 6). The subtraction analysis identified sites 2, 3, and 5 as possible halothane interaction spots in the closed K-Shaw2 conformation. Compared with K-Shaw2 (open) and Kv1.2 (closed), these sites display enhanced affinities.

Although they are structurally heterogeneous, the identified sites are cavities located at the interfacial region between helical segments of the channel, i.e., the S4–S5 linker, S5, and S6. For a cutoff distance of ≤4.6 Å, Table 1 highlights the amino acid side chains of K-Shaw2 that may interact with the anesthetics at these sites. Sites 3, 5, and 8 are delineated by hydrophobic amino acids, whereas sites 2 and 6 are predominantly hydrophilic. Overall, whereas K-Shaw2 inhibition by 1-BuOH implicates sites 3, 6, and 8, the inhibition of the channel by halothane implicates sites 2, 3, and 5. Thus, the intersubunit site 3 emerges as a putative unique binding site for the interaction of 1-BuOH and halothane with K-Shaw2 (Fig. 7). In this site, the residue side chains in close proximity to the anesthetic

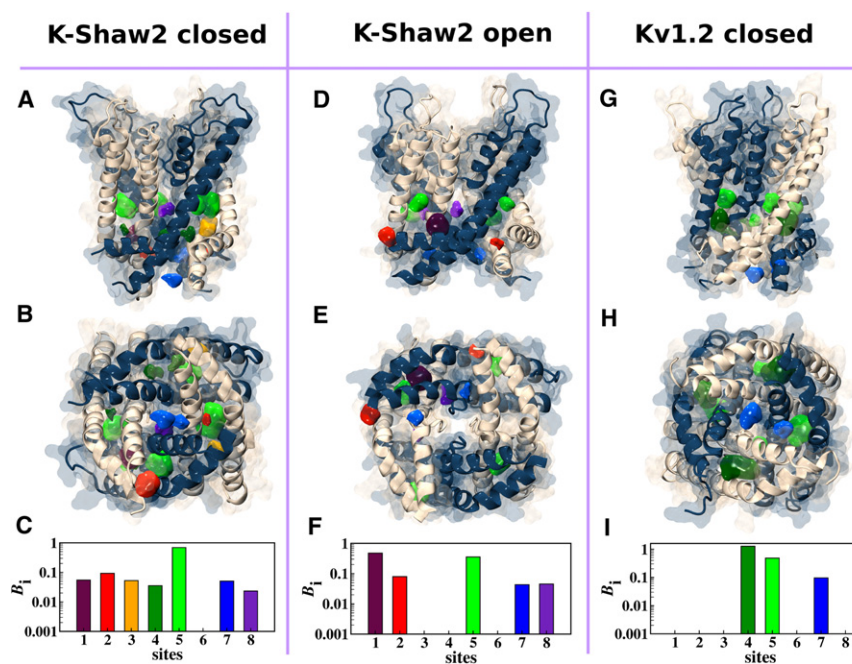


FIGURE 6 In silico docking of halothane to K-Shaw2 (closed and open conformations) and Kv1.2 (closed). Shown are lateral (A) and bottom (B) views of K-Shaw2 in the closed conformation (S4-S5 linker through the S6 segment). In silico docking solutions returned eight possible sites (sites 1–8; Supporting Material). Colored blobs represent the computed density isosurface of the ligand on a given receptor site. (C) Calculated ligand-binding constants (B_i) for sites 1–8 (Supporting Material). (D–F) *Idem* for the open conformation of K-Shaw2. (G–I) *Idem* for the closed conformation of Kv1.2. $B_i = 0$ indicates that the ligand has no affinity for the site.

molecule (Table S5) do not correspond to those of high-impact Ala/Val mutations (Figs. 3 and 4; Table 1). The residue side chains lining site 3 are L315, L318, I319, and F322 in the S4-S5 linker from the same subunit, whereas L331, L332, F335 (in S5), and L407 (in S6) are from a neighboring subunit. These results suggest that Ala/Val mutations in the regions of interest may not primarily perturb physical contacts, and highlight the importance of allosteric interactions involving distinct binding and effector sites in the mechanism that governs the inhibition of K-Shaw2 by general anesthetics.

DISCUSSION

To gain insights into the structural basis of general anesthetic action on voltage-gated ion channels, we investigated K-Shaw2, a unique Kv channel that displays inhibition by n-alcohols and inhaled anesthetics at clinically relevant concentrations. Our results support the notion of distinct but contiguous binding and effector sites implicating components of the channel's activation gate. The following discussion highlights the mechanistic implications of the our results.

Cooperative modulation of K-Shaw2 by general anesthetics

Although the inhibition of wild-type K-Shaw2 by n-alcohols and halothane is weakly cooperative ($n_H = 1.2$ – 1.6), the investigated mutations not only change the $K_{0.5}$, they systematically change n_H (Figs. 2–4; Table S2 and Table S3). Compared with the wild-type, some mutations lower the

n_H (0.8) and others increase it ($n_H = 2$ – 4). In some extreme cases, such as A326V/A417V and A326V/Y419A, an apparent association between large n_H and large $K_{0.5}$ suggests that higher multiple-site occupancy is needed to achieve inhibition when the apparent affinity of the anesthetic sites is very low. Cooperativity is expected because Kv channels are tetrameric and therefore have four possible binding interfaces that may interact allosterically. The general systematic correlations between $\Delta\Delta G$ and n_H for both 1-BuOH and halothane (Figs. 3 C and 4 C) suggest that the mutations may mainly influence effector sites allosterically coupled to binding sites. Indicating a reciprocal communication between anesthetic binding and effector sites, the roles of these effector sites are then twofold: 1), regulate cooperative multisite occupancies; and 2), engage in intra- and inter-subunit interactions, which are discouraged or enhanced upon anesthetic binding to modulate gating. The latter emerges from the significant nonadditive energetic impact of several double mutations on the inhibitions of K-Shaw2

TABLE 1 Residues ≤ 4.7 Å from the ligand at selected sites

Ligand	Site	S4-S5 linker	S5	S6
	3	L315 L318 I319 F322	L331 L332 F335	L407
1-Butanol	6	K316 Q320		Y419 T423
	8			V409
	2	I317	K327 E328	V411 S414 N415 F416 Y420
Halothane	3	L315 L318 I319 F322	L332 F335	L407
	5		L332 V333 L336	V402 L403 T404 L407 P408

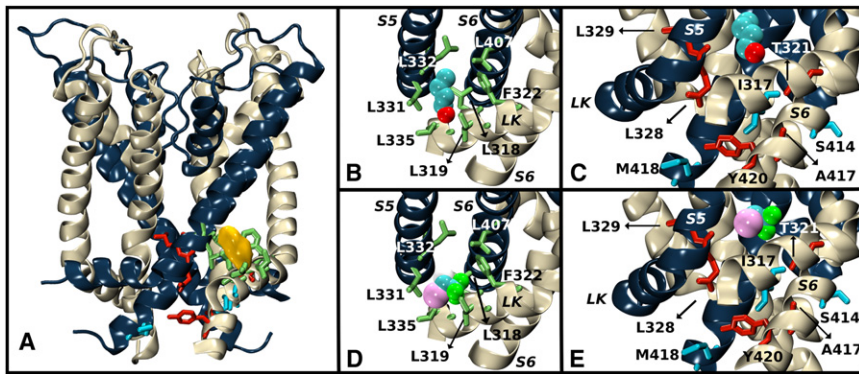


FIGURE 7 Average equilibrium conformation of the K-Shaw2 closed-state structure bound to 1-BuOH and halothane. (A) Side view of K-Shaw2 with backbones colored in navy blue and off-white. The density blob (yellow) depicts 1-BuOH bound to site 3. Residue side chains $< 4.7 \text{ \AA}$ from 1-BuOH are represented as green sticks (Table 1). (B) Close-up view of 1-BuOH in site 3. (C) Close-up view of 1-BuOH effector sites. Red-colored side chains indicate that Ala/Val mutations had an unfavorable energetic impact on the inhibition of K-Shaw2 by 1-BuOH, and blue-colored side chains indicate a favorable energetic impact. (D) As in panel B, but displaying halothane in site 3. (E) As in panel C, but displaying the effects of mutations on the inhibition by halothane.

by 1-BuOH and halothane. Independently of the channel's oligomeric structure, whether this cooperativity may instead or additionally result from local rearrangements within the binding cavity remains to be investigated.

Colocalization of gating and general anesthetic sites in K-Shaw2

The canonical mechanism of voltage-dependent activation gating in cation channels involves electromechanical coupling between the movement of voltage sensors and opening of the S6 bundle crossing that constitutes the main internal activation gate (16–18,33–36). This coupling is made possible by the S4-S5 linkers, which interact with the distal intracellular portion of the S6 segments. Accordingly, it is not surprising that gating alterations may result from mutations in these regions (Fig. S1 and Table S4). Also, because general anesthetic action on K-Shaw2 is gating-state-dependent, perturbations (mutations or voltage) that destabilize the resting/closed states or strongly favor the open state would be predicted to have a negative impact on anesthetic action. We found several clear examples of these predictions (see Results). Interestingly, however, we also found several instances in which the mutations had a significant energetic impact on the inhibition by 1-BuOH and halothane, but had no major effect on voltage-dependent gating, such as S325A, S414A, Y420A, and A326V/Y420A (Table S4). The lack of a systematic general correlation between gating effects and the energetic impact on anesthetic action indicates that a subset of mutations mainly disrupt anesthetic effector sites. Our results are thus consistent with the coexistence of gating and anesthetic sites in the S4-S5 linker and the post-PVP S6 segment of K-Shaw2.

The constitutively open K-Shaw2 P410D mutant yielded one of the most striking results because it is essentially insensitive to the tested general anesthetics. We propose that the conformational change that underlies the opening of the activation gate dramatically rearranges the structure of the anesthetic binding sites. This idea is supported by *in silico* docking experiments demonstrating that the

preferred site (site 3) has very low affinity in the open state of K-Shaw2 and is therefore virtually absent (Fig. 6 and Fig. S7). These interpretations are in line with the notion of a relatively large conformational change underlying the opening of the internal activation gate upon voltage-dependent activation in Kv channels (37).

Structural correlates of general anesthetic action in K-Shaw2

The K-Shaw2 S4-S5 linker presents major primary-sequence variations compared with the homologous region in related Kv channels. For instance, residues I319, F322, and A326 are not found in general anesthetic-resistant Kv channels. Interestingly, the side chains of hydrophobic residues I319 and F322 are modeled in close proximity ($\leq 4.6 \text{ \AA}$) to halothane in site 3 (Fig. 7), the preferred consensus site of anesthetic action in K-Shaw2. L315, L318 (S4-S5 linker), L332, F335 (S5), and L407 (S6) are also in close proximity to halothane but are better conserved across Kv channel subfamilies. Given the predicted architecture of site 3, how can we reconcile the thermodynamic map of individual mutations with the predicted locations of the implicated side chains? Generally, the $\Delta\Delta G$ of individual Ala/Val mutations in S4-S5 and S6 is small or modest (Figs. 3 and 4). The recently published crystal structures of a ligand-gated ion channel bound to propofol or desflurane provides possible answers (6). The authors suggested that the mobility of propofol in its pocket may explain discrepancies between side-chain positions and the effects of the respective mutations on the inhibitory action of the anesthetics. A previous study also showed this fluidity in the hydrophobic general anesthetic binding site of apoferritin (5). This explanation is plausible because typically, binding of general anesthetics to proteins is weakly constrained by specific structural features (1,4). In response to modest mutational perturbations, a general anesthetic may adopt an alternative low-energy state in the protein pocket. Therefore, a single Ala/Val mutation may not be disruptive enough to affect the binding of halothane and 1-BuOH to

K-Shaw2, as the ligand may move to establish new non-specific contacts with the protein backbone and/or membrane phospholipids to facilitate stable binding (38). In future work, investigators should validate this model by investigating the disruption of anesthetic effects by systematic perturbations of residues in binding site 3.

Residues in the effector sites that determine the stability of the closed state through more-specific interactions are, however, more sensitive to mutations. Residues in this category are Q320, T321, S325, A326, E328, L329, A417, M418, Y419, and Y420. The correlation between the n_H and the energetic impact of all mutations and the relatively large coupling energies between a subset of residue pairs indicate that K-Shaw2 effector residues influence binding cooperativity and dictate anesthetic action more strongly than those predicted to be in closer proximity to the anesthetic molecule in the hydrophobic cavity. The double mutant A326V/A417V is an interesting example of stringent interactions controlling gating at effector sites, because although the substitutions are mild, the sensitivity of the double mutant to the anesthetics is nearly eliminated.

Relation to other studies

Several earlier studies focused on the interactions between general anesthetics and archetypical eukaryotic Kv channels expressed heterologously, and demonstrated interesting modulations occurring at relatively high doses (38–41). We found that ShakerB and Kv1.2 channels are inhibited $\leq 10\%$ by relatively high doses of halothane (1–2 mM), and their 1-BuOH $K_{0.5}$ -values are 50 and 120 mM, respectively (data not shown). Thus, these Kv channels are considered general-anesthetic-resistant. In a recent study, Finol-Urdaneta et al. (42) reconstituted the prokaryotic Kv channel (KvAP) in planar lipid bilayers and investigated the modulation of this channel by surface-active substances (including general anesthetics). The authors observed interesting inhibitory modulations and proposed that, depending on the conformational susceptibility of ion channels, a mechanism of general anesthetic action may involve nonspecific membrane effects (e.g., changes in surface tension and phospholipid packing). We did not test these possibilities in our experiments; however, our results do not rule them out. Given the S4-S5 linker's interfacial location at the membrane, it may help transduce lipid bilayer-mediated effects of general anesthetics. Further work is necessary to test this hypothesis.

Generally, the K-Shaw2 mechanism of anesthetic action agrees well with recently reported high-resolution crystallographic observations directly demonstrating the binding of propofol and desflurane to a discrete site in a prokaryotic H⁺-gated ion channel (GLIC) homologous to eukaryotic Cys-loop receptors (6). Here, the anesthetic cavity involves an interface between helical segments of the channel protein in a region that plays a critical role in gating. This cavity can

accommodate either propofol or desflurane, but the binding determinants are distinct and the anesthetics exhibit significant mobility when occupying the site. As proposed for K-Shaw2, general anesthetics also stabilize the closed state of GLIC and a subset of related ligand-gated ion channels.

CONCLUSIONS

We conclude that helical regions of the S4-S5 linker and the S5 and S6 segments of K-Shaw2 form inter- and intrasubunit interfaces that delineate a putative general anesthetic binding pocket/cavity. In this cavity, the side chains of hydrophobic residues surround the anesthetic molecule, and neighboring side chains in the activation gate are allosterically coupled to general anesthetic partitioning into the hydrophobic cavity to ultimately modulate the stability of the closed state. The general structural features of the modeled cavity (inter- and intrasubunit helical regions and a hydrophobic interior) are consistent with those found by crystallographic methods in other proteins exhibiting relevant general anesthetic-binding sites (5,6). We hypothesize that the regions identified in the K-Shaw2 channels may also contribute to general anesthetic action in voltage-gated Na⁺, Ca²⁺, and nonselective cation channels (19–25). Gating of these channels is also essentially dependent on the interaction between the S4-S5 linkers and the S6 segments (16–18,33–36).

SUPPORTING MATERIAL

Experimental details about the Ala/Val scanning mutagenesis, heterologous expression, electrophysiology, MD simulations, and in silico docking, and five tables and seven figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(11\)00972-6](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(11)00972-6).

We thank Mr. Brian Urbani for technical support, and Dr. Qing Meng (from the Eckenhoff laboratory) for HPLC work. We also thank Dr. Rod Eckenhoff for critically reading the preliminary manuscript.

This study was supported by the National Institutes of Health (research grant R01 AA010615 to M.C., and training grant T32 AA007463 to A.F.B.), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (141009/2009-8 to W.T.).

REFERENCES

1. Eckenhoff, R. G., and J. S. Johansson. 1997. Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacol. Rev.* 49: 343–367.
2. Franks, N. P. 2008. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:370–386.
3. Hemmings, Jr., H. C., M. H. Akabas, P. A. Goldstein, J. R. Trudell, B. A. Orser, and N. L. Harrison. 2005. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:503–510.
4. Urban, B. W. 2008. The site of anesthetic action. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–29.
5. Vedula, L. S., G. Brannigan, N. J. Economou, J. Xi, M. A. Hall, R. Liu, M. J. Rossi, W. P. Dailey, K. C. Grasty, M. L. Klein, R. G. Eckenhoff,

- and P. J. Loll. 2009. A unitary anesthetic-binding site at high resolution. *J. Biol. Chem.* 36:24176–24184.
6. Nury, H., R. C. Van, Y. Weng, A. Tran, M. Baaden, V. Dufresne, J. P. Changeux, J. M. Sonner, M. Delarue, and P. J. Corringer. 2011. X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature.* 469:428–431.
 7. Bhattacharji, A., N. Klett, R. C. Go, and M. Covarrubias. 2010. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *Br. J. Pharmacol.* 159:1475–1485.
 8. Covarrubias, M., and E. Rubin. 1993. Ethanol selectively blocks a non-inactivating K^+ current expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6957–6960.
 9. Covarrubias, M., T. B. Vyas, ..., A. Wei. 1995. Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. Insights into the molecular basis of general anesthesia. *J. Biol. Chem.* 270:19408–19416.
 10. Eckenhoff, R. G., J. Xi, M. Shimaoka, A. Bhattacharji, M. Covarrubias, and W. P. Dailey. 2010. Azi-isoflurane, a photolabel analog of the commonly used inhaled general anesthetic isoflurane. *ACS Chem. Neurosci.* 1:139–145.
 11. Shahidullah, M., T. Harris, M. W. Germann, and M. Covarrubias. 2003. Molecular features of an alcohol binding site in a neuronal potassium channel. *Biochemistry.* 42:11243–11252.
 12. Bhattacharji, A., B. Kaplan, T. Harris, X. Qu, M. W. Germann, and M. Covarrubias. 2006. The concerted contribution of the S4–S5 linker and the S6 segment to the modulation of a Kv channel by 1-alkanols. *Mol. Pharmacol.* 70:1542–1554.
 13. Covarrubias, M., A. Bhattacharji, ..., M. W. Germann. 2005. Alcohol and anesthetic action at the gate of a voltage-dependent K^+ channel. In *Basic and Systemic Mechanisms of Anesthesia*. T. Mashimo, K. Ogli, and I. Uchida, editors. Elsevier B.V., Amsterdam. 55–60.
 14. Harris, T., M. Shahidullah, J. S. Ellingson, and M. Covarrubias. 2000. General anesthetic action at an internal protein site involving the S4–S5 cytoplasmic loop of a neuronal K^+ channel. *J. Biol. Chem.* 275:4928–4936.
 15. Harris, T., A. R. Graber, and M. Covarrubias. 2003. Allosteric modulation of a neuronal K^+ channel by 1-alkanols is linked to a key residue in the activation gate. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285:C788–C796.
 16. Lee, S. Y., A. Banerjee, and R. MacKinnon. 2009. Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K^+ channels. *PLoS. Biol.* 7:e47.
 17. Long, S. B., E. B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science.* 309:903–908.
 18. Lu, Z., A. M. Klem, and Y. Ramu. 2002. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K^+ channels. *J. Gen. Physiol.* 120:663–676.
 19. Cacheaux, L. P., N. Topf, G. R. Tibbs, U. R. Schaefer, R. Levi, N. L. Harrison, G. W. Abbott, and P. A. Goldstein. 2005. Impairment of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel function by the intravenous general anesthetic propofol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315:517–525.
 20. Chen, X., J. E. Sirois, Q. Lei, E. M. Talley, C. Lynch, III, and D. A. Bayliss. 2005. HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J. Neurosci.* 25:5803–5814.
 21. Herrington, J., R. C. Stern, A. S. Evers, and C. J. Lingle. 1991. Halothane inhibits two components of calcium current in clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurosci.* 11:2226–2240.
 22. Horishita, T., and R. A. Harris. 2008. n-Alcohols inhibit voltage-gated Na^+ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326:270–277.
 23. Ouyang, W., and H. C. Hemmings, Jr. 2007. Isoform-selective effects of isoflurane on voltage-gated Na^+ channels. *Anesthesiology.* 107: 91–98.
 24. Ouyang, W., T. Y. Jih, T. T. Zhang, A. M. Correa, and H. C. Hemmings, Jr. 2007. Isoflurane inhibits NaChBac, a prokaryotic voltage-gated sodium channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322:1076–1083.
 25. Ratnakumari, L., and H. C. Hemmings, Jr. 1998. Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane. *Anesthesiology.* 88:1043–1054.
 26. Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, and R. W. Aldrich. 1998. Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 111:421–439.
 27. Sukhareva, M., D. H. Hackos, and K. J. Swartz. 2003. Constitutive activation of the shaker Kv channel. *J. Gen. Physiol.* 122:541–556.
 28. Zhang, Y., and J. Skolnick. 2005. The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:1029–1034.
 29. Shrivastava, I. H., and M. S. Sansom. 2000. Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. *Biophys. J.* 78:557–570.
 30. Jogini, V., and B. Roux. 2007. Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K^+ channel in a membrane environment. *Biophys. J.* 93:3070–3082.
 31. Treptow, W., and M. Tarek. 2006. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 90:L64–L66.
 32. Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein, and J. M. Thornton. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR.* 8:477–486, PM:9008363.
 33. Catterall, W. A. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron.* 67:915–928.
 34. Chen, J., J. S. Mitcheson, M. Tristani-Firouzi, M. Lin, and M. C. Sanguinetti. 2001. The S4–S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:11277–11282.
 35. Labro, A. J., A. L. Raes, A. Grottesi, D. Van Hoorick, M. S. Sansom, and D. J. Snyders. 2008. Kv channel gating requires a compatible S4–S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues. *J. Gen. Physiol.* 132:667–680.
 36. Prole, D. L., and G. Yellen. 2006. Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4–S5 linker and Post-S6. *J. Gen. Physiol.* 128:273–282.
 37. Liu, Y., M. Holmgren, ..., G. Yellen. 1997. Gated access to the pore of a voltage-dependent K^+ channel. *Neuron.* 19:175–184.
 38. Li, J., and A. M. Correa. 2001. Single-channel basis for conductance increase induced by isoflurane in Shaker H4 IR K^+ channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280:C1130–C1139.
 39. Correa, A. M. 1998. Gating kinetics of Shaker K^+ channels are differentially modified by general anesthetics. *Am. J. Physiol.* 275:C1009–C1021.
 40. Friederich, P., D. Benzenberg, ..., B. W. Urban. 2001. Interaction of volatile anesthetics with human Kv channels in relation to clinical concentrations. *Anesthesiology.* 95:954–958.
 41. Li, J., and A. M. Correa. 2002. Kinetic modulation of HERG potassium channels by the volatile anesthetic halothane. *Anesthesiology.* 97: 921–930.
 42. Finol-Urdaneta, R. K., J. R. McArthur, P. F. Juranka, R. J. French, and C. E. Morris. 2010. Modulation of KvAP unitary conductance and gating by 1-alkanols and other surface active agents. *Biophys. J.* 98:762–772.

SUPPORTING MATERIAL

Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel

Annika F. Barber, Qiansheng Liang, Cristiano Amaral, Werner Treptow &
Manuel Covarrubias

MATERIALS AND METHODS

Molecular biology and site-directed mutagenesis

The K-Shaw2-F335A was used as the “wild-type” background. This mutant is advantageous because it expresses currents that are much larger than the true wild-type and exhibits only slightly enhanced sensitivity to n-alcohols. All cDNAs encoding the investigated Kv channels were maintained as previously reported (4) and site-directed mutagenesis (Ala/Val scanning) was conducted according to the QuickChange protocol (Stratagene, La Jolla, CA). When a position was occupied by Ala in the wild-type K-Shaw2, the residue was mutated to Val; and, in some instances, Thr was mutated to Val, when the Ala mutation failed to express. All mutations were verified by automated DNA sequencing (Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University).

Reagents

Immediately before the experiments, HPLC grade 1-BuOH (Fisher Scientific, Hampton, NH) and halothane (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ) were diluted to the desired final concentrations. As previously described, halothane was prepared and diluted using gastight methods to prevent loss of the volatile compound (2). Halothane concentrations in solutions and perfusates were determined by HPLC. The loss of halothane in our system was <5%. Halothane is stabilized by addition of 0.1% thymol, which did not affect K-Shaw2 currents at concentrations as high as 1 mM.

Heterologous expression

Care and surgery of *Xenopus laevis* frogs was performed according to a protocol approved by the Thomas Jefferson University IACUC. As described previously (4, 8, 9), the heterologous expression of wild-type and mutant K-Shaw2 channels in *Xenopus* oocytes was achieved by microinjection of in vitro transcribed mRNA (mMessage mMachin kit, Ambion, Austin, TX). Typically, currents were investigated 12-48 h post-microinjection. K-Shaw2-F335A begins to express 6-12 h post-microinjection.

Electrophysiology

Whole-oocyte currents were recorded at room temperature (21-23°C) under two-electrode voltage-clamp conditions. Data acquisition, leak subtraction and initial analysis were performed using pClamp 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Macroscopic currents were low-pass filtered at 0.5-1 kHz and digitized at 1-2 kHz. Leak current was subtracted offline assuming a linear leak over the voltage range investigated.

As reported previously, a gravity-driven perfusion system with syringes containing various doses of 1-BuOH was used to deliver the anesthetic into the recording chamber (1, 2, 8, 9). The valve system was controlled manually to sequentially expose a single oocyte to various doses of the

anesthetic (Fig. 2). To test the anesthetics, the currents were evoked at intervals of 4.6 s by 400-ms depolarizations to +60mV from a holding potential of -100 mV. Only after establishing a reproducible and stable current response during the perfusion of bath solution, the oocyte in the recording chamber was exposed to the anesthetic; and, to ensure equilibrium, the next dose was delivered only after a new baseline was established. After all doses were applied, the chamber was washed out with control bath solution to test the reversibility of the cumulative response. Identical results were observed when the application of each dose was followed by a washout period. To construct the halothane dose-response curve, the plunger of a single Hamilton gas-tight syringe containing a dose of the anesthetic was controlled manually. It was therefore not possible to apply multiple doses of halothane to the same oocytes. Consequently, in all instances, each dose was measured with multiple oocytes. Then, the results from different doses were combined to construct the dose-response curve, which was characterized as described below.

Data analysis

Curve fitting and statistics. Data analysis, curve fitting, plotting and statistical testing were performed in Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA). Unless otherwise indicated, all results are reported as mean \pm SEM; and one-way ANOVA was used to evaluate statistical significances of apparent differences. Table S1 provides a summary of symbols used in the manuscript.

Table S1: Summary of Symbols	
Symbol	Definition
$K_{0.5}$	Concentration of drug that causes 50% inhibition (i.e., IC_{50})
n_H	Hill coefficient (cooperativity index)
K	Aggregate equilibrium dissociation constant = $K_{0.5}^{n_H}$
ΔG	Apparent free energy change = $n_H RT \ln K_{0.5}$
$\Delta\Delta G$	The energetic impact of the mutations = $\Delta G_{MUT} - \Delta G_{WT}$
Ω	The coupling coefficient = $(K_{WT} \times K_{DM}) / (K_{M1} \times K_{M2})$. If the energetic effect of the combined mutations is additive (not coupled), $\Omega=1$.
E_a	Coupling energy = $RT \ln(\Omega)$
B_i	Effective molecular binding constant from AutoDock calculations for each binding site (<i>i</i>) (See Supporting Material pages 5-6)

$K_{0.5}$, n_H , K , ΔG and $\Delta\Delta G$ were each independently calculated for individual oocytes and errors were determined for averages of these independent values. Standard error for Ω and E_a were calculated assuming linear propagation.

Dose-response curves and energetics. Dose-response curves were characterized as previously described (2). Briefly, normalized dose-inhibition curves were empirically described by assuming this form of the Hill equation:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{K_{0.5}}\right)^{n_H}}$$

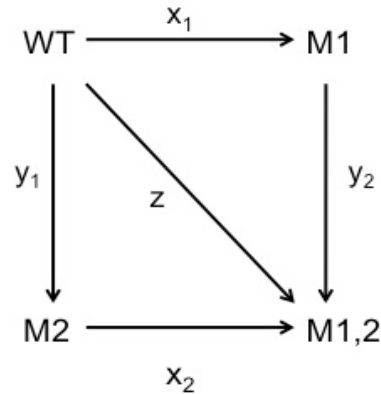
where I is the inhibited current, I_0 is the control current and x is the anesthetic concentration. The best-fit to this equation returned the $K_{0.5}$ and n_H (Table S1). The aggregate equilibrium dissociation constant was calculated as $K = K_{0.5}^{n_H}$, all calculations were performed with molar units.

The apparent free energy change was calculated as $\Delta G = n_H RT \ln K_{0.5}$, and the energetic impact of the mutations ($\Delta\Delta G$) was calculated as $\Delta\Delta G = \Delta G_{MUT} - \Delta G_{WT}$. The standard error for $\Delta\Delta G$ was propagated according to the equation:

$$\alpha_{\Delta\Delta G} = \sqrt{\alpha_{\Delta G_{WT}}^2 + \alpha_{\Delta G_{Mut}}^2}$$

Hill equation fitting was performed for each individual oocyte in response to 1-BuOH, yielding independent measurements of $K_{0.5}$, n_H , aggregate K , ΔG and $\Delta\Delta G$ for each oocyte.

Double mutant cycle analysis (DMCA) was conducted to assess the additivity of free energy changes according to the scheme depicted below (3, 11, 23, 24).



Here, $\frac{x_1}{x_2} = \frac{y_1}{y_2}$, which in terms of the measured parameters (aggregate K) defines the coupling coefficient Ω as

$$\Omega = \frac{K_{WT} \times K_{DM}}{K_{M1} \times K_{M2}}$$

Thus, if the energetic effect of the mutations is additive, $\Omega=1$. The standard error of Ω (α_Ω) was calculated assuming linear error propagation according to the following equation:

$$\alpha_\Omega = \Omega \sqrt{\left(\frac{\alpha_{Dbl}}{K_{Dbl}}\right)^2 + \left(\frac{\alpha_{WT}}{K_{WT}}\right)^2 + \left(\frac{\alpha_{Mut1}}{K_{Mut1}}\right)^2 + \left(\frac{\alpha_{Mut2}}{K_{Mut2}}\right)^2}$$

Then, the coupling energy (E_{α}) was calculated as $RT\ln(\Omega)$, and the corresponding errors were propagated as:

$$\alpha(E_{\Omega}) = \frac{\alpha_{\Omega}}{\Omega}$$

Estimation of gating parameters. To characterize possible effects on channel gating, three empirical parameters were estimated for each mutant. The degree of inactivation was determined by evaluating $I_{\text{peak}}/I_{400\text{ms}}$ for each current record at +70 mV; where I_{peak} is the peak current and $I_{400\text{ms}}$ is the current amplitude at $t = 400$ ms of the depolarizing step. Changes in the rate of activation were determined by calculating the $T_{0.5}$ at +70 mV for each current record, the time at which the current reached half-maximum. In some cases, however, activation was nearly instantaneous. K-Shaw2 has a very low open probability (P_o) and weak voltage dependence. Consequently, maximum P_o cannot be attained within an achievable voltage range in oocytes (19, 20). This limitation prohibits construction of traditional conductance-voltage (G-V) curves and accurate estimation of the best-fit Boltzmann function to derive the activation parameters ($V_{1/2}$ and z , midpoint voltage and equivalent gating charge, respectively). Thus, in lieu of changes in activation $V_{1/2}$, an empirical ΔV was obtained from normalized current-voltage plots to characterize shifts in voltage dependence. ΔV was calculated by determining the maximum x-axis difference between normalized mutant and wild-type curves (Fig. S2B).

Building the K-Shaw2 homology model

Based on the published X-ray crystal structure (14), we modeled the membrane-bound structure of Kv1.2 in the open (activated) and closed (resting) states. Modeling details and validation of the Kv1.2 atomistic structures that satisfy experimental distance constraints were reported previously (6, 21). Given a sequence similarity of ~80% between Kv1.2 and K-Shaw2, a complete atomistic homology model of K-Shaw2 in the closed and open states was built based on the membrane equilibrated structures of Kv1.2. The primary sequence of K-Shaw2 was taken from the Swiss-Prot, entry number P17972. Then, the Modeller software (<http://salilab.org/modeller/>) was used to generate the K-Shaw2 atomistic models.

The macromolecular system (channel + membrane) for each of the starting K-Shaw2 models was built up as follows. Each of the starting K-Shaw2 structures possessed five well-defined cavities. One central cavity located below the selectivity filter and four cavities located in the voltage-sensor domains. As the latter may correspond to hydrated regions of the protein with direct implications in the function of the channel, each protein model was fully hydrated before placing it in a membrane model. The channel constructs were then inserted at the center of a membrane patch composed by palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholine (POPC) lipid molecules, optimizing the distance between conserved aromatic side chains (belonging to S1 through S3) and the phospholipid head groups. The complete systems contain the K-Shaw2 channel, 390 lipid molecules, 26280 solvent-water molecules and 2 potassium ions located in the selectivity filter (a total of 122,988 atoms). To ensure the neutrality of the system, 14 counter ions (chloride) were distributed uniformly in the solvent. The initial dimensions of the simulation cell were 124.672 x 126.874 x 89.8839 Å³.

Molecular dynamics

The MD simulations were carried out in the NPT ensemble using the program NAMD2 (18) and periodic-boundary conditions (PBC). The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm (12). Short- and long-range forces were calculated every 1 and 2 time-steps respectively, with a time step of 2.0 fs. Langevin dynamics and Langevin piston methods were applied to keep the temperature (300 K) and the pressure (1 atm) of the system fixed. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach (5). The water molecules were described using the TIP3P model (13). The simulation used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein (15, 16) and CHARMM27 for the phospholipids (7). A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the POPC lipid molecules (10).

For each K-Shaw2 simulation, the channel was initially relaxed embedded in the membrane for ~4.0 ns with the protein coordinates constrained harmonically around the starting structure. Constraints were applied only to backbone atoms within the secondary structure elements. This procedure ensured a uniform and tight distribution of lipid molecules around the protein without disturbing the initial conformation. The harmonic constraints were then released for multi-ns relaxation of the full channel system by means of unconstrained MD simulation spanning ~15 ns. Execution of NAMD2 was performed on 12 Quad Core Intel 64-bit Xeon E5410 processors (2.33 GHz) of a local cluster.

Docking calculations

1-BuOH and halothane were docked separately on K-Shaw2 (closed), K-Shaw2 (open) and Kv1.2 (closed). Given that the channel conformational flexibility influences ligand binding, the anesthetics were docked against a family of ten equilibrium conformations for each of the channel structures. The conformations for K-Shaw2 in the open and closed states were sampled throughout the last 5 ns of the corresponding equilibrium MD simulations. The MD simulations providing the Kv1.2 conformations were described elsewhere (6).

Using the program AutoDock 4.2 (17), a total of 30 independent docking calculations were performed for each ligand. Each docking calculation consisted of two hundred and fifty runs of Lamarckian genetic algorithm (LGA), with initial population size of 600 individuals. The ligand was docked on the receptor structure by considering a grid of $126 \times 126 \times 80 \text{ \AA}^3$, with 0.45 \AA spacing and containing the intracellular portions of the channel segments S5, S6 and the S4-S5 linker. Chemical bonds in the ligand were flexible. By considering a RMS tolerance of 0.5 \AA , we recovered respectively a total of 1412, 1465 and 1511 docking solutions for 1-BuOH on K-Shaw2 (closed), K-Shaw2 (open) and Kv1.2 (closed), respectively. The total number of docking solutions recovered for halothane on the respective structures was 394, 477 and 353.

The docking solutions were clustered into sites according to their specific location on the channel structure. The affinity of the ligand for a binding site i was then computed by defining the ligand binding constant, B_i :

$$B_i = \frac{\sum_{j=1}^N E_j \delta_{ij}}{Z}$$

where, E_j is the energy of the docking solution j and $Z = \sum_{j=1}^N E_j$ is the cumulative energy over the total number N of docking solutions. Here, $\delta_{ij} = 1$ for every j matching i and $\delta_{ij} = 0$ otherwise. The binding energy E , as provided by Autodock, includes van der Waals, hydrogen bond and electrostatic terms for the ligand-protein interactions, as well as the ligand torsion and implicit solvation.

REFERENCES

1. Bhattacharji, A., B. Kaplan, T. Harris, X. Qu, M. W. Germann, and M. Covarrubias. 2006. The concerted contribution of the S4-S5 linker and the S6 segment to the modulation of a Kv channel by 1-alkanols. *Mol. Pharmacol.* 70: 1542-1554 PM:16887933.
2. Bhattacharji, A., N. Klett, R. C. Go, and M. Covarrubias. 2010. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *Br. J. Pharmacol.* 159: 1475-1485 PM:20136839.
3. Carter, P. J., G. Winter, A. J. Wilkinson, and A. R. Fersht. 1984. The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosyl-tRNA synthetase (*Bacillus stearothermophilus*). *Cell* 38: 835-840 PM:6488318.
4. Covarrubias, M., T. B. Vyas, L. Escobar, and A. Wei. 1995. Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. Insights into the molecular basis of general anesthesia. *J. Biol. Chem.* 270: 19408-19416.
5. Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98: 10089-10092.
6. Delemotte, L., W. Treptow, M. L. Klein, and M. Tarek. 2010. Effect of sensor domain mutations on the properties of voltage-gated ion channels: molecular dynamics studies of the potassium channel Kv1.2. *Biophys. J.* 99: L72-L74 PM:21044565.
7. Feller, S. E., and A. D. Mackerell Jr. 2000. An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J. Phys. Chem. B* 104: 7510-7515.
8. Harris, T., A. R. Graber, and M. Covarrubias. 2003. Allosteric modulation of a neuronal K⁺ channel by 1-alkanols is linked to a key residue in the activation gate. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285: C788-C796 PM:12958027.
9. Harris, T., M. Shahidullah, J. S. Ellingson, and M. Covarrubias. 2000. General anesthetic action at an internal protein site involving the S4-S5 cytoplasmic loop of a neuronal K⁺ channel. *J Biol. Chem.* 275: 4928-4936 PM:10671530.
10. Henin, J., W. Shinoda, and M. L. Klein. 2008. United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J. Phys. Chem. B* 112: 7008-7015 PM:18481889.

11. Hidalgo, P., and R. MacKinnon. 1995. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268: 307-310 PM:7716527.
12. Izaguirre, J. A., S. Reich, and R. D. Skeel. 1999. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 110: 9853-9864.
13. Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79: 926-935.
14. Long, S. B., E. B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* 309: 903-908 PM:16002579.
15. Mackerell Jr., A. D., D. Bashford, M. Bellot, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, and et al. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102: 3586-3616.
16. Mackerell, A. D., Jr., M. Feig, and C. L. Brooks, III. 2004. Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 698-699 PM:14733527.
17. Morris, G. M., R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30: 2785-2791 PM:19399780.
18. Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26: 1781-1802 PM:16222654.
19. Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, and R. W. Aldrich. 1998. Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 111: 399-420.
20. Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, and R. W. Aldrich. 1998. Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 111: 421-439.
21. Treptow, W., and M. Tarek. 2006. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 90: L64-L66 PM:16533847.
22. Treptow, W., and M. Tarek. 2006. K⁺ conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. *Biophys. J.* 91: L81-L83 PM:16980355.
23. Wells, J. A. 1990. Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry* 29: 8509-8517 PM:2271534.
24. Yifrach, O., and R. MacKinnon. 2002. Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell* 111: 231-239 PM:12408867.

SUPPORTING FIGURES

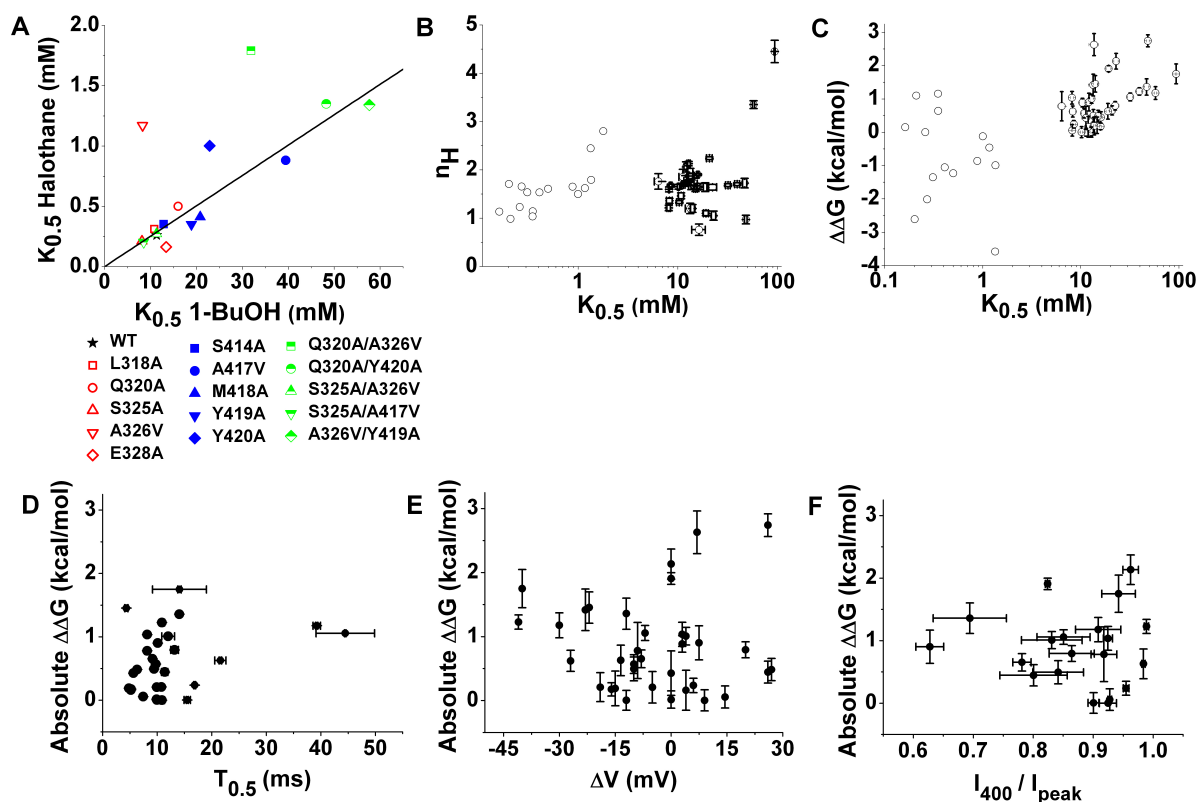


FIGURE S1. Correlations between Hill equation parameters, $\Delta\Delta G$ and gating parameters. (A) Correlation of the $K_{0.5}$ values for 1-BuOH and halothane. The line represents the best fit linear regression ($R^2 = 0.95$). Wild-type indicated with a black star, S4-S5 residues indicated in red, S6 in blue and double mutants in green. Two apparent outliers were excluded from the regression analysis. (B) Semi-log scatter plot of $K_{0.5}$ vs. n_H for all mutants. Halothane data is shown without error bars. These parameters are not correlated whether drugs are considered separately or together. (R^2 from linear fit to all data = 0.07). (C) Semi-log scatter plot of $\Delta\Delta G$ vs. $K_{0.5}$. Halothane data is shown without error bars. These parameters are not correlated whether drugs are considered separately or together (R^2 from linear fit to all data = 0.26). (D) Scatter plot of $\Delta\Delta G$ vs. $T_{0.5}$. The $T_{0.5}$ was measured as explained under Materials and Methods. (E) Scatter plot of $\Delta\Delta G$ vs. ΔV . The maximal shift in the normalized current-voltage plot (ΔV) was calculated as explained under Materials and Methods. (F) Scatter plot of vs. I_{400}/I_{peak} . This ratio measures the degree of current inactivation at 400 ms. Note that there is no apparent correlation between $\Delta\Delta G$ and the three empirical gating parameters.

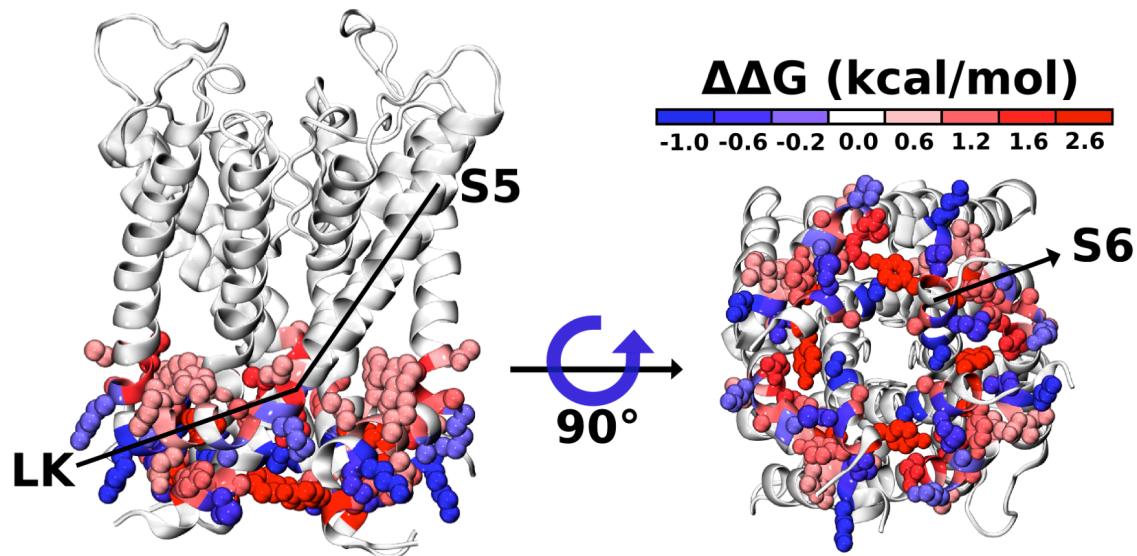


FIGURE S2 Thermodynamic molecular map of free energy changes induced by mutations in the S4-S5 linker and S6 segment of K-Shaw2. Lateral (*left*) and bottom (*right*) views of the K-Shaw2 closed structure showing the energetic impact of single mutations ($\Delta\Delta G$) on the channel inhibition by 1-BuOH. For clarity, only the channel S4-S5 linker (LK) and the pore segments S5 through S6 are depicted and only mutated residues are shown in space-filling view. Residues whose mutation yielded a positive $\Delta\Delta G$ for 1-BuOH (less favorable impact) are shown in red, while residues whose mutation yielded a negative $\Delta\Delta G$ (more favorable impact) are shown in blue.

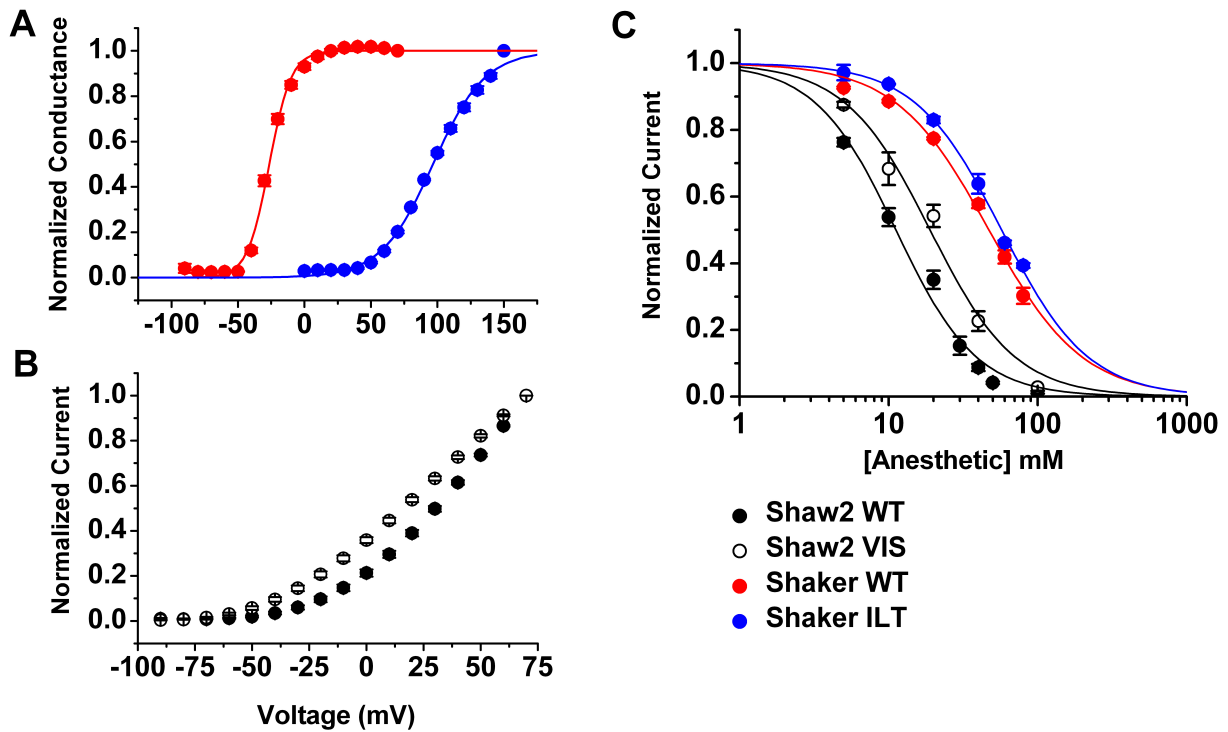


FIGURE S3. 1-BuOH sensitivity of Kv channels with distinct voltage dependencies. (A) The voltage sensor ShakerB-ILT mutant exhibits a large depolarizing shift ($V_{1/2} = +97$ mV, slope factor = 20 mV) compared to WT ($V_{1/2} = -26$ mV, slope factor = 8 mV). (B) The reverse VIS triple mutation in K-Shaw2 causes only a mild leftward shift ($\Delta V = -20$ mV). (C) The ShakerB-ILT mutant retained the characteristic 1-BuOH insensitivity of wild-type ShakerB. The ShakerB-ILT dose response was constructed at +100 mV, the ShakerB WT dose response was constructed at +60 mV. The lines are the best fits to the Hill equation (ILT: $K_{0.5}=57$ mM, $n_H=1.5$; wild-type: $K_{0.5}=47$ mM, $n_H=1.4$). The K-Shaw2-VIS mutation decreased 1-BuOH sensitivity modestly (VIS: $K_{0.5}=19$ mM, $n_H=1.5$; wild-type: $K_{0.5}=11$ mM, $n_H=1.6$). Both K-Shaw2 dose-response curves were constructed at +60 mV as described under Materials and Methods above.

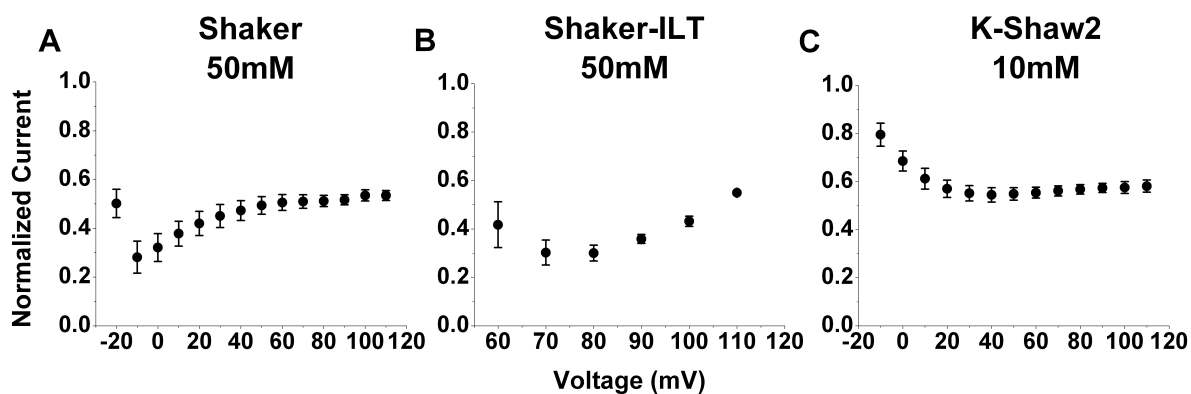


FIGURE S4. Voltage dependence of 1-BuOH action. (A) A voltage step protocol was applied to ShakerB expressed in *Xenopus* oocytes in the presence and absence of 50 mM 1-BuOH. The current in the presence of drug was then divided by the baseline (drug-free) current to yield a normalized current at each voltage. Only voltages at which the current was observed are shown. (B) Voltage dependence of Shaker-ILT mutant, calculated as in panel A. (C) Voltage dependence of K-Shaw2, calculated as in panel A with 10 mM 1-BuOH. Note that the trend is preserved in all panels. At very low P_o , channels are somewhat resistant to inhibition. Inhibition then reaches some trough at a voltage and then climbs again (albeit gradually in C).

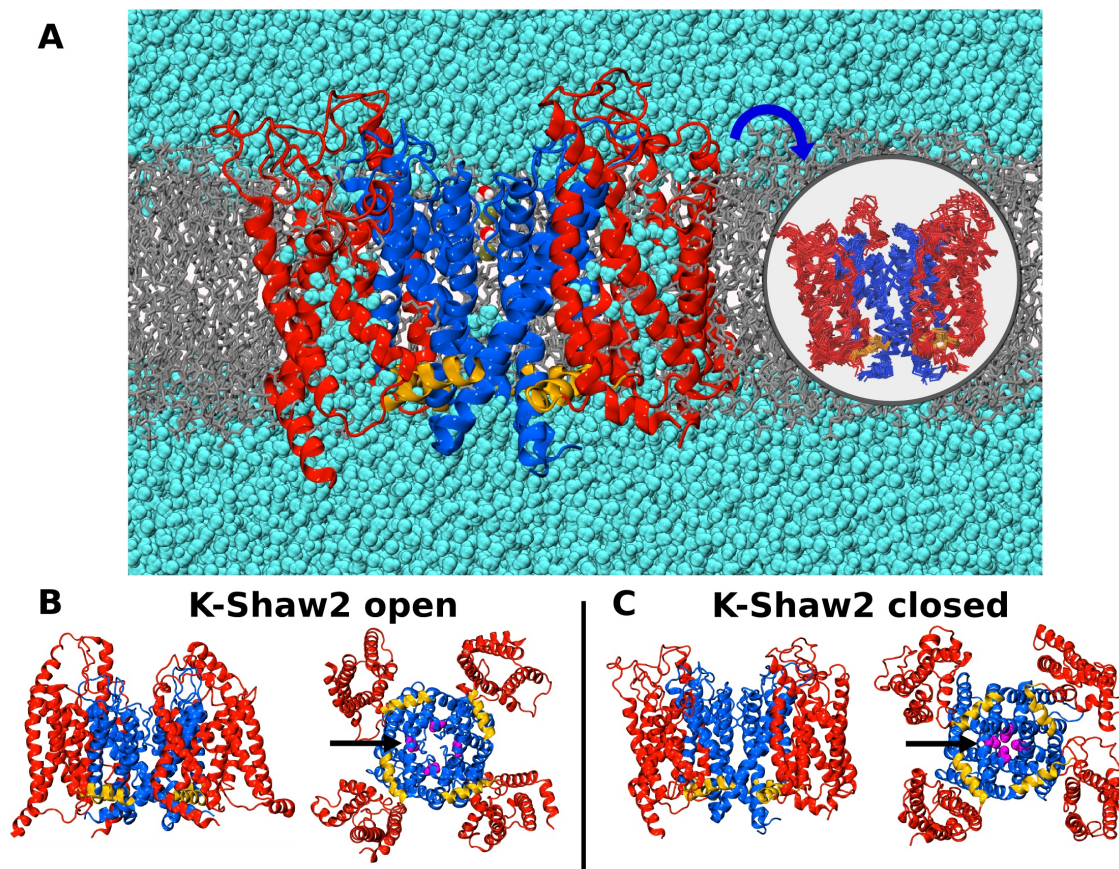


FIGURE S5. MD simulation of the K-Shaw2 channel. (A) Simulation system containing the K-Shaw2 channel (red: voltage sensor; orange: S4-S5 linker; blue: pore) embedded in a fully hydrated patch of POPC lipid bilayer (gray). Two K⁺ ions (ochre) and two water molecules are shown at the selectivity filter. Inset shows overlay of ten equilibrium structures to highlight backbone flexibility. (B and C) Membrane-equilibrated structures of K-Shaw2 in the open and closed states. Note that V409 (pink) forms a hydrophobic gate that controls ion conduction, as previously reported for other Kv channels (22).

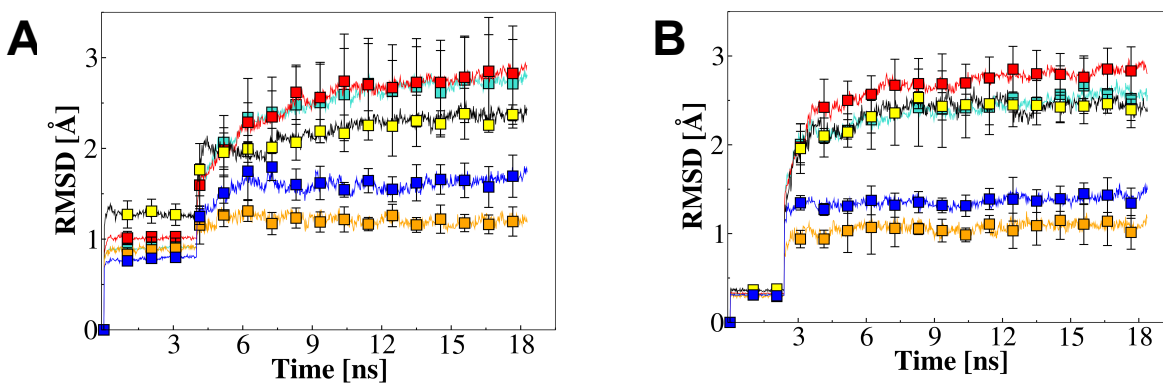


FIGURE S6. RMSD profiles for the K-Shaw2 MD simulation. Root-mean-square deviation (rmsd) profiles for the simulation of K-Shaw2 closed (*A*) and (*B*) open conformations. Profiles for the channel's fragments, i.e voltage sensor (red), S4 (yellow), S4-S5 linker (orange), pore (blue) and the TM domain (cyan) are depicted. The Shaw2 structure was constrained during the equilibration stage to allow for full reorganization of the water and lipids. The rmsd values were calculated with respect to the initial atomistic structure by superposing the main-chain atoms.

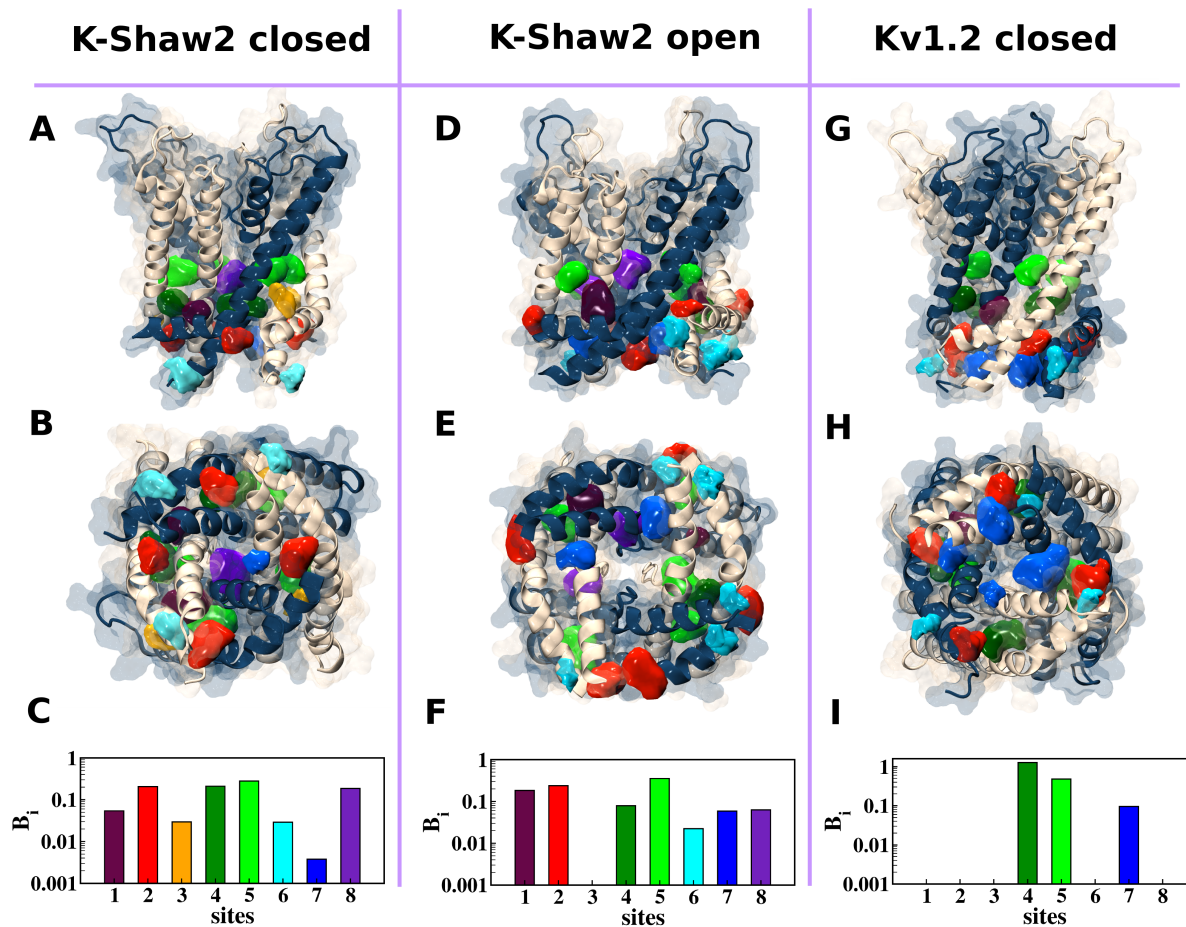


FIGURE S7. 1-BuOH docking calculations. The K-Shaw2 channel (open and closed) exhibits a total of eight possible docking sites. The colored density blobs indicate the location of the sites in the lateral (*A*) and bottom (*B*) views, which are compared against Kv1.2. (*C*). Binding constants were estimated in Autodock. See Materials and Methods and Figure 6 legend for more details.

Table S2: Parameters of the interaction of 1-BuOH with K-Shaw2

Mutant	N	$K_{0.5}$ mM	n_H	Aggregate K mM	ΔG kcal/mol	$\Delta\Delta G$ kcal/mol	Coupling energy kcal/mol
WT (F335A)	29	11.33 ± 0.50	1.69 ± 0.31	0.61 ± .08	-4.53 ± 0.09	0	
S4-S5 LINKER							
K316A	10	12.09 ± 0.54	2.06 ± 0.10*	0.46 ± 0.15	-4.90 ± 0.25	-0.90 ± 0.27	
I317A	8	13.42 ± 0.78	1.95 ± 0.08*	0.29 ± 0.08	-4.98 ± 0.17	-0.49 ± 0.07	
L318A	7	10.81 ± 0.63	1.46 ± 0.06*	1.56 ± 0.32	-3.90 ± 0.12	-0.57 ± 0.15	
I319A	8	12.75 ± 0.66	1.73 ± 0.04	0.59 ± 0.09	-4.46 ± 0.10	0.01 ± 0.13	
Q320A	7	16.02 ± 0.07*	1.65 ± 0.06	1.32 ± 0.33	-4.04 ± 0.15	0.44 ± 0.17	
T321V	3	13.64 ± 1.50*	1.15 ± 0.14*	13.51 ± 6.48	-2.98 ± 0.41	1.50 ± 0.43	
F322A	5	14.65 ± 1.06*	1.71 ± 0.11	0.93 ± 0.28	-4.28 ± 0.23	0.21 ± 0.25	
R323A	7	12.84 ± 0.41	1.74 ± 0.05	0.58 ± 0.12	-4.49 ± 0.13	-0.004 ± 0.15	
A324V	6	13.47 ± 0.63	1.84 ± 0.09	0.48 ± 0.13	-4.68 ± 0.21	-0.21 ± 0.23	
S325A	12	8.13 ± 0.33*	1.21 ± 0.06*	4.90 ± 1.34	-3.40 ± 0.16	1.04 ± 0.19	
A326V	11	8.26 ± 0.56*	1.36 ± 0.05*	1.89 ± 0.43	-3.88 ± 0.14	0.62 ± .17	
K327A	5	11.89 ± 0.36	1.77 ± 0.11	0.60 ± 0.20	-4.63 ± 0.30	-0.16 ± 0.31	

E328A	4	13.37 ± 1.48	1.20 ± 0.11*	7.37 ± 2.38	-3.08 ± 0.31	1.42 ± 0.33	
L329A	5	14.07 ± 0.64*	1.20 ± 0.08*	8.03 ± 3.24	-3.04 ± 0.23	1.45 ± 0.25	
T330V	6	13.69 ± 0.87	1.69 ± 0.10	0.75 ± 0.35	-4.64 ± 0.26	0.19 ± 0.27	
S6 SEGMENT							
S414A	5	12.86 ± 0.49	2.13 ± 0.05*	0.10 ± 0.02	-5.48 ± 0.12	-1.01 ± 0.14	
A417V	6	39.44 ± 2.24*	1.70 ± 0.03	4.16 ± 0.42	-3.26 ± 0.07	1.23 ± 0.11	
M418A	4	20.81 ± 1.38*	2.24 ± 0.03*	0.18 ± 0.03	-5.15 ± 0.12	-0.65 ± 0.14	
Y419A	6	18.87 ± 0.76*	1.64 ± 0.09	2.12 ± 0.78	-3.85 ± 0.22	0.63 ± 0.24	
Y420A	5	22.87 ± 1.13*	1.05 ± 0.09*	22.85 ± 5.50	-2.36 ± 0.22	2.13 ± 0.24	
DOUBLE MUTANTS							
L318A/K327A	4	10.19 ± 0.26	1.65 ± 0.05	0.58 ± 0.12	-4.48 ± 0.14	0.002 ± 0.16	-0.57 ± 0.47
Q320A/T321V	5	6.4 ± 0.48*	1.76 ± 0.16	0.25 ± 0.10	-5.27 ± 0.43	-0.78 ± 0.44	-3.50 ± 0.78
Q320A/A326V	6	31.91 ± 1.79*	1.68 ± 0.03	3.15 ± 0.39	-3.44 ± 0.08	1.06 ± 0.12	-0.14 ± 0.38
Q320A/T330V	9	15.07 ± 0.66*	1.61 ± 0.06	1.64 ± 0.67	-4.01 ± 0.15	0.48 ± 0.17	0.01 ± .68
Q320A/A417V	6	46.95 ± 2.21*	1.73 ± 0.10	4.81 ± 0.87	-3.33 ± 0.23	1.36 ± 0.24	-0.36 ± 0.35
Q320A/M418A	6	22.38 ± 2.16*	1.64 ± 0.06	2.07 ± 0.32	-3.69 ± 0.09	0.79 ± 0.13	0.99 ± 0.36
Q320A/Y420A	3	48.28 ± 1.45*	0.97 ± 0.09*	58.47 ± 15.61	-1.76 ± 0.16	2.74 ± 0.18	0.10 ± 0.45
S325A/A326V	6	11.29 ± 1.03	1.85 ± 0.16	0.40 ± 0.10	-4.89 ± 0.34	-0.43 ± 0.35	-2.11 ± 0.46

S325A/T330V	5	10.37 ± 0.63	$1.33 \pm 0.03^*$	2.43 ± 0.38	-3.59 ± 0.10	0.88 ± 0.13	-0.52 ± 0.58
S325A/A417V	5	$8.50 \pm 0.26^*$	1.67 ± 0.03	0.35 ± 0.04	-4.72 ± 0.07	-0.24 ± 0.11	-1.52 ± 0.41
A326V/A417V	5	$93.87 \pm 1.41^*$	$4.45 \pm 0.23^*$	0.04 ± 0.02	-6.23 ± 0.29	-1.75 ± 0.30	-2.02 ± 0.45
A326V/Y419A	4	$57.66 \pm 1.38^*$	$3.35 \pm 0.08^*$	0.08 ± 0.02	-5.67 ± 0.17	-1.18 ± 0.19	-2.91 ± 0.51
A326V/Y420A	5	$19.18 \pm 1.07^*$	$1.1 \pm 0.05^*$	12.98 ± 0.71	-2.57 ± 0.03	1.91 ± 0.09	-3.96 ± 0.36

$K_{0.5}$ and n_H are averaged from best fits to the Hill equation. See Materials and Methods for calculations of energetic parameters. All errors are standard errors and asterisks indicate $P_{ANOVA} < 0.05$. All aggregate K_s are significantly different from wild-type. Values of $K_{0.5}$, n_H , aggregate K , ΔG and $\Delta\Delta G$ are averages from independent (single oocyte) measurements, consequently when errors are large these numbers cannot be used directly to calculate average values of downstream parameters.

Table S3: Parameters of the interaction of halothane with K-Shaw2

Mutant	N	$K_{0.5}$	n_H	Aggregate K	ΔG	$\Delta\Delta G$	Coupling Energy
		mM		mM	kcal/mol	kcal/mol	kcal/mol
WT	45	0.26	1.23	3.93×10^{-02}	-6.01		
S4-S5 LINKER							
L318A	13	0.31	1.54	4.10×10^{-03}	-7.36	-1.35	
Q320A	17	0.50	1.61	4.92×10^{-03}	-7.24	-1.23	
S325A	17	0.21	0.98	2.39×10^{-01}	-4.91	1.10	
A326V	12	1.17	1.62	1.76×10^{-02}	-6.47	-0.46	
E328	20	0.16	1.13	4.96×10^{-02}		0.15	
S6 SEGMENT							
A417V	9	0.88	1.65	9.08×10^{-03}	-6.87	-0.86	
M418A	9	0.41	1.53	6.37×10^{-03}	-7.06	-1.05	
Y419A	12	0.35	1.03	2.69×10^{-01}	-4.85	1.16	
Y420A	15	1.00	1.50	3.18×10^{-02}	-6.13	-0.12	
DOUBLE MUTANTS							
Q320A/A326V	11	1.79	2.80	1.99×10^{-05}	-10.48	-4.47	-2.74
Q320A/Y420A	17	1.35	1.79	7.26×10^{-03}	-7.00	-0.99	0.35
S325A/A326V	14	0.27	1.65	1.26×10^{-03}	-8.02	-2.02	-2.59
S325A/A417V	12	0.20	1.71	4.88×10^{-04}	-8.62	-2.61	-2.75
A326V/A417V	8				Insensitive		
A326V/Y419A	17	1.34	2.45	9.15×10^{-05}	-9.59	-3.58	-4.17

$K_{0.5}$ and n_H are from obtained from best fits to the Hill equation. See Materials and Methods for details of calculations.

Table S4: Effect of mutation on gating parameters.

Mutant	ΔV mV	I_p/I_{400}	$T_{0.5}$ ms	$\Delta\Delta G$ kcal/mol
WT (F335A)		0.92 ± 0.01	10.86 ± 0.49	
K316A	7.50	0.63 ± 0.02	10.11 ± 0.28	-0.90 ± 0.27
I317A	-10.00	0.84 ± 0.04	9.44 ± 0.20	-0.49 ± 0.07
L318A	-10.00		9.75 ± 0.39	-0.57 ± 0.15
I319A	0.00		9.88 ± 0.33	0.01 ± 0.13
Q320A	26.00	0.80 ± 0.06	11.38 ± 0.59	0.44 ± 0.17
T321V	7.00		Too Fast	1.50 ± 0.43
F322A	-5.00		9.93 ± 0.31	0.21 ± 0.25
R323A	-12.00		9.97 ± 0.42	-0.004 ± 0.15
A324V	-19.00		10.77 ± 0.23	-0.21 ± 0.23
S325A	3.00	0.92 ± 0.01	8.17 ± 0.32	1.04 ± 0.19
A326V	-27.00	0.81 ± 0.01	9.46 ± 0.32	0.62 ± 0.17
K327A	4.00		5.18 ± 0.25	-0.16 ± 0.31
E328A	-23.00		Too fast	1.42 ± 0.33
L329A	-22.00		4.35 ± 0.31	1.45 ± 0.25
T330V	-15.00		4.83 ± 0.31	0.19 ± 0.27
S414A	4.00	0.83 ± 0.05	12.02 ± 0.59	-1.01 ± 0.14
A417V	-41.00	0.99 ± 0.004	10.88 ± 0.47	1.23 ± 0.11
M418A	-8.00	0.78 ± 0.02	9.16 ± 0.28	-0.65 ± 0.14
Y419A	-13.50	0.98 ± 0.003	21.60 ± 1.03	0.63 ± 0.24
Y420A	0.00	0.96 ± 0.01	Too fast	2.13 ± 0.24
L318A/K327A	9.00	0.90 ± 0.01	15.51 ± 0.59	0.002 ± 0.16
Q320A/T321V	-9.00	0.92 ± 0.02	8.15 ± 0.08	-0.78 ± 0.44
Q320A/A326V	-7.00	0.85 ± 0.04	44.48 ± 5.37	1.06 ± 0.12
Q320A/T330V	27.00		6.33 ± 0.19	0.48 ± 0.17
Q320A/A417V	-12.00	0.69 ± 0.06	14.05 ± 0.30	1.36 ± 0.24
Q320A/M418A	20.00	0.86 ± 0.04	13.20 ± 0.69	0.79 ± 0.13
Q320A/Y420A	26.00		Too fast	2.74 ± 0.18
S325A/A326V	0.00		5.65 ± 0.32	-0.43 ± 0.35
S325A/T330V	3.00		Too fast	0.88 ± 0.13
S325A/A417V	6.00	0.95 ± 0.005	16.88 ± 0.21	-0.24 ± 0.11
A326V/A417V	-40.00	0.94 ± 0.28	14.09 ± 4.95	-1.75 ± 0.30
A326V/Y419A	-30.00	0.91 ± 0.04	39.24 ± 0.69	-1.18 ± 0.19
A326V/Y420A	0.00	0.82 ± 0.004	Too fast	1.91 ± 0.09

Errors are standard errors, see Methods for calculation of activation parameters.

**Table S5: Residue distance from
ligand isosurface**

Residue	Distance
S4-S5 LINKER	Å
K316	11.48 ± 0.36
I317	10.10 ± 0.42
L318	4.28 ± 1.17
I319	4.90 ± 0.76
Q320	10.26 ± 0.75
T321	8.25 ± 0.31
F322	5.22 ± 0.98
R323	10.23 ± 2.54
A324	11.53 ± 1.14
S325	10.72 ± 1.24
A326	11.64 ± 2.19
K327	12.89 ± 0.42
E328	10.37 ± 0.45
L329	11.03 ± 0.99
T330	12.90 ± 1.55
S6 SEGMENT	
S414	14.45 ± 0.93
A417	16.11 ± 0.66
M418	16.07 ± 0.66
Y419	12.13 ± 0.74
Y420	14.26 ± 0.76

Distance (\pm standard error) is calculated between the geometrical center of protein side chains from the averaged structure and the geometrical center of the ligand cloud of docking solutions for 1-BuOH in site 3.

Conclusões gerais

"It is all a matter of time scale. An event that would be unthinkable in a hundred years may be inevitable in a hundred million."

-Carl Sagan.

5. Conclusões gerais

Os canais catiônicos dependentes de voltagem (sigla em inglês *VGCC*) compõem uma superfamília de proteínas, que incluem as famílias dos canais de potássio (Kv), sódio (Nav), e cálcio (Cav). Estes conduzem seletivamente diferentes espécies iônicas através da membrana celular³, apesar de haver também aqueles que conduzem cátions de modo não seletivo (HCN). Essas proteínas integrais da membrana estão presentes desde organismos unicelulares até animais superiores¹³⁴. Nas células eucariotas esses canais atuam em conjunto dando origem à geração e as propriedades de propagação do potencial de ação em células excitáveis. Essa intensa atividade elétrica é fundamental para a fisiologia e o funcionamento de grupos celulares como neurônios, fibras musculares e até células neuroendócrinas³.

O comportamento elétrico desses canais foi pioneiramente quantificado sob um arcabouço matemático apenas em 1952 pelos pesquisadores Hodgkin e Huxley⁷ que puderam descrever analiticamente a dependência da condutância desses íons em relação à voltagem transmembrânica e ao tempo. Nas décadas seguintes, com advento de técnicas de eletrofisiologia de alta resolução como o *patch-clamp*^{10,11}, e os experimentos de biologia e biofísica molecular^{16,17} obteve-se um considerável aumento de informação sobre a estrutura e o comportamento elétrico desses canais. Entretanto, apenas em 2005 que a primeira estrutura cristalográfica de um canal iônico de mamífero, o Kv1.2, foi resolvida em alta resolução. Essa proteína foi cristalizada com o *VSD* na conformação ativada, e o poro de condução iônica aberto. A organização estrutural desse canal iônico é do tipo homo tetramérica, cujas subunidades são compostas de seis segmentos de hélices. As quatro primeiras (S1-S4) formam o domínio sensor de voltagem (sigla em inglês *VSD*), em que a hélice S4 contém resíduos básicos de arginina e lisina, que conferem ao domínio uma elevada sensibilidade elétrica à variações do potencial transmembrânico. Já as hélices S5 e S6 formam o domínio do poro (sigla em inglês *PD*), onde encontra-se o filtro que determina a seletividade iônica (sigla em inglês *SF*) do canal.

Subsequentemente, vários trabalhos e estudos teóricos, empregando simulações de dinâmica molecular^{35,40}, foram publicados com o intuito de caracterizar esse estado funcional do Kv1.2 num ambiente de membrana plenamente hidratada, além de aferir as propriedades de hidratação, e a morfologia do dielétrico e do campo elétrico (**E**) do sistema. Nesse sentido, protocolos de simulações computacionais inovadores foram empregados com sucesso para investigar a dinâmica do Kv1.2 embebido na membrana, sobre uma diferença de voltagem^{44,46}.

A primeira parte do trabalho aqui apresentado, versou sobre a desativação do Kv1.2³⁷, que nos permitiu conhecer a estrutura do Kv1.2 com seu *VSD* no estado desativado e com o domínio do poro fechado. Para tanto, iniciando da estrutura do Kv1.2 equilibrada na membrana, com *VSD* ativado e poro aberto, empregamos protocolos de simulação para aplicação de uma diferença de voltagem, afim de disparar os eventos de desativação do domínio sensor de voltagem. Após uma longa simulação de ~ 2.2 μ s pudemos decifrar a regra do deslocamento dos resíduos básicos por dentro do *VSD*. Feito isso, e de modo a acelerar o processo, empregamos simulações fora do equilíbrio para trazer o canal finalmente até o seu estado completamente desativado. Esse resultado é bastante inovador uma vez que, até o momento, não há nenhuma estrutura cristalográfica de canais *VGCC* no estado desativado. Além disso, mostramos que há uma focalização do campo elétrico na região de um centro hidrofóbico caracterizado recentemente por Mackinnon e colaboradores⁴⁸, em que um resíduo de fenilalanina (F²³³) desidrata parcialmente o *VSD* e que cataliza a transferência dos resíduos de arginina por esta região. Esse centro catalítico é apontado como o responsável pela altíssima sensibilidade elétrica dos canais *VGCC*⁴⁸. Um estudo computacional recente⁶⁹ mostrou ainda que mutações pontuais sobre o *VSD* podem perturbar o ambiente dos contatos entre os resíduos dentro do domínio, acarretando numa alteração da morfologia de hidratação do *VSD*, que estaria relacionada a uma série de doenças em humanos. Finalmente, um trabalho de revisão mais atualizado da literatura aponta um consenso geral entre os dados experimentais e teóricos sobre a estrutura desativada/fechada dos canais Kv, cujo nosso modelo do Kv1.2 está em conformidade com aqueles descritos na literatura¹⁰⁶.

No mesmo ano da publicação dos nossos estudos sobre a desativação do Kv1.2 foi resolvida a primeira estrutura cristalográfica de um canal de sódio (NavAb) do organismo *Arcobacter butzleri*⁶⁶. Essa estrutura foi cristalizada com seu poro de condução iônica fechado e com o *VSD* numa conformação desconhecida. Ela inicialmente foi classificada pelos autores como pertencente a um estado pré-ativado. Dessa forma, considerando os resultados e sobretudo a conformações obtidas dos estudos de desativação do Kv1.2, pudemos então responder a qual estado de ativação se encontrava o *VSD* da estrutura cristalográfica do NavAb. Muito além disso, dado a semelhança estrutural entre os canais membros da superfamília *VGCC*, propusemos extrapolar o conhecimento adquirido acerca do Kv1.2 para os canais Nav. Dessa forma, considerando o arcabouço estrutural das conformações obtidas para o Kv1.2 exploramos conformações do NavAb na tentativa de conhecer os estados potencialmente relacionados aos estados fisiológicos funcionais de canais de sódio. Aplicando a metodologia de guiar estruturas alvo para aquelas de referência, conhecida como *target molecular dynamics* ou *TMD* (vide resultados , tópico 3.1.14), guiamos a estrutura cristalográfica equilibrada em membrana do NavAb, i.e

a conformação nomeada de NX, para as conformações de referência do Kv1.2, i.e aquela com o *VSD* ativado (KA) e a outra com o *VSD* desativado (KR). Desse modo, obtivemos inicialmente dois estados bem característicos do *VSD* para o NavAb: NX^{++} , cujo o *VSD* foi construído a partir da conformação KA; e NX^{-} que foi construído baseado na conformação KR. Num segundo momento, no intuito de investigar a abertura do poro da estrutura NX, aplicamos novamente o protocolo de *TMD* para guiar o poro fechado das estruturas NX e NX^{++} até a conformação de poro aberto do Kv1.2 (KA). Surpreendentemente, apenas para a conformação do NavAb de *VSD* completamente ativado (NX^{++}) é que o poro se manteve estável e aberto. Essa estrutura de domínio sensor de voltagem maximamente ativado e de poro aberto foi nomeada como NX^0 . Ao transformar a estrutura NX, o poro rapidamente recuou para uma abertura intermediária, que permitia a hidratação do lúmen da cavidade central do domínio, apesar do raio de abertura não ser compatível com a condução iônica do tipo difusiva. Esse resultado singular posicionou, portanto, as conformações aqui construídas, i.e NX^0 e NX^{-} , como estruturas potencialmente relacionados aos estados fisiológicos funcionais de canais de sódio, condizentes respectivamente às estruturas ativada/aberta e desativada/fechada. A grande saída científica desse resultado foi conseguir pioneiramente estruturas de canais de sódio em estados distintos e pertencentes aos limites do processo de ativação. Esse dado é particularmente importante, pois os canais de sódio são sensíveis a anestésicos gerais e locais como também são alvos de toxinas. Sabe-se porém, que essas moléculas efetoras se ligam em conformações específicas dos canais Nav. Alguns estudos mostram que anestésicos gerais e locais atuam nas conformações desativadas/fechadas desses canais, mas não naquela ativada/aberta^{73,118,119,131}.

De modo a investigar outros canais de sódio modelamos, a partir de conformações do NavAb, três modelos do canal bacteriano NaChBac. A esta altura do trabalho nós não dispúnhamos ainda das conformações NX^{++} e NX^0 do NavAb que detém o *VSD* plenamente ativado, i.e maximamente sobreposto ao *VSD* ativado da conformação de referência KA. Dessa forma construímos três modelos do NaChBac: um modelo com poro fechado e *VSD* intermediário (do tipo NX); e dois modelos com poro aberto, mas com o *VSD* e duas conformações distintas, i.e desativado (*resting-state*, do tipo NX^{-}) e ativado (do tipo NX^{++}). Nesse estudo investigamos inicialmente a influência de resíduos de glicina em movimentos de dobradiça sobre as hélices S6, que estariam envolvidas na regulação da abertura/fechamento do domínio do poro. Investigamos também a configuração de resíduos de fenilalanina (F²²⁴ e F²²⁷) pertencentes à região do portão hidrofóbico (do inglês *hydrophobic gate*, sigla *HC*) do canal NaChBac. Nossos resultados mostram que na conformação fechada do poro há um colapso hidrofóbico dos resíduos de fenilalanina de modo que as cadeias laterais desses aminoácidos se

direcionam para o interior do lúmen da cavidade central. Contrariamente, na conformação aberta do poro esses resíduos são estabilizados por entre os segmentos de hélice S6, e que portanto, não ocluem a cavidade central do canal. Finalmente avaliamos a capacidade das conformações de poro aberto do NaChBac em conduzir íons Na^+ através do caminho de hidratação de suas cavidades equilibradas, calculando o perfil de energia livre para a passagem da espécie iônica do filtro de seletividade para o meio intracelular. Surpreendentemente, em ambos os modelos de poro aberto, apesar de haver um caminho plenamente hidratado pela cavidade central do canal, característica que é requerida para o processo de difusão do íon, o perfil de energia livre calculado equivale a uma barreira de ~ 15 kcal/mol que é proibitiva para um transporte difuso de espécies iônicas. Esse dado suporta a ideia de que as conformações de poro aberto do NaChBac aqui construídas estão relacionados à conformação NX^{PO} do NavAb que, apesar do poro estar parcialmente aberto e hidratado, ainda assim não é compatível com o processo de transporte iônico assistido.

É surpreendente saber que nos dias hoje podemos investigar o funcionamento desses canais iônicos no nível das interações atômicas. Esse nível de conhecimento estrutural que está sendo alcançado atualmente permitirá o avanço de novos temas de estudos como a ação de moléculas efectoras, i.e os anestésicos gerais e toxinas, sobre o funcionamento dos canais *VGCC*. Nesse sentido, num primeiro esforço de conhecer o conjunto total de sítios de ligação de anestésicos gerais à superfamília *VGCC*, empregamos como modelo de estudo as estruturas dos canais iônicos Kv1.2 e K-Shaw2, bem como os anestésicos gerais 1-butanol e halotano. É válido ressaltar, que o canal iônico K-Shaw2 é uma isoforma do Kv1.2, mas que é sensível a anestésicos gerais⁵⁷. Desse modo, aplicamos um cálculo de *docking* molecular para mapear os sítios putativos de ligação dos anestésicos aos canais. De todos os sítios encontrados apenas um deles (sítio 3) aparece como sítio potencialmente relacionado a ter impacto funcional sobre o K-Shaw2. Vale lembrar, que neste problema a ligação do anestésico a um sítio fora da cavidade central, i.e um sítio alostérico ao redor do canal, não significa que essa interação promoverá necessariamente um impacto sobre a abertura/fechamento da proteína. Nesse sentido, o sítio 3 está localizado na região entre subunidades adjacentes do canal, por entre os segmentos S4S5 *linker*, S5 e S6 da proteína. Note que, os segmentos de hélice mencionados são justamente aqueles envolvidos com o mecanismo de abertura/fechamento da proteína. Essa região é anfifílica, mas que apresenta uma série de resíduos hidrofóbicos como Ile, Val e Phe, e que particularmente no sítio 3, detém as melhores condições de acomodar o ligante. Nos experimentos de mutação do tipo *alanine-scanning* realizado pelo grupo americano colaborador deste trabalho, e liderado pelo pesquisador Dr. Manuel Covarrubias, foi demonstrado que resíduos distantes do sítio 3

são aqueles que mais interferem na energia livre de ligação dos anestésicos. Esse resultado surpreendente nos incitou a propor uma hipótese chamada de “hipótese estrutural”. Essa ideia está baseada no fato de que os resíduos que estão distantes da ligação direta ($\sim 4 \text{ \AA}$) do anestésico ao sítio 3 auxiliam e mantem o arcabouço estrutural que favorece a própria existência do sítio 3. Assim sendo, mutações que perturbem a estruturação do sítio 3 interfere na capacidade do anestésico se alojar nessa cavidade, o que impediria portanto sua ligação à proteína nessa região de interconexão das subunidades do canal. Note que, essa hipótese necessita de investigações futuras para sua completa comprovação. Para tanto, a realização de uma nova rodada de mutações, que causem modificações estruturais mais drásticas ao canal (*tryptophan scanning*), seria fundamental para avaliar o impacto dessas perturbações estruturais sobre a afinidade dos anestésicos à conformação fechada do K-Shaw2. Além disso, é preciso refinar os cálculos de energia livre empregando metodologias de simulação computacional, como o formalismo de *FEP* (do inglês *free energy perturbation*), que permite o comuto da energia livre de ligação do ligante levando em consideração termos entrópicos do solvente explícito de uma simulação de dinâmica molecular.

Finalmente, a perspectiva imediata desse trabalho é poder caracterizar uma assinatura elétrica para o funcionamento de canais *VGCC* a partir do atual banco de estruturas cristalográficas da literatura, bem como das conformações dos canais Kv e Nav aqui caracterizados (veja detalhadamente a seguir no tópico 6).

Perspectivas

"With great power comes great responsibility."

-Uncle Ben, Spider man (The movie).

6. Perspectivas e trabalhos em andamento

Os domínios sensíveis à voltagem (*VSD*) são estruturas moleculares, que em resposta à variações do potencial elétrico transmembrânico (ΔV), controlam o mecanismo de ativação e condução de íons dos canais iônicos dependentes de voltagem (*VGCC*) de células excitáveis. Os *VSD* são formados por quatro segmentos de hélice (S1-S4) cujas cargas positivas (*GQR*), altamente conservadas, estão presentes na hélice S4 do canal. Dada sua natureza elétrica, os *VSD* são estruturas altamente sensíveis à variações de voltagem, em que o campo elétrico transmembrânico (**E**) associado, é a força motriz que desencadeia o seu funcionamento, deslocando as *GQR* ao longo da direção transmembrânica (*z*).

Em 2005, a estrutura atomística do *VSD* de um canal potássio de mamífero (Kv1.2), foi ineditamente resolvida por cristalografia de raios-X. O sensor de voltagem dessa estrutura foi caracterizado na conformação ativada. Simulações de dinâmica molecular (*MD*) realizadas por Treptow e colaboradores em 2006³⁹, mostraram em detalhe que a morfologia de hidratação desse estado funcional do *VSD* do Kv1.2 conecta as faces extra e intracelulares do canal, sendo parcialmente interrompida na região de um resíduo hidrofóbico (F²³³). Esse lúmen parcialmente hidratado do *VSD* altera drasticamente a morfologia do potencial eletrostático favorecendo a focalização de **E** na região hidrofóbica do domínio. Especificamente, **E** está relacionado à grandeza física distância elétrica (δ), que traduz o grau de acoplamento do potencial eletrostático local, de cada carga pontual da proteína, com ΔV . Para a conformação ativada do *VSD* do Kv1.2, a análise do perfil da distância elétrica ao longo da direção transmembrânica, $\delta(z)$, varia significativamente apenas nas proximidades do centro hidrofóbico demonstrando, portanto, a focalização de **E** nessa região (figura 6.1). Além disso, nossos resultados anteriores indicam que, para o Kv1.2, **E** permanece estático independentemente da conformação do canal. Note que, até então não há nenhum estudo demonstrando que o conjunto de resultados aferidos para o Kv1.2 seja igualmente válido para os outros membros da família *VGCC*.

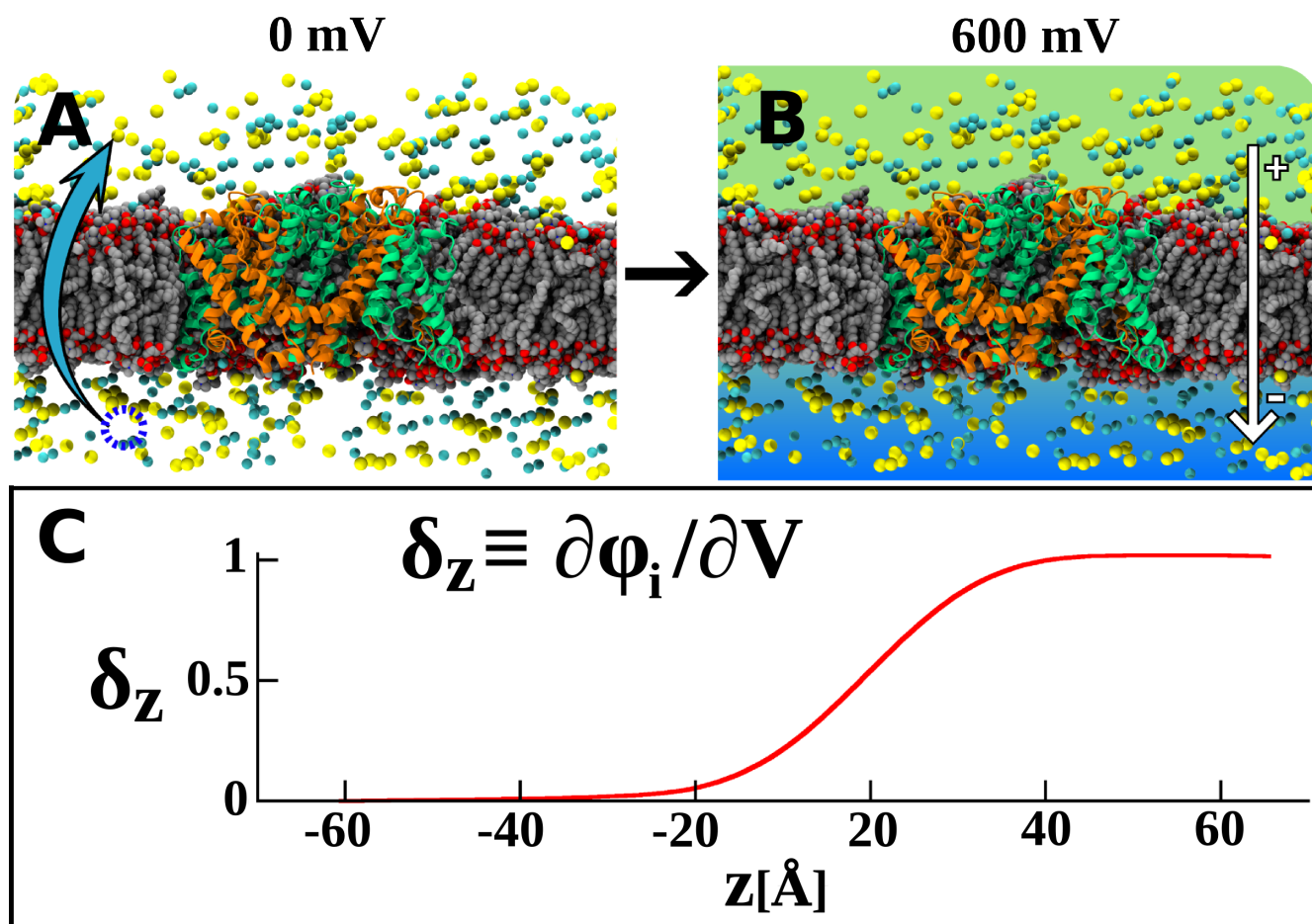


Figura 6.1. Ilustração da metodologia de desbalanço iônico para o cálculo das propriedades de hidratação do *VSD*, além do perfil de distância elétrica na direção transmembrânica. Esse sistema é referente à conformação ativada do canal de potássio Kv1.2 (cartoons em verde e laranja) embebido na membrana (esferas em cinza e vermelho) em um banho de eletrólitos (esferas em azul ciano para íons cloreto e em amarelo para os íons K^+). **A:** Simulação de dinâmica molecular à zero milivolts. **B:** Idem sobre uma diferença de voltagem de ~ 600 mV. **C:** Perfil de distância elétrica na direção transmembrânica da conformação alfa do Kv1.2. Note que há um rápido crescimento da função dentro de uma janela de ~ 20 Å em relação ao centro geométrico da membrana, que coincide com aquele do resíduo hidrofóbico F²³³ responsável pela desidratação parcial do *VSD*, o que é indicativo da focalização do campo elétrico (**E**) nessa região.

Na última década, um conjunto crescente de estruturas cristalográficas de canais *VGCC* com seus *VSD* em diferentes conformações tem sido disponibilizadas, servindo como valiosa fonte de dados estruturais de alta resolução (tabela 6.1). Entre eles destacam-se os canais de potássio (KvAP e Kv1.2-Kv2.1 químera) e as inéditas estruturas de canais de sódio (NavAb e NavRh).

Tabela 6.1. Principais estruturas cristalográficas e modelos de canais iônicos disponíveis na literatura para identificação de uma assinatura elétrica para o funcionamento do *VSD* de *VGCC*.

<i>Canal iônico*</i>	<i>Autor</i>
KvAP α	Jiang Y. <i>et al</i> , 2003 ¹³⁵ (raio-X)
Kv1.2 α	Long S.B. <i>et al</i> , 2005 ³⁸ (raio-X)
Kv1.2-Kv2.1 quimera α	Long, S.B. <i>et al</i> , 2007 ²⁸ (raio-X)
Kv1.2 (β - γ - δ) / ε	Delemotte, L. <i>et al</i> , 2011 ³⁷ (Modelo)
NavAb γ	Payandeh, J. <i>et al</i> , 2011 ¹³⁶ (raio-X)
NavAb α / (δ - ε)	Amaral C. <i>et al</i> , 2012 ¹¹¹ (Modelo)
NavRh α	Zhang. X. <i>et al</i> , 2012 ¹⁰⁸ (raio-X)
NaChBac α / ε	Baber A.F. <i>et al</i> , 2012 ¹¹² (Modelo)

* Os símbolos α , (β - γ - δ) e ε indicam respectivamente os estados ativado, intermediários e desativado do *VSD* desses canais;

Sabe-se que ao se aplicar um campo elétrico externo sobre um sistema contendo um canal iônico *VGCC* adsorvido numa membrana hidratada, aparece um excesso de energia livre no sistema oriundo da aplicação de **E**. Essa quantidade porém pode ser decomposta em dois termos principais i) a energia livre de origem termodinâmica, oriunda dos contatos eletrostáticos dos resíduos carregados do *VSD*, e ii) um componente energético puramente elétrico, que é devido ao grau de acoplamento dessas cargas da proteína ao campo elétrico. Dessa forma, ao isolar o termo elétrico do problema nós esperamos poder identificar uma assinatura elétrica geral para os canais iônicos da superfamília *VGCC* (figura 6.2). Essa informação apesar de bastante intuitiva ainda não foi explicitamente solucionada, e a decorrência desses estudos está vinculada à possibilidade de se pode explicar mutações específicas que se encerram sobre esses canais, causando doenças em humanos, sobre um ponto de vista não das interações alquímicas entre os átomos, mas sobre uma descrição elétrica do sistema. Como perspectiva dos trabalhos alcançados até agora pelo nosso grupo, i.e considerando o conjunto de estruturas resolvidas para Kv1.2 e NavAb, e aliado ao banco de estruturas recentemente disponibilizado na literatura, pretendemos aplicar os estudos sobre as propriedades elétricas dos *VSD* na membrana através de análises da estrutura de hidratação do domínio, e de $\delta(z)$, e extrair especificamente a informação elétrica por detrás do funcionamento do *VSD* que confere aos canais iônicos *VGCC* uma elevada sensibilidade elétrica que é requerida para a fisiologia e funcionamento de organismos superiores.

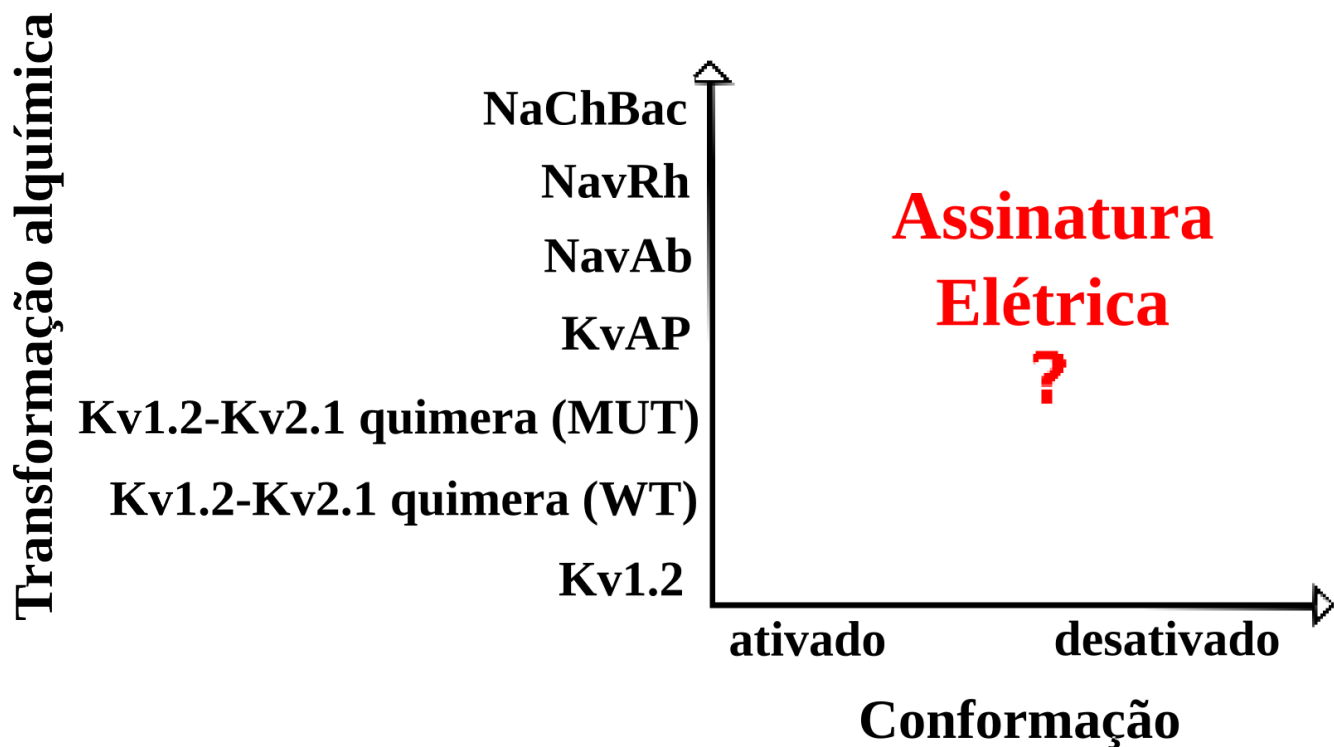


Figura 6.2. Resumo do espaço matemático proposto para identificar uma assinatura elétrica de canais iônicos membros da superfamília *VGCC*. Note que, na dimensão vertical temos várias transformações alquímicas, que são variações de sequência primária, partindo-se do Kv1.2 até o canal mais distante (NaChBac). Já o eixo das abcissas é referente ao espaço de conformação, i.e o *VSD* no estado ativado ou desativado. Dentro desses dois espaços independentes iremos calcular $\delta(z)$ e investigar o efeito da conformação e variação de aminoácidos sobre essa propriedade elétrica dos canais *VGCC*.

Apesar de existirem variações estruturais locais, e de sequência primária nos *VSD* de canais potássio (Kv) e de sódio (Nav), essas proteínas são amplamente distribuídas, em seus estados funcionais, em diversos organismos na natureza. Tal observação é indicativa de que, apesar de variações na sequência de aminoácidos da proteína, existe um arcabouço estrutural que é responsável pela resposta elétrica altamente sensível desses canais. Nossa hipótese de teste é que o conjunto de propriedades elétricas para o Kv1.2, previamente investigados pelo nosso grupo, está igualmente presente nos diversos membros da família *VGCC*.

Para desenvolver os objetivos aqui propostos iremos utilizar modelos atomísticos embebidos na membrana e explicitamente hidratados, empregando protocolos avançados de simulações de *MD*, como a aplicação de ΔV a partir de soluções iônicas contendo eletrólitos explícitos, e análises avançadas de propriedades eletrostáticas (perfil de hidratação, E , $\delta(z)$). Os resultados preliminares sobre o perfil de hidratação de algumas das estruturas atomísticas disponíveis na literatura estão ilustrados nas figuras 6.3 a 6.5. Tomados em conjunto, os resultados oriundos da metodologia aqui proposta nos permitirá caracterizar uma assinatura elétrica geral para funcionamento dos *VSD* de canais iônicos da superfamília *VGCC*.

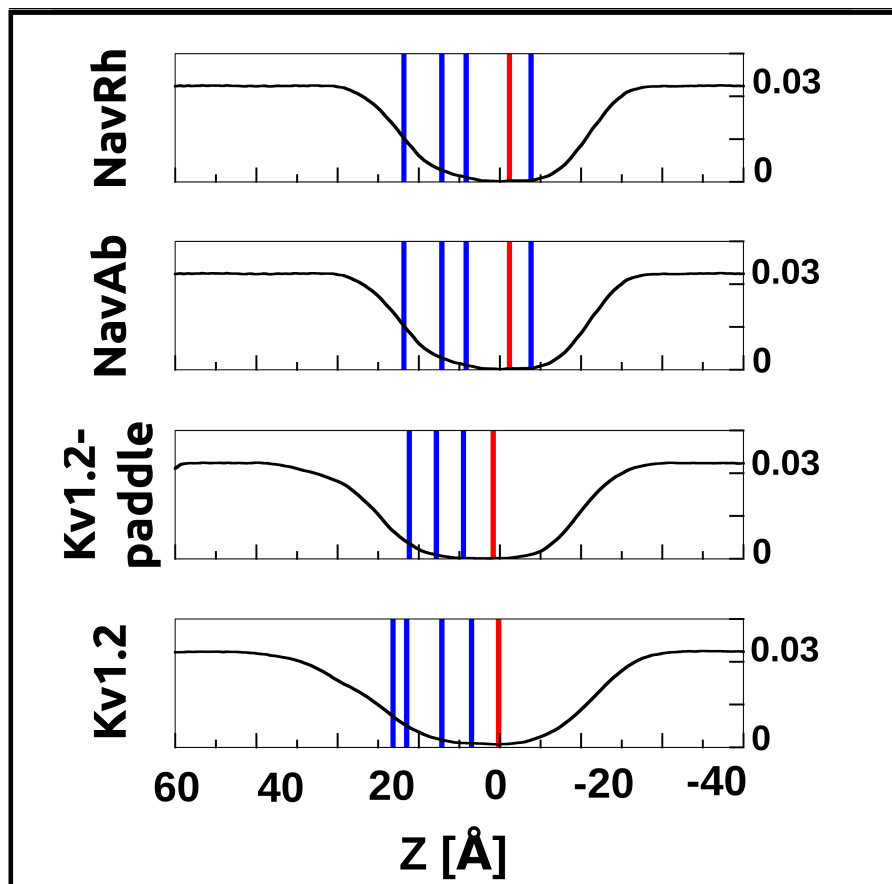


Figura 6.3. Perfil de hidratação do *VSD*, na direção transmembrânica, de algumas das estruturas cristalográficas da tabela 6.1, equilibradas na membrana. O eixo das ordenadas representa o nº de hidratação do sensor de voltagem, i.e a quantidade de moléculas de água normalizada pelo volume do cilindro no interior do *VSD*. As barras azuis representam a posição em *Z* dos resíduos básicos R_1 - R_4 e a barra vermelha indica a posição da Phe em cada um dos canais investigados. Note que, a presença desse resíduo hidrofóbico na região do centro catalítico favorece a desidratação parcial do domínio. O nº de hidratação é calculado como uma média das quatro subunidades em cada canal

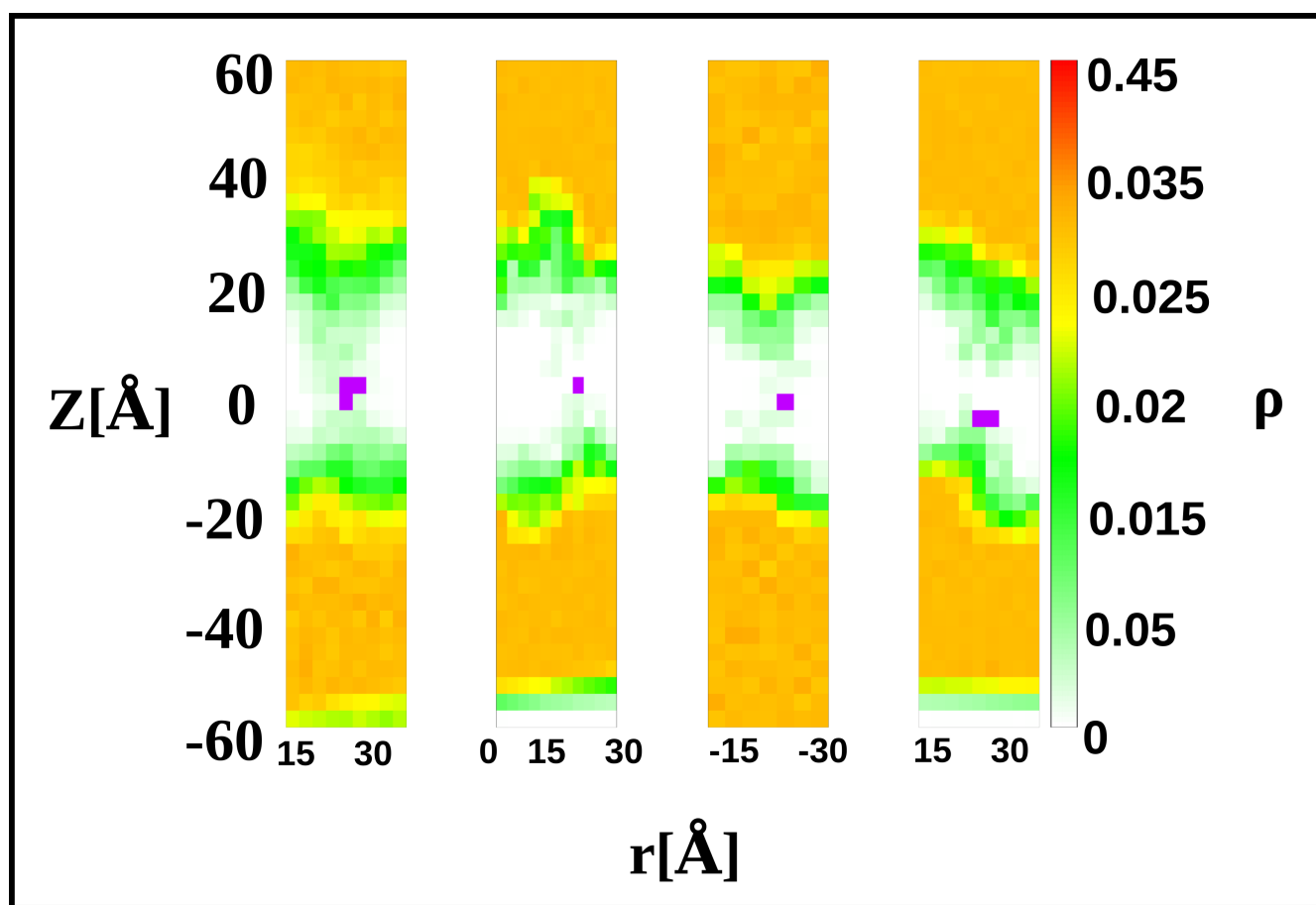


Figura 6.4. Morfologia do dielétrico para estruturas cristalográficas de membros da superfamília *VGCC* (canais, da esquerda para direita, Kv1.2 e Kv1.2-Kv2.1 quimera, NavAb e NavRh). Perfil de hidratação bi-dimensional do *VSD*. Aqui, o n° de hidratação (eixo das ordenadas à direita) é apresentado adicionalmente em relação à direção radial, i.e aquela perpendicular à direção transmembrânica (z) (eixo das abcissas). O resíduo de fenilalanina do centro catalítico do *VSD* dos canais é representado pelos pontos em roxo com densidade de água próxima a zero. Novamente, percebemos que a distribuição da densidade de moléculas de água que hidratam o *VSD* é menor nas proximidades do centro catalítico.

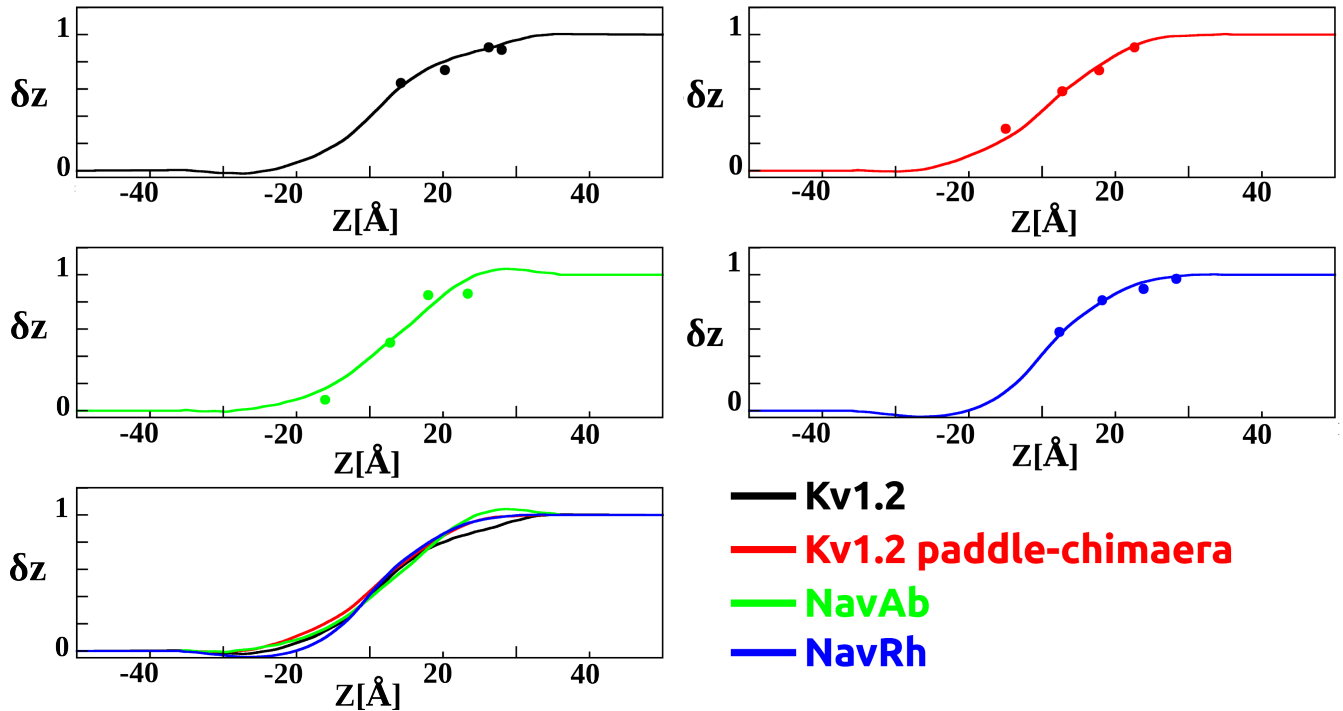


Figura 6.5. Perfil de distância elétrica $\delta(z)$ das mesmas estruturas da figura 6.4. Note que, as curvas individuais de cada estrutura, mesmo com pequenas diferenças na conformação do *VSD*, são sobrepostas em uma mesma equação mestre sigmoide $\delta(z)$, que é um primeiro indicio de um comportamento elétrico universal dos membros da superfamília *VGCC*.

Esses resultados contribuirão, à médio prazo, para a construção de modelos minimalistas que possam descrever e generalizar o funcionamento global dos *VSD* na membrana, na forma de uma assinatura elétrica para os membros da superfamília *VGCC*, além de relacionar a atividade elétrica desses dispositivos em relação às conformações e sequências primárias dos diversos canais *VGCC*. À longo prazo, espera-se desvendar os detalhes no nível das interações atômicas de defeitos estruturais que alteram o funcionamento elétrico desses canais, potencialmente relacionados à doenças em humanos.

7. Referências Bibliográficas

1. Cole, K. S. Membranes, ions, and impulses: A chapter of classical biophysics (Biophysics series). University of California Press. (1968).
2. Armstrong, C.M. Evidence for ionic pores in excitable membranes. *Biophysical journal* **15**, 932 (1975).
3. Hille, B. Ion Channels of Excitable Membranes (3rd Edition). (2001).
4. Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiological Reviews* **79**, 1317–1372 (1999).
5. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* **57**, 387–395 (2005).
6. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. *Principles of neural science*. (McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000).
7. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500–544 (1952).
8. Sakmann, B. & Neher, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology* **46**, 455–472 (1984).
9. Armstrong, C. M., C. M. & Bezanilla, F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **242**, 459–461 (1973).
10. Keynes, R. D. & Rojas, E. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)* **239**, 393–434 (1974).
11. Schneider, M. F. & Chandler, W. K. Voltage Dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244–246 (1973).
12. Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **80**, 555–592 (2000).
13. Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A. & Sigworth, F. J. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* **255**, 1712–1715 (1992).
14. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* **16**, 1169–1177 (1996).
15. Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1159–1167 (1996).
16. Noda, M. *et al.* Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121–127 (1984).
17. Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**, 770–775 (1987).
18. Treptow, W., Maigret, B., Chipot, C. & Tarek, M. Coupled Motions between Pore and Voltage-Sensor Domains: A Model for Shaker B, a Voltage-Gated Potassium Channel. *Biophysical Journal* **87**, 2365–2379 (2004).
19. Catterall, W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* **67**, 915–928 (2010).
20. Vargas, E., Bezanilla, F. & Roux, B. In Search of a Consensus Model of the Resting State of a Voltage-Sensing Domain. *Neuron* **72**, 713–720 (2011).
21. Stock, L., Souza, C. & Treptow, W. Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation channels. *Biochemistry* (2013).doi:10.1021/bi3013017
22. Horn, R. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* **39**, 15653–15658 (2000).

23. Islas, L. D. & Sigworth, F. J. Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **114**, 723–742 (1999).
24. Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* **31**, 239–295 (1998).
25. Liu, J. & Siegelbaum, S. A. Change of Pore Helix Conformational State upon Opening of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Neuron* **28**, 899–909 (2000).
26. Lai, H. C. & Jan, L. Y. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* **7**, 548–562 (2006).
27. Catterall, W. A. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* **26**, 13–25 (2000).
28. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376–382 (2007).
29. Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M. & Isacoff, E. Y. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* **271**, 213–216 (1996).
30. DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Sharp, E. M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 22498–22503 (2009).
31. DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na⁺ channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18825–18830 (2011).
32. Yarov-Yarovoy, V. *et al.* PNAS Plus: Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E93–E102 (2011).
33. Blaustein, R. O. & Miller, C. Ion channels: Shake, rattle or roll? *Nature* **427**, 499–500 (2004).
34. Guy, H. R. & Seetharamulu, P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 508–512 (1986).
35. Catterall, W. A. Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends in Neurosciences* **9**, 7–10 (1986).
36. Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33–41 (2003).
37. Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C. & Treptow, W. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 6109 (2011).
38. Long, S. B. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
39. Treptow, W. & Tarek, M. Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* **90**, L64–L66 (2006).
40. Jogini, V. & Roux, B. Dynamics of the Kv1.2 Voltage-Gated K⁺ Channel in a Membrane Environment. *Biophysical Journal* **93**, 3070–3082 (2007).
41. Sands, Z. A. & Sansom, M. S. How does a voltage sensor interact with a lipid bilayer? Simulations of a potassium channel domain. *Structure* **15**, 235–244 (2007).
42. Krepkiy, D. *et al.* Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* **462**, 473–479 (2009).
43. Nishizawa, M. & Nishizawa, K. Molecular Dynamics Simulation of Kv Channel Voltage Sensor Helix in a Lipid Membrane with Applied Electric Field. *Biophysical Journal* **95**, 1729–1744 (2008).
44. Bjelkmar, P., Niemelä, P. S., Vattulainen, I. & Lindahl, E. Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel. *PLoS Comput Biol.* **5**, e1000289 (2009).
45. Jensen, M. O. *et al.* Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* **336**, 229–233

- (2012).
46. Treptow, W., Tarek, M. & Klein, M. L. Initial Response of the Potassium Channel Voltage Sensor to a Transmembrane Potential. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 2107–2109 (2009).
 47. Denning, E. J., Crozier, P. S., Sachs, J. N. & Woolf, T. B. From the gating charge response to pore domain movement: initial motions of Kv1.2 dynamics under physiological voltage changes. *Mol Membr Biol.* **26**, 397–421 (2009).
 48. Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A. & MacKinnon, R. A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors. *Science* **328**, 67–73 (2010).
 49. Beckstein, O., Tai, K. & Sansom, M. S. Not ions alone: barriers to ion permeation in nanopores and channels. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14694–14695 (2004).
 50. Treptow, W. & Tarek, M. Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels. *Biophysical Journal* **91**, L26–L28 (2006).
 51. Nury, H. *et al.* One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *PNAS* (2010).doi:10.1073/pnas.1001832107
 52. Sotomayor, M. & Schulten, K. Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance MscS. *Biophys. J.* **87**, 3050–3065 (2004).
 53. Jensen, M. O. *et al.* Principles of conduction and hydrophobic gating in K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 5833–5838 (2010).
 54. Treptow, W., Marrink, S. J. & Tarek, M. Gating motions in Kv channels: insights from coarse-grained MD simulations. *J Phys Chem B.* **112**, 3277 – 3282 (2008).
 55. Covarrubias, M., Vyas, T. B., Escobar, L. & Wei, A. Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. Insights into the molecular basis of general anesthesia. *J. Biol. Chem.* **270**, 19408–19416 (1995).
 56. Harris, T., Shahidullah, M., Ellingson, J. S. & Covarrubias, M. General anesthetic action at an internal protein site involving the S4-S5 cytoplasmic loop of a neuronal K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4928 (2000).
 57. Harris, T., Graber, A. R. & Covarrubias, M. Allosteric modulation of a neuronal K⁺ channel by 1-alkanols is linked to a key residue in the activation gate. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **285**, C788–C796 (2003).
 58. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, 607–614 (1994).
 59. Miller, K. W., Firestone, L. L., Alifimoff, J. K. & Streicher, P. Nonanesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1084–1087 (1989).
 60. Weight, F. F. Cellular and molecular physiology of alcohol actions in the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* **33**, 289–348 (1992).
 61. Moss, G. W., Lieb, W. R. & Franks, N. P. Anesthetic inhibition of firefly luciferase, a protein model for general anesthesia, does not exhibit pressure reversal. *Biophys. J.* **60**, 1309–1314 (1991).
 62. Slater, S. J. *et al.* Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* **364**, 82–84 (1993).
 63. Alifimoff, J. K., Firestone, L. L. & Miller, K. W. Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 9–16 (1989).
 64. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* **254**, 427–430 (1991).
 65. Wood, S. C., Tonner, P. H., De Armendi, A. J., Bugge, B. & Miller, K. W. Channel inhibition by alkanols occurs at a binding site on the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **47**, 121–130 (1995).
 66. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated

- sodium channel. *Nature* **475**, 353–358 (2011).
67. Xu, Y., Ramu, Y. & Lu, Z. Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* **451**, 826–830 (2008).
 68. Khalili-Araghi, F. *et al.* Refinement and Validation of Atomic Models of the Kv1.2 Potassium Channel Through Molecular Dynamics and Gating Charge Calculations. *Biophys J.* **98**, 520a–521a (2010).
 69. Delemotte, L., Treptow, W., Klein, M. L. & Tarek, M. Effect of Sensor Domain Mutations on the Properties of Voltage-Gated Ion Channels: Molecular Dynamics Studies of the Potassium Channel Kv1.2. *Biophysical Journal* **99**, L72–L74 (2010).
 70. Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E., Roux, B. & Schulten, K. Molecular Dynamics Investigation of the ω -Current in the Kv1.2 Voltage Sensor Domains. *Biophysical Journal* **102**, 258–267 (2012).
 71. Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y. Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* **45**, 379–388 (2005).
 72. Pathak, M. M. *et al.* Closing In on the Resting State of the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* **56**, 124–140 (2007).
 73. Barber, A. F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W. & Covarrubias, M. Molecular Mapping of General Anesthetic Sites in a Voltage-Gated Ion Channel. *Biophysical Journal* **101**, 1613–1622 (2011).
 74. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: a Program for Macromolecular Energy, Minimizations, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem* **4**, 187–217 (1983).
 75. Lindahl, E., Hess, B. & Van der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling* **7**, 306–317 (2001).
 76. Treptow, W. Canais iônicos dependentes de voltagem: formulação de uma teoria geral para excitabilidade celular. (2003).
 77. Allen, M. P. & Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. (Oxford University Press, USA, 1989).
 78. MacKerell Jr, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998).
 79. Cornell, W. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197 (1995).
 80. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English* **29**, 992–1023 (1990).
 81. Martyna, G. J., Tuckerman, M. E., Tobias, D. J. & Klein, M. L. Explicit reversible integrators for extended systems dynamics. *Molecular Physics* **87**, 1117–1157 (1996).
 82. Tuckerman, M. E. & Martyna, G. J. Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications. *J. Phys. Chem. B* **104**, 159–178 (2000).
 83. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. *Chemical Physics Letters* **28**, 578–581 (1974).
 84. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics* **23**, 187–199 (1977).
 85. Hénin, J. & Chipot, C. Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem* **121**, 2904–2914 (2004).
 86. Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W. & Tarek, M. Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 5547–5550 (2008).
 87. Delemotte, L. On the function and modulation of voltage-gated potassium channels: insights from large-scale all-atom molecular dynamics simulations. (2011).
 88. Sigg, D., Bezanilla, F. & Stefani, E. Fast gating in the Shaker K⁺ channel and the energy

- landscape of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7611–7615 (2003).
89. MacKerell Jr, A. D., Feig, M. & Brooks III, C. L. Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J. Am. Chem. Soc* **126**, 6982–699 (2004).
 90. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* **19**, 1639–1662 (1998).
 91. Oshiro, C. M., Kuntz, I. D. & Dixon, J. S. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **9**, 113–130 (1995).
 92. Westhead, D. R. *et al.* PRO-LIGAND: an approach to de novo molecular design. 3. A genetic algorithm for structure refinement. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **9**, 139–148 (1995).
 93. Horton, H. R. *Principles of biochemistry*. (Prentice- Hall, 1996).
 94. Mo, H. & IGI Global *Handbook of research on artificial immune systems and natural computing applying complex adaptive technologies*. (IGI Global (701 E. Chocolate Avenue, Hershey, Pennsylvania, 17033, USA), 2009).
 95. Gilson, M. K. & Honig, B. H. Calculation of electrostatic potentials in an enzyme active site. *Nature* **330**, 84–86 (1987).
 96. Bashford, D., Karplus, M. & Canters, G. W. Electrostatic effects of charge perturbations introduced by metal oxidation in proteins. A theoretical analysis. *J. Mol. Biol.* **203**, 507–510 (1988).
 97. Böhm, H.-J. LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Computer-Aided Mol Des* **6**, 593–606 (1992).
 98. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem* **26**, 1781–1802 (2005).
 99. Nosé, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 511–519 (1984).
 100. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys* **98**, 10089–10092 (1993).
 101. Feller, S. E. & MacKerell Jr, A. D. An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J. Phys. Chem. B* **104**, 7510–7515 (2000).
 102. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys* **79**, 926–935 (1983).
 103. Khalili-Araghi, F. *et al.* Calculation of the Gating Charge for the Kv1.2 Voltage-Activated Potassium Channel. *Biophysical Journal* **98**, 2189–2198 (2010).
 104. Henrion, U. *et al.* Tracking a Complete Voltage-Sensor Cycle with Metal-Ion Bridges. *PNAS* (2012).doi:10.1073/pnas.1116938109
 105. Das, R. & Baker, D. Macromolecular Modeling with Rosetta. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 363–382 (2008).
 106. Vargas, E. *et al.* An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* **140**, 587–594 (2012).
 107. Yarov-Yarovoy, V., Baker, D. & Catterall, W. A. Voltage sensor conformations in the open and closed states in Rosetta structural models of K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7292–7297 (2006).
 108. Zhang, X. *et al.* Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* (2012).doi:10.1038/nature11054
 109. McCusker, E. C. *et al.* Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nature Communications* **3**, 1102 (2012).
 110. Carnevale, V., Treptow, W. & Klein, M. L. Sodium Ion Binding Sites and Hydration in the Lumen of a Bacterial Ion Channel from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2**, 2504–2508 (2011).
 111. Amaral, C., Carnevale, C., Klein, M.L. & Treptow, W. Exploring conformational states of the

- bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2012).doi:10.1073/pnas.1218087109
112. Barber, A. F. *et al.* Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1818**, 2120–2125 (2012).
 113. Campos, F. V., Chanda, B., Roux, B. & Bezanilla, F. Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7904 (2007).
 114. Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L. & Treptow, W. Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 21336–21341 (2012).
 115. Erik Lindahl Unraveling the strokes of ion channel molecular machines in computers. (2012).at <<http://www.pnas.org/content/109/52/21186.full.pdf+html?sid=cb2c6006-f489-48f5-abc0-b1e49671e7ae>>
 116. George, A. L., Jr Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J. Clin. Invest.* **115**, 1990–1999 (2005).
 117. Clare, Tate, Nobbs & Romanos Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov. Today* **5**, 506–520 (2000).
 118. Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* **265**, 1724–1728 (1994).
 119. Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *PNAS* **93**, 9270–9275 (1996).
 120. Yarov-Yarovoy, V. *et al.* Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J. Biol. Chem.* **277**, 35393–35401 (2002).
 121. Charalambous, K. & Wallace, B. A. NaChBac: The Long Lost Sodium Channel Ancestor. *Biochemistry* **50**, 6742–6752 (2011).
 122. Richardson, J. *et al.* Distance measurements reveal a common topology of prokaryotic voltage-gated ion channels in the lipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15865–15870 (2006).
 123. Shafrir, Y., Durell, S. R. & Guy, H. R. Models of the Structure and Gating Mechanisms of the Pore Domain of the NaChBac Ion Channel. *Biophysical Journal* **95**, 3650–3662 (2008).
 124. Shafrir, Y., Durell, S. R. & Guy, H. R. Models of Voltage-Dependent Conformational Changes in NaChBac Channels. *Biophysical Journal* **95**, 3663–3676 (2008).
 125. Pearson, W. R. Searching protein sequence libraries: comparison of the sensitivity and selectivity of the Smith-Waterman and FASTA algorithms. *Genomics* **11**, 635–650 (1991).
 126. Bernèche, S. & Roux, B. Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* **78**, 2900–2917 (2000).
 127. Shrivastava, I. H. & Sansom, M. S. P. Simulations of ion permeation through a potassium channel: Molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. *Biophys. J.* **78**, 557–570 (2000).
 128. Bocquet, N. *et al.* X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111–114 (2008).
 129. Brannigan, G., LeBard, D. N., Héning, J., Eckenhoff, R. G. & Klein, M. L. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 14122–14127 (2010).
 130. Nury, H. *et al.* X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
 131. Beck, E. J. & Covarrubias, M. Kv4 channels exhibit modulation of closed-state inactivation in

- inside-out patches. *Biophysical journal* **81**, 867–883 (2001).
132. Bhattacharji, A. *et al.* The concerted contribution of the S4-S5 linker and the S6 segment to the modulation of a Kv channel by 1-alkanols. *Mol Pharmacol.* **70**, 1542–1554 (2006).
 133. Wang, G. & Covarrubias, M. Voltage-dependent gating rearrangements in the intracellular T1-T1 interface of a K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **127**, 391–400 (2006).
 134. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
 135. Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33–41 (2003).
 136. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353–358 (2011).