



**Universidade de Brasília - UnB**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR - CEL

LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA TEÓRICA E COMPUTACIONAL – LBTC

---

# **Mecanismos de Condução Iônica em Canais de Sódio**

---

Aluna: Leticia Stock Vieira

Orientador: Dr. Werner Treptow

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para obtenção do grau mestre em Biologia Molecular.

BRASÍLIA – DEZEMBRO DE 2013

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Katia Stock e Hélio Letti, pelo apoio incondicional e pelo incentivo a alcançar meus objetivos. Por todo carinho e pelo exemplo. Sem dúvidas, é impossível enumerar tudo que eu tenho a agradecer. A vocês minha infinita gratidão!

Ao meu orientador, Dr. Werner Treptow, pelo imenso aprendizado. Agradeço também pela confiança na realização desse trabalho, bem como por toda paciência e amizade. Espero que possamos dar continuidade a esse e demais trabalhos nos próximos anos.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional Caio Souza, Cristiano Amaral e Juliana Hosoume por toda amizade e companheirismo além de, claro, prontidão em ajudar em assuntos relacionados à pesquisa.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dispensado à leitura e melhoramento da versão final deste documento.

Aos funcionários da UnB, em particular àqueles do departamento de Biologia Celular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## Resumo

Canais iônicos (CIs) são proteínas transmembrânicas capazes de regular o fluxo de íons, para dentro e para fora das células, abrindo e fechando seus poros. Tal regulação se dá em resposta a diferentes estímulos, como ligação de moléculas, diferenças de potencial eletrostático, estímulos mecânicos, etc. Além disso, em geral, CIs são altamente seletivos a um íon. Assim, em função do íon transportado pelo canal, estes podem ser denominados canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Cl}^-$ . O funcionamento de CIs está relacionado a uma variedade de funções biológicas essenciais como: contração muscular, sinapses, geração e transmissão de impulsos nervosos, controle da pressão osmótica, secreção hormonal, percepção do ambiente e consciência, entre outros. Portanto, essas proteínas tem sido alvo de intensas investigações ao longo das últimas décadas.

Diversas estruturas cristalográficas de canais iônicos foram resolvidas nos últimos anos. Conjuntamente com avanços no poder computacional, tais estruturas possibilitam a investigação de CIs com alta resolução, via simulações de dinâmica molecular (DM). Em 2011 foi publicada a primeira estrutura cristalográfica de canal de  $\text{Na}^+$ : um CI bacteriano denominado NavAb (Payandeh et al., 2011). Observa-se que o poro de CIs apresenta uma estrutura geral comum. Em contrapartida, a região responsável pela discriminação dos íons, o chamado filtro de seletividade (FS), naturalmente mostra diferenças consideráveis. Segundo pode ser observado na estrutura cristalográfica, o FS de canais de  $\text{Na}^+$  é relativamente curto e amplo, sendo portanto capaz de acomodar íons hidratados no seu interior. Além disso, é sugerido que íons dispõem de certa mobilidade no interior desse FS. Tal descrição difere significativamente do ambiente constrito e pouco hidratado observado no FS de canais de  $\text{K}^+$ . Frente a isso, espera-se que os mecanismos de condução em canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  sejam diferentes.

Neste trabalho, cálculos de energia livre (via metadinâmica) e simulações de DM com aplicação de potenciais eletrostáticos transmembrânicos foram empregados na investigação do mecanismo de condução de canais de  $\text{Na}^+$ , através do CI NavAb. Conjuntamente, ambas metodologias mostram que os íons ligam-se essencialmente a três sítios no interior do FS, chamados HFS, CEN e IN. Mostrou-se também que o movimento de íons e água no interior do filtro é pouco restrito. Em decorrência disso, é permitida a ocupação concomitante de um único sítio do FS por mais de um íon, o que implica em um mecanismo fundamentalmente distinto daquele observado em canais de  $\text{K}^+$ . Outro resultado interessante aponta para uma assimetria nos mecanismos de condução de  $\text{Na}^+$  em condições de hiperpolarização ou equilíbrio ( $\Delta V \leq 0$ ) e de despolarização ( $\Delta V > 0$ ). O mecanismo de condução predominante a  $\Delta V \leq 0$  envolve essencialmente a participação de dois  $\text{Na}^+$ . Em contrapartida, a  $\Delta V > 0$ , o mecanismo conta com três íons, sendo que a chegada do terceiro estimula a liberação de um dos íons

anteriormente presentes no canal. Perspectivas desse estudo impactam algumas das questões mais desafiantes da biofísica molecular atual, tais como: identificar os fatores determinantes da seletividade iônica; compreender melhor a relação estrutura-função de canais iônicos eucariotos, particularmente canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ ; mecanismo de ação de anestésicos e aplicações nanobiotecnológicas.

## Abstract

Ion channels (ICs) are transmembrane (TM) protein pores, capable of regulating the flow of ions in and out of the cells by opening and closing the hydrated pathway they form. This can be done in response to various stimuli, such as binding of ligands, voltage, mechanical stimuli, etc. Moreover, most ICs are highly selective. Hence, according to the ion they selectively transport, ICs can be denominated either  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  or  $\text{Cl}^-$  channels. ICs functioning is essential to a variety of biological functions, e.g.: muscular contraction, electric signaling in neurons, control of the osmotic pressure, hormone secretion, consciousness, etc. Therefore have been the subject of intense research over the last 50 years.

Several IC crystal structures have been resolved over the last few years. Along with improvements in computer processing power, such structures enable the investigation of ICs with atomic resolution, by means of molecular dynamics (MD) simulations. In 2011 the first crystal structure of a sodium channel (a bacterial channel named NavAb) was published (Payandeh et al., 2011). While ICs display a pore with overall conserved structure, significant differences can be seen in the so-called selectivity filter (SF): the pore region responsible for discriminating between different ionic species. As of its crystal structure, the  $\text{Na}^+$  channel SF is relatively short and wide, and thence can fit hydrated cations. Besides, ions and water molecules are expected to have a certain degree of mobility inside the SF. Such SF characteristics greatly differ from the narrow dehydrated environment described for the  $\text{K}^+$  channel SF. In this context, conduction mechanisms are also expected to be significantly different in these channels.

Here, free energy calculations and MD simulations with an applied TM voltage were harnessed to investigate the conduction mechanisms of  $\text{Na}^+$  channels. Altogether, these methodologies indicate that  $\text{Na}^+$  ions can bind to three main sites within the SF, named HFS, CEN and IN. Because the movement of ions and water is less restricted, a side-by-side configuration of ions is permitted. This implies in a conduction mechanism fundamentally different from what is known for  $\text{K}^+$  channels. What is more, this study describes an asymmetry in the conduction mechanisms taking place under hyperpolarizing/neutral ( $\Delta V \leq 0$ ) and depolarizing ( $\Delta V > 0$ ) conditions. Under  $\Delta V \leq 0$ , conduction involves two  $\text{Na}^+$  ions bound to the filter. Contrastingly, under  $\Delta V > 0$ , 3 ions participate and the approach of the third ion triggers the conduction. Perspectives of this study can impart some of the most interesting questions in the molecular biophysics field, such as: identify the determinants of ion selectivity; better understand the structure-function interplay in eukaryotic ICs, specially  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{++}$ ; the molecular mechanism of anesthetics action and nanobiotechnological applications.

# Sumário

<b>Lista de figuras e tabelas</b> .....	1
<b>I. Introdução</b> .....	2
<b>I.1 Condução Iônica</b> .....	3
<b>I.2 Canais Iônicos</b> .....	5
<b>I.3 Arquitetura Geral de Canais Iônicos</b> .....	6
<b>I.4 Canais de Potássio</b> .....	12
<b>I.5 Canais de Sódio</b> .....	15
<b>II. Objetivos</b> .....	18
<b>II.1 Objetivo Geral</b> .....	18
<b>II.2 Objetivos Específicos</b> .....	18
<b>III. Teoria e Métodos</b> .....	19
<b>III.1 Simulações de Dinâmica Molecular</b> .....	20
<b>III.2 Cálculo das Superfícies de Energia Livre</b> .....	24
<u>III.2.1 Metadinâmica</u> .....	25
<b>III.3 Distância Elétrica e Excesso de Energia Livre</b> .....	28
<u>III.3.1 Cálculo do Potencial Eletrostático</u> .....	29
<b>III.4 Aplicação de Potencial Eletrostático Transmembrânico em Simulações de DM</b> 30	
<u>III.4.1 Campo Elétrico</u> .....	30
<u>III.4.2 Desbalanço de Cargas</u> .....	31
<b>III.5 Protocolo Geral das Simulações</b> .....	32
<b>III.6 Protocolo das Simulações de Cálculo de Energia Livre</b> .....	33
<u>III.6.1 Configuração inicial do Sistema e Equilibração</u> .....	33
<u>III.6.2 Coordenada de Reação e Parâmetros da Metadinâmica</u> .....	34
<u>III.6.3 Análise das Superfícies de Energia Livre</u> .....	36
<u>III.6.4 Caminho de mínima energia livre (MEP)</u> .....	36
<u>III.6.5 Cálculo do Potencial Eletrostático Transmembrânico</u> .....	37
<b>III.7 Protocolo das Simulações Com Aplicação de Voltagem</b> .....	37
<u>III.7.1 Configurações iniciais dos sistemas polarizados</u> .....	37
<u>III.7.2 Análise Probabilística das Trajetórias</u> .....	38
<b>IV. Resultados</b> .....	40

<b>IV.1 Sítios de Ligação de Na<sup>+</sup> no Filtro de Seletividade.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.2 Mecanismo de Condução Iônica a 0 mV.....</b>	<b>44</b>
<b>IV.3 Superfície de energia livre Em Função da Aplicação de Potencial Transmembrânico.....</b>	<b>46</b>
<b>IV.4 Mecanismo de Condução Sob Aplicação de Potenciais Transmembrânicos.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.5 Contribuição do Terceiro Na<sup>+</sup>.....</b>	<b>53</b>
<b>V. Discussão.....</b>	<b>55</b>
<b>V.1 Mecanismo de Condução em Canais de Sódio.....</b>	<b>56</b>
<b>V.2 Flexibilidade do Filtro de Seletividade.....</b>	<b>61</b>
<b>V.3 Efeitos de Polarização.....</b>	<b>63</b>
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>VII. Perspectivas.....</b>	<b>68</b>
<b>VII.1 Mecanismo de Seletividade.....</b>	<b>69</b>
<b>VII.2 Relação com Demais Canais Iônicos – K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> e canais de Na<sup>+</sup> eucariotos.....</b>	<b>71</b>
<b>VII.3 Modelos Mais Seletivos.....</b>	<b>72</b>
<b>VII.4 Modelo Cinético e Componentes da Superfície de Energia Livre.....</b>	<b>73</b>
<b>VII.5 Modulação de Canais de Sódio.....</b>	<b>74</b>
<b>VII.6 Canais Iônicos e Nanotecnologia.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>76</b>
<b>IX. Anexos.....</b>	<b>87</b>
<b>IX.1 Anexo 1: Conduction In a Biological Sodium Selective Channel.....</b>	<b>88</b>
<b>IX.2 Anexo 2: Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels.....</b>	<b>99</b>

## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Tabela 1</b> .....	<b>4</b>
<b>Tabela 2</b> .....	<b>7</b>
<b>Figura. 1</b> .....	<b>8</b>
<b>Figura. 2</b> .....	<b>10</b>
<b>Figura. 3</b> .....	<b>14</b>
<b>Figura. 4</b> .....	<b>16</b>
<b>Figura. 5</b> .....	<b>26</b>
<b>Figura. 6</b> .....	<b>27</b>
<b>Figura. 7</b> .....	<b>32</b>
<b>Figura. 8</b> .....	<b>34</b>
<b>Figura. 9</b> .....	<b>35</b>
<b>Figura. 10</b> .....	<b>42</b>
<b>Figura. 11</b> .....	<b>43</b>
<b>Figura. 12</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura. 13</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura. 14</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura. 15</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura. 16</b> .....	<b>51</b>
<b>Figura. 17</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura. 18</b> .....	<b>54</b>
<b>Figura. 19</b> .....	<b>57</b>
<b>Figura. 20</b> .....	<b>59</b>
<b>Figura. 21</b> .....	<b>70</b>

# **I. Introdução**

## I.1 Condução Iônica

Células, sejam elas eucariotas ou procariotas, são delimitadas por membranas. As membranas definem uma barreira seletiva que regula o fluxo de moléculas através desse limite, bem como coordenam séries de reações mais complexas, importantes ao funcionamento dos organismos. Em função da sua natureza essencialmente hidrofóbica, a membrana plasmática impõe uma considerável barreira energética à travessia de macromoléculas ou mesmo pequenos compostos polares ou carregados, como os íons. Em contrapartida, gases e pequenos compostos hidrofóbicos são capazes de atravessar livremente a membrana em um processo difusivo simples. A evidência de que o transporte de algumas dessas substâncias polares/carregadas ocorre de forma extremamente rápida e seletiva sugeriu a existência de estruturas que auxiliam seu transporte. Atualmente sabe-se que de fato existem estruturas embebidas nas membranas que racionalizam o transporte de espécies carregadas através do dielétrico. Essas estruturas são proteínas integrais de membrana (Alberts et al., 2002).

Tomemos como exemplo os íons, que são objetos de interesse desse trabalho. De forma geral, em uma solução aquosa em equilíbrio, íons se difundem sem direcionalidade, uma vez que estão imersos em um meio isotrópico. Quando inseridos em um meio específico, como o ambiente celular, em que dois banhos são separados por uma membrana seletiva, esse transporte é governado por duas tendências: a diferença de concentração da espécie iônica nos ambientes intra e extracelular; e a diferença de carga líquida entre esses dois meios. As diferenças de concentração geram um potencial químico, enquanto as diferenças de carga, um potencial elétrico. Assim, na ausência de outras influências, o transporte dos íons ocorrerá no sentido que esgota esses potenciais e conseqüentemente minimiza a energia livre do sistema. Conjuntamente, essas duas tendências geram o potencial eletroquímico, que pode ser macroscopicamente descrito na forma:

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_i}{C_e} + ZF \Delta V \quad [1]$$

onde R é a constante dos gases, T a temperatura,  $C_i$  e  $C_e$  as concentrações do íon no meio interno e externo, respectivamente. Esses formam o potencial químico. Ainda, Z é a carga do íon; F a

constante de Faraday e  $\Delta V$ , a diferença de potencial transmembrânico gerada pela distribuição desigual das cargas. Tais termos definem o potencial elétrico. O gradiente do potencial eletroquímico define portanto a direcionalidade do transporte.

Conforme o tipo de transporte que as proteínas integrais de membrana mencionadas realizam, este pode ser classificado nas seguintes categorias: transporte ativo ou difusão facilitada. No transporte ativo, proteínas geralmente denominadas transportadoras e bombas (bomba de prótons, bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , etc.) utilizam energia metabólica na forma de ATP para transportar substâncias contra seu gradiente eletroquímico. Tal transporte é responsável pela produção e manutenção de diferenças de concentração de solutos entre os meios intra e extracelular, que geram o gradiente eletroquímico. Por exemplo, a bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  transporta três  $\text{Na}^+$  intracelulares para fora da célula e dois  $\text{K}^+$  extracelulares para dentro, em um processo em que a hidrólise de ATP induz a fosforilação e uma consequente mudança conformacional da proteína. Assim, células eucarióticas geralmente apresentam meio extracelular rico em  $\text{Na}^+$  e com menor concentração de  $\text{K}^+$ , e meio intracelular com alta concentração de  $\text{K}^+$  e baixa de  $\text{Na}^+$ .

Já na difusão facilitada, os íons são transportados através da membrana sem gasto adicional de energia (i.e. transporte passivo), com auxílio de poros que delimitam um caminho de permeação hidrofílico, chamados canais iônicos (abaixo). O transporte de íons no interior desses canais iônicos possui portanto uma direcionalidade, regida pelo gradiente eletroquímico gerado pelas bombas.(Alberts et al., 2002) A concentração de íons livres em uma célula muscular de mamífero em condições fisiológicas é mostrada como exemplo da ação dessas proteínas na **Tabela.1**.

**Tabela.1** Concentração de íons livres em célula muscular esquelética de mamífero. (Hille, 1992)

Íon	Concentração extracelular (mM)	Concentração intracelular (mM)
$\text{Na}^+$	145	12
$\text{K}^+$	4	155
$\text{Ca}^{2+}$	1,5	$10^{-4}$
$\text{Cl}^-$	123	4,2

## I.2 Canais Iônicos

O desenvolvimento das técnicas de eletrofisiologia na primeira metade do século XX representou um grande avanço para a área de neurociências, permitindo uma melhor compreensão das propriedades elétricas de células excitáveis. Na série de artigos seminais de Alan Hodgkin e Andrew Huxley (Hodgkin and Huxley, 1952a, 1952b, 1952c, 1952d), é descrito pela primeira vez como o fluxo de íons através da membrana plasmática gera o chamado potencial de ação – um sinal elétrico capaz de transmitir informações, caracterizado pela transiente despolarização (elevação do potencial eletrostático transmembrânico) seguida pela repolarização (queda do potencial) da membrana celular. Somente a partir dos anos 1970, foi demonstrado que esse fluxo seletivo de íons era realizado por proteínas transmembrânicas, atualmente chamadas de canais iônicos (CIs) (Katz and Miledi, 1970). Desde então, diversos esforços têm sido direcionados para caracterizações extensivas tanto das estruturas e das funções de CIs, quanto dos processos por eles mediados. Ainda que o estudo de canais iônicos tenha tido seu início com a investigação de células excitáveis, atualmente é reconhecido que esses canais estão presentes em virtualmente todas as células (Alberts et al., 2002).

Canais iônicos (CIs) são proteínas integrais de membrana que formam poros hidratados que conectam as faces intra e extracelular das células e permitem o transporte passivo de íons através da membrana. Não por acaso, o estudo desses canais é particularmente relevante: o fluxo de íons é fundamental para diversas funções biológicas como determinação do potencial de repouso das células, contração muscular, sinapses, geração e transmissão de impulsos nervosos, percepção e consciência, controle da pressão osmótica, secreção hormonal, entre outros (Hille, 1992).

Os poros dos CI são dotados de mecanismos moleculares capazes de abrir e fechar o caminho de permeação, e portanto de controlar o fluxo de íons. A mudança conformacional que leva à abertura e ao fechamento, conhecida como *gating*, pode ser regulada por diferentes estímulos. Além disso, em geral, CIs permitem a passagem de determinada espécie iônica de forma altamente seletiva. Com isso, canais iônicos podem ser classificados segundo duas características biofísicas fundamentais: (i) o íon que é seletivamente transportado através do seu poro, sendo denominados essencialmente canais de sódio, potássio, cálcio ou cloro; (ii) o

estímulo que regula o processo de *gating*, podendo ser então dependentes de ligantes, de estímulos mecânicos, de pH, de nucleotídeos cíclicos, dependentes de voltagem, etc (Hille, 1992).

De acordo com o estímulo que regula o *gating* do canal, este pode apresentar estruturas especializadas na percepção do estímulo. Por exemplo, canais iônicos dependentes de voltagem apresentam um domínio transmembrânico sensível a voltagem acoplado a cada subunidade, enquanto o canal de  $K^+$  dependente da ligação de  $Ca^{2+}$  possui um domínio intracelular com sítios de ligação específicos. Como será discutido logo adiante, cada uma dessas classes de canais, apesar de poderem apresentar propriedades particulares, como condutância e seletividade iônica, apresentam um poro de condução com estrutura geral comum, que racionaliza seu funcionamento e o transporte quase difusivo de íons através da membrana plasmática.

### **I.3 Arquitetura Geral de Canais iônicos**

Em meados dos anos 1980, foi possível começar a elucidar a natureza molecular dos canais iônicos, em função dos grandes avanços alcançados em técnicas de biologia molecular, clonagem e sequenciamento (Noda et al., 1984; Tempel et al., 1987). Tais técnicas permitiram a determinação da estrutura primária, bem como supor a estrutura geral adotada por vários desses poros, via predição de estrutura secundária e comparação de sequências. Entretanto nenhum dado estrutural com nível de detalhamento atômico havia sido revelado até então. Devido à dificuldade em se cristalizar proteínas integrais de membrana, somente em 1998 o grupo do pesquisador Roderick Mackinnon conseguiu resolver a estrutura molecular de um canal de  $K^+$  bacteriano, o KcsA (Doyle et al., 1998). A elucidação da estrutura tridimensional desse poro constituiu um avanço significativo para o entendimento da relação estrutura-função de CIs e este é considerado um arquétipo de poro de condução em geral, em função da similaridade de sequências desse segmento em diferentes canais (Doyle et al., 1998). Ademais, desde a sua cristalização, estruturas cristalográficas de diversos outros canais iônicos seletivos a potássio e sódio foram resolvidas. (Brohawn et al., 2012; Jiang et al., 2002, 2003; Kuo et al., 2003; Long et al., 2005, 2007; McCusker et al., 2012; Miller and Long, 2012; Payandeh et al., 2011, 2012; Shaya et al., 2013;

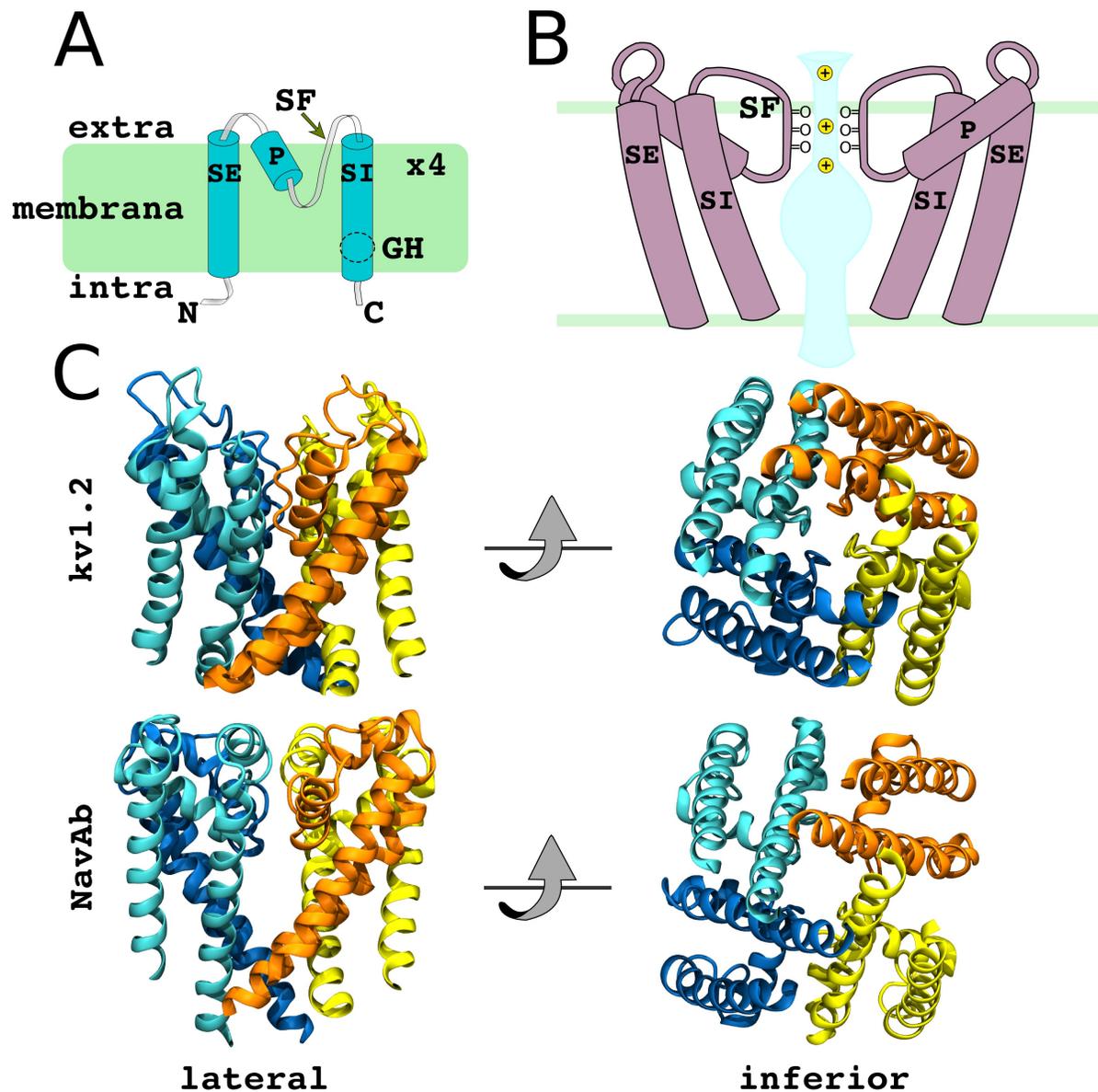
Zhang et al., 2012). Uma relação dos CIs com estruturas conhecidas é mostrada na **Tabela.2**.

**Tabela.2** Estruturas cristalográficas conhecidas de canais iônicos.

	Nome (organismo de origem)	Poros	Resolução do cristal (Å)	Referência	
Íon Seleccionado	K <sup>+</sup>	KcsA ( <i>Streptomyces lividans</i> )	Fechado	3,2	Doyle et al., 1998
		MthK ( <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> )	Aberto	3,3	Jiang et al., 2002
		KvAP ( <i>Aeropyrum pernix</i> )	Aberto	3,2	Jiang et al., 2003
		KirBac1.1 ( <i>Burkholderia pseudomalleri</i> )	Fechado	3,65	Kuo et al., 2003
		Kv1.2 (Humano)	Aberto	2,9	Long et al., 2005
		Kv1.2/Kv2.1 quimera (Humano)	Aberto	2,4	Long et al., 2007
		TRAAK (Humano)	Aberto	3,8	Brohawn et al., 2012
		TWIK1 (Humano)	Aberto	3,4	Miller and Long, 2012
	Na <sup>+</sup>	NavAb ( <i>Archobacter butzleri</i> )	Fechado	2,7 e 3,2	Payandeh et al., 2011, 2012
		NavRh ( <i>Rickettsiales sp.</i> )	Fechado	3,0	Zhang et al., 2012
		NavMs ( <i>Magnetococcus sp.</i> )	Aberto	4,2	McCusker et al., 2012
		NavAe1p ( <i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> )	Fechado	4,0	Shaya et al., 2013

Assim, tais experimentos e estruturas cristalográficas puderam conjuntamente demonstrar que canais iônicos são formados por subunidades, homólogas ou não, (ou repetições em uma única cadeia peptídica) que se arranjam de maneira a delimitar um poro. Cada subunidade (ou repetição) é composta por duas alfa-hélices transmembrânicas, denominadas aqui SI (segmento interno) e SE (segmento externo). Conectando os segmentos SI e SE, encontra-se a hélice do poro e um loop, chamado P-loop em referência ao poro. Este contém um motivo altamente conservado, responsável pela seletividade iônica do canal – o filtro de seletividade (FS). Abaixo do filtro de seletividade encontra-se a cavidade central, uma região do poro bem mais ampla, delineada por resíduos de aminoácido essencialmente apolares (Armstrong, 1969; Doyle et al., 1998). Na face mais intracelular da cavidade central encontra-se o chamado *gate* hidrofóbico, uma região do poro composta por resíduos hidrofóbicos, cuja constrição define os estados aberto e fechado do canal, e regula a condução iônica. Como demonstrado em uma variedade de estudos

(abaixo), esses dois arranjos moleculares (filtro de seletividade e *gate* hidrofóbico) constituem peças fundamentais à maquinaria de funcionamento de CIs, cuja estrutura geral é ilustrada na **Figura. 1**.



**Figura. 1:** Estrutura de canais iônicos. **A:** Topologia de um domínio de canal iônico. O arranjo tetramérico de segmentos externo (SE) e interno (SI) formam o poro de condução. P é a hélice do poro e SF o filtro de seletividade; GH é o *gate* hidrofóbico; C e N indicam as extremidades C e N-terminal da cadeia peptídica, respectivamente. **B:** Ilustração do arranjo tridimensional de

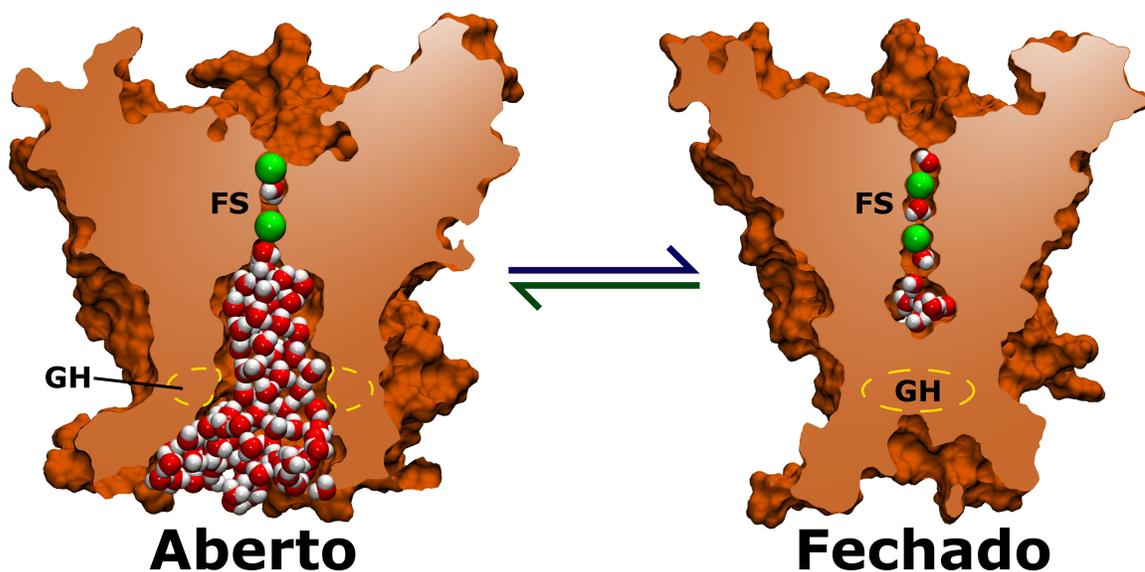
duas das quatro subunidades. Superfície em azul indica o caminho de permeação hidratado quando o poro está aberto. O filtro de seletividade apresenta oxigênios (provenientes de grupos carboxila ou carbonila, segundo o canal) que estabilizam os cátions (esferas amarelas) que atravessam esse poro. C: estrutura cristalográfica do poro de dois canais iônicos, um seletivo a  $K^+$  (Kv1.2) e outro seletivo a  $Na^+$  (NavAb), ilustrando a semelhança do arranjo estrutural em diferentes canais.

A existência de um *gate* hidrofóbico já foi comprovada para uma variedade de canais seletivos a diferentes espécies iônicas (e.g.: Barber et al., 2012; Treptow and Klein, 2010; Nury et al., 2010; Sotomayor and Schulten, 2004; Payandeh et al., 2012). Assim, ao contrário do FS, que apresenta particularidades segundo o canal analisado, o *gate* parece ser um traço comum aos CIs em geral, tanto estrutural quanto funcionalmente.

O conjunto de resíduos hidrofóbicos que constituem o *gate*, equipa os canais iônicos com um mecanismo intrínseco de controle de condução. Em simulações de DM extremamente longas com o canal de  $K^+$  Kv1.2, foi demonstrado que na presença do estímulo que ativa o canal, o *gate* hidrofóbico transita entre conformações abertas e fechadas, em função da hidratação/desidratação transiente do poro (Jensen et al., 2010). Uma observação que está em consonância com a abertura estocástica de canais evidenciada por experimentos de eletrofisiologia (*patch-clamp*) (Hamill et al., 1981). Em contrapartida, na ausência desse estímulo, o *gate* se mantém essencialmente fechado. A investigação acima corrobora diversos estudos anteriores que demonstram ainda que a constrição da região do *gate* (característica da conformação “fechada”) desidrata o caminho de permeação e impõe uma pena energética muito grande à condução iônica (Beckstein et al., 2004; Hénin and Chipot, 2004; Treptow and Tarek, 2006a). **Figura. 2**

Em oposição, quando aberto, o caminho de permeação permite a passagem de íons a altas taxas. Como aferido por experimentos de eletrofisiologia, essa passagem é da ordem de  $10^6$  íons. $s^{-1}$  para canais de  $K^+$  e de  $Na^+$ , condizente com um transporte quase difusivo dos íons (LeMasurier et al., 2001). Essas altas taxas de condução são possibilitadas pela hidratação do caminho de permeação quando da abertura do canal e pela consequente ação estabilizadora das moléculas de água nos íons sendo translocados. Adicionalmente, o fato de o poro conter resíduos

hidrofóbicos previne que íons interajam de forma excessivamente favorável com o caminho de permeação e não sejam conduzidos.



**Figura. 2:** Abertura e fechamento do poro. O mecanismo que controla a passagem de íons pelo canal age pela constrição do gate hidrofóbico (localizado no segmento interno) e consequente desidratação do caminho de permeação. Aqui, FS é o filtro de seletividade; GH é o gate hidrofóbico. Moléculas de água (branco e vermelho) e íons (verde) são mostrados no interior do poro. Observe a completa desidratação do caminho de permeação na conformação fechada (direita), descontinuando a passagem de íons.

Claramente, para viabilizar a passagem de íons de um lado a outro da membrana, o canal deve estar apto a conduzir esses íons. Funcionalmente, são definidos três estados para canais iônicos: aberto, fechado e inativado. Enquanto o estado aberto corresponde a um canal capaz de conduzir íons, os demais estados fechado e inativado não o são. No estado fechado, a permeação iônica é impedida pelo fechamento do *gate* hidrofóbico, como mencionado acima. Já no estado inativado, mesmo com o *gate* aberto, é proposto que mudanças conformacionais induzidas após longos períodos de despolarização ocorram em outras regiões do canal, inibindo a condução (Cordero-Morales et al., 2006; Domene et al., 2008; Imai et al., 2010). A situação em que tais mudanças ocorrem no filtro de seletividade é referida como mecanismo de inativação tipo C (C-

*type inactivation*).

Em 2011, a primeira estrutura cristalográfica de um canal de sódio, o canal dependente de voltagem procariótico NavAb (do organismo *Arcobacter butzleri*), foi resolvida com resolução de 2.7 Å (Payandeh et al., 2011). NavAb é um canal iônico dependente de voltagem (CIDV) e como tal apresenta um domínio especializado, sensível a pequenas mudanças no potencial elétrico da membrana plasmática – o domínio sensor de voltagem (DSV). Os DSVs regulam o mecanismo de abertura e fechamento do *gate* em CIDVs conforme potenciais hiperpolarizados ou despolarizados induzem a ativação ou desativação desses domínios. Como esperado, mesmo se tratando de um canal dependente de voltagem, características conservadas entre CIs são evidentes no domínio do poro desse canal. (**Figura. 1, C**) NavAb é formado por homotetrâmeros, onde cada subunidade é composta por duas alfa-hélices transmembrânicas (SI e SE); possui uma região mais constricta na face extracelular, correspondente ao filtro de seletividade; bem como também apresenta no caminho de permeação uma região mais intracelular equivalente ao *gate* hidrofóbico (Payandeh et al., 2012).

Nesse contexto, e considerando os aspectos que determinam o estado condutivo de um canal iônico, é interessante mencionar que o canal NavAb foi cristalizado em uma conformação não condutiva, com o poro central fechado e domínios sensores de voltagem aparentemente ativados. Tal conformação, interpretada como representativa de um estado intermediário na rota de ativação do canal, impõe nítidas limitações à investigação dos mecanismos de condução iônica.

Um estudo recente realizado por Amaral e colaboradores (Amaral et al., 2012) mostrou que, na conformação em que os DSVs foram cristalizados, a conformação DSV ativado-poro aberto de NavAb não é estabilizada. Quando equilibrado em uma membrana hidratada, o poro fecha, indicando que os DSVs não estão completamente ativados. De fato, uma comparação com o canal de potássio Kv1.2, cuja estrutura ativada-aberta já é bem caracterizada (Jensen et al., 2012; Long et al., 2005; Treptow and Tarek, 2006b), mostra que o DSV do NavAb se encontra parcialmente ativado (Amaral et al., 2012). Assim, baseando-se em estudos prévios relacionados à investigação dos estados funcionais (ativado-aberto e desativado-fechado) do canal de K<sup>+</sup> Kv1.2 (Delemotte et al., 2011), essa pesquisa foi capaz de modelar a conformação completamente ativada-aberta de NavAb inserido em uma membrana fosfolipídica hidratada.

Notavelmente, o poro dessa estrutura na conformação aberta é estável nas escalas de tempo amostradas (~40 ns). De posse dessa estrutura, e em um contexto de crescente desenvolvimento de técnicas e poder computacional, torna-se possível investigar em detalhes os mecanismos de transporte iônico através de toda a extensão do canal de sódio.

#### **I.4 Canais de Potássio**

A discussão acima evidencia que a estrutura geral dos poros de CIs é notadamente semelhante, divergindo significativamente apenas na região do filtro de seletividade. Isto posto, dado o papel do FS na função desempenhada por CIs, é pertinente analisá-lo em mais detalhes.

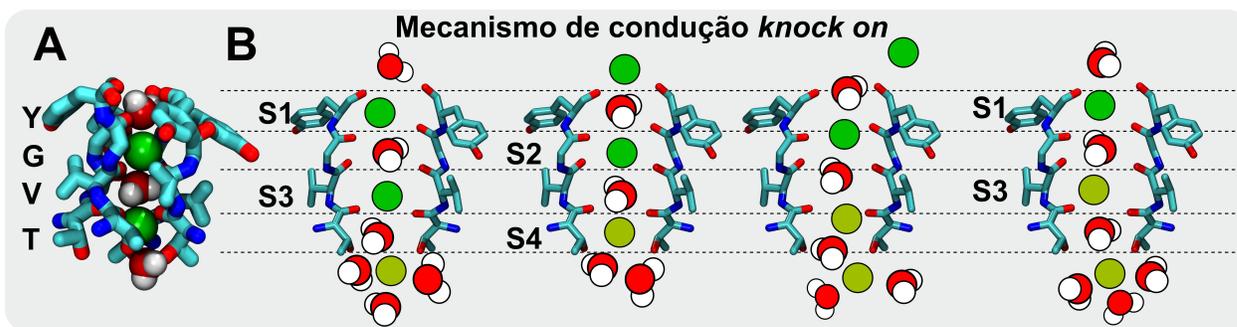
Canais de potássio são os mais bem estudados entre os membros da família de canais iônicos, de forma que grande parte dos avanços metodológicos tanto em áreas experimentais, quanto na biofísica computacional foram desenvolvidos nesse modelo estrutural. Essa predileção pode ser atribuída, ao menos parcialmente, ao fato de canais de  $K^+$  terem sido os primeiros a terem estruturas cristalográficas de alta resolução determinadas. Ainda como consequência, as principais caracterizações de canais iônicos foram inicialmente realizadas em canais de  $K^+$ , que são portanto importantes referências no estudo dos demais canais.

Como indicado primeiramente pela estrutura do KcsA e em seguida confirmado pelas demais estruturas de canais de potássio (inclusive o canal iônico dependente de voltagem de mamífero Kv1.2) (Brohawn et al., 2012; Jiang et al., 2002, 2003; Kuo et al., 2003; Long et al., 2005; Miller and Long, 2012) o filtro de seletividade altamente conservado entre canais seletivos a  $K^+$  é composto por quatro segmentos, um de cada subunidade. Cada um desses segmentos contém a sequência consenso de resíduos de aminoácido TVGYG (Heginbotham et al., 1994), e juntos formam uma região constricta de aproximadamente 12 Å de comprimento.

A quantidade de informações que podem ser extraídas unicamente das estruturas cristalográficas no entanto é limitada a dados estáticos em um meio distinto ao natural, de forma que informações dinâmicas a respeito de mudanças conformacionais e mecanismos devem ser avaliados por outros métodos. Assim, providos dessas estruturas, diversos grupos passaram a empregar além das técnicas experimentais, métodos computacionais, em particular a dinâmica

molecular (DM), a fim de caracterizar os detalhes atomísticos da estrutura e dinâmica desses canais. Segundo tais investigações, portanto, o filtro de seletividade de canais de  $K^+$  é estreito e rígido o suficiente para impor que íons  $K^+$  sejam quase completamente desidratados ao entrar, mantendo apenas uma das moléculas de água de sua camada de hidratação. O custo energético relativo à retirada da camada de solvatação do cátion é contrabalanceado pelo FS, onde os íons são coordenados (na geometria octaédrica preferencial) pelos grupamentos carbonila da cadeia principal dos resíduos do FS, todas direcionadas para o lúmen do caminho de permeação. Nesse arranjo foram identificados quatro sítios de ligação, denominados S1 a S4 (Guidoni et al., 2000; Morais-Cabral et al., 2001). **Figura. 3**

No contexto da condução iônica, é proposto que os sítios de ligação acomodem alternadamente moléculas de água e íons  $K^+$ , em uma única fila alinhada ao eixo de simetria do filtro (Berneche and Roux, 2000; Khalili-Araghi et al., 2006; Zhou and MacKinnon, 2004). Apesar de a condução em canais de  $K^+$  ser um processo com altos valores de condutância associados, na maioria dos estudos, a amostragem completa do processo ainda é limitada pelas escalas de tempo presentemente alcançadas por simulações computacionais. Dessa forma, simulações de DM associadas a metodologias para se melhorar a amostragem do espaço de fase também foram empregadas (Aqvist and Luzhkov, 2000; Bernèche and Roux, 2001; Treptow and Tarek, 2006c). Segundo esses estudos, o mecanismo preferencial levando à condução de  $K^+$  é aquele no qual o filtro alterna entre duas configurações com pelo menos dois íons ligados ao FS: S2 - S4, e S1 - S3, com moléculas de água nos sítios não ocupados pelos íons. A chegada de um íon externo ao FS catalisa a alternância entre tais configurações em um movimento coordenado entre íons e água, bem como a condução em si, com a saída de um dos íons para o meio extracelular. Esse mecanismo de condução é conhecido como *knock-on*, uma vez que um terceiro íon é requerido para incitar a liberação de um dos íons ligados ao FS (**Figura. 3**). Mais recentemente, simulações considerando potenciais eletrostáticos transmembrânicos reiteram o mecanismo preferencial de condução observado em canais de potássio, *knock-on* (Jensen et al., 2010; Khalili-Araghi et al., 2006).



**Figura. 3:** Mecanismo de condução preferencial em canais de  $K^+$ . **A:** Filtro de seletividade de canais de  $K^+$  com a sequência conservada TVGY. Os oxigênios dos grupos carbonila da cadeia principal definem sítios de ligação aos íons. **B:** Mecanismo de condução knock-on. Íons  $K^+$  se ligam preferencialmente aos sítios S2 e S4 ou S1 e S3, com moléculas de água alternadas. A chegada de um terceiro  $K^+$  estimula a condução de um dos íons inicialmente no filtro.

O FS tem a impressionante capacidade de distinguir entre espécies iônicas extremamente semelhantes, sem no entanto limitar o transporte rápido e difusivo do íon adequado. Por exemplo, o canal de  $K^+$  dependente de voltagem de mamíferos, Kv1.2, seleciona íons  $K^+$  com taxa  $K^+ : Na^+$  da ordem de até 10000:1 (LeMasurier et al., 2001; Neyton and Miller, 1988; Nimigean and Miller, 2002), conquanto ambos íons são cátions monovalentes e só diferem em 0,38 Å no raio atômico – 1,33 Å para  $K^+$  contra 0,95 Å para  $Na^+$ . Uma variedade de hipóteses são propostas para a seleção de íons  $K^+$ . Segundo tais hipóteses, a seletividade pode ser alcançada em função da natureza química dos ligantes compondo o FS, (Noskov et al., 2004; Roux et al., 2011) da geometria e número de coordenação proporcionada ao íon no interior do FS (Bostick and Brooks, 2007) ou pelas características cinéticas da condução de diferentes íons (Thompson et al., 2009). Além disso, a energia necessária para desidratar íons  $K^+$  é menor do que a requerida para desidratar íons  $Na^+$ . Considerando as características do FS de canais de  $K^+$ , um ambiente estreito e que requer a desidratação do íon na entrada, este fator contribui também para a alta seletividade dos canais de  $K^+$ . É interessante ressaltar ainda que, apesar de a sequência do FS ser extremamente conservada entre canais seletivos a  $K^+$ , estes apresentam uma variedade de taxas de permeação. Isso sugere portanto que outros fatores contribuem para o mecanismo de seletividade iônica e ajustam mais finamente as taxas de condução e seletividade. De fato,

demonstrou-se que o ambiente imediatamente próximo ao filtro de seletividade tem influência significativa tanto na estabilidade do filtro em sua conformação condutiva, quanto no perfil de energia-livre associado à permeação de íons  $K^+$ . (Cordero-Morales et al., 2007; Treptow and Tarek, 2006c) Por exemplo, dentre outras diferenças, enquanto o canal de  $K^+$  KcsA apresenta o resíduo ácido glutâmico na posição 71 (especialmente localizado atrás do FS, interagindo com as cadeias laterais dos resíduos do filtro), o canal Kv1.2 apresenta uma valina. Uma mutação pontual substituindo o Glu pela Val no Kv1.2 torna o perfil de energia livre associado a condução de íons  $K^+$  muito semelhante àquele do canal KcsA. (Treptow and Tarek, 2006c).

## **I.5 Canais de Sódio**

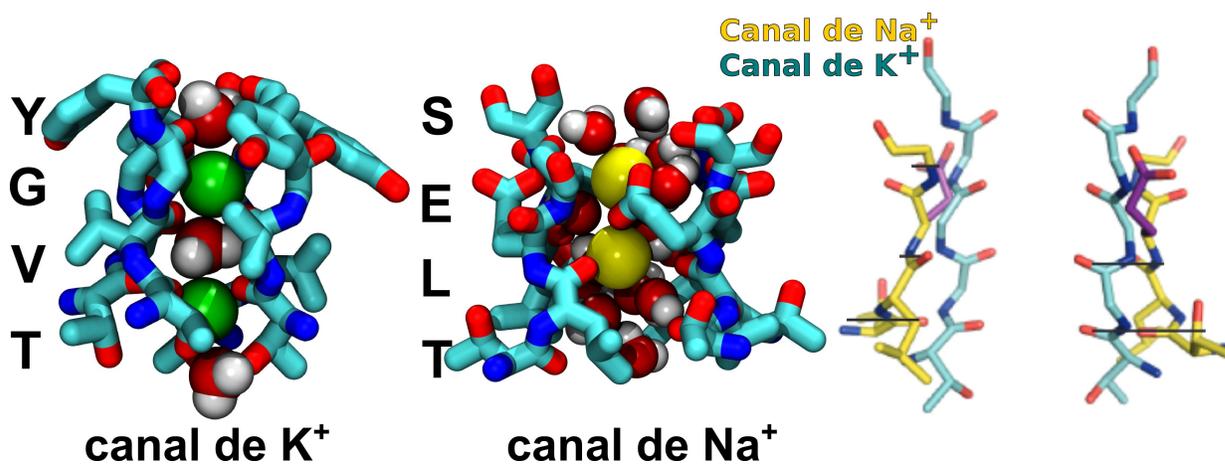
À luz do que foi desenvolvido para canais de  $K^+$ , diversas frentes de pesquisa buscam estender os conhecimentos relativos a estrutura e mecanismos de funcionamento para demais CIs. No entanto, por um longo período esse avanço foi refreado pela ausência de informações estruturais atômicas, em vista da ainda desafiante tarefa de se cristalizar proteínas integrais de membrana.

Estudos anteriores empregando toxinas específicas que se ligam na entrada extracelular de canais de sódio, bem como estudos de mutagênese foram capazes de identificar resíduos, do poro de condução de canais de sódio de rato, envolvidos na seletividade iônica (Heinemann et al., 1992; Noda et al., 1989; Terlau et al., 1991). Entretanto, a compreensão da forma como esses resíduos se arranjam no espaço tridimensional só foi possível recentemente, com a resolução em 2011 da estrutura cristalográfica do canal de  $Na^+$  NavAb. Seguido de um curto intervalo, a estrutura tridimensional de outros canais de sódio, também bacterianos, foram publicadas (cf. Tabela.1): NavRh (Zhang et al., 2012) do organismo *Rickettsiales sp.*; NavMs (McCusker et al., 2012), de *Magnetococcus sp.* e NavAb em duas conformações potencialmente inativadas (Payandeh et al., 2012). Com esse evento, uma ampla gama de oportunidades foram criadas no sentido de se conhecer mais a respeito desse e demais CIs relacionados.

O filtro de seletividade como apresentado nas estruturas cristalográficas desses canais de  $Na^+$  tem comprimento e raio de aproximadamente 10 Å e 4,6 Å, respectivamente, sendo portanto

mais curto e largo o suficiente para comportar íons  $\text{Na}^+$  hidratados em seu interior (**Figura. 4**). Mesmo na parte mais constricta do filtro, o anel de glutamatos, este seria capaz de acomodar um íon sódio com duas moléculas de água no mesmo plano (Payandeh et al., 2011). Corroborando essa ideia, um estudo recente de dinâmica molecular aponta que a camada de coordenação de um íon por moléculas de água no FS de NavAb é semelhante àquela de íons completamente solubilizados e que estes íons dispõem de relativa mobilidade no interior do FS (Carnevale et al., 2011). Ainda nesse estudo, foi demonstrado que o fluxo de moléculas de água não é acoplado ao transporte de íons, o que reitera a expectativa de que os mecanismos de condução em canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  sejam fundamentalmente diferentes.

O filtro de seletividade dos canais NavAb e NavMs apresenta a sequência conservada TLES, Thr<sup>175</sup>, Leu<sup>176</sup>, Glu<sup>177</sup> e Ser<sup>178</sup>, e Thr<sup>51</sup>, Leu<sup>52</sup>, Glu<sup>53</sup> e Ser<sup>54</sup> para NavAb e NavMs, respectivamente. A partir da estrutura cristalográfica do NavAb, hipotetizou-se a existência de três sítios de ligação aos íons sódio: sítio HFS (*high field strength*) formado pelos grupos carboxila da cadeia lateral do Glu<sup>177</sup> e do grupo carbonila da Ser<sup>178</sup>; sítio CEN (central) e sítio IN (interno) compostos pelos grupos carbonila da Leu<sup>176</sup> e Thr<sup>175</sup>, respectivamente (Payandeh et al., 2011).



**Figura. 4:** Detalhe dos filtros de seletividade de canais de  $\text{K}^+$  (esquerda) e  $\text{Na}^+$  (centro) e sobreposição das estruturas cristalográficas dos FSs (direita, adaptado de Payandeh et al., 2011). Aqui, evidencia-se as principais diferenças entre os FSs. O FS do canal de  $\text{Na}^+$  é visivelmente mais curto e amplo que o FS do canal de  $\text{K}^+$ . No FS de canais de  $\text{Na}^+$ , os íons  $\text{Na}^+$  (esferas amarelas) apresentam maior hidratação; íons e moléculas de água não estão restritas

*a uma conformação alinhada. Ainda, observa-se que íons  $\text{Na}^+$  podem ser coordenados por oxigênios provenientes da cadeia lateral dos resíduos do filtro. A sequência de aminoácidos característica de cada filtro de seletividade é mostrada ao lado da estrutura.*

A resolução de tais estruturas de canais de  $\text{Na}^+$  possibilitou pela primeira vez uma comparação direta entre as estruturas tridimensionais de canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , particularmente na região do filtro de seletividade. Nesse sentido, diferenças fundamentais entre esses filtros de seletividade são evidentes (**Figura. 4**). Canais de  $\text{K}^+$  possuem um FS mais estreito e longo, onde íons são quase completamente desidratados ao entrar; os oxigênios que coordenam os íons no interior do filtro são provenientes exclusivamente dos grupos carbonila da cadeia principal dos resíduos do filtro; bem como íons e água estão preferencialmente alinhados ao eixo de simetria do canal. De forma muito contrastante, canais de  $\text{Na}^+$  comportam íons hidratados, não necessariamente alinhados ao eixo de simetria em função de seu FS ser mais amplo; além disso, íons podem ser coordenados por oxigênios da cadeia principal ou da cadeia lateral dos aminoácidos, em diferentes regiões do filtro. Naturalmente, é esperado que essas diferenças repercutam de forma significativa nos mecanismos de condução e seletividade desses canais e portanto instigam questões relevantes a respeito dos possíveis mecanismos levando à condução em canais de  $\text{Na}^+$ .

## II. Objetivos

### II.1 Objetivo Geral

Caracterizar o mecanismo de condução em canais de  $\text{Na}^+$  utilizando como modelo estrutural o canal NavAb via simulações de Dinâmica Molecular e cálculos de energia livre.

### II.2 Objetivos Específicos

1. Calcular a superfície de energia livre relativa à permeação de íons  $\text{Na}^+$  pelo canal NavAb a 0 mV;
2. Amostrar eventos de condução via simulações sob a influência de potenciais eletrostáticos transmembrânicos hiperpolarizados ( $\Delta V < 0$ ) e despolarizados ( $\Delta V > 0$ );
3. Definir os sítios e afinidades de ligação a  $\text{Na}^+$  no filtro de seletividade (FS) de NavAb, no equilíbrio ( $\Delta V = 0$ ) e sob a influência de potenciais eletrostáticos transmembrânicos.

### **III. Teoria e Métodos**

O objetivo do presente capítulo consiste em equipar o leitor com as ideias e conceitos essenciais à compreensão das ferramentas utilizadas na realização desse trabalho. Conquanto metodologias mais recentes serão discutidas com um pouco mais de detalhes, em absoluto esta seção se propõe a ser uma exposição minuciosa do desenvolvimento dos métodos e algoritmos. Métodos e teorias bem estabelecidas como simulações de dinâmica molecular e seus detalhes técnicos, amostragens estatísticas dos sistemas simulados, etc, já foram cuidadosamente compiladas e podem ser consideradas em maiores detalhes em diversas referências, como (Allen and Tildesley, 1989) ou (Frenkel and Smit, 2002). Além disso, as referências pertinentes também são indicadas no texto.

### III.1 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)

A dinâmica molecular (DM) é uma metodologia computacional cujo princípio consiste na produção de trajetórias para um número finito de partículas por meio da integração numérica das equações clássicas de movimento. Seu objetivo final é o cálculo de propriedades dinâmicas médias de um dado sistema microscópico. Assim, para um sistema ergódico (como é assumido para a maioria dos sistemas simulados em DM), a média termodinâmica da propriedade de interesse é calculada na forma de uma média temporal segundo o esquema:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}_t = \langle A \rangle, [2]$$

onde  $A$  é qualquer propriedade;  $\bar{A}_t$  e  $\langle A \rangle$  são médias temporais e termodinâmicas, respectivamente.

Além do cômputo de grandezas medidas experimentalmente (e.g. temperatura, pressão, calor específico, etc.), avanços significativos na acurácia das descrições dos sistemas, bem como no poder computacional concederam às simulações de DM um importante papel como experimento computacional, capaz de prever o comportamento de sistemas moleculares de interesse. Mais do que isso, métodos teóricos computacionais, como a DM, são capazes de

fornecer informações dinâmicas a nível molecular atômico presentemente inalcançáveis via técnicas experimentais, seja pelo poder de resolução, seja porque as condições experimentais são de difícil controle (Frenkel and Smit, 2002).

A descrição do sistema mencionada acima é condicionada a uma função de energia potencial  $U(\mathbf{r}^N)$ , onde  $\mathbf{r}^N$  corresponde às coordenadas de cada uma das  $N$  partículas.  $U(\mathbf{r}^N)$  é a principal função dos cálculos de DM, uma vez que dela derivam as forças agindo em todas as partículas de um sistema. Associada a parâmetros moleculares, que definem constantes de equilíbrio e cargas parciais obtidas a partir de cálculos quânticos, esta compõe o campo de força. O campo de força é portanto um conjunto de descrições das interações intra e intermoleculares do sistema. (Feller and MacKerell, 2000) Diversos campos de força clássicos para simulações de dinâmica molecular estão atualmente disponíveis, e.g.: GROMOS (Schuler et al., 2001), CHARMM (Feller and MacKerell, 2000; MacKerell et al., 1998) e AMBER (Ponder and Case, 2003). Apesar das particularidades da implementação, de forma geral, os componentes de  $U(\mathbf{r})$  podem ser divididos em termos de (i) interações ligadas: energias de ligação, angulares e diedrais; e (ii) interações não ligadas: energias de van der Waals e eletrostática. (cf. Equação [3])

$$U(\mathbf{r}) = \sum_{\text{ligação}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} \sum_n \frac{U_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{\substack{i < j \\ (i, j) > 1-4}} \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{i < j \\ (i, j) > 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon r_{ij}} ; [3]$$

Aqui, respectivamente,  $k_r$  e  $k_\theta$  são constantes de força de ligação e angular;  $r_0$  e  $\theta_0$  são distâncias e ângulos de equilíbrio;  $U_n/2$ ,  $n$  e  $\gamma$  são barreira torsional, sua periodicidade e fase;  $\epsilon$  é a constante dielétrica;  $q_i$  é a carga parcial do átomo  $i$ ;  $R_{ij}^*$  e  $\varepsilon_{ij}$  correspondem aos parâmetros e à força de van der Waals para o par  $ij$ .

Em geral, os sistemas simulados em DM têm número de átomos da ordem de  $10^4$ . Portanto, por se tratar de um sistema de tamanho limitado, é esperado que efeitos de borda tenham influência significativa em seu comportamento. A fim de minimizar tais efeitos nos

limites do sistema, condições periódicas de contorno (PBC, do inglês *periodic boundary conditions*) são comumente aplicadas. Brevemente, nesse esquema, o sistema completo de interesse é compartimentalizado em uma célula unitária mínima e réplicas dessa caixa mínima circundam a célula original em todas as direções ( $\pm x$ ,  $\pm y$ ,  $\pm z$ ). Cada partícula que atravessa os limites de uma célula é representada por uma partícula que se reinsere na célula pelo limite oposto. Porque todas as réplicas são idênticas, só precisam ser representadas uma única vez no código de dinâmica.

As simulações de DM conduzidas nesse estudo são simulações atomísticas, o que equivale dizer que cada átomo foi explicitamente considerado no cálculo das interações descritas acima, sem entretanto considerar graus de liberdade eletrônicos. Atualmente, uma variedade de programas podem ser utilizados para conduzir simulações de dinâmica molecular (Bhandarkar et al., 2002; Brooks et al., 2009; Lindahl et al., 2001). O código de dinâmica molecular empregado no presente trabalho é o NAMD (Bhandarkar et al., 2002; Phillips et al., 2005) e portanto os aspectos apresentados a seguir referem-se aos algoritmos e metodologias nele implementados.

No programa, a integração do movimento das partículas é realizada com o chamado algoritmo de Verlet (Verlet, 1967). Com esse algoritmo, definidas as posições e velocidades em um dado instante,  $\mathbf{r}(t)$  e  $\mathbf{v}(t)$ , as posições no instante seguinte  $t + \delta t$  são derivadas da expansão de Taylor das posições da partícula em  $t + \delta t$  e  $t - \delta t$ , de forma que:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \delta t^2 + O(\delta t^4). [4]$$

Igualmente, utilizando essa expansão pode-se calcular as velocidades, requeridas para o cálculo da energia total do sistema:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2). [5]$$

A despeito do considerável aumento do tempo computacional, um passo de integração ( $\delta t$ ) infinitesimal, da ordem de 2 femtosegundos ( $10^{-15}$  s), é requerido para assegurar a

conservação de energia do sistema (Frenkel and Smit, 2002).

Por padrão, simulações de dinâmica molecular geram trajetórias em uma amostra microcanônica i.e., com número de partículas, volume e energia total constantes (NVE). Entretanto, é interessante realizar simulações em condições mais próximas às experimentais, como isotérmicas (NVT, amostra canônica) ou isotérmicas e isobáricas (NPT). Para tanto, modificações no algoritmo utilizado são necessárias, e diversos esquemas estão disponíveis.

Uma amostra isotérmica pode ser simulada utilizando-se o termostato de Nosé-Hoover (Hoover, 1985; Nosé, 1984). Em linhas gerais, um banho térmico na temperatura média desejada é considerado via adição de um grau de liberdade não físico  $w$ , independente do tempo no Hamiltoniano do sistema. Dessa forma, a velocidade de uma partícula  $i$  pode ser escrita como:

$$\mathbf{v}_i = w \dot{\mathbf{r}}_i = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i w} \quad [6]$$

onde  $\mathbf{p}_i$  e  $m_i$  são o momento e a massa da partícula  $i$ . Os termos cinético  $K_w$  e potencial  $U_w$  associados a  $w$  podem ser considerados o termostato do sistema e são escritos como:

$$U_w = k_B T (f+1) \ln w \quad [7] \text{ e}$$

$$K_w = \frac{1}{2} Q \dot{w}^2 \quad [8]$$

tal que  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura;  $Q$  é um parâmetro relacionado à inércia termal e regula a flutuação da temperatura e  $f$  é o número de graus de liberdade do sistema. Essa abordagem é também conhecida como Lagrangiano estendido.

O mesmo formalismo do Lagrangiano estendido pode também ser empregado para se manter a pressão constante. O acoplamento a uma variável externa  $V$ , dessa vez representando um pistão que age no sistema e altera o volume da caixa de simulação, mantém a pressão constante (Andersen, 1980). Uma combinação dessas duas abordagens possibilita simular sistemas NPT.

## III.2 Cálculo das Superfícies de Energia Livre

Como mencionado em III.1 simulações de dinâmica molecular são empregadas com o intuito de se calcular propriedades termodinâmicas de equilíbrio do sistema analisado. Uma propriedade particularmente interessante no estudo de processos biológicos é a energia livre. Assim, a energia livre  $A(s)$  de um sistema, descrita em termos de uma coordenada de reação  $s$ , pode ser dada por:

$$A(s^*) = -k_B T \ln P(s^*) + A_0 \quad [9]$$

onde a probabilidade  $P(s^*)$  é:

$$P(s^*) = \frac{\int dX \delta(s^* - s) e^{-\beta H(X)}}{\int dX e^{-\beta H(X)}} \quad [10]$$

tal que  $\beta = 1/k_B T$ ;  $A_0$  é um valor de referência, constante;  $X = \{r_1, r_2, \dots, r_N, p_1, p_2, \dots, p_N\}$  representa o espaço de configurações e momentos dos  $N$  átomos e  $H(X)$  o Hamiltoniano do sistema.

Deve-se notar no entanto, que na prática eventos raros (i.e.: configurações com energias muito altas; eventos que ocorrem em escalas de tempo mais longas do que a simulada, etc.) geralmente não são amostrados de forma satisfatória. Ainda nesse sentido, funções de energia potencial suficientemente realistas são intrinsecamente complexas e de lenta convergência, o que frequentemente inviabiliza o uso dessa abordagem no cálculo da energias livre. Em geral, para se amostrar completamente o espaço configuracional do sistema, é necessário conduzir simulações por um tempo muito longo. A fim de tornar o cálculo da energia livre mais eficiente, diversos métodos avançados de amostragem podem ser empregados, e.g: *Umbrella Sampling*, *Adaptive Biasing Force* (ABF), *Free Energy Perturbation* (FEP), Integração Termodinâmica e Metadinâmica. Aqui, exploraremos os princípios da metadinâmica que é a metodologia empregada nesta investigação.

### III.2.1 Metadinâmica

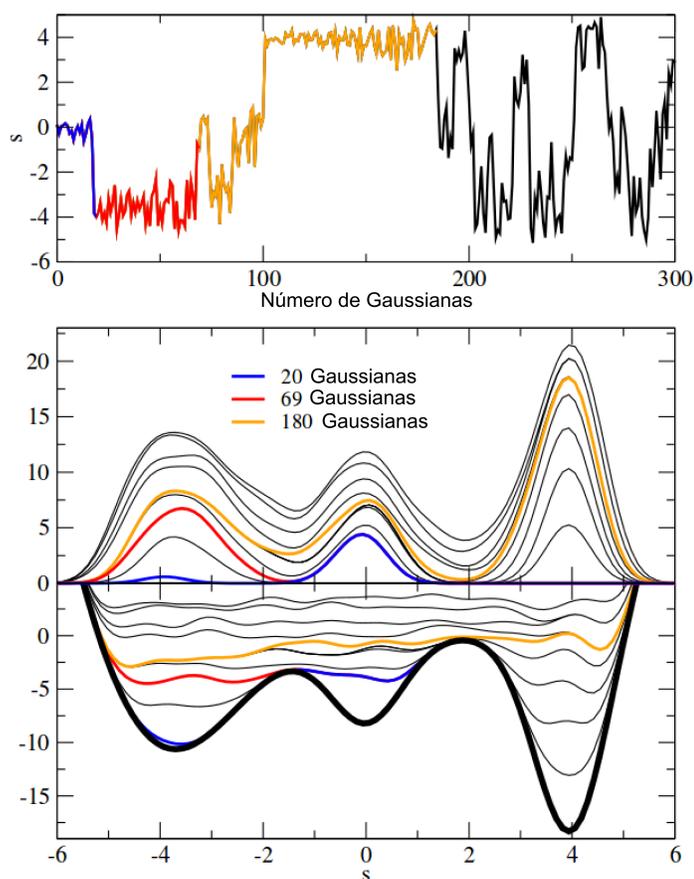
A metadinâmica (Laio and Gervasio, 2008; Laio and Parrinello, 2002) é um algoritmo utilizado para acelerar a amostragem de eventos raros e reconstruir superfícies de energia livre de sistemas descritos por Hamiltonianos complexos. Para tanto, a evolução temporal do sistema é enviesada por um potencial repulsivo proveniente da soma de gaussianas centradas na trajetória seguida por um conjunto de variáveis coletivas previamente definidas. Tais variáveis coletivas definem a coordenada de reação e podem ser qualquer função das posições atômicas. A soma dessas gaussianas é então utilizada para reconstruir iterativamente um estimador da energia livre do sistema, bem como para forçá-lo a escapar de mínimos de energia.

O potencial aplicado  $U_{MD}$  é dependente das gaussianas adicionadas previamente ou seja, depende do histórico de vieses já aplicados ao sistema e é da forma:

$$U_{MD}(S(\chi), t) = w \sum_{t'} e^{\left( - \sum_{\alpha=1}^d \frac{(S_{\alpha}(\chi) - s_{\alpha}(t'))^2}{2 \delta s_{\alpha}^2} \right)} \quad [11]$$

onde os parâmetros  $w$  e  $\delta s$  correspondem respectivamente à altura e à largura da gaussiana e  $t'$  é a frequência com que as gaussianas são adicionadas.  $\chi$  é um conjunto de coordenadas (e.g. posições atômicas),  $s$  é um vetor  $d$ -dimensional que representa a variável coletiva definida e  $S(x)$  é a função de coordenadas que assume valor  $s(t)$  no instante  $t$ ; tal que  $s(t) = S(x(t))$ , para  $d$  dimensões.

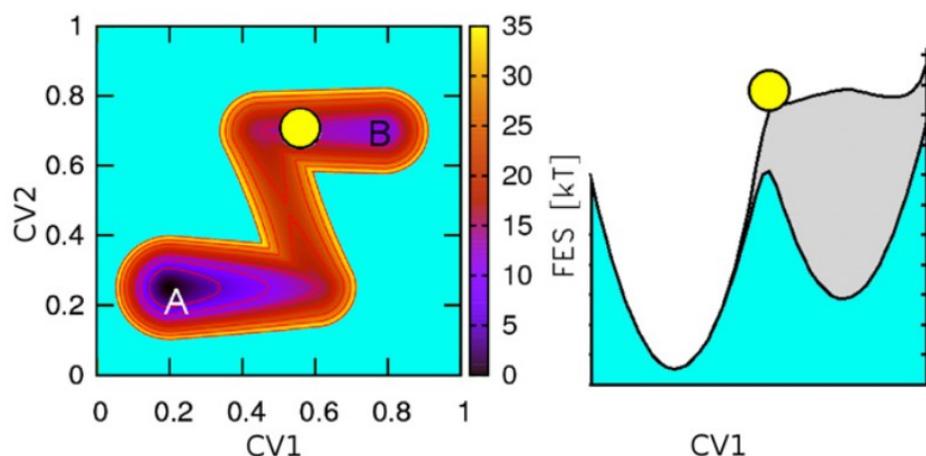
O princípio da metadinâmica é que esse potencial iterativo é capaz de compensar mínimos da superfície de energia livre do sistema original, permitindo que ele escape desses vales e explore eventos menos prováveis. Dessa forma, é possível calcular a altura das barreiras pelo “negativo” das gaussianas adicionadas. Quando  $U_{MD} = -A(s)$ , a superfície de energia livre se torna plana e mesmo configurações pouco prováveis são amostradas. (**Figura. 5**)



**Figura. 5:** *Potencial iterativo da metadinâmica. Painel superior: trajetória unidimensional de um sistema na coordenada  $s$ , com três mínimos de energia (linha preta espessa, painel inferior), em função do número de gaussianas adicionadas. Após “preencher” todos os mínimos, é possível amostrar livremente a coordenada  $s$ . Painel do meio: Evolução temporal do potencial  $U_{\text{MD}}$ . Em azul, vermelho e amarelo estão ilustrados os potenciais aplicados  $U_{\text{MD}}$  quando o primeiro, segundo e terceiro mínimos de energia são preenchidos, respectivamente. Painel inferior: Evolução temporal da soma do potencial  $U_{\text{MD}}$  com a superfície de energia livre  $A(s)$  (linha preta espessa). Cores das linhas indicam quantas gaussianas foram adicionadas. Adaptado de Laio e Gervasio, 2008.*

Uma questão central no cálculo de superfícies de energia livre, diz respeito à definição da coordenada de reação (CR). Particularmente, canais iônicos são sistemas complexos com muitos graus de liberdade de forma que definir uma coordenada capaz de modelar o seu comportamento

ao longo do processo de condução no nível de detalhe atômico não é uma tarefa trivial. Negligenciar graus de liberdade relevantes para a reação analisada ou ainda amostrar de forma ineficiente a coordenada escolhida resultam em efeitos como histerese e não-convergência, e portanto em estimativas equivocadas para as energias. (**Figura. 6**) Em contrapartida, definir uma coordenada de reação que compreende diversos graus de liberdade, aumenta o custo computacional de forma proibitiva. Portanto, quando CR são definidas, estas devem representar unicamente os graus de liberdade que influenciam diretamente a propriedade analisada.



**Figura. 6:** Impacto da negligência de graus de liberdade relevantes para a superfície de energia livre final. Esquerda: superfície hipotética 2-D de energia livre descrita por dois graus de liberdade,  $CV1$  e  $CV2$ . Direita: trajetória produzida em uma simulação com cálculos de metadinâmica utilizando apenas  $CV1$ . Observe que  $CV1$  sozinha não é capaz de descrever a transição de  $A$  para  $B$  (ilustrados na figura da direita pelos dois mínimos de energia), e gera medidas equivocadas das barreiras. Retirado de Laio e Gervasio, 2008.

Além da coordenada de reação, outro aspecto relativo à qualidade dos cálculos deve ser considerado. Os parâmetros  $w$  e  $\delta s$  mencionados acima (cf. Equação [11]) influenciam tanto a acurácia da superfície recuperada, quanto a eficiência com que a conta é realizada. Por exemplo, se  $U_{MD}$  tem  $\delta s$  muito grande, ou seja uma gaussiana muito larga, os mínimos de energia serão rapidamente preenchidos, porém características da superfície que tenham escala menor que  $\delta s$  são negligenciadas. Em contrapartida, valores mais baixos de altura e largura aumentam a

sensibilidade do cálculo ao mesmo tempo que aumentam o tempo necessário para amostrar o espaço configuracional.

### III.3 Distância elétrica e excesso de energia livre

O cálculo de metadinâmica acima foi utilizada para gerar perfis de energia livre na ausência de potenciais eletrostáticos transmembrânicos, i.e. a 0 mV. Entretanto, é interessante considerar como a aplicação de voltagem influencia a superfície final de energia livre, em particular quando se trata de sistemas cujo funcionamento está intimamente relacionado à diferença de potencial elétrico transmembrânico.

A imposição de uma diferença de potencial entre as faces interna e externas da membrana gera um excesso de energia livre que estimula o transporte dos íons através do poro dos canais iônicos na direção que esgota esse potencial. Nesse contexto, é útil que seja possível relacionar o excesso de energia livre que surge em um sistema em decorrência da aplicação de voltagem com a diferença de potencial imposta. De fato, isso pode ser feito de acordo com a seguinte expressão:

$$\Delta A(\Delta V) = A(V) - A(0) \text{ , [12]}$$

tal que  $A(V)$  pode ser aproximado por,

$$A(V) = V \sum q_{ion} \delta_{ion}(z) \text{ , [13]}$$

onde  $A(0)$  é o perfil de energia livre calculado a 0 mV, ou a componente química da energia livre, e  $A(V)$  é a energia livre na presença de um potencial eletrostático transmembrânico  $V$  (componente elétrica da energia livre) que atua em cada partícula carregada do sistema  $q_{ion}$ , particularmente representadas pelos íons.

Aqui,  $\delta_{ion}(z)$ ,

$$\delta_{ion}(z) = \frac{\partial}{\partial V} \varphi_{ion}(z)|_{V=0} \text{ [14]}$$

é a distância elétrica percorrida pelo íon e representa a fração adimensional do potencial

transmembrânico na posição  $z$  do íon. Em outras palavras, é o grau de acoplamento do potencial eletrostático local  $\varphi_{ion}(z)$  com o potencial transmembrânico  $\Delta V \cdot \delta_{ion}(z)$  representa portanto não a distância física percorrida por uma partícula carregada, mas sim a fração do campo elétrico atravessado por ela. Observa-se que tais conceitos não são de maneira nenhuma intercambiáveis, principalmente em situações em que o campo elétrico é focalizado.

Segundo esse formalismo, é possível portanto racionalizar os efeitos da aplicação de voltagem na superfície de energia livre calculada a 0 mV pelos cálculos de metadinâmica. Além disso, torna-se possível realizar uma comparação mais direta entre esses resultados e os obtidos via simulações em condição de hiper e despolarização.

### III.3.1 Cálculo do Potencial Eletrostático (PE)

Para calcular a distância elétrica definida acima, é necessário conhecer o potencial eletrostático local ao longo da direção transmembrânica  $z$ . Simulações de DM fornecem a posição de cada átomo, bem como sua carga parcial, de forma que é possível calcular o potencial eletrostático  $\varphi(\mathbf{r}, \Delta V)$  do sistema, em uma coordenada  $\mathbf{r}$ , considerando explicitamente a contribuição de cada átomo  $i$  na resolução da equação de Poisson:

$$\nabla^2 \varphi(\mathbf{r}, \Delta V) = -4\pi \sum_{i=1}^n \rho_i(\mathbf{r}) \quad [15]$$

aqui,  $\rho_i(\mathbf{r})$  é a carga pontual na coordenada  $\mathbf{r}$ , aproximada por uma Gaussiana esférica. Um mapa 3-D médio de  $\varphi(\mathbf{r}, \Delta V)$  pode ser obtido pela média dos mapas calculados ao longo de uma simulação de DM (Aksimentiev and Schulten, 2005). Especialmente interessante é o cálculo do potencial eletrostático transmembrânico, uma vez que essa grandeza pode ser comparada a medidas experimentais de eletrofisiologia, além de ser a força motriz fundamental no funcionamento dos CIs (Hille, 1992). A partir dos mapas 3-D obtidos pelo método descrito acima, é possível extrair o potencial eletrostático ao longo da direção transmembrânica  $\varphi(z)$  do sistema pela média de  $\varphi(\mathbf{r}, \Delta V)$  no plano xy.

### III.4 Aplicação de Potencial Eletrostático Transmembrânico em Simulações de DM

Usualmente, experimentos visando o estudo de fenômenos intrinsecamente dependentes de voltagem, como a condução iônica, devem gerar uma diferença de potencial através da membrana plasmática. Essa diferença pode ser alcançada via desbalanço iônico explícito gerado por diferenças de concentração de espécies carregadas entre os meios intra e extracelulares (como em experimentos de *clamp* de voltagem), ou pela reorganização dos eletrólitos estimulada por um pulso de voltagem transmembrânica (*patch clamp*).

Em simulações de dinâmica molecular, com uso de condições periódicas de contorno (PBC), gerar uma diferença de potencial elétrico via desbalanço explícito de íons não é uma tarefa óbvia, uma vez que o banho interno (externo) interage com a imagem periódica do banho externo (interno) e estes entram em equilíbrio (cf. III.1). Dessa forma, protocolos alternativos para contornar essa dificuldade foram desenvolvidos.

#### III.4.1 Campo elétrico

No contexto acima, uma estratégia simples para simular diferenças de potencial elétrico é a aplicação de um campo elétrico uniforme  $E$  ao longo da direção normal à membrana (Crozier et al., 2001; Suenaga et al., 1998; Tieleman et al., 2001; Zhong et al., 1998). Nesse método, a diferença de voltagem resultante  $V$  é calculada na forma:

$$V = |E| \cdot L_z, [16]$$

onde  $L_z$  é o tamanho médio em  $z$  da caixa simulada. Na prática, isso é implementado aplicando-se uma força  $F = E \cdot q_i$  em todos os átomos  $i$  com carga  $q$ . Apesar de constituir um método bem aceito e de simples implementação mesmo com o uso de PBC, a aplicação sistemática de forças pode ter efeitos na distribuição de cargas e/ou orientação de dipolos no interior da

proteína, por exemplo. Além disso, em sistemas celulares, a diferença de potencial transmembrânica surge de uma distribuição desigual de cargas entre as soluções interna e externa, gerando um pequeno desbalanço de cargas na vizinhança da membrana plasmática. Comparativamente portanto, a aplicação do campo elétrico constitui um método artificial para gerar diferenças de potencial eletrostático (Roux, 2008).

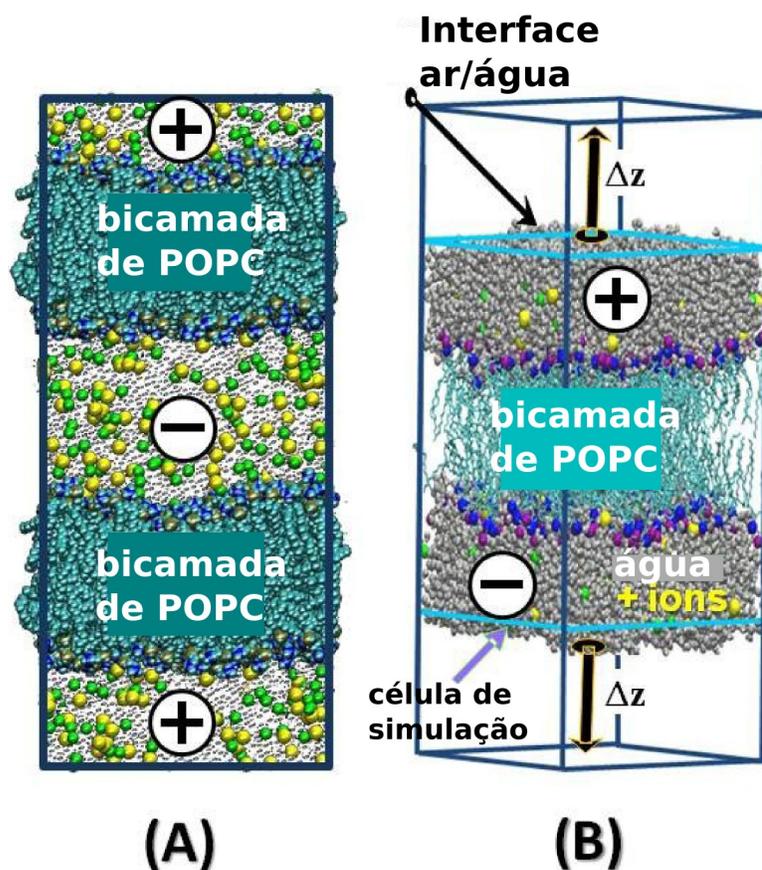
### III.4.2 Desbalanço de Cargas

Uma abordagem alternativa possibilita gerar diferenças de potencial mais realísticas pelo desbalanço explícito de íons através da membrana, mantendo PBCs em todas as dimensões do sistema, contanto que uma das duas condições a seguir sejam impostas:

(i) Em um dos métodos propostos, voltagens transmembrânicas são produzidas em um sistema formado por uma célula unitária contendo três banhos e duas bicamadas lipídicas (Sachs et al., 2004) (**Figura. 7, A**). Apesar de isolar os banhos, o método aumenta significativamente o número de átomos simulados devido à introdução de outra bicamada fosfolipídica, e por consequência aumenta o custo computacional do cálculo.

(ii) Uma variação do método acima, o *Charge Imbalance Protocol* (Delemotte et al., 2008), proposta por Treptow e colaboradores, contorna o inconveniente do aumento do número de átomos pela introdução de banhos delimitados por uma interface solução-vácuo, gerada pela extensão da célula unitária na direção perpendicular à membrana (**Figura. 7, B**).

Inicialmente o sistema é simulado em uma amostra NPT, com interação entre banhos internos e externos, para devida equilibração dos eletrólitos, área por fosfolipídio, etc. Em seguida, a interface banho-vácuo é introduzida e as simulações passam a ser realizadas a volume constante (NVT), de forma a manter a separação entre banhos das imagens. Essa interface banho-vácuo deve ser grande o suficiente para impedir a interação entre os banhos internos e externos. Com esse *setup* portanto, é possível impor uma diferença de potencial pelo desbalanço explícito de íons, sem o custo computacional imputado pelo método (i).



**Figura. 7** Sistemas com desbalanço de cargas. **A:** Nessa situação, o banho central é isolado do banho da extremidade pelas bicamadas lipídicas. **B:** Aqui a membrana adicional é substituída por uma interface água/vácuo produzida pela extensão da caixa de simulação na coordenada  $z$ . Em ambos os casos, a diferença de potencial é gerada pelo desbalanço explícito de íons de um banho para outro. Retirada da Tese de Amaral, C. (Amaral, 2013).

### III.5 Protocolo Geral das Simulações

Todas as simulações foram conduzidas no programa de dinâmica molecular NAMD2 (Bhandarkar et al., 2002). A dinâmica de Langevin foi empregada para manter constante a temperatura de 27° C (algoritmo de Nosé-Hoover) e a pressão a 1 atm. Condições periódicas de contorno (PBC), foram aplicadas nos eixos  $x$ ,  $y$ , e  $z$ , a fim de evitar efeitos de borda nos limites

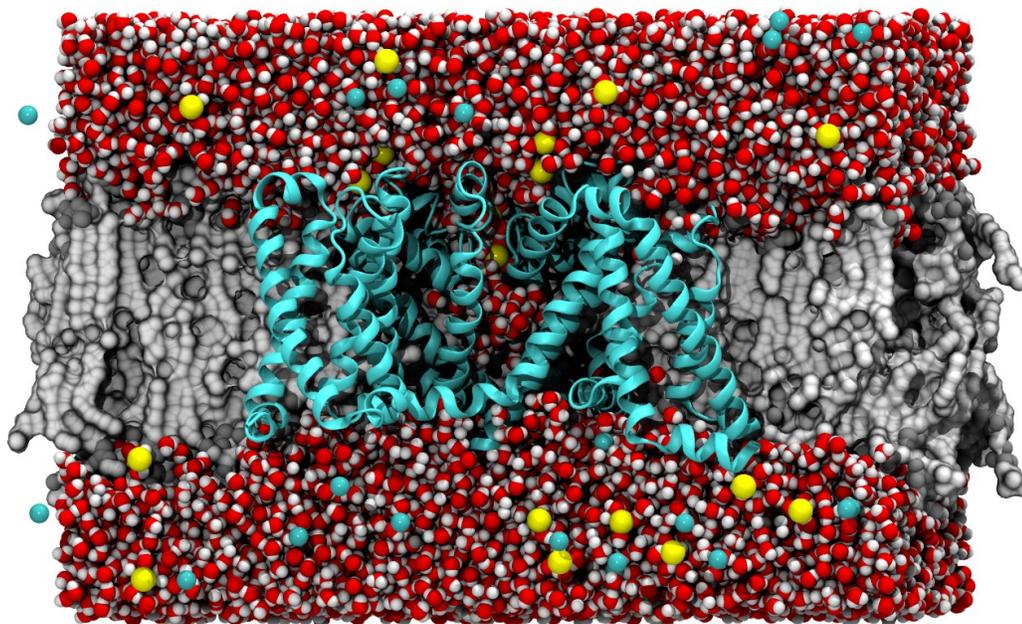
do sistema. Integração das equações de movimento foi feita pelo algoritmo de Verlet, com um passo de integração de 2 fs. Interações de curto e longo alcance foram computadas a cada 1 e 2 passos de integração, respectivamente. As ligações químicas entre os hidrogênios e os demais átomos do sistema foram restringidas a seu valor de equilíbrio com o algoritmo SHAKE. Interações de longo alcance eletrostáticas foram computadas pelo algoritmo PME (do inglês *Particle Mesh Ewald*) (Darden et al., 1993). As simulações empregaram o campo de força clássico não polarizável CHARMM22-CMAP para proteínas (MacKerell Jr et al., 1998, 2004) e CHARMM27 (Feller and MacKerell Jr, 2000) para lipídios. Foi adotada uma representação de átomos unidos para os elementos de carbono da cadeia alifática do fosfolípido POPC (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina). Considera-se que íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  possuem carga +1, +1 e -1, respectivamente. Moléculas de água são descritas pelo modelo TIP3 (Jorgensen et al., 1983). Imagens dos sistemas moleculares foram preparadas com o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (Humphrey et al., 1996).

### III.6 Protocolo das Simulações de Cálculo de Energia Livre

#### III.6.1 Configuração Inicial do Sistema e Equilibração

O ponto de partida utilizado advém de uma investigação prévia, empregando a estrutura cristalográfica do canal iônico NavAb (Carnevale et al., 2011). Em detalhes, NavAb foi inserido em uma bicamada fosfolipídica hidratada por uma solução de NaCl (~100 mM). A construção do sistema contém aproximadamente 434 palmitoil-oleoil-fosfatidil-colinas (POPC), 28173 moléculas de água TIP3, 36 íons sódio e 44 íons cloro, totalizando 129799 átomos. Esse *setup* foi equilibrado nas condições supracitadas ao longo de ~0.15  $\mu\text{s}$  em uma amostra NPT. Durante esse período, a estrutura se manteve estável, com RMSD (do inglês *Root Mean Square deviation*, uma medida de desvio estrutural) < 3.5 Å para o domínio transmembrânico e ~1.5 Å para o filtro de seletividade. Ainda durante essa trajetória, o filtro de seletividade do canal é espontaneamente ocupado por dois íons. A estrutura final equilibrada, contendo dois íons  $\text{Na}^+$  no interior do filtro de seletividade foi utilizada como configuração inicial para os cálculos de metadinâmica. **Figura.**

8

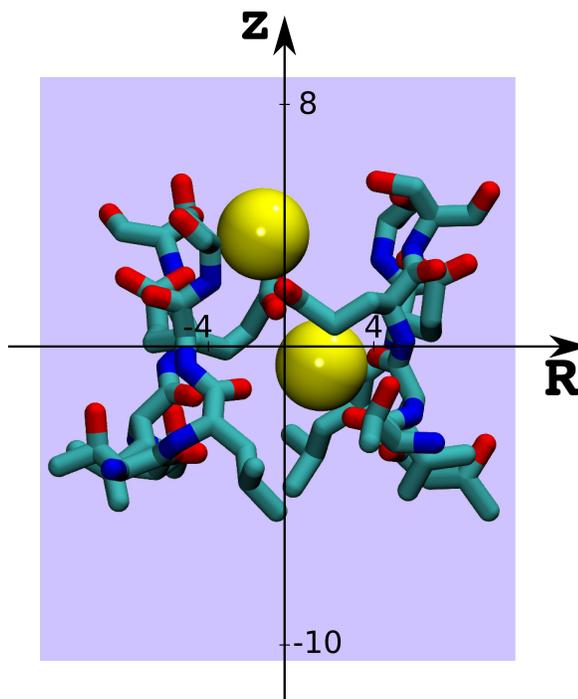


**Figura. 8** Sistema inicial das simulações com cálculos de metadinâmica. Estrutura cristalográfica do NavAb (azul) equilibrada, inserida em uma bicamada fosfolipídica POPC (cinza), completamente hidratada por uma solução de NaCl a aproximadamente 100 mM. Moléculas de água: esferas em vermelho e branco; Esferas amarelas são íons  $\text{Na}^+$  e esferas azuis  $\text{Cl}^-$ . Observe os íons  $\text{Na}^+$  hidratados no interior do filtro de seletividade.

### III.6.2 Coordenada de Reação e Parâmetros da Metadinâmica

Como mencionado em I.5, o filtro de seletividade do canal NavAb é relativamente amplo, de forma que os íons são capazes de se deslocar tanto verticalmente, ao longo do eixo perpendicular à membrana, quanto horizontalmente. Assim, para avaliar a superfície de energia livre referente ao processo de permeação de dois íons no filtro de seletividade do CI NavAb, definiu-se uma coordenada de reação (CR) de quatro dimensões (4-D), a saber: a distância ao longo caminho de permeação, normal em relação à membrana (eixo z); e a distância radial desse eixo (R, definido no plano x,y), para cada um dos dois íons presentes no FS. Em todos os casos,

o centro geométrico dos carbonos alfa do resíduo Glu<sup>177</sup> foi utilizado como referência. (**Figura. 9**) A fim de definir uma coordenada de reação quadridimensional, o módulo de variáveis coletivas implementado no programa NAMD foi utilizado (Hénin et al., 2010)



**Figura. 9** Coordenada de reação dos cálculos de metadinâmica. A coordenada  $z$  e  $R$  é definida para cada um dos dois íons no interior do filtro de seletividade, tendo como referência o centro geométrico dos carbonos-alfa dos glutamatos 177. As coordenadas amostradas vão de  $z = -10,0 \text{ \AA}$  a  $z = 8,0 \text{ \AA}$  e de  $R = -4,0 \text{ \AA}$  a  $R = 4,0 \text{ \AA}$ . Note que com essa definição de  $CR$ , os íons podem adotar configurações “lado a lado” em toda a extensão do FS.

Além disso, os seguintes parâmetros foram definidos:

- Altura da gaussiana,  $w = 0,3 \text{ kcal/mol}$  ;
- Largura da gaussiana ao longo de  $z$ ,  $\delta s_z = 0,25$  ;
- Largura da gaussiana ao longo de  $R$ ,  $\delta s_R = 0,25$  ;
- Extensão da coordenada amostrada em  $z$ ,  $-10,0 \leq z \leq 8,0 \text{ \AA}$  ;
- Extensão da coordenada amostrada em  $R$ ,  $R \leq 4,0 \text{ \AA}$  ;

Em ambos casos (z e R) a amostragem da coordenada foi restrita aos limites acima por barreiras de 100 kcal/mol. Os cálculos de metadinâmica totalizaram 180 ns, ao fim dos quais houve convergência dos resultados.

### III.6.3 Análise das Superfícies de Energia Livre

Em função da coordenada de reação escolhida acima, a metadinâmica fornece como resultado o valor de energia livre associado a essa coordenada na forma:

$$R1, z1, R2, z2, A(R1, z1, R2, z2).$$

De forma equivalente à equação [9]:

$$A(R1, z1, R2, z2) = -k_B T \ln P(R1, z1, R2, z2) + A_0 \quad [17]$$

A fim de viabilizar a análise dos dados, essa superfície de energia livre quadridimensional (4-D) gerada foi projetada em subespaços 1-D (axial) e 2-D (axial-radial e axial-axial). Para tanto, primeiramente, foi calculada a distribuição de probabilidades 4-D. Segue da equação [17] acima que:

$$P(R1, z1, R2, z2) = e^{-\beta[A(R1, z1, R2, z2) - A_0]} \quad [18]$$

Em seguida, computou-se a distribuição marginal de probabilidades no espaço 1-D (z) e 2-D, (z, z') ou (z, R), via integração nas coordenadas remanescentes, considerando os íons como indistinguíveis. A partir dessas distribuições de probabilidade, recuperou-se as superfícies de energia livre projetadas nos subespaços correspondentes,  $G(z)$ ,  $G(z, z')$  e  $G(z, R)$  na forma da equação [17].

### III.6.4 Caminho de mínima energia livre (MEP)

A fim de encontrar o caminho de mínima energia livre conectando os pontos iniciais e

finais do processo de condução na superfície  $G(z, z')$ , i.e.: um íon no interior do filtro e outro no banho externo ou na cavidade central, utilizou-se o algoritmo modificado *nudged elastic band*. A partir de uma hipótese inicial do trajeto composto por um número finito  $i$  de pontos na superfície, o MEP é encontrado por meio da minimização, via algoritmo de Monte Carlo, da seguinte função de energia:

$$E = \sum_{i=1}^{N-1} k(l_{i,j+1} - l_0) + G(z_i, z_i') \quad [19]$$

Aqui,  $N$  é o número de pontos utilizados para descrever o caminho de mínima energia livre,  $k$  e  $l_0$  são parâmetros empíricos,  $l_{i,j}$  é a distância entre dois pontos consecutivos no caminho e  $G(z_i, z_i')$  é a energia livre no  $i$ -ésimo ponto, em função das duas coordenadas axiais.

### III.6.5 Cálculo do Potencial Eletrostático Transmembrânico

Nas simulações geradas nesse estudo, os mapas tridimensionais do PE foram estimados pelo algoritmo PME (Batcho et al., 2001) (do inglês, *Particle Mesh Ewald*) implementado no programa VMD. O inverso da largura de  $\rho_i(\mathbf{r})$ ,  $\sigma$  vale  $0,25 \text{ \AA}^{-1}$  e a densidade do *grid* em que a equação [15] foi resolvida é  $1,5 \times 1,5 \times 1,5 \text{ \AA}^3$ .

## **III.7 Protocolo das Simulações Com Aplicação de Voltagem**

### III.7.1 Configurações iniciais dos sistemas polarizados

Com o intuito de investigar a condução iônica no canal NavAb sob a influência da aplicação de potenciais transmembrânicos, a estrutura aberta-ativada desse canal (cf. I.3) foi empregada. Após a simulação de 40 ns gerada para equilibrar essa estrutura, foi atribuída ao

solvente uma concentração de 100 mM de NaCl, seguida de mais aproximadamente 15 ns de simulação, ambas no esquema NPT. A fim de poder comparar os resultados de ambas metodologias (metadinâmica e simulações polarizadas), dois íons foram inicialmente alocados no interior do filtro de seletividade. Esse sistema relaxado, com dois íons no FS, foi simulado por mais ~30 ns, gerando os pontos de partida dos sistemas com aplicação de voltagem. Cada configuração inicial é espaçada 1 ns da seguinte na trajetória do sistema equilibrado. Em seguida, o protocolo *charge imbalance* (cf. III.4.2), foi aplicado às configurações iniciais da estrutura aberta-ativada desse canal a fim de obter uma diferença de potencial transmembrânica de aproximadamente 600 mV. Apesar de essa ser uma diferença de potencial aproximadamente 10 vezes maior do que a observada fisiologicamente (~ -70 mV), esta foi escolhida para acelerar os eventos de condução amostrados. 14 sistemas hiperpolarizados ( $\Delta V = -600 \text{ mV}$ ) e 8 despolarizados ( $\Delta V = 600$ ) foram gerados.

### III.7.2 Análise probabilística das trajetórias

Para fins de análise das trajetórias, os íons inicialmente presentes no FS são denominados  $i$  e  $j$ , enquanto o terceiro íon mais próximo do filtro participando do evento de condução é chamado  $k$ .

Todas as probabilidades analisadas foram computadas a partir da frequência de eventos observados no decorrer da totalidade de trajetórias de dinâmica molecular. Especificamente, a fim de se calcular a ocupância  $\rho$  de um dado íon  $\text{Na}^+$  ao longo da direção  $z$  do caminho de permeação (cf. Figura.14) computou-se a frequência  $h(z, t)$  nas trajetórias, isto é:

$$\rho(z) = \frac{1}{\Delta t} \int h(z, t) dt, \quad [20]$$

$\Delta t$  sendo o tempo total das simulações.

Tomados em conjunto, os resultados dos cálculos de energia livre permitem identificar 3 sítios de ligação para o íon sódio na região do filtro de seletividade a saber, os sítios HFS, CEN e IN (cf. IV.1). Além desses, as trajetórias polarizadas foram analisadas levando-se em

consideração o fracionamento adicional do caminho de permeação nas regiões EX, CC e OT. Aqui EX identifica a entrada extracelular do filtro de seletividade, CC a região da cavidade central e OT a região imediatamente intracelular. Essa partição facilitou a análise dos eventos de condução iônica ao longo de todo o caminho de permeação.

Dito isso, considere um estado  $m_{ij}$  que caracteriza uma posição específica dos íons  $i$  e  $j$  na coordenada axial-axial  $(z, z')$  em um instante  $t$ , tal que  $m_{ij}$  pode a princípio assumir qualquer um dos valores de  $x = \{EX-EX, EX-HFS, EX-CEN, EX-IN, EX-CC, EX-OT, HFS^2, HFS-CEN, HFS-IN, HFS-CC, HFS-OT, CEN^2, CEN-IN, CEN-CC, CEN-OT, IN^2, IN-CC, IN-OT, CC^2, CC-OT, OT^2\}$ . Nessa notação, “2” denota uma configuração de íons lado a lado. Assim, de forma similar ao cálculo da ocupância, a probabilidade do estado  $P_{m_{ij}}$  é definida pela frequência com que os íons são encontrados no dado estado, normalizado pela duração da simulação.

A probabilidade de transição  $P_{mn}$  de um estado  $m_{ij}$  para um outro estado  $n_{ij}$ , definido da mesma forma que  $m_{ij}$ , é calculada para um intervalo de tempo de 20 ps e assegura a seguinte

$$\text{condição de normalização: } \sum_n \sum_m P_{mn} = 1 .$$

A distribuição de probabilidades de se encontrar o íon  $k$  em uma dada coordenada axial  $z$ , condicionadas à posição dos outros dois íons  $i$  e  $j$  (definida acima como o estado  $m_{ij}$ ) é definida pela seguinte relação:

$$P_{k,m}(m_{ij}; z) = P_k(z|m_{ij})P(m_{ij}) \quad [21]$$

de forma que a probabilidade conjunta de se encontrar um certo estado  $m_{ij}$  e íon  $k$  em uma determinada posição corresponde à probabilidade de  $k$  dada a ocorrência de  $m_{ij}$ . Tal probabilidade condicional segue as seguintes propriedades:

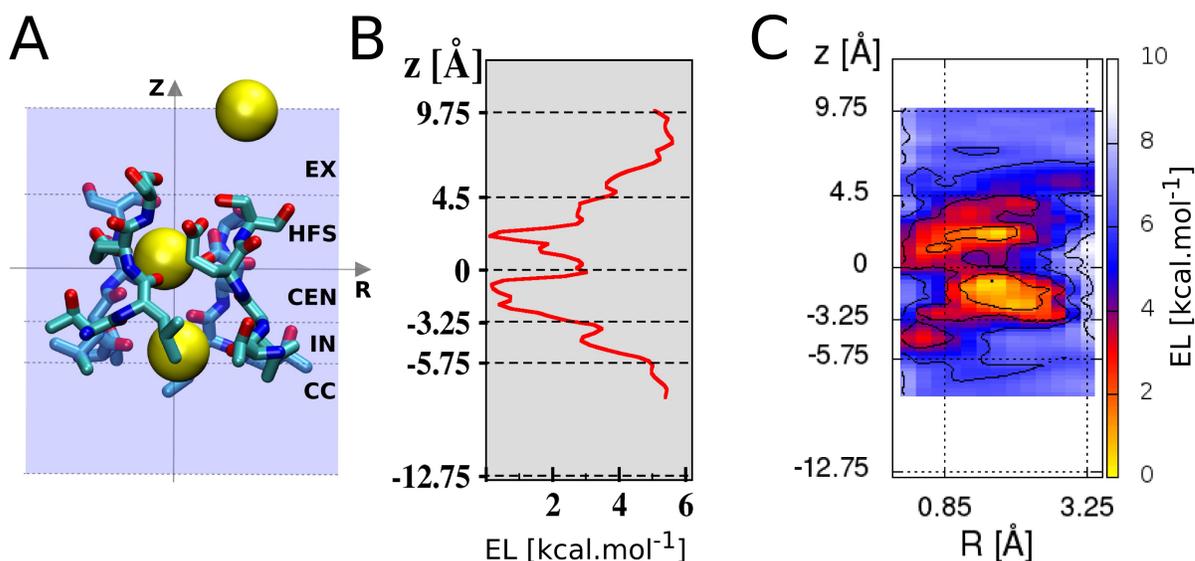
- (1)  $P_k(z|m_{ij}) \geq 0$  ;
- (2)  $\int P_k(z|m_{ij}) dz = 1$  ;
- (3)  $P_k(z) = \int P_k(z|m_{ij})P(m_{ij}) dm_{ij}$  .

## **IV. Resultados**

Logo após a resolução da estrutura cristalográfica do canal de sódio procariótico, NavAb, em 2011, diversos grupos empenharam, de forma independente, métodos teóricos de dinâmica molecular para investigar os detalhes dos mecanismos de condução iônica através desse canal. Como será discutido mais extensamente a seguir, apesar de determinadas características desse processo terem sido elucidadas, diversas outras permaneceram sem resposta, a saber: quais coordenadas radiais dois íons são permitidos a ocupar no interior do filtro de seletividade; a energia livre de ligação aos sítios quando o filtro de seletividade é ocupado por esses íons; a estabilidade relativa de todas as configurações acessíveis aos íons no filtro de seletividade, visto que somente parte desse conjunto de configurações possíveis foi amostrado em estudos anteriores; e o efeito da aplicação de potenciais eletrostáticos no mecanismo de condução envolvendo dois íons. Nessa análise, portanto, simulações massivas de DM conjuntamente com métodos avançados de amostragem, particularmente a metadinâmica, foram aplicados ao estudo do mecanismo de permeação de dois íons  $\text{Na}^+$  através do canal de sódio NavAb. Os resultados produzidos nesse trabalho foram recentemente publicados (Stock et al., 2013) e serão apresentados a seguir.

#### IV.1 Sítios de Ligação de $\text{Na}^+$ no Filtro de Seletividade

A superfície de energia livre em função da coordenada de reação axial  $z$ ,  $G(z)$ , computada no presente trabalho identifica três mínimos bem definidos que determinam sítios de ligação em concordância com a expectativa de Payandeh et al. Segundo a análise de  $G(z)$ , tais sítios doravante referidos como HFS, CEN e IN estão localizados respectivamente em  $0 < z \leq 4,5$ ,  $-3,25 < z \leq 0$  e  $-5,75 < z \leq -3,25$ , tal que  $z=0$  é definido em relação ao centro de massa dos carbonos-alfa do Glu<sup>177</sup>. Os sítios HFS e CEN apresentam energias de ligação similares de aproximadamente  $-6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , enquanto o mínimo local correspondente ao sítio IN é relativamente menos estável, com energia de ligação de aproximadamente  $-3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . **Figura. 10, A e B.**

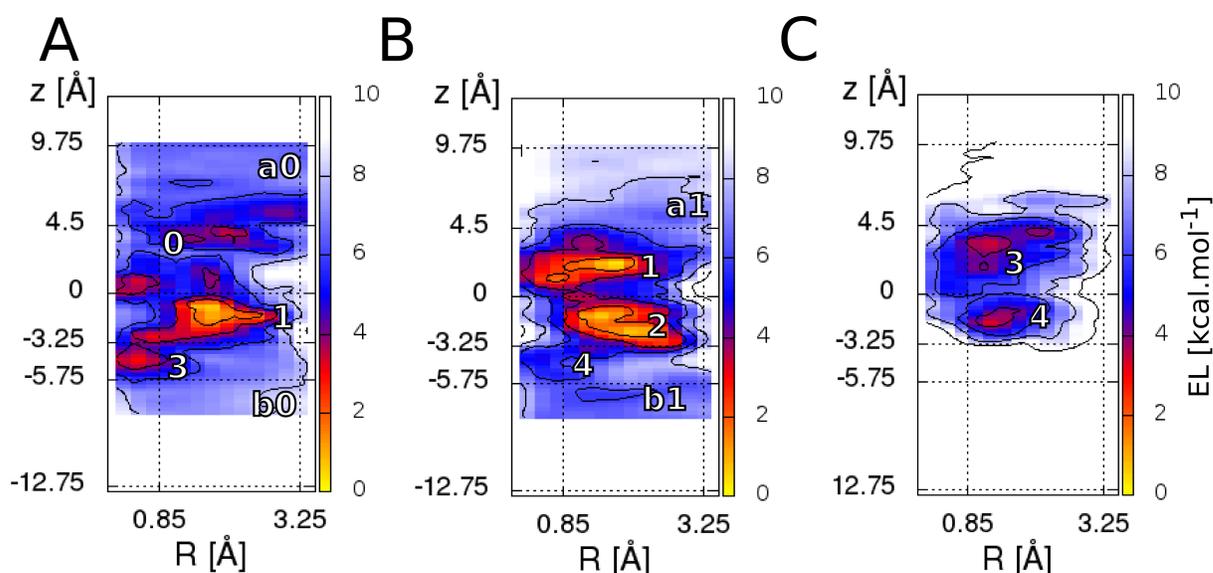


**Figura. 10** Sítios de Ligação de  $\text{Na}^+$  no Filtro de Seletividade. **A:** Ilustração dos sítios de ligação disponíveis no FS de NavAb: EX, entrada extracelular do filtro; HFS, delimitado pelos grupos carboxila das cadeias laterais dos quatro  $\text{Glu}^{177}$  e pelos grupos carbonila da  $\text{Ser}^{178}$ ; CEN e IN delimitados respectivamente pelos grupos carbonila da  $\text{Leu}^{176}$  e da  $\text{Thr}^{175}$ ; CC, cavidade central do poro. **B:** Superfície axial de energia livre  $G(z)$  e **C:** superfície axial-radial de energia livre  $G(z, R)$ , ambos para dois íons no filtro de seletividade do CI NavAb. Observe que os mínimos de energia correspondem aos três sítios de ligação antecipados. Em C, destaca-se a posição radial dos íons em relação ao eixo de simetria do canal. A unidade das energias é  $\text{kcal.mol}^{-1}$ . EL: energia livre.

A projeção da superfície de energia livre 4-D no plano  $G(z, R)$  (cf. III.6.3) nos permite analisar as posições radiais (i.e., a distância no plano x,y entre o íons e o centro de massa dos carbonos-alfa do  $\text{Glu}^{177}$  das quatro subunidades) dos íons em cada sítio, quando o filtro é populado por dois  $\text{Na}^+$ . Como pode ser observado na **Figura. 10, C**, a região permitida aos íons no sítio HFS abrange toda a distribuição de posições radiais, podendo manter sua camada de hidratação ou ser parcialmente coordenados por grupos carboxila da cadeia lateral do  $\text{Glu}^{177}$ . No sítio CEN, os íons se localizam deslocados em relação ao eixo z, sendo parcialmente coordenados por grupos carbonila da  $\text{Leu}^{176}$ . Quando no sítio IN, íons se encontram

preferencialmente alinhados com o eixo de simetria do FS e portanto mantêm sua camada de solvatação.

Buscando uma melhor compreensão das configurações que podem ser assumidas por dois íons no filtro de seletividade, a densidade de probabilidades conjuntas no plano  $(z, R)$  para um íon quando o outro (independente de sua identidade) está em cada um dos sítios foi computada. Essa distribuição de probabilidades é então traduzida para superfícies de energia livre (cf. III.6.3), ilustradas na **Figura. 11**.



**Figura. 11** Superfícies axiais-radiais conjuntas de energia livre. Esse painel destaca as estabilidades de diferentes configurações quando um dos íons se encontra no sítio HFS (A), CEN (B) ou IN (C). Aqui é possível identificar cinco mínimos locais apontados por números de 0 a 4. São eles: HFS<sup>2</sup> (0), HFS-CEN (1), CEN<sup>2</sup> (2), HFS-IN (3) e CEN-IN (4). Energias estão em kcal.mol<sup>-1</sup>. Configurações de entrada e saída também são identificadas: EX-HFS (a0), EX-CEN (a1), HFS-CC (b0) e CEN-CC (b1).

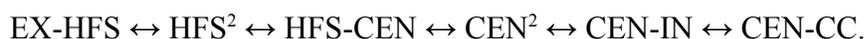
Com essa análise, é possível identificar cinco configurações correspondentes a mínimos locais de energia livre: HFS-CEN e CEN<sup>2</sup>, os mínimos mais profundos com energias-livres de aproximadamente -12,5 kcal.mol<sup>-1</sup>; HFS<sup>2</sup>, HFS-IN e CEN-IN, mínimos menos profundos com

energias entre -7 e -9 kcal.mol<sup>-1</sup>. Daqui em diante o “2” superescrito identifica a ocupação de um mesmo sítio por dois íons. Observe que as energias obtidas para as configurações condicionais não correspondem propriamente a energias de ligação, uma vez que os valores de referência são relativos à configuração de maior energia, e não ao valor de energia livre na solução. É interessante observar também que a configuração IN<sup>2</sup> não representa um mínimo de energia, em função da localização preferencialmente alinhada com o eixo z adotada pelos íons nesse sítio.

## IV.2 Mecanismo de Condução Iônica a 0 mV

No contexto da superfície 4-D de energia livre, o mecanismo de condução de Na<sup>+</sup> no canal NavAb pode ser pensado como uma trajetória na paisagem de energia que conecta dois estados limítrofes do processo, i.e. um íon no meio extracelular e outro no FS até um íon no filtro de seletividade e outro na cavidade central, ou vice versa. Em vista da direcionalidade transmembrânica da condução iônica, o perfil axial-axial de energia livre  $G(z, z')$  fornece uma visão compreensiva das configurações que compõe essa superfície.

O subespaço  $G(z, z')$  identifica cinco configurações estáveis correspondentes a mínimos mais ou menos profundos de energia livre, além de duas configurações de entrada e saída, representados na **Figura. 12** por número e letras, respectivamente. Nessa superfície, íons podem transitar de uma configuração a outra por uma variedade de caminhos, com maioria das barreiras menores que 5 kcal.mol<sup>-1</sup> e não maiores que 8 kcal.mol<sup>-1</sup>. O caminho de mínima energia livre (cf. III.6.4) no entanto descreve o seguinte mecanismo como rota preferencial para condução:



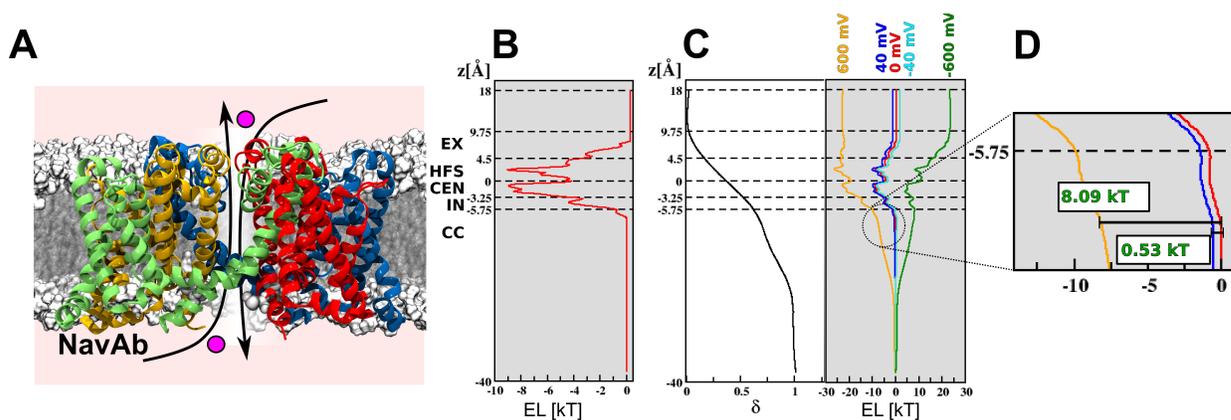
Aqui, nota-se que a existência de sítios com dupla ocupância ( HFS<sup>2</sup> e CEN<sup>2</sup>) assegura que o transporte de um íon não requer que o íon anteriormente presente no filtro seja conduzido. Em outras palavras, o mesmo MEP é consistente com dois mecanismo de condução: um deles semelhante ao *knock-on* observado em canais de K<sup>+</sup>, porém com o deslocamento entre os íons mais fracamente acoplado (veja por exemplo que a transição CEN-IN ↔ CEN-CC ocorre sem



### IV.3 Superfície de energia livre Em Função da Aplicação de Potencial Transmembrânico

Uma vez que o funcionamento de CIs está intimamente relacionado à tensão transmembrânica, o passo subsequente é naturalmente a análise da influência desse potencial na superfície de energia livre, e conseqüentemente no mecanismo de condução iônica. Assim, são apresentados aqui os resultados provenientes de uma avaliação analítica das alterações imputadas por  $\Delta V$ .

A aplicação de potencial eletrostático transmembrânico gera um excesso de energia livre que pode ser entendido como uma fração da força-motriz atuando no processo de condução, segundo a equação [12] (cf. III.3). A contribuição do potencial no processo de condução se conecta à superfície de energia livre por meio de uma grandeza chamada distância elétrica (cf. Equação [14]), que traduz a fração do potencial eletrostático local agindo na partícula carregada localizada em uma determinada coordenada do sistema.



**Figura. 13** Dependência do PMF com a imposição de potenciais eletrostáticos transmembrânicos. **A:** Estrutura aberta-ativada do canal NavAb mostrando toda a extensão do caminho de permeação. **B:** Superfície de energia livre a 0 mV, para dois íon no interior do FS. Observe que aqui assume-se que o íon não experimenta barreiras para sair do poro, uma vez que o FS tenha sido atravessado e o poro esteja aberto. **C:** Perfil de distância elétrica ( $\delta$ ) calculado para todo o caminho de permeação (esquerda) e superfície de energia livre resultante da aplicação de diferentes valores de  $\Delta V$  (direita). **D:** Detalhe indicando o excesso de energia livre gerado. As energias dadas em  $k_B T$ , 0,53 e 8,09 correspondem respectivamente a aproximadamente 0,3 e 4,8 kcal.mol<sup>-1</sup>.

Sob a aplicação de potenciais eletrostáticos relativamente pequenos, da ordem de  $\pm 50$  mV, a superfície de energia livre  $G(z, \Delta V)$  é essencialmente igual à superfície calculada no equilíbrio  $G(z, 0)$ , contando com um excesso de energia da ordem de  $0.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (menor que flutuação térmica a  $25^\circ\text{C}$ ) como evidenciado acima, na **Figura. 13**. Em contrapartida, diferenças de potencial maiores acarretam diferenças significativas nessa superfície. Particularmente, sob condições de despolarização ( $\Delta V > 0$ ), íons são favorecidos a entrar na cavidade central do canal, ilustrado pelo declive na superfície de energia livre na entrada da cavidade central. É perceptível no entanto que o mesmo não ocorre em condições de hiperpolarização ( $\Delta V < 0$ ), uma vez que o excesso de energia livre altera essencialmente a altura do platô no banho externo.

Tal diferença sugere portanto que, sob a influência de grandes diferenças de potencial eletrostático transmembrânico, o mecanismo de condução no sentido extra  $\rightarrow$  intracelular não equivale àquele identificado para o sentido intra  $\rightarrow$  extracelular, contrastando com o observado a  $0 \text{ mV}$  onde o mesmo mecanismo é válido para os dois sentidos. Esse resultado coaduna com a assimetria encontrada nas simulações de eventos de condução com aplicação explícita de potenciais elétricos transmembrânicos (cf. IV.4, abaixo).

#### **IV.4 Mecanismo de Condução Sob Aplicação de Potenciais Transmembrânicos**

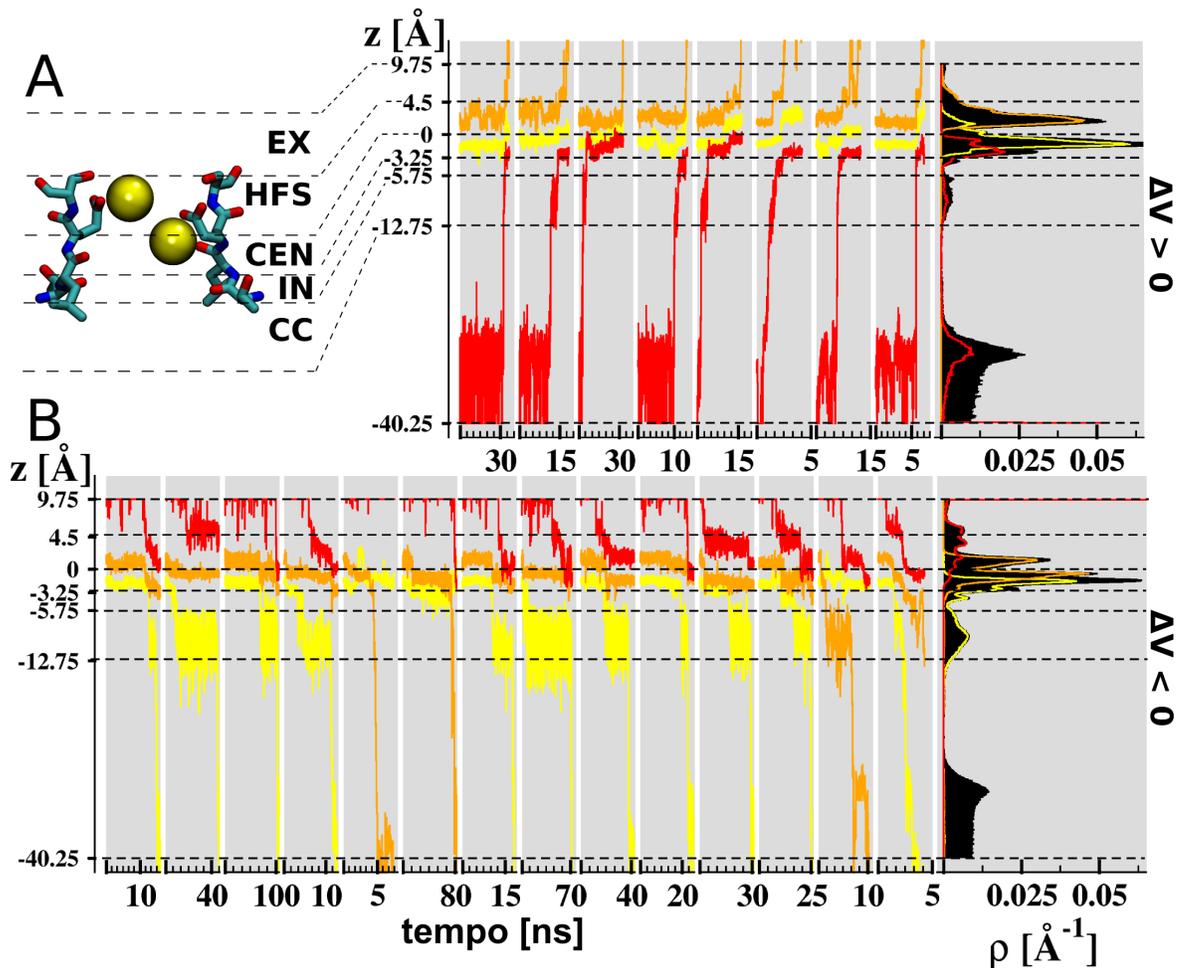
A fim de estudar o mecanismo de permeação de íons através de toda a extensão do poro do canal, é necessário que este esteja apto a conduzir, i.e., que o canal esteja na sua conformação aberta. Dessa forma, investigou-se no presente trabalho os mecanismos de condução iônica sob a influência de potenciais eletrostáticos através da estrutura completamente aberta-ativada do NavAb (I.3). Um esquema para possibilitar o desbalanço explícito de íons entre as faces intra e extracelulares (cf. III.4.2) foi utilizado de forma a gerar uma diferença de potencial de  $+600 \text{ mV}$  e  $-600 \text{ mV}$ , para os sistemas despolarizados e hiperpolarizados, respectivamente, com o intuito de acelerar os eventos de condução. No total, 14 eventos de condução a  $-600 \text{ mV}$  e 8 eventos a  $600 \text{ mV}$  foram observados. Aqui, os íons inicialmente presentes no FS são denominados  $i$  e  $j$ , e o terceiro íon mais próximo do filtro participando do evento de condução é chamado  $k$ . Ao contrário dos cálculos de metadinâmica, essa metodologia não restringe o número de íons, nem a

coordenada de reação avaliada no curso dos eventos de condução e portanto nos permite, em uma certa medida, uma abordagem mais semelhante ao que é investigado experimentalmente.

O perfil de densidades (cf. III.7) calculado considerando-se todos os íons do sistema aponta duas regiões de ocupância significativa e uma menos proeminente, porém distinguível, no interior do filtro de seletividade, correspondentes aos sítios previamente propostos HFS, CEN e IN. Além desses, outros picos também foram resolvidos para as regiões dos banhos interno e externo, bem como para a cavidade central do canal. (**Figura. 14, B**)

A integração das densidades nos limites  $-5,75$  a  $9,75$  que definem o FS resulta na ocupância média do filtro ao longo das simulações, cujo valor é  $1,8$  para  $\Delta V < 0$ . De forma consistente, esse valor sugere que a condução de NavAb em condições hiperpolarizadas envolve a participação de dois íons ligados ao filtro. Nota-se ainda, que tanto nas simulações hiper, quanto nas despolarizadas, a contribuição dos  $\text{Na}^+$  definidos acima como  $i, j$  e  $k$  (indicadas na **Figura. 14** como linhas laranja, amarela e vermelha, respectivamente) para as densidades é predominante nos sítios do filtro de seletividade, descartando a possibilidade da participação efetiva de demais íons no processo. Em outras palavras, é válido assumir que os eventos de condução aqui amostrados contam essencialmente com a participação dos íons  $i, j$  e  $k$  e portanto as análises que seguem podem ser focadas nas contribuições desses  $\text{Na}^+$ .

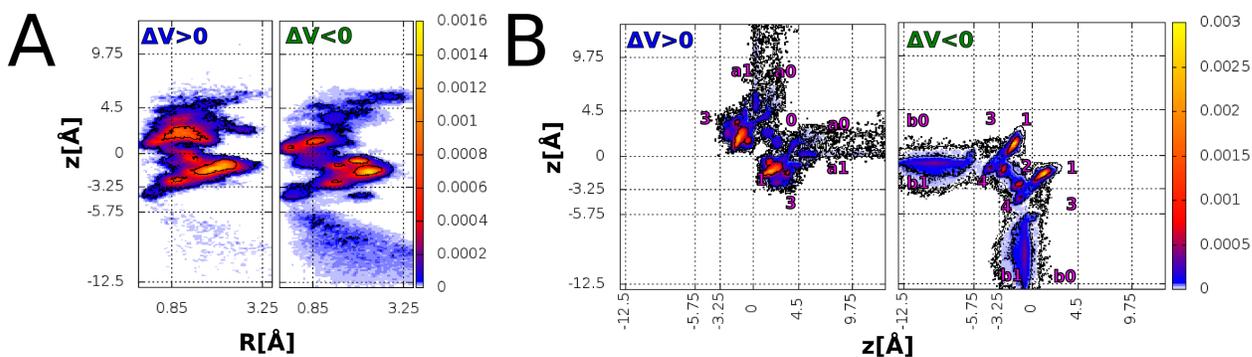
As distribuições de probabilidades ao longo das coordenadas axiais e radiais foram computadas a fim de caracterizar o mecanismo de condução nas diferentes condições de polarização. Em analogia à análise feita nos estudos a  $0$  mV, calculou-se aqui as probabilidades axial-radial  $P(z, R)$  e axial-axial  $P(z, z')$  para os dois íons ligados ao FS.



**Figura. 14** Simulações polarizadas de dinâmica molecular. **A:** Trajetórias seguidas por três íons ( $i, j$  e  $k$ ) ao longo do eixo de simetria axial do canal, sob condições despolarizadas. Iniciando a simulação com os íons  $i$  e  $j$  (laranja e amarelo) nos sítios HFS e CEN do FS, esta prossegue até que um desses íons atinja o banho externo. O íon  $k$  é representado em vermelho. O histograma à direita indica a ocupância  $\rho$  dos íons, ao longo do eixo axial do caminho de permeação. O mesmo é válido para simulações hiperpolarizadas (**B**), exceto que um dos íons do filtro de seletividade deve ser conduzido para o banho intracelular.

O perfil de distribuição de probabilidades  $P(z, R)$  reitera não só o fato de que dois  $\text{Na}^+$  podem se ligar nos sítios HFS, CEN e IN, mas também suas posições relativas ao eixo de simetria do poro, indicando que nesses mesmos sítios os íons se ligam preferencialmente de

forma alinhada/não-alinhada, não-alinhada e alinhada ao eixo axial  $z$ , respectivamente (**Figura. 15, A**). Ao passo que  $P(z, R)$  concorda com resultados obtidos a 0 mV, também revela que tais informações são verdadeiras para sistemas sob influência da tensão transmembrânica.  $P(z, z')$ , por sua vez, reflete as configurações mais prováveis no curso dos eventos de condução. A distribuição de probabilidades axial-axial identifica nove estados com dois íons e probabilidade diferente de zero, apresentadas na **Figura. 15, B**. Apesar de as distribuições de probabilidades terem sido calculadas ao longo de todo o caminho de permeação, i.e. da entrada extracelular até o a saída intracelular do canal, somente aquelas referentes aos íons no interior do poro (e que correspondem à principal contribuição) são mostradas. Uma ilustração das configurações correspondentes aos estados da **Figura. 15 B**, bem como as probabilidades de transição de um estado para outro são evidenciadas na **Figura. 16**.



**Figura. 15** Distribuição de probabilidades para ocupação de sítios do filtro. **A e B:** Respectivamente, distribuição de probabilidades axiais-radiais  $P(z, R)$  e axiais-axiais  $P(z, z')$  para ocupação dos sítios do filtro de seletividade, ao longo da totalidade de trajetórias hiper ( $\Delta V < 0$ ) ou despolarizadas ( $\Delta V > 0$ ). Observe que as distribuições foram simetrizadas de forma a não diferenciar os íons  $i$  e  $j$ . Os mesmo estados definidos nas análises das superfícies de energia livre ( $a$ ,  $b$  e  $0 - 4$ ) estão identificados em rosa. O gradiente à direita indica a probabilidade do estado.

Não por acaso, percebe-se que a composição das duas imagens na **Figura. 15, B** guarda alguma semelhança com a superfície de energia livre  $G(z, z')$ . A partir das probabilidades,



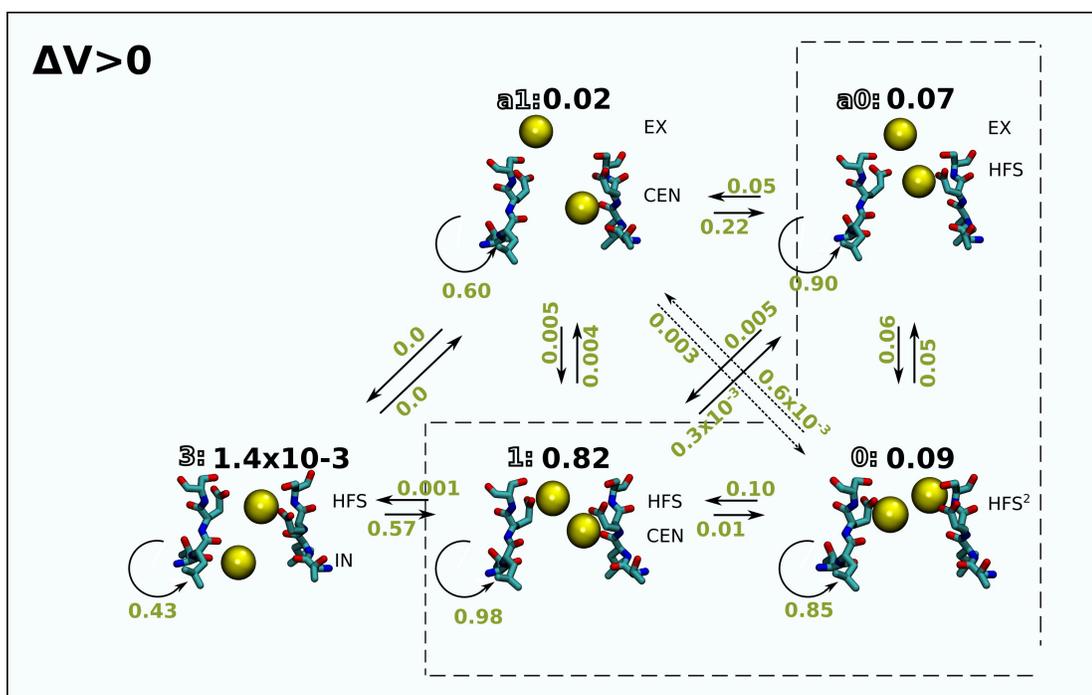
*indicado pela seta curva. O mecanismo de permeação mais provável é indicado pela linha tracejada.*

Nas oito simulações com potencial eletrostático positivo (despolarizadas) tanto as densidades ao longo do eixo  $z$ , quanto a distribuição de probabilidades  $P(z,R)$  para  $\Delta V > 0$  estão essencialmente de acordo com os resultados apresentados para trajetórias hiperpolarizadas (**Figura. 14** e **Figura. 15**). Diferentemente, a ocupância iônica total no filtro de seletividade encontrada é aproximadamente 2,3, sugerindo uma participação mais pronunciada do terceiro íon no mecanismo de condução nessa condição.

$P(z, z')$  para  $\Delta V > 0$  recupera o mesmo mecanismo de condução antecipado pelo MEP, a saber:



Aqui também, tal sequência de eventos corresponde à maioria das configurações observadas na totalidade das simulações despolarizadas. Particularmente, os três estados acima correspondem a 98% de todas as configurações observadas. As probabilidades detalhadas de cada estado e de transição são ilustradas abaixo (**Figura. 17**).



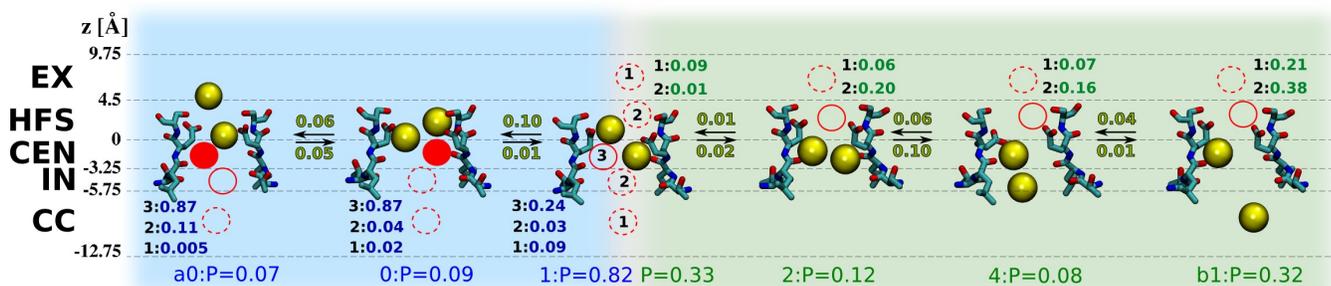
**Figura. 17** Distribuição de probabilidades para o estado ( $P_{m_{ij}}$ ) e probabilidades de transição ( $P_{mn}$ ), computadas a partir das distribuições de probabilidades axiais-axiais ( $P(z, z')$ ) dos sistemas despolarizados. Configurações compondo o mecanismo de permeação mais provável são demarcadas pela linha tracejada.

#### IV.5 Contribuição do Terceiro $\text{Na}^+$

Até então, focou-se no mecanismo de condução envolvendo a participação de dois  $\text{Na}^+$ . No entanto, é evidente a partir das trajetórias na **Figura. 14** que a participação do terceiro íon não pode ser negligenciada. No âmbito de avaliar o papel desempenhado por  $k$ , calculou-se as probabilidades condicionais axiais, relacionando a coordenada desse terceiro  $\text{Na}^+$  com um dado estado representativo do processo de condução (i.e., aqueles identificados acima como os mais prováveis).

Nas trajetórias hiperpolarizadas ( $\Delta V < 0$ ), observa-se que  $k$  é preferencialmente encontrado na solução extracelular quando  $i$  e  $j$  estão nas configurações HFS-CEN, CEN<sup>2</sup> e CEN-IN. Somente quando o par de íons está no estado CEN-CC,  $k$  é encontrado com uma

probabilidade considerável, 38%, no sítio HFS (vide **Figura. 18**). Isso equivale a dizer que o mecanismo de condução a  $\Delta V < 0$  é fracamente acoplado ao terceiro  $\text{Na}^+$ , uma vez que este participa do evento de condução somente após um dos íons previamente no FS ter sido conduzido.



**Figura. 18** Contribuição do íon  $k$  para o mecanismo de condução. Probabilidades do estado  $m_{ij}$  ( $P$ , embaixo) e de transição (setas) são mostradas para as configurações preferenciais identificadas nas investigações com  $\Delta V > 0$  (fundo azul) e com  $\Delta V < 0$  (fundo verde). Novamente, somente duas subunidades do filtro de seletividade são mostradas. Destacado em vermelho estão as probabilidades axiais para o íon  $k$ , condicionadas à ocorrência do estado  $m_{ij}$  ( $P_k(z|m_{ij})$ ). (cf. III.7)

Uma situação distinta é observada nas trajetórias despolarizadas. Nesse caso, a probabilidade de se encontrar  $k$  no interior do filtro de seletividade, dado que os outros dois íons estão no estado HFS-CEN é de 27% e aumenta para mais de 90% (no estado HFS<sup>2</sup>) até aproximadamente 100% (HFS-EX) conforme o processo de condução prossegue. Esse resultado constitui uma forte evidência de que a  $\Delta V > 0$  a condução segue um mecanismo envolvendo três íons, diferente daquele observado a  $\Delta V < 0$ . Nas simulações com despolarização,  $k$  é requerido para desencadear a saída de  $i$  ou  $j$  do filtro.

## **V. Discussão**

## V.1 Mecanismo de Condução em Canais de Sódio

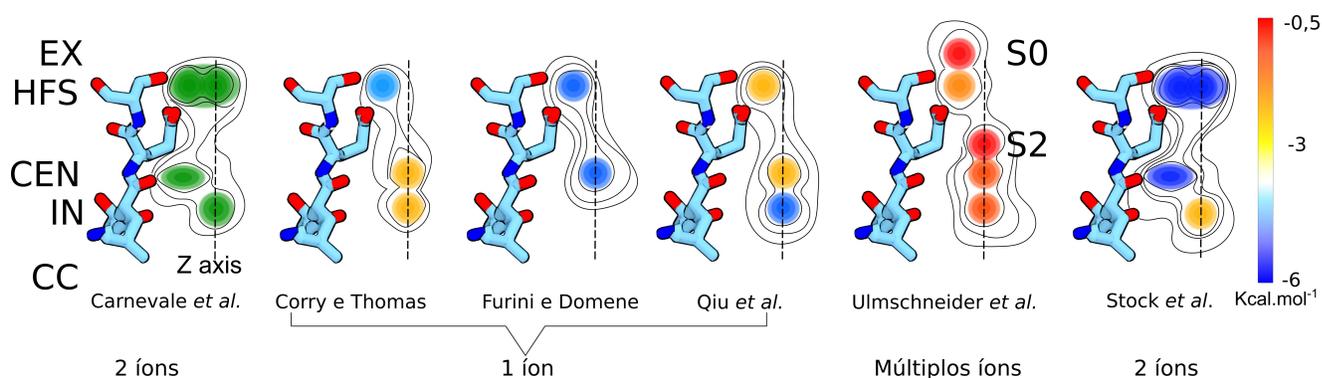
Embora o NavAb tenha sido cristalizado em presença de uma solução contendo  $\text{Na}^+$ , nenhum íon foi co-cristalizado no interior do seu filtro de seletividade (Payandeh et al., 2011), consistente com a baixa afinidade ( $K_d$  da ordem de 350 mM) desse canal com íons  $\text{Na}^+$  (Hille, 1975). Mesmo nessas condições, Payandeh e colaboradores identificaram, a partir da estrutura, quatro camadas de oxigênios provenientes tanto das cadeias principais, quanto das cadeias laterais dos aminoácidos compondo o filtro de seletividade. Os grupos carbonila e carboxila reportados encontram-se voltados para o lúmen do filtro, potencialmente definindo sítios de ligação de cátions. Assim, foi proposta a existência de três sítios de ligação: HFS (do inglês *high field site*), CEN e IN delimitados respectivamente pelos grupos carboxila dos Glu<sup>177</sup> e pelos grupos carbonila das Ser<sup>178</sup>; pelos grupos carbonila da Leu<sup>176</sup>; e pelos grupos carbonila da Thr<sup>175</sup> de cada uma das quatro subunidades do canal.

Seguida a publicação dessa estrutura, um primeiro estudo de DM buscando esclarecer a estrutura de hidratação do  $\text{Na}^+$  no filtro de seletividade de NavAb foi realizado por Carnevale e colaboradores (Carnevale et al., 2011). Nesse, foi reportado que o filtro de seletividade do canal, inicialmente hidratado, é espontaneamente populado dois  $\text{Na}^+$ . Ao longo de aproximadamente 150 ns de trajetória, as densidades axiais-radiais iônicas computadas mostram que os íons ligam-se a três sítios consistentes com a definição de Payandeh *et al.* As maiores ocupâncias são observadas nos sítios HFS (deslocados ou alinhados com o eixo axial de simetria) e IN (alinhado), e em menor escala no sítio CEN (deslocado). Apesar de identificar os sítios de ligação antecipados e além disso fornecer informações a respeito da posição radial dos dois íons no filtro de seletividade, a afinidade de ligação não pôde ser computada.

Pouco depois, outros estudos (Corry and Thomas, 2012; Furini and Domene, 2012; Qiu et al., 2012) avaliaram o perfil de energia livre ao longo da coordenada axial  $z$  referente à permeação de um  $\text{Na}^+$ . De forma consistente, todos encontraram evidências de que o íon se liga aos sítios HFS e CEN, e quase todos (à exceção de Furini e Domene) identificaram IN como mínimo local ou global de energia. Com base na primeira camada de hidratação do cátion no interior do FS (i.e., se esta é composta unicamente por moléculas de água, ou se há a participação de oxigênios provenientes de resíduos de aminoácido também), os autores inferiram que no sítio

HFS o íon ocupa uma posição deslocada em relação ao eixo de simetria do poro, uma vez que é coordenado por um dos Glu<sup>177</sup>, bem como pela Ser<sup>178</sup> e moléculas de água. Nos sítios CEN e IN, os íons mantêm sua camada de hidratação, sugerindo portanto que estes estão alinhados com o eixo z. Apesar da coerência entre as posições relativas ocupadas pelo íon, os estudos divergem a respeito da estabilidade em cada um dos sítios de ligação encontrados.

Os resultados produzidos no âmbito desta dissertação não só reiteram os sítios ocupados pelos íons no FS de NavAb, mas também reportam explicitamente suas posições radiais, além das respectivas energias de ligação. Não surpreendentemente, a presença de um ou dois íons no FS impacta as afinidades ao Na<sup>+</sup> notadas para cada sítio, e uma comparação direta entre esses estudos não é possível. Ainda assim, é interessante observar os diferentes resultados encontrados nas duas abordagens. Enquanto estudos com um íon (Corry e Thomas, Furini e Domene e Qiu *et al.*) sugerem que este esteja respectivamente fora do eixo, no eixo e no eixo nos sítios HFS, CEN e IN, investigações com dois íons (Carnevale *et al.* e o presente estudo, Stock *et al.*) propõem que os íons estejam no eixo/fora do eixo, fora do eixo e no eixo nos mesmos sítios. Esta constitui uma forte evidência de que os modos de ligação dos íons no filtro de seletividade são dependentes do número de íons presentes. Uma representação esquemática dos resultados obtidos por esses e um outro estudo discutido logo a seguir pode ser vista abaixo (**Figura. 19**).



**Figura. 19** Comparação entre os sítios de ligação encontrados em diferentes estudos com NavAb e canais relacionados, com sequência do filtro TLES. Círculos coloridos indicam as posições axiais-radiais e respectivas energias de ligação (exceto para Carnevale *et al.*, dado não computado) do Na<sup>+</sup> no filtro de seletividade dos diferentes canais estudados. As regiões de ocupância foram determinadas para situações em que o FS é habitado por 1 (Corry e Thomas,

*Furini e Domene, e Qiu et al.) ou dois íons (Carnevale et al. e Stock et al.) a 0 mV. Análises também foram realizadas para dois íons no FS (Stock et al. e Ulmschneider et al.) na presença de  $\Delta V < 0$ . A fim de facilitar a visualização, apenas uma das subunidades do filtro é mostrada.*

A altura das barreiras encontradas por Corry e Thomas, Furini e Domene e Qiu e colaboradores para o processo de permeação de um único íon através do FS é da ordem de 4 a 6 kcal.mol<sup>-1</sup>. Apesar de ser possível o mecanismo em que um íon sozinho ultrapassa essa barreira, a ideia mais aceita é a de que o processo de condução envolva dois ou mais íons, uma vez que a repulsão entre os dois cátions reduziria a barreira para condução de um dos íons. Um mecanismo de dois ou mais íons é também sugerido pela ocupação espontânea do FS por dois íons demonstrada em Carnevale et al. e mais recentemente reiterado por Chakrabarti et al., 2013. Aliado a esse fato, observa-se que a superfície de energia livre axial para 1 Na<sup>+</sup> de um desses estudos (Furini e Domene) tem barreira de energia maior do que 8 kcal.mol<sup>-1</sup> impedindo a saída do cátion para o meio extracelular, reforçando a necessidade da presença de dois ou mais íons para viabilizar o processo de condução. De fato, a presença de grupos carboxila e carbonila delineando o filtro de seletividade (quatro por subunidade) racionaliza a possibilidade de ligação de múltiplos íons.

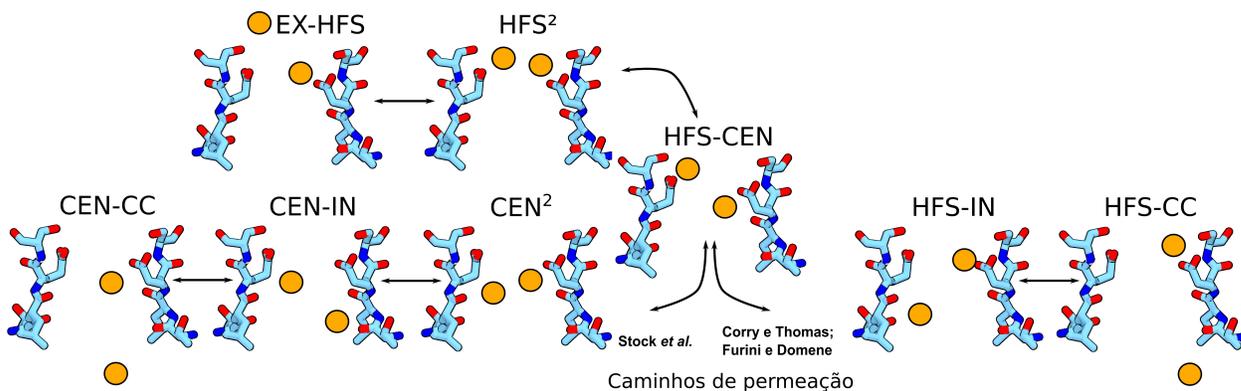
Frente a esse fato, os estudos de Corry e Thomas e Furini e Domene avaliaram também a superfície de energia livre axial-axial para o processo de permeação envolvendo dois íons e propuseram a seguinte sequência de configurações estáveis levando à condução:



Esse mecanismo é descrito como um *knock-on* (em alusão ao mecanismo de condução de canais de K<sup>+</sup>) fracamente acoplado, uma vez que um dos íons prossegue enquanto o outro se mantém essencialmente na mesma posição. De forma contrastante, no mecanismo *knock-on* de canais de K<sup>+</sup>, os dois íons devem se mover simultaneamente.

Tais achados são diretamente comparáveis aos resultados obtidos via análise da superfície de energia livre associada à permeação de 2 Na<sup>+</sup> a 0mV, expostos nesta dissertação. Segundo a presente investigação, o mecanismo acima é um entre os possíveis caminhos seguidos por dois

íons durante um evento de condução no FS (cf. **Figura. 12**), porém este difere do MEP, EX-HFS  $\leftrightarrow$  HFS<sup>2</sup>  $\leftrightarrow$  CEN<sup>2</sup>  $\leftrightarrow$  CEN-IN  $\leftrightarrow$  CEN-CC. Observa-se portanto que essa diferença de mecanismos propostos é plausivelmente atribuída ao fato de que os estudos anteriores exploraram somente uma fração de todas as configurações acessíveis ao par de íons. A coordenada de reação definida em Corry e Thomas e Furini e Domene abrange  $-10 \leq z \leq 7$  para um dos íons e  $0 \leq z' \leq 15$  para o outro, o que permite a sobreposição de coordenadas dos íons somente no sítio HFS ou em coordenadas mais externas. Dessa forma, alguns dos possíveis mecanismos de condução, particularmente envolvendo a dupla ocupância do sítio CEN, foram negligenciados. Diferentemente, a coordenada de reação definida em nosso estudo amostra toda a extensão de coordenadas axiais e radiais contidas no FS e portanto fornece uma visão mais compreensiva da totalidade de configurações que contribuem para a permeação iônica. Os mecanismos de condução propostos por essas três investigações independentes estão ilustrados abaixo na **Figura. 20**.



**Figura. 20** Caminhos de permeação identificados nos estudos de Stock et al. e de Corry e Thomas e Furini e Domene, via análise das superfícies de energia livre axiais-axiais.

Os resultados discutidos até então referem-se a aspectos da condução de Na<sup>+</sup> restritos ao FS e na ausência de diferenças de potencial eletrostático. Em um estudo recente, Ulmschneider e colaboradores (Ulmschneider et al., 2013) empregaram uma abordagem similar à apresentada para investigação dos eventos de condução sob voltagem. Os autores avaliaram a condução sob ação de potenciais transmembrânicos através de toda a extensão de um canal de sódio dependente

de voltagem bacteriano semelhante a NavAb, o NavMs (McCusker et al., 2012), que contém a mesma sequência conservada do filtro de seletividade (TLES). NavMs, assim como NavAb, é um canal iônico dependente de voltagem e seu poro foi cristalizado na conformação aberta, porém na ausência dos domínios sensores de voltagem. Dada a instabilidade da conformação aberta do domínio do poro na ausência do DSV ativado (Yifrach and MacKinnon, 2002), a aplicação de forças externas para assegurar um poro continuamente aberto se faz necessária no contexto de simulações de DM visando a análise da condução iônica. Impostas essas restrições estruturais, o mecanismo de condução pôde ser avaliado ao longo de todo o caminho de permeação do canal. Diversos eventos de condução com diferenças de potencial variando entre -39 e -665 mV, impostas via aplicação de campo elétrico, foram amostrados. Aqui, em média, o filtro é ocupado por 1,8 íons, reforçando os achados publicados em Stock *et al.* de que a  $\Delta V < 0$  aproximadamente dois íons estão presentes no FS. Além disso, o perfil de energia livre axial extraído das simulações indica a existência de cinco sítios de ligação (**Figura. 19**): os já destacados HFS, CEN e IN, e dois sítios não identificados nos demais estudos, denominados pelos autores como S0 (na entrada extracelular do FS) e S2 (entre HFS e CEN). A análise das trajetórias e da primeira camada de hidratação dos íons no FS revela ainda que nos sítios S0 e HFS íons  $\text{Na}^+$  se ligam de maneira assimétrica em relação a  $z$ , enquanto que nos demais sítios (S2, CEN e IN) se mantêm alinhados ao eixo de simetria. Com esse trabalho, Ulmschneider e colaboradores foram capazes de recuperar condutâncias para NavMs coerentes com valores experimentais (aproximadamente 40 pS contra 33 pS medidos experimentalmente), demonstrando que a princípio o domínio do poro sem o domínio sensor de voltagem pode ser utilizado para se investigar os mecanismos de condução através de todo o caminho de permeação. Nesse ponto, é válido mencionar contudo que a aplicação de potenciais harmônicos para assegurar que o poro esteja aberto pode eventualmente restringir rearranjos conformacionais do canal potencialmente importantes no processo de condução. Particularmente no caso do estudo da condução iônica, movimentos com magnitude da ordem de flutuações térmicas são comparáveis, por exemplo, às distâncias entre átomos do FS e íons (Allen et al., 2004). Assim, ressalta-se a importância da utilização da estrutura completamente aberta-ativada estável (i.e., que não requer o uso de restrições estruturais para se manter na conformação aberta) de NavAb empregada em nossas investigações do mecanismo de condução sob aplicação de  $\Delta V$ .

Nas simulações polarizadas realizadas com a estrutura aberta-ativada de NavAb, uma análise restrita aos dois íons inicialmente ligados ao FS mostra que as distribuições de probabilidades axiais-radiais  $P(z,R)$  e axiais-axiais  $P(z,z')$  marcadamente recuperam os sítios de ligação e as configurações estáveis para dois íons identificadas a 0 mV. Ao avaliar a contribuição de um terceiro íon  $\text{Na}^+$  ( $k$ ) ao andamento do processo de permeação, torna-se evidente que este tem pouca influência no mecanismo de condução em condições hiperpolarizadas (cf. IV.5). Portanto, de forma geral, é possível inferir que o mecanismo de condução sob  $\Delta V < 0$  segue um percurso envolvendo essencialmente dois íons e se assemelha ao processo descrito na ausência de voltagem. Em contrapartida, nas simulações despolarizadas,  $k$  aparenta ter um papel muito mais marcado no desencadeamento do evento de condução (**Figura. 18**). Longe de ser um resultado trivial, a assimetria do mecanismo de condução no canal de sódio NavAb somente é esclarecida frente à análise dos excessos de energia livre gerados com a aplicação do potencial transmembrânico (cf. IV.3). Como mencionado anteriormente, altas voltagens influenciam o mecanismo de condução gerando um excesso de energia livre. As diferenças de potencial aplicadas nas trajetórias polarizadas são da ordem de  $\pm 600$  mV, de forma que esse excesso tem efeitos pronunciados, produzindo a assimetria observada entre os mecanismos sob potenciais hiper e despolarizados. Espera-se, no entanto, que em condições fisiológicas, com diferenças de potencial da ordem de  $\pm 60$  mV, não haja assimetria e que os mecanismos sejam semelhantes àquele observado a 0 mV.

## V.2 Flexibilidade do Filtro de Seletividade

Um fator potencialmente relevante não analisado nesse estudo diz respeito à flexibilidade do filtro de seletividade. Nas escalas de tempo amostradas, tanto nos estudos com metadinâmica, quanto nas simulações com aplicação de voltagem, a conformação do filtro de seletividade se manteve próxima da conformação encontrada na estrutura cristalográfica. Assim, a condução em conformações alternativas, ou mesmo a existência dessas conformações, não foi avaliada. Contudo, como mencionado acima, alterações sutis na estrutura do FS podem ter impactos na condução e diversos estudos têm ponderado o papel da flexibilidade estrutural do filtro de

seletividade em processos como a condução e seletividade de canais iônicos (Allen et al., 2004; Bostick and Brooks, 2007, 2010; Noskov et al., 2004; Roux et al., 2011). Nesses trabalhos, é proposto que o FS de canais de  $K^+$  é uma estrutura dinâmica que apresenta flutuações estruturais da ordem de angstroms. Deve-se ressaltar porém que não há consenso a respeito dos fatores levando à seletividade dos canais de  $K^+$ . Como mencionado em I.4, uma variedade de hipóteses, não obrigatoriamente exclusivas, são propostas para racionalizar esse fenômeno. Estudos, empregando campos de força clássicos, conduzidos até o momento com canais de  $Na^+$  também sugerem que o filtro de seletividade desses canais apresenta uma considerável flexibilidade estrutural (Carnevale et al., 2011; Ulmschneider et al., 2013), em especial visto que íons no interior do FS são parcialmente coordenados pelas cadeias laterais dos resíduos Ser e Glu. Ademais, um trabalho recente (Chakrabarti et al., 2013) propõe ainda que alterações na orientação da cadeia lateral dos Glu<sup>177</sup> constitui um fator importante para o processo de condução através do canal NavAb. Nesse sentido, pelo presente estudo não ter empregado nenhuma restrição estrutural aos átomos do sistema, o papel da orientação das cadeias laterais, bem como a influência da aplicação de tensão transmembrânica na orientação desses resíduos poderá ser posteriormente avaliada.

Outro aspecto interessante se refere ao mecanismo lento de inativação “tipo C” (ou *C-type inactivation*) observado em canais iônicos. Esse fenômeno foi identificado nos primeiros estudos de eletrofisiologia, porém caracterizado em detalhes somente mais recentemente. Foi demonstrada a existência de um mecanismo de controle da condução iônica, distinto do *gate* hidrofóbico, localizado no filtro de seletividade de canais seletivos a potássio. Nesse mecanismo, os grupos carbonila que delineiam o FS sofrem consideráveis mudanças conformacionais ou torções que persistem por longos períodos de tempo e impedem a condução iônica (Bernèche and Roux, 2005; Domene et al., 2008). Estudos de mutagênese e eletrofisiologia sugerem que canais de  $Na^+$  apresentam um mecanismo semelhante ao descrito para canais de  $K^+$  (Balsler et al., 1996; Ong et al., 2000; Pavlov et al., 2005). Entretanto, detalhes estruturais com resolução atômica desse mecanismo ainda são desconhecidos. Nesse contexto, é plausível supor que essa flexibilidade do FS tenha impacto tão ou mais relevante ao funcionamento de canais de sódio, quanto o observado em canais de potássio. A fim de esclarecer a influência de configurações alternativas do FS tanto na condução e seletividade, quando nos mecanismos de inativação,

novas análises, fazendo uso das estruturas de alta resolução atualmente disponíveis, ainda devem ser conduzidas.

### **V.3 Efeitos de Polarização**

Não surpreendentemente, as informações extraídas de estudos de dinâmica molecular estão intrinsecamente condicionadas à descrição da energia potencial adotada e às escalas de tempo amostradas. Para a maioria dos sistemas biomoleculares analisados via DM, simulações atomísticas utilizando campos de força clássicos representam o sistema de interesse de forma satisfatoriamente detalhada, e com um custo computacional pequeno o suficiente para gerar trajetórias nas escalas de tempo relevantes. Entretanto, um tratamento acurado para processos de polarização ainda representa um grande desafio. De forma geral, as cargas atômicas consideradas nos campos de força utilizados em dinâmica molecular são pontos fixos – i.e. a polarização das moléculas simuladas é definida na construção do sistema, considerando um comportamento médio. Contudo, a polarização eletrônica se torna particularmente importante na presença de campos locais fortes, como por exemplo no caso de íons confinados ao ambiente do filtro de seletividade (Bucher and Rothlisberger, 2010; Bucher et al., 2006; Guidoni and Carloni, 2002; Yu et al., 2010). Nesse contexto, é possível que uma consideração simplificada desse fenômeno resulte em descrições menos precisas dos eventos de condução e seletividade em CIs.

De fato, um estudo recente (Fowler et al., 2013) aponta que o campo de força clássico não é capaz de descrever corretamente a superfície de energia livre associada à condução em canais  $K^+$ . O fato de a investigação de Ulmschneider e colaboradores, na qual simulações de eventos de condução a diferentes voltagens foram realizadas, ser capaz de recuperar condutâncias medidas experimentalmente sugere uma boa descrição do evento de condução em canais de  $Na^+$ . Possivelmente, tal diferença resulta do fato de o FS de canais de  $Na^+$  ser mais amplo, correlacionado à maior hidratação dos íons no interior do FS. Não obstante, é possível que diferentes mecanismos de condução levem a valores semelhantes de condutância e mais estudos ainda devem ser realizados. Além disso, outro aspecto deve ser ponderado cuidadosamente: o

estado de protonação dos glutamatos do FS desses canais. Observa-se que nas análises realizadas nesse e demais trabalhos relativos à condução através dos canais NavAb e NavMs, os quatro glutamatos do FS encontram-se desprotonados. Essa escolha é fundamentada no fato de esses resíduos estarem na entrada extracelular do FS e portanto acessíveis ao solvente. Nessa condição, espera-se que o seu ponto isoelétrico seja próximo da referência 4,5 (relativa ao aminoácido em solução), de forma que em pH neutro este se encontraria negativamente carregado. Entretanto, a variedade de estados de protonação possíveis para os quatro Glu<sup>177/53</sup> não deve ser negligenciada. Corry e Thomas, por exemplo, consideram também uma situação em dois desses glutamatos se encontram protonados e observam alterações nos mecanismos de seletividade reportados. Estudos envolvendo campos de força polarizáveis, ou cálculos quânticos do tipo QM/MM devem ser importantes para certificar o estado de protonação dos glutamatos, bem como para avaliar em detalhes o efeito da polarização eletrônica na condução/seletividade iônica.

## **VI. Conclusões**

Neste trabalho, duas metodologias – metadinâmica e simulações de dinâmica molecular com aplicação de potenciais eletrostáticos transmembrânicos, considerando campos de força clássicos – foram empregadas na investigação do mecanismo de condução de íons sódio no canal iônico dependente de voltagem bacteriano NavAb. Em sua totalidade, os resultados gerados nos permitem desprender informações a respeito desse processo. Primeiramente, foram identificados três sítios de ligação ao sódio, HFS, CEN e IN, antecipados desde a resolução da estrutura cristalográfica do canal NavAb. Íons experimentam uma relativa liberdade de modos de ligação no interior do FS devido ao seu diâmetro comparativamente mais amplo, em relação a por exemplo canais de  $K^+$ . Portanto determinou-se também posições radiais acessíveis em relação ao eixo de simetria (z) do caminho de permeação do canal. Tanto as afinidades quanto as ocupâncias mensuradas para cada um desses sítios quando o filtro de seletividade é ocupado por dois íons atesta a proposição de que os  $Na^+$  se ligam aos sítios HFS, CEN e IN de forma desalinhada ou alinhados ao eixo axial de simetria, desalinhada e alinhada, respectivamente.(cf. IV.1)

O processo de condução pode ser vislumbrado como a alternância dos íons entre sítios favoráveis de ligação, resultando no transporte de um dos cátions do meio extracelular para a cavidade central, ou o oposto. Dessa forma, a residência combinada de dois íons nesses sítios de ligação revelam uma variedade de configurações estáveis que potencialmente contribuem para o processo de permeação. Segundo a presente análise, o caminho de mínima energia livre calculado a 0 mV incorpora cinco dessas configurações, sugerindo que a condução ocorre preferencialmente na forma: EX-HFS  $\leftrightarrow$  HFS<sup>2</sup>  $\leftrightarrow$  HFS-CEN  $\leftrightarrow$  CEN<sup>2</sup>  $\leftrightarrow$  CEN-IN  $\leftrightarrow$  CEN-CC.

Simulações sob influência de potencial eletrostático transmembrânico revelam que em condições hiperpolarizadas, o mesmo mecanismo com dois íons explicitado acima descreve o caminho preferencialmente seguido nos eventos de condução amostrados. De forma contrastante, em condições de despolarização, o mecanismo mais provável parece ser um envolvendo não dois, mas três cátions que se movem de forma coerente, porém não completamente acoplados.

Dada a relevância da compreensão dos mecanismos que subsidiam o funcionamento de CIs, e particularmente canais de  $Na^+$ , desde a resolução da primeira estrutura cristalográfica de canal de sódio, em 2011, diversos grupos independentes abordaram concomitantemente a questão da condução iônica nesses canais. O presente trabalho e o desses grupos, apesar de versarem

sobre o mesmo tema, sobrepõem-se em poucos aspectos. Dessa maneira, lacunas deixadas por esses estudos foram aqui preenchidas, bem como aspectos inéditos revelados.

Adicionalmente, ainda que os resultados aqui apresentados tenham sido desenvolvidos em um canal iônico dependente de voltagem, o poro e o DSV constituem domínios independentes, tanto estrutural quanto funcionalmente (McCusker et al., 2011; Shaya et al., 2011). Assim, espera-se que as conclusões retiradas desse estudo sejam válidas também para demais canais dependentes de voltagem ou não, cuja estrutura seja semelhante à do NavAb.

## **VII. Perspectivas**

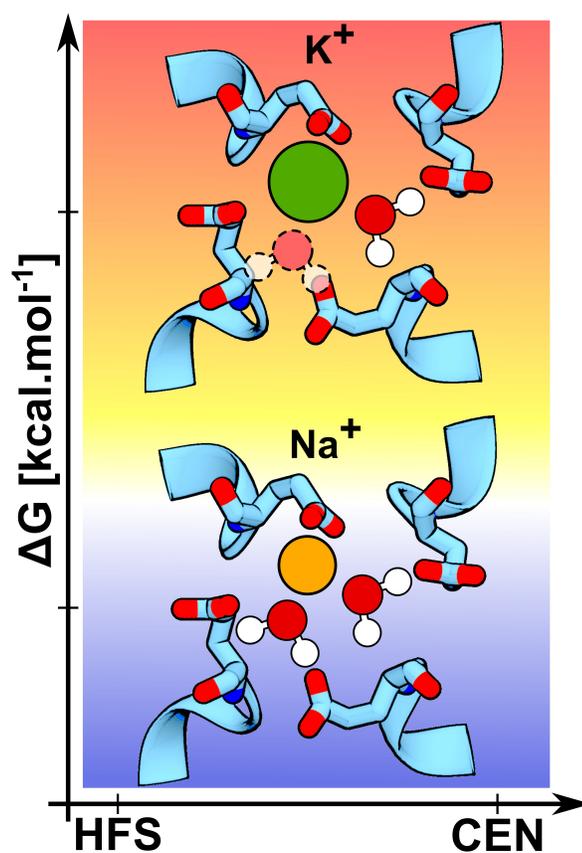
Apesar de caracterizações bioquímicas, biofísicas e eletrofisiológicas de canais de sódio, a até então recente escassez de dados estruturais e dinâmicos em nível atômico dificultou o avanço de tópicos fundamentais, como mecanismos de ativação, mecanismos de condução, definição dos determinantes da seletividade iônica, mecanismos de modulação por moléculas agonistas e antagonistas, etc. Nesse contexto, é evidente que novas pesquisas se fazem necessárias para o esclarecimento dessas e demais questões relevantes para a compreensão do complexo assunto que é o funcionamento de canais iônicos.

## VII.1 Mecanismo de Seletividade

Entre as questões que ainda devem ser investigadas a fim de melhor caracterizar as estruturas e modos de funcionamento de canais iônicos, destaca-se o mecanismo que resulta na discriminação dos íons atravessando essas proteínas. Nos trabalhos de Corry e Thomas (Corry and Thomas, 2012) e Furini e Domene (Furini and Domene, 2012), os autores reportam o perfil de energia livre relativo à permeação de um ou dois  $K^+$  através do filtro de seletividade de NavAb. Segundo evidenciado por esses estudos, íons  $K^+$  podem se ligar aos mesmos sítios HFS, CEN e IN identificados para íons  $Na^+$ . Entretanto,  $K^+$  deve atravessar uma barreira de energia livre  $3 \text{ kcal.mol}^{-1}$  maior do que a atravessada por  $Na^+$  entre os sítios HFS e CEN. Essa região é definida pelo plano formado pelas cadeias laterais dos  $Glu^{177}$ , também a mais constricta do FS. Na travessia de íons  $Na^+$ , há um mínimo local de energia entre esses sítios, inexistente no perfil de energia livre da condução de  $K^+$ . Uma análise mais detalhada das trajetórias sugere o motivo desse contraste: ambos íons mantêm seu número de coordenação aproximadamente constante ao longo da travessia (principalmente moléculas de água, mas também oxigênios da proteína), entretanto íons  $K^+$  não conseguem atravessar na geometria preferencial, com moléculas de água alinhadas ao plano de  $Glu^{177}$ . **(Figura. 21)** Ainda segundo esse estudo, é proposto que a remoção das cargas das cadeias laterais dos glutamatos elimina a seletividade observada (Corry and Thomas, 2012). Sabidamente, no entanto, simulações empregando campos de força clássicos sequer são capazes de recuperar o número de hidratação para íons  $Na^+$  e  $K^+$  em solução, o que levanta dúvidas a respeito da hipótese proposta para a seletividade dos canais de  $Na^+$ . (Ansell et

al., 2006; Varma and Rempe, 2006) Deve-se notar ainda que a mesma ressalva a respeito da coordenada de reação incompleta (cf. V.1) deve ser feita também para essas análises.

A fim de esclarecer o papel da camada de coordenação, bem como do estado de protonação dos resíduos do filtro de seletividade, na geração de seletividade, propõe-se investigar diferentes estruturas de hidratação via metodologias *ab initio* ou métodos híbridos de mecânica quântica e mecânica clássica (QM/MM). Em vista das limitações do campo de força clássico na descrição de graus de liberdade eletrônicos (discutidas anteriormente, cf. V.3), uma análise mais completa considerando efeitos de polarização, por exemplo, fornece uma perspectiva mais acurada do processo de condução e seletividade.



**Figura. 21** Potencial mecanismo de seletividade em canais de  $\text{Na}^+$  levantado por Corry e Thomas. Nesse mecanismo, é proposto que a coordenação de íons  $\text{K}^+$  em uma geometria desfavorável entre os sítios HFS e CEN resulta na desestabilização da configuração, explicando a seletividade de  $\text{Na}^+$  em detrimento de  $\text{K}^+$ .

## VII.2 Relação com Demais Canais Iônicos – $K^+$ , $Ca^{++}$ e canais de $Na^+$ eucariotos

Mesmo na fase inicial em que se encontra a caracterização estrutural de canais de  $Na^+$ , uma comparação entre os mecanismos já bem caracterizados para canais de potássio e as novas descobertas relativas a canais de sódio, bem como diferenças nas sequências de aminoácidos desses canais (Yu et al., 2005), sugerem que desde muito cedo na história evolutiva dos CIs, pelo menos dois mecanismos essencialmente divergentes surgiram a fim de racionalizar o transporte dessas duas espécies iônicas. Em contrapartida, canais seletivos a  $Ca^{++}$  parecem ter mais características em comum com os canais de  $Na^+$ . Apesar da evidente diferença entre os íons permitidos a atravessar cada um desses canais, análises de sequências e estudos de mutagênese sugerem que canais de  $Na^+$  e de  $Ca^{++}$  possuem filtros de seletividade com arquiteturas semelhantes (Favre et al., 1996; Heinemann et al., 1992; Tang et al., 1993; Yu et al., 2005). Como suporte, foi demonstrado que canais de  $Na^+$  podem ter sua seletividade convertida a  $Ca^{++}$  com apenas uma mutação pontual (Heinemann et al., 1992; Yue et al., 2002). Conversivelmente, a substituição de um único resíduo no FS do canal de cálcio, o torna permeável a íons  $Na^+$  (Tang et al., 1993). Assim, é possível supor que as investigações a respeito de canais de  $Na^+$  podem também servir ao propósito de fornecer informações a respeito da muito menos caracterizada família de canais de  $Ca^{++}$ .

Contudo, uma importante ressalva deve feita. Canais de  $Na^+$  bacterianos diferem em diversos aspectos e são consideravelmente mais simples do que canais de sódio eucarióticos. Enquanto aqueles são formados por quatro subunidades idênticas, estes são formados por uma única cadeia e os domínios homólogos apresentam diferenças de sequência. Além disso, uma diferença fundamental é observada no filtro de seletividade: em substituição ao plano de glutamatos característico de canais de  $Na^+$  bacterianos, a região mais estreita do FS de canais de  $Na^+$  eucarióticos possui um anel assimétrico com a sequência DEKA (Heinemann et al., 1992; Kim et al., 1993). Apesar do avanço representado pela cristalização das estruturas de Navs procarióticos, as divergências mencionadas acima tornam a comparação direta entre achados entre canais procarióticos e eucarióticos uma tarefa desafiante. Estudos recentes têm avançado nesse sentido ao modelar o filtro de seletividade do canal de sódio eucarioto Nav1, com base na estrutura do NavAb, e ao recuperar a ligação do canal modelado com toxinas que

conhecidamente se ligam ao Nav1 (Tikhonov and Zhorov, 2012).

### VII.3 Modelos Mais Seletivos

Ainda no contexto da seletividade iônica em CIs, enquanto a abordagem acima (VII.1) é capaz de fornecer esclarecimentos sobre os mecanismos subjacentes, uma análise quantitativa explícita da seletividade de determinado canal só pode ser alcançada a partir dos valores de condutância para as diferentes espécies iônicas avaliadas. Ulmschneider e colaboradores analisaram em suas simulações, além de íons  $\text{Na}^+$ , eventos de condução de íons  $\text{K}^+$  através do canal de sódio NavMs, na escala de  $\mu\text{s}$ . Os valores de corrente iônica extraídos dessas simulações indicam uma razão  $I_{\text{Na}^+}/I_{\text{K}^+}$  de aproximadamente 3 a 6. Tais valores são consideravelmente mais baixos do que os observados para canais de  $\text{K}^+$  ou mesmo para canais de sódio eucariotos (Favre et al., 1996). Assim, é possível inferir que canais cujas estruturas são atualmente conhecidas são pouco seletivos. Segue portanto um questionamento razoável referente à relevância ou adequação do uso de tais canais bacterianos para se compreender o fenômeno da seletividade em canais de  $\text{Na}^+$  mais seletivos.

Diante desse fato, uma possível abordagem fundamenta-se na inserção de modificações que tornem os filtros de seletividade mais seletivos a  $\text{Na}^+$ , naturalmente acompanhada da análise dos mecanismos responsáveis pela aquisição dessa seletividade. Nesse sentido, uma estratégia promissora consiste na incorporação da sequência de resíduos DEKA presente em canais eucariotos no arcabouço estrutural de NavAb/NavMs. Investigações têm realizado esforços para atingir esse objetivo (Tikhonov and Zhorov, 2012; Xia et al., 2013), entretanto esta não é uma tarefa trivial em vista da participação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido no filtro de seletividade. Enquanto canais de sódio procariotos apresentam um anel de glutamatos (EEEE) na região mais externa do filtro, canais eucariotos possuem a assimétrica sequência DEKA. Embora, como discutido acima, as perspectivas sejam otimistas, de fato tais diferenças entre canais de sódio eucariotos e procariotos impõem um maior desafio para modelagem desse FS.

#### VII.4 Modelo Cinético e Componentes da Superfície de Energia Livre

No presente trabalho, os eventos de condução amostrados via DM com imposição de diferença de potencial foram gerados somente para um valor de voltagem, de forma que não foi possível recuperar valores de condutância diretamente a partir das taxas de condução observadas. Apesar de uma abordagem envolvendo extensas simulações a diferentes voltagens ser a princípio adequada para se recuperar valores de condutância (Ulmschneider et al., 2013), o excessivo custo computacional associado à amostragem exaustiva de eventos de condução limita sua aplicabilidade. Particularmente sob a influência de potenciais eletrostáticos transmembrânicos menos elevados, coerentes com valores fisiológicos, o tempo requerido para amostrar satisfatoriamente o espaço de fase se torna proibitivo. Em um contexto de produção de modelos de filtro de seletividade seletivos a  $\text{Na}^+$ , metodologias menos onerosas, computacionalmente, são fundamentais. Propõe-se portanto que modelos cinéticos, como teoria do estado de transição, por exemplo podem ser capazes de computar as taxas de condução a partir das alturas das barreiras observadas nas superfícies de energia livre e assim avaliar a condutância e seletividade dessas construções. Além disso, sistemas mais simples, contendo por exemplo apenas o filtro de seletividade do CI, também são alternativas para se reduzir o custo computacional e possibilitar a utilização de descrições mais acuradas do sistema (e.g.: campos de força polarizáveis ou cálculos *ab initio*).

Ainda com o objetivo de explorar em detalhes os mecanismos moleculares que regulam os eventos de condução e/ou seletividade é interessante analisar cada um dos componentes da superfície de energia livre separadamente. Decompor a superfície de energia livre nos permite avaliar que componentes dessa energia, se algum em especial, contribuem mais significativamente para o processo. Como suporte, observa-se que em um estudo envolvendo modelos simplificados de canais, Portella e colaboradores puderam decompor as contribuições entrálpicas e entrópicas da energia livre e portanto determinar a origem das barreiras energéticas observadas.(Portella et al., 2008)

## VII.5 Modulação de Canais de Sódio

Outro tópico extremamente relevante que deve ser abordado nas próximas pesquisas diz respeito à modulação de canais iônicos pela interação com ligantes, como toxinas e anestésicos. Torna-se particularmente interessante investigar o efeito desses ligantes em canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem pois eles são responsáveis pela geração do potencial de ação de células excitáveis. Além disso, uma maior diversidade de moléculas moduladoras parecem se ligar a canais de  $\text{Na}^+$  do que a canais de  $\text{K}^+$  (Catterall et al., 2007). Uma classe de moléculas particularmente interessante a ser investigada são os anestésicos. Apesar de extensamente empregados, pouco se sabe a respeito dos alvos moleculares e mecanismos de ação de anestésicos gerais e locais. Foi demonstrado anteriormente que um canal procarioto relacionado a NavAb, o NaChBac (de *Bacillus halodurans*) é inibido por concentrações clínicas de isoflurano (Ouyang et al., 2007). Em um estudo mais recente, mecanismos de ação também foram propostos para um modelo estrutural desse mesmo canal (Raju et al., 2013). Nesse contexto, a estrutura cristalográfica do canais iônico NavAb, e demais estruturas de canais de  $\text{Na}^+$  recentemente cristalizadas, devem ser extremamente úteis na investigação da ação tanto de anestésicos gerais, quanto locais no funcionamento dos canais iônicos.

## VII.6 Canais Iônicos e Nanotecnologia

Finalmente, canais iônicos têm a surpreendente capacidade de selecionar cátions extremamente similares, conduzi-los a altíssimas taxa, bem como ser regulados por fatores externos (como voltagem ou pH, por exemplo). Tais propriedades têm inspirado a produção de novas tecnologias biomiméticas. Em um estudo computacional recente (He et al., 2013), os autores projetaram nanoporos de grafeno inspirados nas propriedades de canais iônicos. Ao contrário das proteínas de membrana que geralmente perdem sua função uma vez que retiradas do ambiente biológico, nanoporos sintéticos possuem uma aplicabilidade em uma gama muito maior de ambientes. Além de fornecer informações a respeito dos mecanismos de seletividade

relevantes para os sistemas biológicos, a produção de nanoporos sintéticos seletivos têm a perspectiva de ser amplamente aplicada na nanobiotecnologia. Potenciais aplicações desses nanoporos sintéticos, segundo os autores, variam de sensores de íons e nano-aparelhos regulados por pequenas variações de voltagem a dispositivos para dessalinização da água e produção de diagnósticos. Tais aplicações nanotecnológicas e demais perspectivas aqui apresentadas são um testemunho a favor da relevância do estudo de canais iônicos e a respeito das potenciais implicações desses estudos.

## VIII. Referências Bibliográficas

- Aksimentiev, A., and Schulten, K. (2005). Imaging  $\alpha$ -Hemolysin with Molecular Dynamics: Ionic Conductance, Osmotic Permeability, and the Electrostatic Potential Map. *Biophys. J.* 88, 3745–3761.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allen, M.P., and Tildesley, D.J. (1989). *Computer simulation of liquids* (Oxford [England]; New York: Clarendon Press ; Oxford University Press).
- Allen, T.W., Andersen, O.S., and Roux, B. (2004). On the Importance of Atomic Fluctuations, Protein Flexibility, and Solvent in Ion Permeation. *J. Gen. Physiol.* 124, 679–690.
- Amaral, C.G. do (2013). Mecanismo de ativação de canais iônicos dependentes de voltagem, Kv e Nav, e a interação com anestésicos gerais.
- Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M.L., and Treptow, W. (2012). Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Andersen, H.C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* 72, 2384–2393.
- Ansell, S., Barnes, A.C., Mason, P.E., Neilson, G.W., and Ramos, S. (2006). X-ray and neutron scattering studies of the hydration structure of alkali ions in concentrated aqueous solutions. *Biophys. Chem.* 124, 171–179.
- Aqvist, J., and Luzhkov, V. (2000). Ion permeation mechanism of the potassium channel. *Nature* 404, 881–884.
- Armstrong, C.M. (1969). Inactivation of the Potassium Conductance and Related Phenomena Caused by Quaternary Ammonium Ion Injection in Squid Axons. *J. Gen. Physiol.* 54, 553–575.
- Balsler, J.R., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M.T., Marban, E., and Tomaselli, G.F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in  $\mu$ 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol.* 494 ( Pt 2), 431–442.
- Barber, A.F., Carnevale, V., Raju, S.G., Amaral, C., Treptow, W., and Klein, M.L. (2012). Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim.*

Biophys. Acta BBA - Biomembr. *1818*, 2120–2125.

Batcho, P.F., Case, D.A., and Schlick, T. (2001). Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* *115*, 4003.

Beckstein, O., Tai, K., and Sansom, M.S.P. (2004). Not Ions Alone: Barriers to Ion Permeation in Nanopores and Channels. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 14694–14695.

Berneche, S., and Roux, B. (2000). Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* *78*, 2900–2917.

Bernèche, S., and Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel. *Nature* *414*, 73–77.

Bernèche, S., and Roux, B. (2005). A Gate in the Selectivity Filter of Potassium Channels. *Structure* *13*, 591–600.

Bhandarkar, M., Brunner, R., Chipot, C., Dalke, A., Dixit, S., Grayson, P., Gullinsrud, J., Gursoy, A., Humphrey, W., Hurwitz, D., et al. (2002). NAMD version 2.4.  
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd>.

Bostick, D.L., and Brooks, C.L. (2007). Selectivity in K<sup>+</sup> channels is due to topological control of the permeant ion's coordinated state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 9260–9265.

Bostick, D.L., and Brooks, C.L. (2010). Selective Complexation of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in Simple Polarizable Ion-ligating Systems. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 13185–13187.

Brohawn, S.G., Mármol, J. del, and MacKinnon, R. (2012). Crystal Structure of the Human K2P TRAAK, a Lipid- and Mechano-Sensitive K<sup>+</sup> Ion Channel. *Science* *335*, 436–441.

Brooks, B.R., Brooks, C.L., Mackerell, A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., et al. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* *30*, 1545–1614.

Bucher, D., and Rothlisberger, U. (2010). Molecular simulations of ion channels: a quantum chemist's perspective. *J. Gen. Physiol.* *135*, 549–554.

Bucher, D., Raugei, S., Guidoni, L., Dal Peraro, M., Rothlisberger, U., Carloni, P., and Klein, M.L. (2006). Polarization effects and charge transfer in the KcsA potassium channel. *Biophys. Chem.* *124*, 292–301.

Carnevale, V., Treptow, W., and Klein, M.L. (2011). Sodium Ion Binding Sites and Hydration in the Lumen of a Bacterial Ion Channel from Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.*

Lett. 2, 2504–2508.

Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007).

Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 49, 124–141.

Chakrabarti, N., Ing, C., Payandeh, J., Zheng, N., Catterall, W.A., and Pomès, R. (2013).

Catalysis of Na<sup>+</sup> permeation in the bacterial sodium channel NaVA<sub>B</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11331–11336.

Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 311–318.

Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Lewis, A., Vásquez, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2007). Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062–1069.

Corry, B., and Thomas, M. (2012). Mechanism of Ion Permeation and Selectivity in a Voltage Gated Sodium Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1840–1846.

Crozier, P.S., Henderson, D., Rowley, R.L., and Busath, D.D. (2001). Model channel ion currents in NaCl-extended simple point charge water solution with applied-field molecular dynamics. *Biophys. J.* 81, 3077–3089.

Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089–10092.

Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., and Tarek, M. (2008). Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *J. Phys. Chem. B* 112, 5547–5550.

Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M.L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011). Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Domene, C., Klein, M.L., Branduardi, D., Gervasio, F.L., and Parrinello, M. (2008).

Conformational Changes and Gating at the Selectivity Filter of Potassium Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9474–9480.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69–77.

Favre, I., Moczydlowski, E., and Schild, L. (1996). On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> in the voltage-gated sodium channel. *Biophys. J.* *71*, 3110–3125.

Feller, S.E., and MacKerell, A.D. (2000). An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. *J. Phys. Chem. B* *104*, 7510–7515.

Feller, S.E., and MacKerell Jr, A.D. (2000). An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* *104*, 7510–7515.

Fowler, P.W., Abad, E., Beckstein, O., and Sansom, M.S.P. (2013). Energetics of multi-ion conduction pathways in potassium ion channels. *J. Chem. Theory Comput.* 131008183610004.

Frenkel, D., and Smit, B. (2002). *Understanding molecular simulation from algorithms to applications* (San Diego: Academic Press).

Furini, S., and Domene, C. (2012). On Conduction in a Bacterial Sodium Channel. *PLoS Comput Biol* *8*, e1002476.

Guidoni, L., and Carloni, P. (2002). Potassium permeation through the KcsA channel: a density functional study. *Biochim. Biophys. Acta* *1563*, 1–6.

Guidoni, L., Torre, V., and Carloni, P. (2000). Water and potassium dynamics inside the KcsA K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* *477*, 37–42.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* *391*, 85–100.

He, Z., Zhou, J., Lu, X., and Corry, B. (2013). Bioinspired Graphene Nanopores with Voltage-Tunable Ion Selectivity for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. *ACS Nano*.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* *66*, 1061–1067.

Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* *356*, 441–443.

Hénin, J., Fiorin, G., Chipot, C., and Klein, M.L. (2010). Exploring Multidimensional Free Energy Landscapes Using Time-Dependent Biases on Collective Variables. *J. Chem. Theory Comput.* *6*, 35–47.

Hénin, J., and Chipot, C. (2004). Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. *J Phys Chem* *121*, 2904–2914.

Hille, B. (1975). Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J. Gen. Physiol.* *66*, 535–560.

Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer Associates Inc).

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* *116*, 449–472.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952b). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* *116*, 473–496.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* *116*, 497–506.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* *117*, 500–544.

Hoover, W.G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* *31*, 1695–1697.

Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* *14*, 33–38, 27–28.

Imai, S., Osawa, M., Takeuchi, K., and Shimada, I. (2010). Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 6216–6221.

Jensen, M.Ø., Borhani, D.W., Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Jogini, V., Eastwood, M.P., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2010). Principles of conduction and hydrophobic gating in K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 5833–5838.

Jensen, M.Ø., Jogini, V., Borhani, D.W., Leffler, A.E., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2012). Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* *336*, 229–233.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* *417*, 515–522.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* *423*, 33–41.

Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., and Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* *79*, 926–935.

Katz, B., and Miledi, R. (1970). Membrane Noise produced by Acetylcholine. *Nature* *226*, 962–963.

- Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E., and Schulten, K. (2006). Dynamics of K<sup>+</sup> ion conduction through Kv1.2. *Biophys. J.* *91*, L72–74.
- Kim, M.K., Morii, T., Sun, L.X., Imoto, K., and Mori, Y. (1993). Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett* *318*, 145–148.
- Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T., and Doyle, D.A. (2003). Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science* *300*, 1922–1926.
- Laio, A., and Gervasio, F.L. (2008). Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science. *Rep. Prog. Phys.* *71*, 126601.
- Laio, A., and Parrinello, M. (2002). Escaping free-energy minima. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 12562–12566.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001). Kcsa: It's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* *118*, 303–314.
- Lindahl, E., Hess, B., and Spoel, D. van der (2001). GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Mol. Model. Annu.* *7*, 306–317.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science* *309*, 897–903.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* *450*, 376–382.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, Dunbrack, R. L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., et al. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. *J. Phys. Chem. B* *102*, 3586–3616.
- MacKerell Jr, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack Jr, R.L., Evanseck, J., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., et al. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* *102*, 3586–3616.
- MacKerell Jr, A.D., Feig, M., and Brooks III, C.L. (2004). Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J Am Chem Soc* *126*, 6987–6999.
- McCusker, E.C., D'Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2011). Simplified Bacterial “Pore” Channel Provides Insight into the Assembly, Stability, and Structure of Sodium Channels.

J. Biol. Chem. 286, 16386–16391.

McCusker, E.C., Bagn eris, C., Naylor, C.E., Cole, A.R., D’Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* 3, 1102.

Miller, A.N., and Long, S.B. (2012). Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1. *Science* 335, 432–436.

Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37–42.

Neyton, J., and Miller, C. (1988). Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 549–567.

Nimigean, C.M., and Miller, C. (2002). Na<sup>+</sup> Block and Permeation in a K<sup>+</sup> Channel of Known Structure. *J. Gen. Physiol.* 120, 323–335.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., et al. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.

Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and St uhmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.* 259, 213–216.

Nos e, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52, 255–268.

Noskov, S.Y., Bern eche, S., and Roux, B. (2004). Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431, 830–834.

Nury, H., Poitevin, F., Renterghem, C.V., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010). One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6275–6280.

Ong, B.-H., Tomaselli, G.F., and Balser, J.R. (2000). A Structural Rearrangement in the Sodium Channel Pore Linked to Slow Inactivation and Use Dependence. *J. Gen. Physiol.* 116, 653–662.

Ouyang, W., Jih, T.-Y., Zhang, T.-T., Correa, A.M., and Hemmings, H.C. (2007). Isoflurane Inhibits NaChBac, a Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 1076–1083.

Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P., and French, R.J. (2005). The Pore,

not Cytoplasmic Domains, Underlies Inactivation in a Prokaryotic Sodium Channel. *Biophys. J.* *89*, 232–242.

Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* *475*, 353–358.

Payandeh, J., El-Din, T.M.G., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*.

Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* *26*, 1781–1802.

Ponder, J.W., and Case, D.A. (2003). Force Fields for Protein Simulations. In *Advances in Protein Chemistry*, Valerie Daggett, ed. (Academic Press), pp. 27–85.

Portella, G., Hub, J.S., Vesper, M.D., and de Groot, B.L. (2008). Not Only Enthalpy: Large Entropy Contribution to Ion Permeation Barriers in Single-File Channels. *Biophys. J.* *95*, 2275–2282.

Qiu, H., Shen, R., and Guo, W. (2012). Ion solvation and structural stability in a sodium channel investigated by molecular dynamics calculations. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 2529–2535.

Raju, S.G., Barber, A.F., LeBard, D.N., Klein, M.L., and Carnevale, V. (2013). Exploring Volatile General Anesthetic Binding to a Closed Membrane-Bound Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel via Computation. *PLoS Comput Biol* *9*, e1003090.

Roux, B. (2008). The Membrane Potential and its Representation by a Constant Electric Field in Computer Simulations. *Biophys. J.* *95*, 4205–4216.

Roux, B., Bernèche, S., Egwolf, B., Lev, B., Noskov, S.Y., Rowley, C.N., and Yu, H. (2011). Ion selectivity in channels and transporters. *J. Gen. Physiol.* *137*, 415–426.

Sachs, J.N., Crozier, P.S., and Woolf, T.B. (2004). Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. *J. Chem. Phys.* *121*, 10847–10851.

Schuler, L.D., Daura, X., and van Gunsteren, W.F. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* *22*, 1205–1218.

Shaya, D., Kreir, M., Robbins, R.A., Wong, S., Hammon, J., Brüggemann, A., and Minor, D.L. (2011). Voltage-gated sodium channel (NaV) protein dissection creates a set of functional pore-only proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 12313–12318.

Shaya, D., Findeisen, F., Abderemane-Ali, F., Arrigoni, C., Wong, S., Nurva, S.R., Loussouarn, G., and Minor Jr., D.L. (2013). Structure of a Prokaryotic Sodium Channel Pore Reveals Essential Gating Elements and an Outer Ion Binding Site Common to Eukaryotic Channels. *J. Mol. Biol.*

Sotomayor, M., and Schulten, K. (2004). Molecular Dynamics Study of Gating in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance MscS. *Biophys. J.* *87*, 3050–3065.

Stock, L., Delemotte, L., Carnevale, V., Treptow, W., and Klein, M.L. (2013). Conduction in a Biological Sodium Selective Channel. *J. Phys. Chem. B.*

Suenaga, A., Komeiji, Y., Uebayasi, M., Meguro, T., Saito, M., and Yamato, I. (1998). Computational observation of an ion permeation through a channel protein. *Biosci. Rep.* *18*, 39–48.

Tang, S., Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Varadi, G., and Schwartz, A. (1993). Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J. Biol. Chem.* *268*, 13026–13029.

Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* *237*, 770–775.

Terlau, H., Heinemann, S.H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., and Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* *293*, 93–96.

Thompson, A.N., Kim, I., Panosian, T.D., Iverson, T.M., Allen, T.W., and Nimigean, C.M. (2009). Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> binding sites within the KcsA pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1317–1324.

Tieleman, D.P., Berendsen, H.J., and Sansom, M.S. (2001). Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophys. J.* *80*, 331–346.

Tikhonov, D.B., and Zhorov, B.S. (2012). Architecture and pore block of eukaryotic voltage-gated sodium channels in view of NavAb bacterial sodium channel structure. *Mol. Pharmacol.* *82*, 97–104.

Treptow, W., and Klein, M.L. (2010). The membrane-bound state of K2P potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 8145–8151.

- Treptow, W., and Tarek, M. (2006a). Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels. *Biophys. J.* *91*, L26–L28.
- Treptow, W., and Tarek, M. (2006b). Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophys. J.* *90*, L64–L66.
- Treptow, W., and Tarek, M. (2006c). K<sup>+</sup> Conduction in the Selectivity Filter of Potassium Channels Is Monitored by the Charge Distribution along Their Sequence. *Biophys. J.* *91*, L81–L83.
- Ulmschneider, M.B., Bagn eris, C., McCusker, E.C., DeCaen, P.G., Delling, M., Clapham, D.E., Ulmschneider, J.P., and Wallace, B.A. (2013). Molecular dynamics of ion transport through the open conformation of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Varma, S., and Rempe, S.B. (2006). Coordination numbers of alkali metal ions in aqueous solutions. *Biophys. Chem.* *124*, 192–199.
- Verlet, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* *159*, 98–103.
- Xia, M., Liu, H., Li, Y., Yan, N., and Gong, H. (2013). The Mechanism of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Selectivity in Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels Based on Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. J.* *104*, 2401–2409.
- Yifrach, O., and MacKinnon, R. (2002). Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel. *Cell* *111*, 231–239.
- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., and Catterall, W.A. (2005). Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol. Rev.* *57*, 387–395.
- Yu, H., Mazzanti, C.L., Whitfield, T.W., Koeppe, R.E., Andersen, O.S., and Roux, B. (2010). A Combined Experimental and Theoretical Study of Ion Solvation in Liquid N-Methylacetamide. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 10847–10856.
- Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A., and Clapham, D.E. (2002). The Cation Selectivity Filter of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac. *J. Gen. Physiol.* *120*, 845–853.
- Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., et al. (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature*.
- Zhong, Q., Moore, P.B., Newns, D.M., and Klein, M.L. (1998). Molecular dynamics study of the

LS3 voltage-gated ion channel. *FEBS Lett.* 427, 267–270.

Zhou, M., and MacKinnon, R. (2004). A Mutant KcsA K<sup>+</sup> Channel with Altered Conduction Properties and Selectivity Filter Ion Distribution. *J. Mol. Biol.* 338, 839–846.

## **IX. Anexos**

**IX.1 Anexo 1**

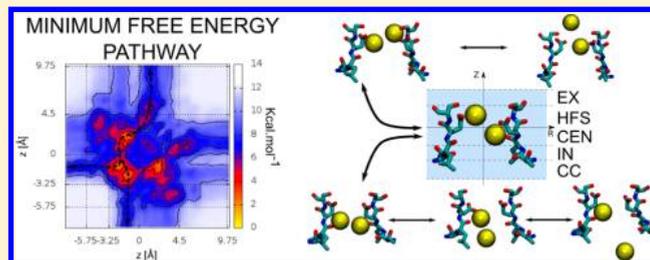
## **Conduction In a Biological Sodium Selective Channel**

# Conduction in a Biological Sodium Selective Channel

Letícia Stock,<sup>†,§</sup> Lucie Delemotte,<sup>‡,§</sup> Vincenzo Carnevale,<sup>\*,‡</sup> Werner Treptow,<sup>\*,†,‡</sup> and Michael L. Klein<sup>‡</sup><sup>†</sup>Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília DF, Brasil<sup>‡</sup>Institute of Computational and Molecular Science, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania 19122, United States

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The crystal structure of NavAb, a bacterial voltage gated Na<sup>+</sup> channel, exhibits a selectivity filter (SF) wider than that of K<sup>+</sup> channels. This new structure provides the opportunity to explore the mechanism of conduction and help rationalize its selectivity for sodium. Recent molecular dynamics (MD) simulations of single- and two-ion permeation processes have revealed that a partially hydrated Na<sup>+</sup> permeates the channel by exploring three SF binding sites while being loosely coupled to other ions and/or water molecules; a finding that differs significantly from the behavior of K<sup>+</sup> selective channels. Herein, we present results derived from a combination of metadynamics and voltage-biased MD simulations that throws more light on the nature of the Na<sup>+</sup> conduction mechanism. Conduction under 0 mV bias explores several distinct pathways involving the binding of two ions to three possible SF sites. While these pathways are very similar to those observed in the presence of a negative potential (inward conduction), a completely different mechanism operates for outward conduction at positive potentials.



from a combination of metadynamics and voltage-biased MD simulations that throws more light on the nature of the Na<sup>+</sup> conduction mechanism. Conduction under 0 mV bias explores several distinct pathways involving the binding of two ions to three possible SF sites. While these pathways are very similar to those observed in the presence of a negative potential (inward conduction), a completely different mechanism operates for outward conduction at positive potentials.

The functional viability of biological ion channels relies on their ability to conduct ions at a near-diffusion-limited rate as well as to discriminate between ionic species. These attributes are crucial for a variety of biological functions, including the propagation of nervous impulses, the control of osmotic pressure, and cellular contraction.<sup>1</sup> This remarkable behavior rests on the unique attributes of the structural motifs constituting their respective selectivity filters (SFs). Indeed, the presence of several polar/charged residues favors the partial desolvation of cations thereby ensuring a fast kinetics of permeation through the constricted region of the SF lumen.<sup>2</sup> Strikingly, similar ionic species can show permeation rates differing by, at least, 2 or 3 orders of magnitude. In general, passage of ions through the hydrophilic lumen of channels relies on a dynamic process of binding/dissociation to/from favorable SF binding sites. Subtle differences in the free-energy (FE) landscape describing this process for different ions results in significantly different permeation rates, providing a possible rationalization of selectivity.<sup>3</sup> To date, the mechanism of ionic conduction and selectivity operating in K<sup>+</sup> selective channels has been well characterized, as described extensively in recent reviews.<sup>3–6</sup>

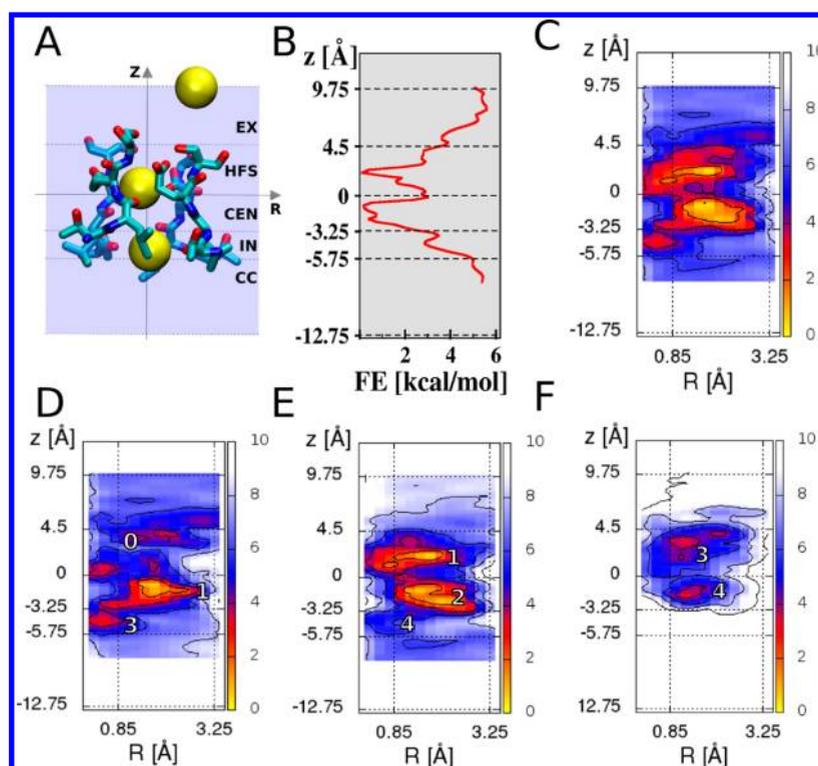
The atomic structure of NavAb, a bacterial voltage-gated Na<sup>+</sup> channel, was reported recently.<sup>7</sup> This finding enables a deeper understanding of the function of the Nav family and the closely related Cav channels. Indeed, NavAb is one of the possible ancestors of the large family of vertebrate Nav and Cav channels,<sup>8</sup> providing us with a working model to characterize the molecular mechanisms underlying ionic conduction in a Na<sup>+</sup> selective channel. In contrast to the case of K<sup>+</sup> channels, the structure of the NavAb SF, formed by a tetrameric

arrangement of the conserved sequence TLESWAS, features a pore 15 Å long that is large enough to accommodate a fully solvated cation (Figure 1A). The SF structure of NavAb exhibits a complex architecture formed by four layers of pore-lining oxygen ligands defining three putative sites for Na<sup>+</sup> binding, HFS, CEN, and IN, respectively, as originally envisioned by Payandeh et al.<sup>7</sup> The outermost site (HFS) is formed by the four negatively charged carboxyl groups involving the Glu177 side-chains and the hydroxyl groups of Ser178, whereas the other two sites, CEN and IN, are lined by the carbonyl groups of Leu176 and Thr175, respectively. The picture that emerged from K<sup>+</sup> channels of a rigid environment mimicking the first aqueous solvation shell<sup>9</sup> seems to be inappropriate for Na<sup>+</sup> channels, and most importantly, it is unable to rationalize selectivity.

Shortly after publication of the NavAb structure, several groups investigated independently the conduction mechanism of Na<sup>+</sup> across the SF of NavAb via MD simulations.<sup>10–13</sup> Studies relying on calculations of the potential of mean force (PMF) along the SF axis of symmetry (axial PMF) for a single Na<sup>+</sup> indicated that a single ion can bind the NavAb filter at sites HFS, CEN, and IN, providing support to the hypotheses of Payandeh et al.<sup>11–13</sup> As estimated from the axial PMFs, free-energy barriers in the range of 3–5 kcal/mol limit the diffusion of a single Na<sup>+</sup> through the SF of NavAb.<sup>11–13</sup> Although it may be possible for a single ion to overcome such an energy barrier, axial–axial PMF calculations for two Na<sup>+</sup> ions support the

Received: February 7, 2013

Revised: March 2, 2013



**Figure 1.** Binding of two  $\text{Na}^+$  ions in the NavAb SF. (A) Available SF sites are: the external medium (EX); the central cavity (CC); plus the volumes enclosed by the ring of Glu177 carboxyls and Ser178 carbonyls (HFS); the carbonyls of Leu176 (CEN) and Thr175 (IN). (B) Axial and (C) radial-axial FE plots for  $\text{Na}^+$  within the SF, highlighting three major binding sites, HFS (jointly off- and on-axis of symmetry), CEN (off-axis), and IN on-axis. Panels D–F are the conditional radial-axial FE surfaces describing the stability of a configuration with one ion at position  $(R, z)$  given that the other one is in site HFS (D), CEN (E), and IN (F), respectively. These surfaces reveal five local minima: HFS<sup>2</sup> (0), HFS-CEN (1), CEN<sup>2</sup> (2), HFS-IN (3), and CEN-IN (4). All FEs are in kcal/mol.

notion that conduction through NavAb involves the participation of an additional ion,<sup>11,12</sup> which is consistent with results by Carnevale et al. showing spontaneous SF occupation by two ions.<sup>10</sup> Thus, the emerging view to the conduction process is that of a SF preferentially occupied by two ions, which can switch between different configurations through a loosely coupled mechanism,<sup>11,12</sup> which is decoupled from water transport across the filter.<sup>10</sup> In spite of few inconsequential structural differences, this picture seems also to apply also to NavRh.<sup>14</sup>

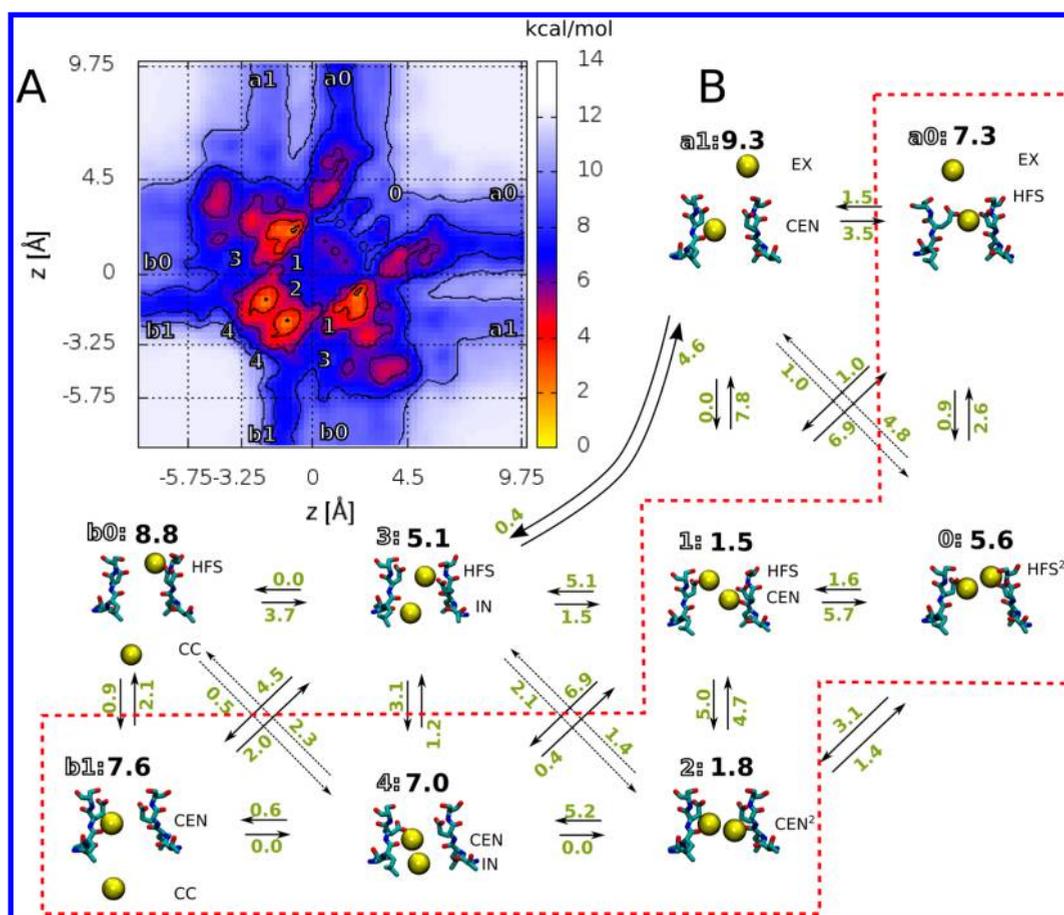
Although the general features of conduction have been revealed, some questions remain unanswered. For instance, the binding affinity of  $\text{Na}^+$  for each site when the SF is occupied by two ions remains unclear. Furthermore, the relative stability of all configurations accessible to a pair of SF-bound ions has not been characterized yet. Indeed, as discussed in details below, only a small fraction of two-ion configurations is present in the free-energy surfaces (FES) reported in the earlier works,<sup>11,12</sup> and therefore other potentially viable pathways of conduction were not sampled. Furthermore, the effect of the transmembrane potential on the conduction mechanism was explored only for the case of permeation of a single ion.<sup>13</sup> To shed light on these issues, we first characterize the relative stability of all configurations of a pair of  $\text{Na}^+$  ions bound to the SF and then analyze the events underlying  $\text{Na}^+$  translocation through the SF by employing nonequilibrium, voltage-driven MD simulations on the open-state structure of NavAb.<sup>15</sup> Importantly, the availability of a structural model of the open channel allows the study of conduction throughout the entire extension of the permeation pathway. In this fashion, subtle

details of the process are revealed that were not evident in earlier studies based on the structure of the closed channel. The present study builds on insights from earlier computational investigations. Although there is overall consistency with the previous works, our picture of  $\text{Na}^+$  conduction uncovers several previously unnoticed features.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Two-Ion Conduction Mechanism on 4D Free-Energy Surfaces.** Based on the X-ray structure of NavAb, we characterized the stability of all configurations of a pair of  $\text{Na}^+$  bound to the SF and inferred the most probable conduction mechanism. For this purpose, metadynamics<sup>16,17</sup> was used to compute the FE as a function of the position of two ions. Two variables were chosen to locate the position of each ion: the distance along the SF axis of symmetry from the geometrical center of the Glu177 C $\alpha$  residues (axial coordinate,  $z$ ), and the distance from this axis (radial coordinate,  $R$ ). The resulting 4-D FES was analyzed along several different subspaces by computing the corresponding marginal probability distribution functions.

The PMF as a function of the  $z$  coordinate of one ion (irrespective of its identity) shows consistently the anticipated picture of three binding sites HFS, CEN, and IN for  $0 < z \leq 4.5$ ,  $-3.25 < z \leq 0$ , and  $-5.75 < z \leq -3.25$ , respectively (Figure 1). Sites HFS and CEN have similar energies (binding energies of  $\sim 6$  kcal/mol), whereas site IN (binding energy of  $\sim 3$  kcal/mol) corresponds to a less stable local minimum along  $z$ . When the FES is considered as a function of the  $z$ - $R$  coordinates of one ion, one recovers the radial position of these sites. The



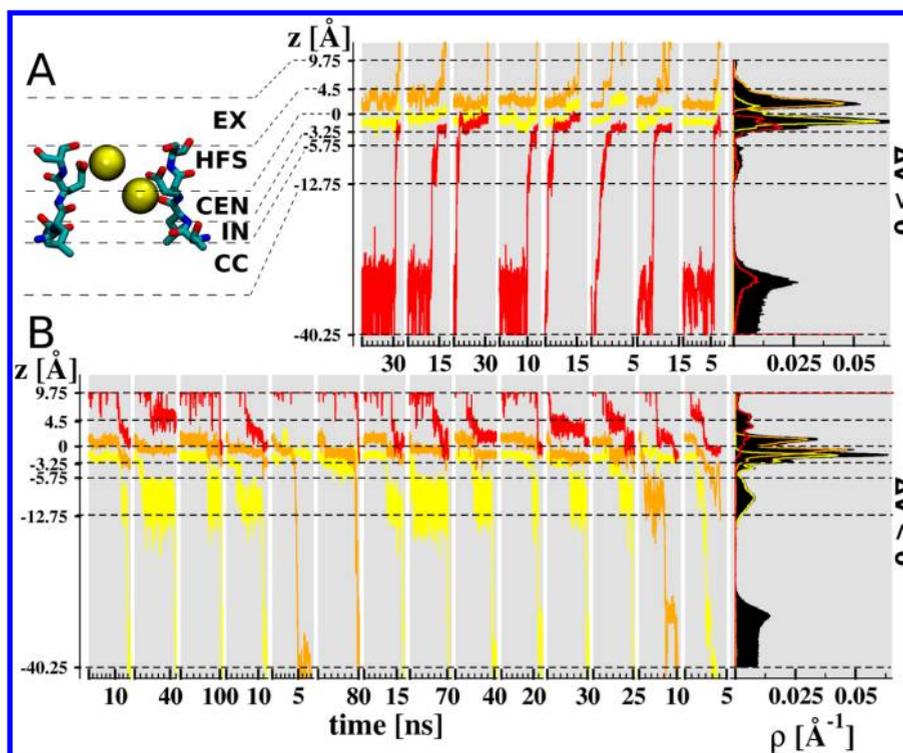
**Figure 2.** Two-ion conduction mechanism. (A) Symmetrized projection of 4-D free energy (kcal/mol) profile onto the two-ion axial-axial subspace,  $G(z, z')$ . (B) Five stable states (0 to 4) plus entry (a0, a1) and exit (b0, b1) configurations of two indistinguishable Na<sup>+</sup> ions along the SF symmetry axis. The FE and barriers for the forward and backward transitions are reported in black and green, respectively. The PMF is highlighted in red.

HFS site spans the entire range of radial distances, where a partially dehydrated ion binds to one or two Glu177-carboxyl groups. The CEN site is located off-axis, with the ion partially dehydrated and in close contact with one or two Leu176-carboxyl groups. The IN site lies close to the central axis, indicating that in this case the permeating ion retains its entire solvation shell. While validating the site positions previously reported by Carnevale et al.,<sup>10</sup> these FES provide further the binding energy of the ion in each site when two Na<sup>+</sup> occupy the filter. Note that the PMF results contrast with those obtained for a singly occupied SF, thereby highlighting the binding dependence with the number of SF-resident ions. For a singly occupied SF, all previous studies reported that, although a partially desolvated Na<sup>+</sup> sits off-axis at HFS by sticking to Glu177-carboxyl oxygens, a fully hydrated ion sits on-axis at sites CEN and IN, respectively. However, these studies provided a less consistent description of the relative stability of the different binding sites.<sup>11–13</sup>

To better characterize the FE of all of the configurations accessible to two ions, we computed the  $z$ - $R$  probability density functions for one ion conditioned on the position of the other one (Figure 1). Specifically, we considered three different probability density functions corresponding to configurations with one ion bound to HFS, CEN, or IN (hereafter, we use the superscript “2” to denote double occupancy of a site). The FES reveal five local minima: two deep ones (HFS-CEN and CEN<sup>2</sup>) with free energy  $\sim -12.5$  kcal/mol and three shallower ones (HFS<sup>2</sup>, HFS-IN and CEN-IN with free-energy  $\sim -7$  to  $-9$

kcal/mol (in ref 12 HFS-CEN was also reported as the most stable state). Interestingly, the IN<sup>2</sup> state, i.e., a configuration with double occupancy of the IN site, does not exhibit a free-energy minimum, resulting from the on-axis location of the site. Note that these energies do not correspond to binding energies since the reference state is chosen here as the uppermost sampled configuration, in contrast to the case of the 1D-PMF in Figure 1B.

In the context of the 4-D FES, conduction of Na<sup>+</sup> through the SF is conceived as a connected path on the energy landscape joining two terminal states: one ion bound to the SF and the other one in the external medium (EX) and one ion bound to the SF and the other in the central cavity (CC), respectively. Given the directionality of Na<sup>+</sup> conduction through the SF, the diffusion process on this surface is best conveyed by a projection on the subspace spanned by the axial coordinates of the two indistinguishable ions (Figure 2). When mapped onto this space, states HFS<sup>2</sup>, HFS-CEN, CEN<sup>2</sup>, HFS-IN, and CEN-IN correspond to different ranges for the two axial coordinates, with the doubly occupied sites located approximately along the diagonal. We focus here on inward conduction but it is worth noting that outward conduction involves the reverse pathway. Entry to the SF from the EX occurs mostly through a pathway involving one ion in the HFS site and exit to the CC through a pathway involving one ion bound in the CEN site. Bridging between these entry and exit configurations, the presence of five stable states linked to each other by relatively low free-energy barriers (up to 6 kcal/mol)



**Figure 3.** Membrane-polarized MD simulations of NavAb. (A) Trajectories of three Na<sup>+</sup>: i (yellow), j (orange), and k (red) along the axial direction ( $z$ ) under applied depolarization voltage differences ( $\Delta V > 0$ ). Simulations start with ions j and i positioned, respectively at sites HFS and CEN of the SF (inset) and proceeds until complete delivery of either ion i or j to the external milieu. Ion k is the nearest external-bulk ion to the SF participating in the conduction event. The histogram of permeating ions calculated from the MD trajectories shows each of the i, j, and k densities ( $\rho$ ) along the permeation pathway. Note that, the i, j, and k contribute mostly to the total Na<sup>+</sup>-density (black) into the channel lumen. (B) Idem for conduction simulations under hyperpolarization conditions ( $\Delta V < 0$ ). The bulk occupancy of ion “k” in the set of hyper- and depolarized simulations is shown as an occupancy peak at  $z = 9.75$  Å (A) and  $z = -40.25$  Å (B), respectively.

entails a plethora of productive pathways. However, the minimum-energy pathway (MEP), evidenced by a modified nudged elastic band method (See Methods for further details), involves sequential passage through four of the five states: HFS<sup>2</sup>, HFS-CEN, CEN<sup>2</sup>, and CEN-IN. Interestingly, the presence of minima along the diagonal of the axial–axial FES (states HFS<sup>2</sup> and CEN<sup>2</sup>) ensures that the transport of Na<sup>+</sup> through the NavAb SF does not require forcing the preceding ion to leave: conduction may occur following the same MEP either through a knock-on or a drive-by mechanism in which the incoming ion proceeds unimpeded past the bound ion, stressing the ‘loosely coupled’ nature of the mechanism.

The present axial–axial FES can be compared directly with earlier works by Corry and Thomas<sup>11</sup> and Furini and Domene.<sup>12</sup> In the latter studies, conduction was reported to proceed preferentially through the pathway: EX-HFS ↔ HFS<sup>2</sup> ↔ HFS-CEN ↔ HFS-IN ↔ HFS-CC. Although we find that this pathway is one of the most probable (Figure 2), our results point to a distinct MEP involving double-ion occupancy of SF sites, i.e., EX-HFS ↔ HFS<sup>2</sup> ↔ HFS-CEN ↔ CEN<sup>2</sup> ↔ CEN-IN ↔ CEN-CC. This difference stems from the fact that in the previous studies only a portion of the entire range of possible axial displacements of the two sodium ions ( $z$  and  $z'$ ) was sampled. In Corry and Thomas<sup>11</sup> and Furini and Domene,<sup>12</sup> the two-ion axial–axial FES  $G(z, z')$  was computed over  $-10 \leq z \leq 17$  and  $9 \leq z' \leq 25$ , with the ion coordinates  $z$  and  $z'$  overlapping only within the SF region of site HFS and above. As such, the stability of some of the configurations of a pair of

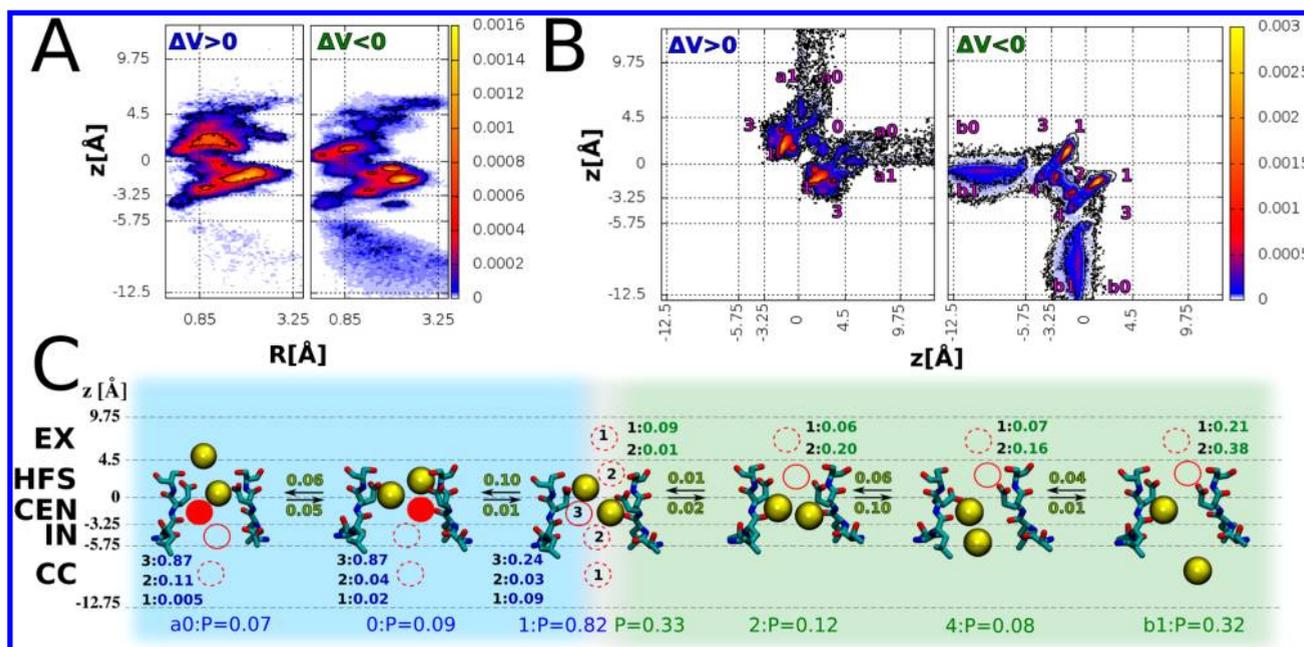
Na<sup>+</sup> ions bound to the SF was not determined, leading to a partial description of the conduction process.

#### Conduction Mechanism under TM-Voltage Potentials.

In the following, we investigate the inward transport of ions through NavAb in a series of voltage-driven MD simulations of the full-length activated-open structure of the channel. Using a charge-imbalance protocol,<sup>18</sup> a (hyperpolarized) potential of  $\sim -600$  mV was applied to the NavAb-membrane system in order to increase the rate of sampling of conduction events over these runs (cf. methods). Following this protocol, a set of 14 runs, starting with two ions in the SF at the HFS-CEN state, which according to our results is the global FE minimum at 0 mV, was carried out to sample inward conduction. The voltage-driven runs spanned a total of  $\sim 0.5$   $\mu$ s.

From the simulations, the density profile for Na<sup>+</sup> along  $z$  features dominant peaks at HFS and CEN, and a small, yet resolved peak at IN (Figure 3). Further peaks are observed at EX, central cavity (CC) and activation gate (AG). Analysis of the number of oxygens in the first-coordination shell (3.1 Å cutoff) of Na<sup>+</sup> indicates hexa-coordination of the ion along the permeation pathway; only within the SF the ion is partially desolvated by SF-lining oxygen ligands. Overall, the axial-radial probability distribution  $P(z, R)$  for Na<sup>+</sup> in the region of the SF agrees with the (0 mV) axial-radial FES in that it shows the on/off-, off-, and on-axis positions of sites HFS, CEN, and IN, respectively (Figure 1).

Integration of the density profile over the SF shows an average occupancy of  $\sim 1.8$  ions in the filter, implying that at negative voltages, conduction across the filter involves two SF-



**Figure 4.** Sodium conduction under depolarized ( $\Delta V > 0$ ) and hyperpolarized ( $\Delta V < 0$ ) TM voltage differences. (A) Normalized axial-radial  $P(z, r)$  and (B) axial-axial  $P(z, z')$  probability distributions for ion occupancy at the NavAb filter. Both distributions were computed from data shown in Figure 2;  $P(z, z')$  was symmetrized from the data by not distinguishing between ions  $i$  and  $j$ . (C) State ( $P_s$ ) and forward/backward transition ( $P_{wm}$ ) probabilities for the preferential conduction pathway under applied voltages,  $\Delta V > 0$  (blue) and  $\Delta V < 0$  (green). Starting from HFS-CEN (1), conduction proceeds inwardly via states CEN<sup>2</sup> (2), CEN-IN (4), and CEN-CC (b1) or outwardly via states HFS<sup>2</sup> (0) and HFS-EX (a0). For each of them,  $P_s$  was computed by integrating  $P(z, z')$  over the domain  $D = \{z, z'\}$  that maps the two-ion state in  $G(z, z')$ . Highlighted in red are the axial probabilities for ion  $k$  conditioned on the occupancy of state “ $s$ ” of the SF-bound ions,  $P_k(z|s)$ ; here,  $k$  is the ion closest to the SF participating in the conduction events.  $P_k(z|s)$  is presented as the cumulative probability over the axial regions BULK, EX, HFS, and CC. Note that in the case of hyperpolarized runs, when the SF-bound ions are in the b1 configuration, ion  $k$  is likely to be found in site HFS suggesting a loose coupling with release of sodium into the CC, whereas in the case of depolarization conditions,  $P_k(z|s)$ , integrated over the CC or SF regions, highlights a strong coupling between the motion of  $k$  and the release of sodium into the bulk region.

bound ions. To characterize this two-ion process and its coupling to other ions, we focus our analysis on a three-ion  $ijk$  system. As indicated in Figure 3, ions  $i$  and  $j$  started the simulations in the filter whereas  $k$  is the ion closest to the SF that participates in the conduction event. Note that, within the filter and central cavity of the channel, the total- $\text{Na}^+$  density results mostly from contributions of these ions. The axial-axial probability distribution  $P(z, z')$  for the SF-bound ions shows a total of 8 distinct regions with nonzero probability participating in the inwardly driven conduction process (Figure 4). Conduction proceeds preferentially along the MEP determined from the (0 mV) axial-axial FES, i.e., starting from the state HFS-CEN, ion permeation proceeds sequentially through states CEN<sup>2</sup>, CEN-IN, and CEN-CC. Indeed, 85% of the total number of configurations sampled along the trajectories is observed to be in one of these states and forward transition probabilities along the path are at least 1 order of magnitude larger than those relative to alternate routes leading to conduction, e.g., the pathways ending at states HFS-CC or IN-CC (cf. Figure S1).

The axial probability distribution function of the ion  $k$  conditioned on the occupancy of each of the states  $s$  marking this pathway,  $P_k(z|s)$ , shows that  $k$  is mostly located in the bulk region when the two SF-bound ions are in states HFS-CEN, CEN<sup>2</sup>, and CEN-IN (cf. Figure S2). Instead, when the SF-bound ions are in state CEN-CC, a sizable fraction of instantaneous configurations show ion  $k$  in regions EX and HFS (21% and 38%, respectively). This demonstrates that the

third ion is engaged in permeation only after one of the preceding ones has left the SF.

Overall, the results derived from our voltage-biased simulations through the open channel indicate that, at negative potentials, inward conduction of  $\text{Na}^+$  through the selectivity filter of NavAb involves preferentially a two-ion mechanism. The results from the ( $\Delta V$ ) probability distributions support the notion that the latter resembles the process inferred from the FES (based on the closed channel structure at 0 mV).

**Outward Conduction and the Role of a Third Ion.** In addition to the inwardly driven MD runs, we investigated further the outward transport of ions through NavAb in a series of 8 simulations of the channel under depolarized ( $\Delta V > 0$ ) potentials (cf. methods). Although retaining similar features of the simulations at negative potentials, the depolarized runs show in contrast, an SF-occupancy of  $\sim 2.3$  ions implying the participation of a third ion in outward conduction (Figures 3 and 4). Starting from the state HFS-CEN, permeation of a pair of ions across the filter follows the same pathway inferred from the (0 mV) FES, i.e., conduction proceeds essentially through HFS<sup>2</sup> and HFS-EX. Note that also in this case the vast majority (98%) of instantaneous configurations are found to populate these states. Computation of  $P_k(z|s)$  along this pathway indicates that ion  $k$  has a probability of 24% to be located in the filter when the two SF-bound ions are in the state HFS-CEN.  $P_k(z|s)$  becomes significantly larger (87%) when the former ions adopt states HFS<sup>2</sup> and EX-HFS. However, in contrast to inward conduction, the strong correlations between the position of  $k$  and the SF-bound ions suggests that the

outwardly driven transport of ions through the open channel involves a distinct three-ion mechanism, in which a “nudging” collision with an additional cation is required to trigger outward conduction. From the available data, the reasons for this apparent directional asymmetry of the process through the open channel are unclear and further studies will be required to shed light on this topic.

## CONCLUSIONS

Two methodologies, metadynamics and voltage-driven MD simulations, have been harnessed to sample rare Na<sup>+</sup> ion channel-crossing events and thereby unravel the conduction mechanism in the NavAb channel. The combination of binding two ions into three stable binding sites of the SF (HFS, CEN, and IN) has revealed five stable configurations. The conduction mechanism involves jumps between these states and whereas a plethora of productive pathways are in principle accessible, we show that most of the permeation events proceed through a minimum FE pathway involving five FE barrier jumps between HFS<sup>2</sup>, HFS-CEN, CEN<sup>2</sup>, and CEN-IN. This two-ion mechanism can explain the inward conduction of ions through the open channel at negative potentials, but in contrast, under positive potentials, outward conduction seems to involve a distinct three-ion mechanism.

The overall outcome of our work amplifies earlier results that indicate Na<sup>+</sup> conduction operates under a distinct mechanism from K<sup>+</sup> selective channels.<sup>4,6</sup> The latter involves a single file of ion and water molecules, which moves coherently when nudged by a third ion external to the SF thus defining a process involving a bistable (up–down) throughput cycle of two SF-bound K<sup>+</sup> ions.

An important caveat is in order concerning the scope of the present work. First, the calculations were restricted to the conformation of the SF observed in the X-ray structure (the filter structure remains stable in our simulations).<sup>7</sup> Recent studies of K<sup>+</sup> channels have weighed in on the role of conformational flexibility in determining conduction and selectivity.<sup>19,20</sup> In analogy with K<sup>+</sup> channels, both MD trajectories<sup>10</sup> and recent crystal structures of bacterial Na<sup>+</sup> channels<sup>21</sup> suggest that the SF of NavAb shows a significant degree of structural heterogeneity, raising the hypothesis that alternate configurations of the SF may however play a role in conduction and selectivity. Furthermore, given the position of Glu177 at the external entrance of the NavAb-SF structure and thereby its solvent accessibility, the simulation setups relied on the expectation that the pK<sub>a</sub> of the side-chain of Glu177 is close to the reference value for the amino-acid in solution and that Glu177 is negatively charged at neutral pH. However, several protonation states are possible for the four titratable side-chains, which may affect conduction and selectivity in NavAb. Indeed, as presented by Corry and Thomas,<sup>11</sup> there seems to be an influence of glutamate protonation on the ion occupancy states of NavAb, suggesting that additional studies are required to address this topic. Finally, it is interesting to set the body of results within the broader context of conduction in Na<sup>+</sup> selective channels. Translating the results of these simulations to eukaryotic channels is not straightforward because the sequence motif of their SF is different. In contrast to K<sup>+</sup> channels, ion conduction in Na<sup>+</sup> channels involves the SF backbone carbonyls as well as their side-chains, making the primary structure of key importance.

Elucidating the molecular determinants of conduction and selectivity is a long-standing goal and involves some of the most

fundamental questions in the field of biophysics. Different models have been proposed to rationalize these mechanisms, which emphasize either the different affinity for different species,<sup>22</sup> and/or the ability of sustaining multi-ion concerted displacements.<sup>3</sup> The common trait is, however, the assumption that a well-defined sequence of events underlies conduction. Therefore, the detailed characterization of the ion conduction mechanism within the first structurally characterized sodium selective ion channel holds promise to shed light on the fascinating general problem of conduction and selectivity in biological ion channels, and to ultimately contribute with the key long-term goal of understanding the more complex and pharmacologically relevant mammalian Nav and Cav channels.

## METHODS

**Molecular Dynamics.** The MD simulations were carried out using the program NAMD2.<sup>23</sup> Langevin dynamics was applied to keep the temperature (300 K) fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm.<sup>24</sup> 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.<sup>25</sup> The water molecules were described using the TIP3P model.<sup>26</sup> The simulation used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein<sup>27,28</sup> and CHARMM27 for the phospholipids.<sup>29</sup> A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the POPC lipid molecules.<sup>30</sup>

**Equilibrium Simulation of NavAb.** In this contribution, we discuss our previous MD simulations of the reported X-ray crystal structure of NavAb<sup>7</sup> as well as the proposed “fully activated” open conformation of the channel.<sup>15</sup> Details for the NavAb modeling and construction of the macromolecular system can be found in the original papers.<sup>10,15</sup> Briefly, the open structure of NavAb, embedded in a fully hydrated lipid bilayer, was relaxed for ~35 ns bathed in ~100 mM NaCl, at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm), neutral pH, and with no applied transmembrane (TM) electrostatic potential. An equilibrium ensemble of membrane-equilibrated structures of NavAb, generated by sampling every 0.25 ns from the last 5 ns of the MD trajectory, served as input to a series of independent simulations exploring the conduction of Na<sup>+</sup> through the channel.

**Free-Energy Calculations.** Since the motion of the ions is restricted to the SF, we use the X-ray structure of NavAb<sup>7</sup> as an initial configuration. The 4-D FE profiles for the two ion permeation events were calculated by metadynamics,<sup>16</sup> using the collective variables module implemented in NAMD.<sup>17</sup> For each ion, two reaction coordinates were chosen: the distance along the pore axis (*z*-axis) and the radial distance in the plane normal to this axis, i.e., the (*x*, *y*) plane, taking in both cases the geometrical center, C<sub>α</sub> of the Glu177 residues as a reference. The Gaussian height parameter used to bias the metadynamics runs was 0.3 kcal/mol and the width 0.5 along the *z*-axis and a 0.25 along the radial dimension, respectively. The space of explored by the *z* reaction coordinate was restricted to lie within the range −10 to +8 Å by 100 kcal/mol walls. Also, the radial reaction coordinates were limited to a 4 Å radius by the same means. Altogether, the duration of the calculation amounted to 180 ns.

To project the 4-D FES onto a 2-D space, we first computed the 4-D probability distribution function at 300 K. From this, we computed the marginal 2-D probability distribution function by integrating over the remaining reaction coordinates and computed therefrom the corresponding FE surface. To recover the minimum FE path linking two FE minima on the axial-axial  $G(z, z')$  surface, we identified the saddle point by using a “modified nudged elastic band” method. Specifically, starting from an initial guess of the string, constituted by a discrete set of points  $i$  on the FE surface, we minimized using a Monte Carlo algorithm the following energy function:

$$E = \sum_{i=1}^{N-1} k(l_{i,j+1} - l_0) + G(z_i, z'_i)$$

Here  $N$  is the number of points used to describe pathway,  $k$  and  $l_0$  are two empirical parameters,  $l_{ij}$  is the distance between two consecutive points along the path, and  $G(z_i, z'_i)$  is the FE at the  $i$ th point as a function of the two axial coordinates. Note that this procedure will favor compact string conformations. The value of  $N$  was chosen in order to sample appropriately the roughness of the FES.

**Simulations of NavAb under Polarized-Membrane Conditions.** To investigate the conduction properties of NavAb under applied voltages, a “fully activated-open” NavAb channel<sup>15</sup> was simulated under polarized-membrane conditions using a charge-imbalance protocol.<sup>18</sup> In this scheme, the channel-membrane system is bathed with  $\sim 100$  mM NaCl, and air–water interfaces are then created for electrolytes on each side of the membrane by extending the length of the simulation box in the direction perpendicular to the membrane. Following a short equilibration MD run at constant volume, the system is then simulated under a TM potential imposed by a net-charge imbalance between the upper and lower electrolytes. Since the membrane/channel system behaves as a condenser, the imbalance between the electrolytes creates a potential,  $\Delta V$ . Here,  $\Delta V$  is generated by displacing an appropriate number of  $\text{Na}^+$  ions from the lower to the upper electrolyte (or vice versa), while keeping the overall concentration of the bulk phases constant.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

Supplementary Figures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*(W.T.) Phone: +55.61.3307.2053. E-mail: [treptow@unb.br](mailto:treptow@unb.br). (V.C.) Phone: +1-215-204-4214. E-mail: [vincenzo.carnevale@temple.edu](mailto:vincenzo.carnevale@temple.edu).

### Author Contributions

<sup>§</sup>These authors contributed equally.

### Funding

This work was supported in part by the National Institutes for Health and the Commonwealth of Pennsylvania. W.T. thanks the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for research support (Grant No. 470406/2011-9) and graduate fellowship to L.S. The computations were performed using HPC resources from XSEDE.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ REFERENCES

- (1) Hille, B. *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed.; Sinauer: Sunderland, MA, 1992.
- (2) Shrivastava, I. H.; Tieleman, D. P.; Biggin, P. C.; Sansom, M. S.  $\text{K}^+$  versus  $\text{Na}^+$  ions in a K channel selectivity filter: a simulation study. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 633–645.
- (3) Nimigeon, C. M.; Allen, T. W. Origins of ion selectivity in potassium channels from the perspective of channel block. *J. Gen. Physiol.* **2011**, *137*, 405–413.
- (4) Roux, B. Ion conduction and selectivity in  $\text{K}^+$  channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 153–171.
- (5) Alam, A.; Jiang, Y. Structural studies of ion selectivity in tetrameric cation channels. *J. Gen. Physiol.* **2011**, *137*, 397–403.
- (6) Treptow, W.; Klein, M. L. Computer Simulations of Voltage-Gated Cation Channels. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1017–1023.
- (7) Payandeh, J.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **2011**, *475*, 353–358.
- (8) Charalambous, K.; Wallace, B. A. NaChBac: the long lost sodium channel ancestor. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6742–6752.
- (9) Burykin, A.; Kato, M.; Warshel, A. Exploring the origin of the ion selectivity of the KcsA potassium channel. *Proteins* **2003**, *53*, 412–426.
- (10) 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. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2504–2508.
- (11) Corry, B.; Thomas, M. Mechanism of Ion Permeation and Selectivity in a Voltage Gated Sodium Channel. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1840–1846.
- (12) Furini, S.; Domene, C. On Conduction in a Bacterial Sodium Channel. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002476.
- (13) Qiu, H.; Shen, R.; Guo, W. Ion solvation and structural stability in a sodium channel investigated by molecular dynamics calculations. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 2529–2535.
- (14) Zhang, X.; Xia, M.; Li, Y.; Liu, H.; Jiang, X.; Ren, W.; Wu, J.; Decaen, P.; Yu, F.; Huang, S.; He, J.; Clapham, D. E.; Yan, N.; Gong, H. Analysis of the selectivity filter of the voltage-gated sodium channel Na(v)Rh. *Cell Res.* **2012**, *23*, 409–422.
- (15) 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.* **2012**, *109*, 21336–21341.
- (16) Laio, A.; Gervasio, F. L. Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71*, 126601.
- (17) Hénin, J.; Fiorin, G.; Chipot, C.; Klein, M. L. Exploring Multidimensional Free Energy Landscapes Using Time-Dependent Biases on Collective Variables. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 35–47.
- (18) Delemotte, L.; Dehez, F.; Treptow, W.; Tarek, M. Modeling membranes under a transmembrane potential. *J. Chem. Phys. B* **2008**, *112*, 5547–5550.
- (19) Noskov, S. Y.; Bernèche, S.; Roux, B. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* **2004**, *431*, 830–834.
- (20) Bostick, D. L.; Brooks, C. L., 3rd. Selectivity in  $\text{K}^+$  channels is due to topological control of the permeant ion’s coordinated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 9260–9265.
- (21) McCusker, E. C.; Bagnéris, C.; Naylor, C. E.; Cole, A. R.; D’Avanzo, N.; Nichols, C. G.; Wallace, B. A. Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1102.
- (22) Bernèche, S.; Roux, B. Energetics of ion conduction through the  $\text{K}^+$  channel. *Nature* **2001**, *414*, 73–77.
- (23) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.

- (24) Izaguirre, J. A.; Reich, S.; D, S. R. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 9853–9864.
- (25) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- (26) 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.* **1983**, *79*, 926–935.
- (27) MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586–3616.
- (28) MacKerell, A. D., Jr.; Feig, M.; Brooks, C. L., III Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 698–699.
- (29) Feller, S. E.; MacKerell, A. D., Jr. An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7510–7515.
- (30) Héning, J.; Shinoda, W.; Klein, M. L. United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J. Chem. Phys. B* **2008**, *112*, 7008–7015.

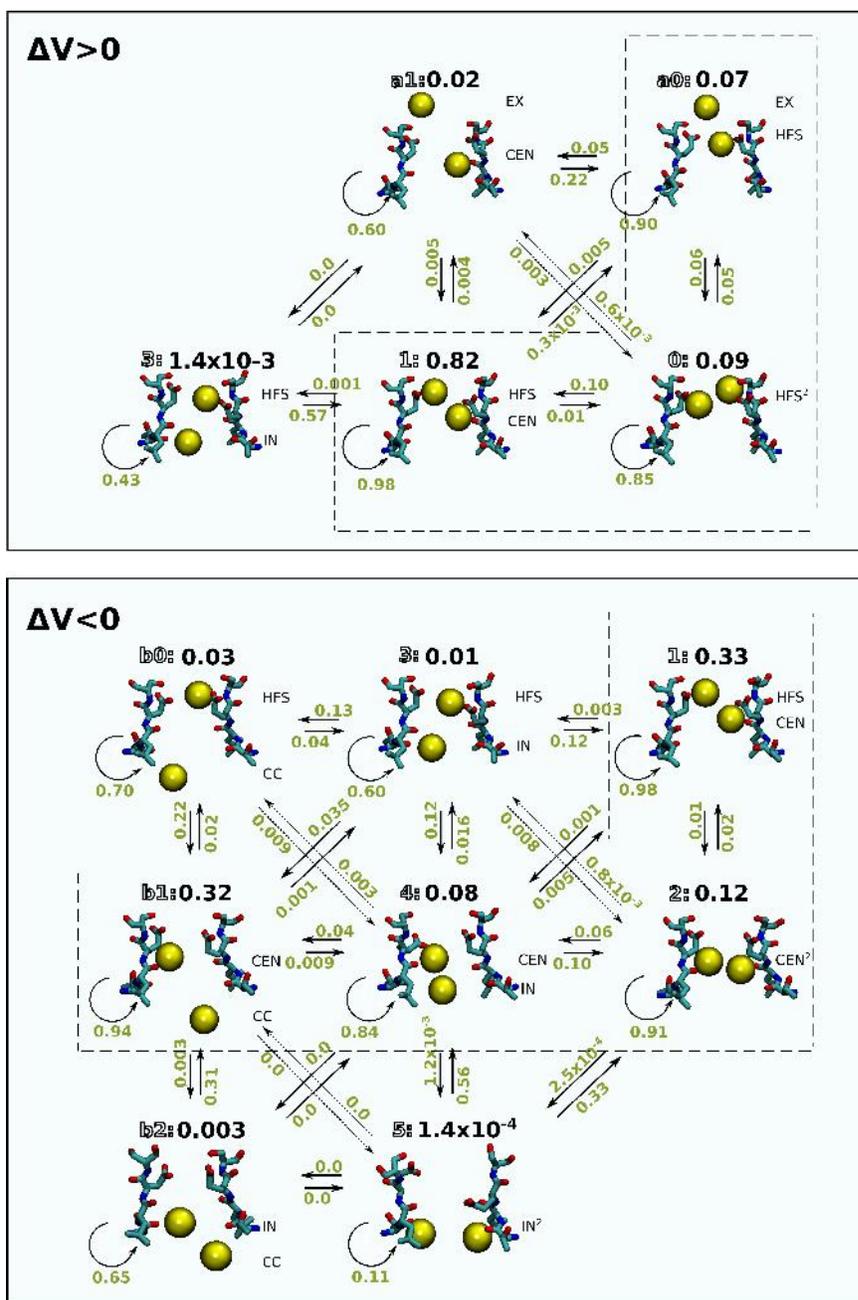
## Conduction in a Biological Sodium Selective Channel

Letícia Stock<sup>a</sup>, Lucie Delemotte<sup>b</sup>, Vincenzo Carnevale<sup>b</sup>, Werner Treptow<sup>a,b</sup>, and Michael, L. Klein<sup>b</sup>

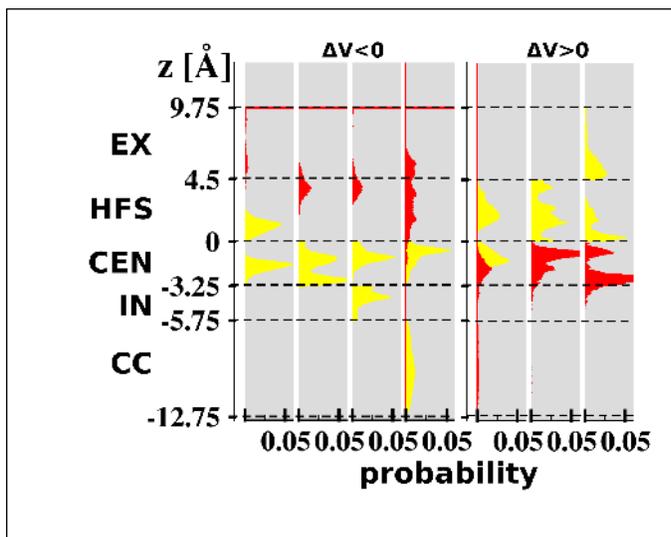
<sup>a</sup>Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília DF,

Brasil; <sup>b</sup>Institute of Computational and Molecular Science, Temple University, Philadelphia, PA 19122.

### SUPPLEMENTARY FIGURES



**Figure S1.** State ( $P_s$ ) and forward/backward transition ( $P_{wm}$ ) probabilities computed from the normalized axial-axial  $P(z, z')$  probability distribution for the set of depolarized ( $\Delta V > 0$ ) and hyperpolarized ( $\Delta V < 0$ ) MD simulations.  $P_s$  was computed by integrating  $P(z, z')$  over the domain  $D = \{z, z'\}$  that maps each of the two-ion states described in  $G(z, z')$  (see Fig. 2). Representative microstates for each of the sampled states with non-zero probabilities are depicted. Given a state “w” at time  $t$ ,  $P_{wm}$  was simply computed as the transition probability to state “m” at time  $t + \Delta t$ , where from the simulation trajectories  $\Delta t = 20$  ps.



**Figure S2.** Axial probability of ion k (red) conditional on the occupancy of each of the MEP-states "s" of two SF-bound ions (yellow),  $P_k(z|s)$ . The MEP states are: HFS-CEN, CEN<sup>2</sup>, CEN-IN and CEN-CC for the simulations under membrane hyperpolarized conditions ( $\Delta V < 0$ ), and HFS-CEN, HFS<sup>2</sup>, HFS-EX for the depolarized ( $\Delta V > 0$ ) simulations. Here, k is the ion closest to the SF participating on the conduction events (see Fig. 3). Note that, for the simulations under  $\Delta V < 0$ ,  $P_k(z|s)$  for the external bulk occupancy of ion "k" is shown as a peak at  $z = 9.75 \text{ \AA}$ .

**IX.2 Anexo 2**

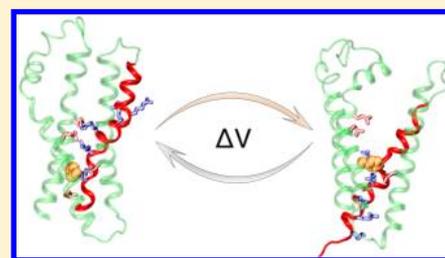
## **Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels**

# Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels

Leticia Stock, Caio Souza, and Werner Treptow\*

Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brasília, Brazil

**ABSTRACT:** Because of their remarkable roles in electrical cell signaling, voltage-gated cation channels (VGCCs) have been the subject of intense investigations and debate for more than 50 years. Ultimately, the prospective implications of such studies have an impact on our understanding of the molecular properties of VGCCs involved in consciousness, anesthesia, and diseases, to mention a few. The following review aims to summarize our current knowledge of activation of VGCCs by highlighting major methodological innovations in the field and the breakthroughs they allowed. Focusing mainly on insights gained through computer simulations, while acknowledging important experimental findings, we hope to inspire experimentalists to benefit from these approaches in the generation of hypotheses and design of experiments. Also, we outline major future challenges for the field, such as channel modulation, lesser-known receptors, and molecular origins of channel dysfunctions.



Voltage-gated cation channels (VGCCs) are membrane-embedded protein pores that assist the flow of selective ionic species across the cell membrane in response to a voltage stimulus. It is this property that defines these proteins as the fundamental molecular devices for diverse electrically mediated biological processes such as hormone regulation, cellular secretion, electric signaling in neurons, and contraction in excitable muscle cells.<sup>1</sup>

VGCCs make up a protein superfamily encompassing channels selective for Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and K<sup>+</sup>, namely, Nav, Cav, and Kv, respectively, and those that discriminate only the cationic nature (HCN). Given their relevance in essential physiological processes, these channels are encoded by a substantial number of genes in higher organisms. Mutations in these channel genes are implicated in several human diseases, termed channelopathies.<sup>2</sup> Examples of channelopathies include hyperexcitability disorders and inheritable diseases such as epilepsy, cardiac long-QT syndrome, and neuromuscular diseases. The comprehension of the structure–function interplay of VGCCs promises the development of new approaches for the treatment of channelopathies, particularly by targeting malfunctioning channels.<sup>3</sup>

The following overview describes results obtained from a variety of VGCC structure–function studies, some of which trace back to early electrophysiology experiments, but centers on contributions from the computational modeling field. As such, this review is intended both to highlight successful methodological innovations in the field of ion channel molecular dynamics (MD) simulations and to inspire experimentalists to benefit from these theoretical approaches in the generation of hypotheses and design of experiments. Historically, a plethora of experimental data, including high-resolution X-ray structures and a large set of atomic-level information gathered from MD simulations, have been made available for Kv (*Shaker*) channels,<sup>4,5</sup> thereby making the K<sup>+</sup> channel the critical model for investigating the structural basis

of activation in VGCCs. These structural studies of K<sup>+</sup> channels provide an invaluable resource for resolving future challenges in the field, namely the structural characterization of other members of the VGCC family, in light of the most recently determined X-ray structures of prokaryotic voltage-gated Na<sup>+</sup> channels.<sup>6–9</sup> Other appealing questions relate to the structural basis of inactivation in VGCCs, their modulation by ligands, including neurotoxins and anesthetics, and their channelopathies and related dysfunctions.

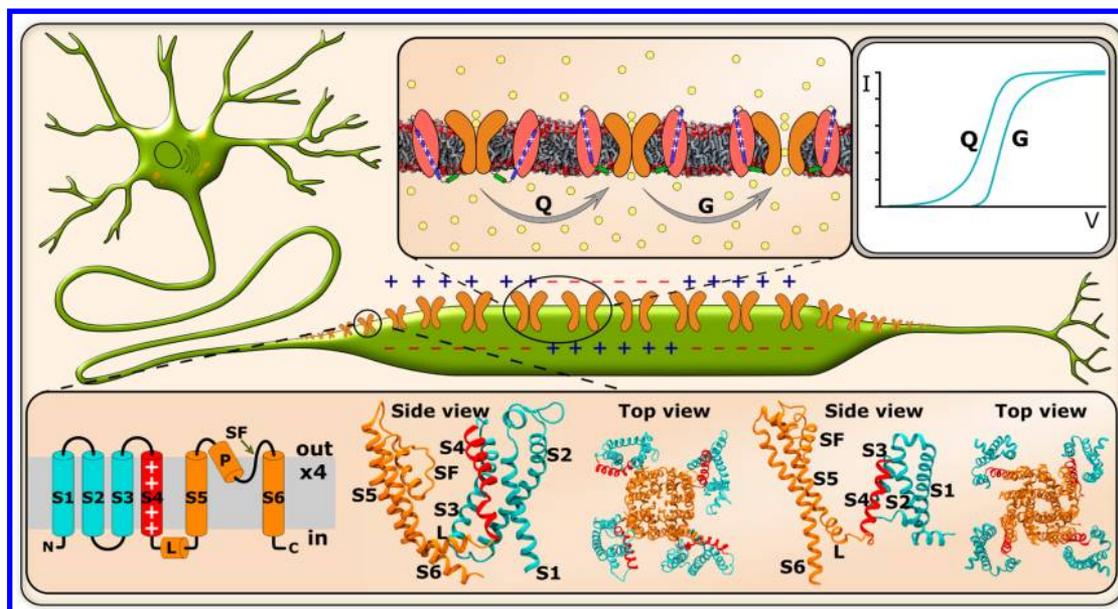
## FUNCTIONAL STUDIES AND ACTIVATION MODELS OF VGCCS

Ingenuous patch–clamp experiments<sup>10</sup> were critical in revealing the activation (opening) of VGCCs as the key voltage-dependent process by which the channel controls ionic conduction (Figure 1). At hyperpolarized potentials ( $V < 0$ ), VGCCs are preferentially nonconductive resting (closed) structures. In response to membrane depolarization ( $V > 0$ ), VGCCs switch on their active (open) state, exhibiting various levels of ionic conductance.<sup>11</sup> The molecular transition from the resting (closed) state to the active (open) state is known as the activation gating process of the channel. Although they are approximately 2 orders of magnitude smaller than ionic currents ( $G$ ), the so-called “gating currents” were found to correspond to a fundamental observable of channel activation, given their strong voltage dependence and coupling to ionic currents. Since the pioneering work of Hodgkin and Huxley, gating currents and, more specifically, gating charges ( $Q$ ), corresponding to the time integral of the gating current at a given voltage, have been measured for a variety of channels, as discussed extensively in refs 4 and 5. Typically, the activation process gives rise to a total  $Q$  of  $\sim 12$ – $14$  e.<sup>12–14</sup>

**Received:** September 24, 2012

**Revised:** January 14, 2013

**Published:** January 14, 2013



**Figure 1.** From macroscopic observables to atomistically detailed structures. Excitable cell, represented here by a neuron, with highlighted membrane-embedded VGCCs and their normalized measured gating ( $Q$ ) and ionic ( $G$ ) currents, which originated from reorganization of membrane-bound charged particles and flow of ions through the channel, respectively. From left to right, the bottom insets depict the VGCC topology, the channel subunit and tetrameric structure of Kv1.2 and those same structures of NavAb, respectively. Labels are S1–S6 for transmembrane helices, L for the linker, P for the pore helix, and SF for the selectivity filter.

As revealed by cloning and sequencing experiments<sup>15,16</sup> and also by recently determined X-ray crystallography structures (see below), VGCCs are either tetrameric or pseudotetrameric (Figure 1). The central pore forms from the arrangement of four transmembrane (TM) domains. Each subunit is composed of six TM helices, labeled S1–S6. Segments S5 and S6 constitute the central pore domain (PD) and delineate the pathway for the ionic current. A conserved motif between these segments forms the selectivity filter (SF), responsible for ion selectivity. Segments S1–S4, identified as the voltage sensor domain (VSD), connect to PD via an S4–S5 linker. In this helical bundle, S4 contains at least four highly conserved positively charged arginine amino acids, called hereafter  $R_1$ – $R_4$ .

Experiments probing the contribution of the S4 basic residues to the total  $Q$  culminated in the identification of this charged helix as a critical element in channel activation.<sup>4,5</sup> Mutations of S4 charged residues have been shown not only to diminish the associated total  $Q$  but also to affect the voltage dependence of the channel. In these experiments, the contribution of the S4 basic residues was evaluated by neutralizing or reversing its positive charges and subsequently verifying the resulting  $Q$ , either directly or indirectly through the measurement of open pore probability.<sup>14,17</sup> The activation was envisioned to proceed via a complex mechanism involving VSD motions resulting essentially from S4 movements. Here, results from a plethora of experimental approaches, including the substituted cysteine accessibility method,<sup>18,19</sup> histidine scanning,<sup>20</sup> fluorescent labeling,<sup>21</sup> and second-site suppressor analysis and disulfide locking,<sup>22–27</sup> converged to show that S4 forms sequential state-dependent salt bridge interactions throughout its activation path, moving from a more internal binding site to a more external one.

Although agreeing to identify that S4 “senses” voltage variations triggering conformational changes that lead to channel activation, these early studies produced three putative activation mechanisms by which S4 could transfer  $Q$  across the

low-dielectric membrane.<sup>28</sup> The first mechanism termed the sliding-helix or helical-screw activation model was originally proposed by Guy and Seerharamulu<sup>29</sup> and Catterall<sup>30</sup> and later adapted by other groups.<sup>31,32</sup> In the model, the S4 charged residues form sequential ion pairs with acidic residues on the neighboring S2 and S3 segments. Upon activation, the S4 helix goes through a large axial pistonlike motion (10–15 Å perpendicular to the membrane plane) crossing a focused, motionless electric field, while rotating  $\sim 180^\circ$  to the left. In contrast, the mechanism described by the transporter model of Bezanilla proposes that hydration of S4 focuses the electric field within the VSD and activation involves reshaping this intensely focused field around S4 rather than extensively displacing the segment across the membrane.<sup>33–35</sup> Under modifications of the local dielectric environment of S4, a relatively small TM movement of the S4 charges, accompanied by a rotation and a possible helical tilt, would suffice to account for the total gating charges.

In 2003, following the publication of the crystallographic structure of a Kv channel from the archaeon *Aeropyrum pernix*, KvAP,<sup>36</sup> another model for the activation of VGCCs was proposed. This model states that S4 and the C-terminal region of S3, designated S3b, form a “voltage-sensor paddle” that neighbors the intracellular surface when the channel is closed. Upon activation, this paddle would move a large distance of  $\sim 20$  Å within the membrane. However, the model was refuted by many years of contradicting evidence, and it has now been admitted that the channel may have been crystallized in a non-native conformation. A revised version of the paddle model, based on the X-ray crystal of the “paddle chimera” Kv1.2–Kv2.1 channel,<sup>37</sup> proposes that the paddle moves  $\sim 15$  Å relative to helices S1 and S2, rather than tilting to a horizontal position. Moreover, a concertina-like transition of S4 from  $\alpha$ - to  $3_{10}$ -helix as it passes through the narrowest region of the VSD is thought to prevent S4 charges from being exposed to the lipid membrane, discarding the need for helix twist.

## ■ ACTIVATION OF VGCCS: INSIGHTS FROM MD STUDIES OF KV CHANNELS

For many years, an improved understanding of VGCC structure and function was hindered by the scarcity of atomic-level structural and dynamical data. This limitation is due primarily to the difficulty of obtaining atomistic structural data, by either X-ray diffraction, electron microscopy, or nuclear magnetic resonance (NMR). As evidence, it was only in 2005 that the first and only crystallographic structure of a mammalian voltage-gated K<sup>+</sup> channel, the Kv1.2 channel, was resolved (Figure 1).<sup>38</sup> The latter, pertaining to the *Shaker* family, was crystallized in the open activated state, allowing researchers to begin to answer essential questions about VGCCs. At large, the structure reveals a TM-oriented VSD only loosely attached to the pore, and in opposition to previous hypotheses, S4 is not shielded from the membrane by a protein canal but rather faces helices S1–S3 on one side and a lipid surface on another. Furthermore, the structure depicts the S4–S5 linker as a short  $\alpha$ -helical segment lying at the inner membrane–water interface where, via its atomic contacts with the S6-crossing helical bundle, the segment bridges S4 to the main gate region of the channel. The same overall structural patterns have also been found in the recently determined X-ray structure of the Kv1.2–Kv2.1 paddle chimera.<sup>37</sup>

With the release of the Kv1.2 crystal structure, a number of efforts employing MD simulations and related methodologies were performed to characterize activation of the new channel. As described below, the accuracy with which force fields were able to reproduce a channel's properties, such as conduction, gating motions, and modulation by ligands, is a clear testament to the competence of the approach in the study of such complex molecular systems.<sup>39</sup>

**Molecular Dynamics Simulations.** The principle of MD simulations consists simply of generating a trajectory for a finite set of particles through multiple-time step numerical integration of classical equations of motion.<sup>40</sup> The final goal of computing a MD trajectory is to estimate any thermodynamic property  $\langle A \rangle$  of an ergodic system in the form of a temporal average  $\bar{A}_t$ , i.e.,  $\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}_t = \langle A \rangle$ . The potential energy  $U(r^N)$ , characteristic of an  $N$ -particle system, in which  $r^N$  corresponds to the set of  $N$  atomic Cartesian coordinates, is the main function in MD.  $U(r^N)$  associated with molecular parameters, obtained via quantum mechanics and experiments, corresponds to the so-called force field that accounts for bonded and nonbonded interactions in the system. In successful approaches,<sup>41–45</sup> the force field treats these interactions as a single effective potential, which can be written as

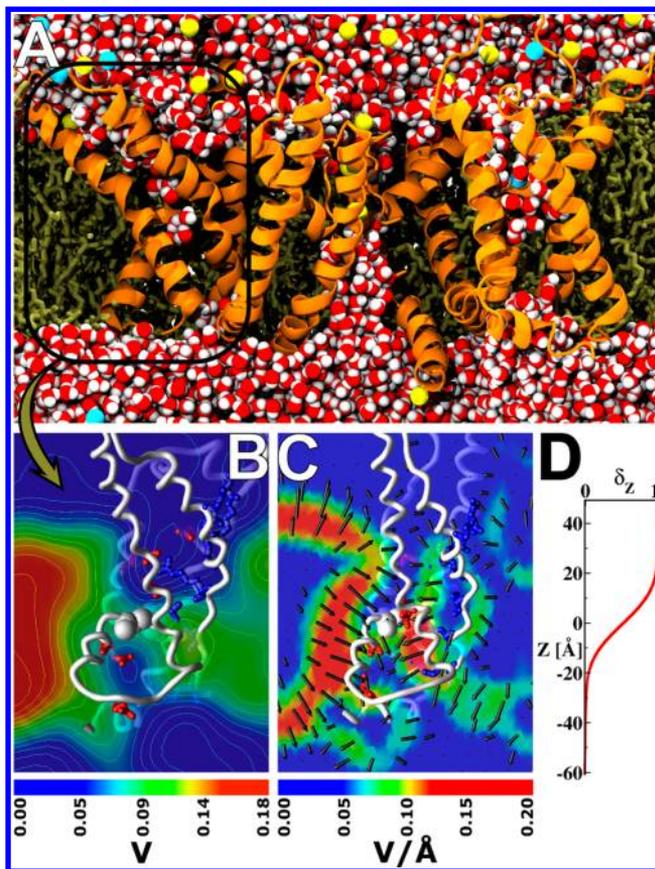
$$\begin{aligned}
 U(r^N) = & \sum_{\text{bond}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angle}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{dihedral}} \sum_n \frac{U_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \\
 & \sum_{i < j} \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (1)
 \end{aligned}$$

where  $k_r$  and  $r_0$  correspond to bond strength and chemical equilibrium position, respectively;  $k_\theta$  and  $\theta_0$  are the angle force constant and its equilibrium value, respectively;  $1/2 U_n$ ,  $n$ , and  $\gamma$  are the torsional barrier, its frequency and its phase, respectively;  $q_i$  is the partial electric charge of atom  $i$ ;  $\epsilon$  is the dielectric constant; and, finally,  $R_{ij}^*$  and  $\varepsilon_{ij}$  match the parameters and van der Waals forces for the atomic pairs  $\{ij\}$ , respectively. In eq 1, bonded interactions are explicitly described by bond, angle, and dihedral terms.

Briefly, in the method, integration of Newton's equations is accomplished for every atom  $i$  with an infinitesimal time step  $\delta t$  on the order of 2 fs. Different schemes for controlling temperature and pressure can be applied to sample an NPT ensemble, as a way of simulating experimental conditions. An infinitesimal  $\delta t$  is required to ensure energy  $E$  conservation throughout the simulation and comes with the expense of a substantial computational time. As such, MD simulations are usually conducted with open source codes<sup>46,47</sup> that scale to hundreds of processors on high-end parallel platforms for systems of any size, making it feasible to complete continuous calculations in a short time. At present, it is possible to perform hundreds of nanosecond time scale MD simulations for >200000-atom systems. Nonetheless, a special purpose machine, named "Anton", capable of simulating equally large systems on the millisecond time scale,<sup>48</sup> has been recently designed, expanding the range of issues potentially tackled by MD simulations.

**MD Simulations of the Membrane-Bound Activated Structure of Kv1.2.** One of the first contributions of MD applied to the study of Kv1.2 activation has derived from simulations intended for the investigation of the structure of the open activated state of the channel embedded in the membrane (Figure 2).<sup>49,50</sup> In these studies, the simulation setup consisted of Kv1.2 embedded in a fully hydrated phospholipid bilayer. The protein was simulated either with or without the N-terminal tetramerization (T1) domain, to simplify the study system.<sup>51</sup> In these simulations, the VSD was described as an hourglass-like structure in which water penetrates from the extra- and intracellular sides exposing S4 charges to the solvent, consistent with the earlier accessibility and histidine scanning measurements. MD simulations of the VSD alone<sup>52</sup> in the membrane and NMR experiments further corroborated these results.<sup>53</sup> Specific salt bridge interactions between S4 arginines and neighboring VSD acidic residues and membrane–lipid heads were shown to stabilize the domain conformation.<sup>49,50</sup> In detail, R<sub>1</sub>–R<sub>4</sub> are exposed to the externally accessible extracellular milieu, forming salt bridges with the following binding sites: PO<sub>4</sub><sup>−</sup> outer membrane layer lipid headgroup and E<sup>183</sup>, E<sup>226</sup>, and E<sup>236</sup>, respectively; the residues are located in segments S1, S2, and S2, respectively (Figure 3, top).

**Electrostatic Calculations of Kv1.2 Embedded in the Membrane.** The exquisite electric sensitivity of Kv1.2 relies on a number of intrinsic electrostatic properties related to the transport of gating charges during activation. In the context of MD simulations, investigation of such properties has relied primarily on the accurate computation of the electrostatic potential arising from the channel charges, ions, and dielectric properties of the environment. The initial efforts to electrostatically describe Kv1.2 and related channels<sup>54</sup> considered a continuum mean-field approximation based on the Poisson–Boltzmann (PB) equation, which assumes that the distribution of charges in the system is related to the electrostatic potential according to Boltzmann statistics



**Figure 2.** Structural details and electrostatic properties of Kv1.2 embedded in the membrane. (A) Typical atomistic MD simulation system of Kv1.2 embedded in a fully hydrated phospholipid bilayer. The system contains the channel (orange) with two K<sup>+</sup> ions (yellow) in the selectivity filter, 390 lipid molecules (ochre), 36280 solvent water (red) molecules, and salt in solution (a total of ~150000 atoms). A black frame highlights the VSD and its hydration structure. (B) Two-dimensional electrostatic potential map depicting the VSD environment when no TM potential is applied to the system. Note that the aqueous (blue) environment of the gating charges (blue licorice) and acidic residues (red licorice) carried by the VSD (white ribbons) collapses the electrostatic potential around F<sup>233</sup> (white spheres). (C) Two-dimensional map of the electric field within the activated VSD structure under a hyperpolarized TM potential. (D) Electrical distance profile ( $\delta_z$ ) through the VSD as a function of  $Z$ , the normal to the bilayer.

$$\nabla \cdot [\epsilon(r) \nabla \Phi(r)] - \bar{k}^2(r) \Phi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (2)$$

where  $\Phi(r)$  is the electrostatic potential,  $\rho(r)$  is the fixed charge density, and  $\epsilon(r)$  and  $\bar{k}(r)$  are the position-dependent dielectric and ionic screening constants, respectively. Later, three-dimensional electrostatic potential (EP) maps for the Kv1.2–membrane system were determined independently by taking into consideration an MD-generated ensemble of equilibrium configurations of the channel,<sup>49</sup> in which every point charge of the system was explicitly considered to solve Poisson’s equation

$$\nabla^2 \Phi(r) = -4\pi \sum_i \rho_i(r) \quad (3)$$

where  $\Phi(r)$  and  $\rho_i(r)$  are the electrostatic potential and the charge density at  $r$ , respectively. In practice, the point charge can be approximated by a spherical Gaussian of inverse width  $\sigma$ ,

with a typical value of  $0.25 \text{ \AA}^{-1}$ , which improves efficiency for computation of eq 3.<sup>55</sup>

In Kv1.2, the “catalytic center” comprises the amino acid triad of F<sup>233</sup> (S2), E<sup>236</sup> (S2), and D<sup>259</sup> (S3) that appears to “catalyze” the transfer of each S4 basic residue across the membrane field, as indicated by recent mutations with natural and unnatural amino acids, electrophysiological recordings, and X-ray crystallography experiments.<sup>56</sup> In the activated VSD, F<sup>233</sup> “plugs” the most constricted hydrophobic region of the construct and disconnects the internally and externally accessible water crevices. From calculations based on eqs 2 and 3, and applied to Kv1.2, it was demonstrated that a fundamental consequence of the morphology of these high-dielectric regions is to collapse the EP within the VSD, favoring the existence of a focused electric field around the S4 gating charges (Figure 2). Continuum electrostatic computations were initially applied to determine the dimensionless fraction of the membrane voltage  $V$  at position  $r$  ( $\phi_{mp}$ ), according to a modified Poisson–Boltzmann (PB-V) equation that accounts for the effect of transmembrane potential<sup>50</sup>

$$\nabla \cdot [\epsilon(r) \nabla \phi_{mp}(r)] - \bar{k}^2(r) [\phi_{mp}(r) - \Theta(r)] = 0 \quad (4)$$

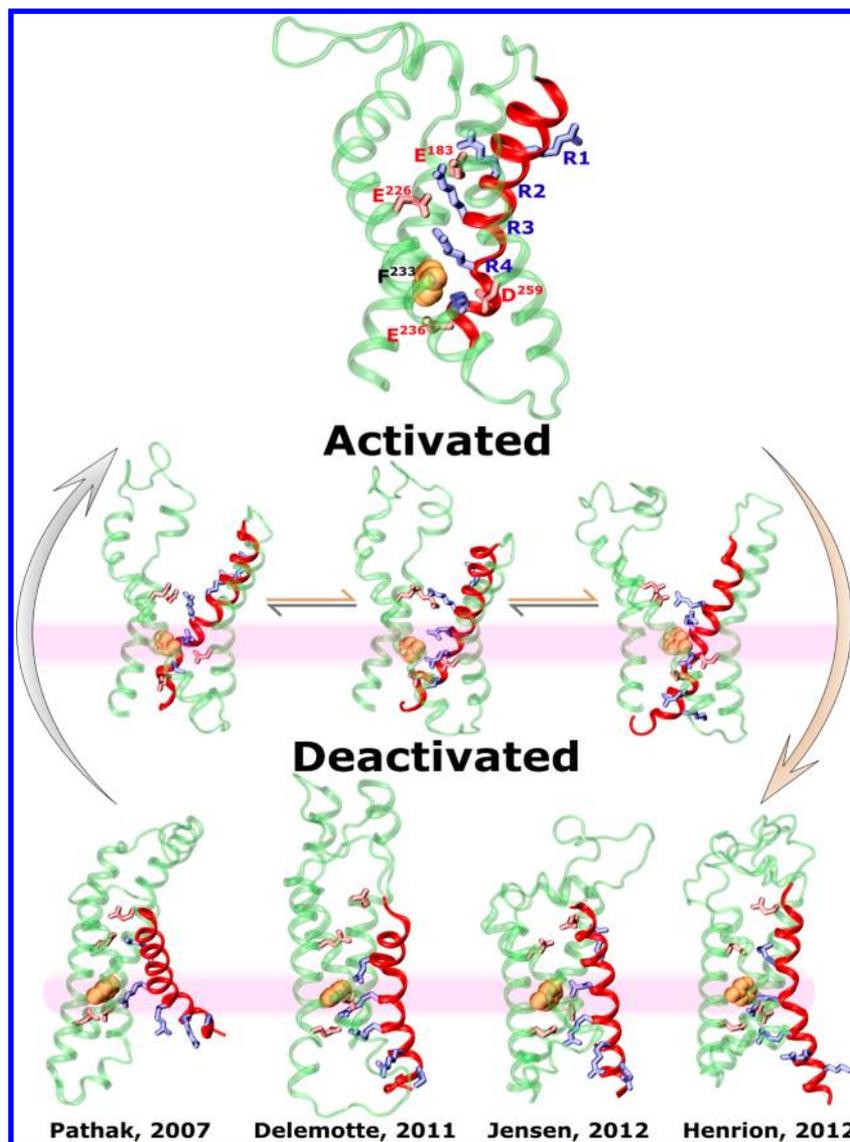
where  $\epsilon(r)$  and  $\bar{k}(r)$  are the space-dependent dielectric coefficient and Debye–Huckel ionic screening factor, respectively, and  $\Theta(r)$  is a Heaviside step function equal to 0 on one side of the membrane and 1 on the other side. Alternatively, explicit all-atom calculations<sup>57,58</sup> were also considered to estimate  $\phi_{mp}$  in the form of the so-called “electrical” distance  $\delta_i$ <sup>59–62</sup>

$$\delta_i \equiv \frac{\partial}{\partial V} \phi_i|_{V=0} \quad (5)$$

that accounts for the degree of coupling between the local electrostatic potential  $\phi_i$  at position  $r$  of the  $i$ th protein charge and the TM voltage difference  $V$ .  $\phi_i$  was calculated as an average over an ensemble of  $n$  MD-generated system configurations; i.e.,  $\phi_i \equiv (1/n) \sum_{j=1}^n \Phi_j(r)$ , where  $\Phi_j(r)$  is the electrostatic potential, computed according to eq 3. Taken together, both types of calculations were required to show consistently that the membrane voltage profile across the VSD,  $\phi_{mp}(z)$ , is a sigmoidlike function with its steepest part spanning a narrow TM region ( $\sim 10$ – $15 \text{ \AA}$ ) in the vicinity of the phenyl center F<sup>233</sup> (Figure 2). This major finding confirmed the existence of a focused electric field within the activated voltage sensor conformation of Kv1.2.

**Modeling the Resting Closed State of Kv1.2.** The activated membrane-equilibrated structure of Kv1.2, along with ever-increasing computational power and cutting-edge MD methodologies, has fostered a new generation of in silico studies, focused on channel deactivation, with the main goal of characterizing the structure of the deactivated and/or resting closed state of Kv channels.

**Ab Initio Modeling in Combination with MD Simulations.** Rosetta is an ab initio structural modeling program initially designed for predicting the structure of soluble proteins but was later adapted to model TM proteins inserted into the phospholipid environment, founded on statistical analyses of TM  $\alpha$ -helical data sets.<sup>63</sup> In the method, a fragment-based protein structure generation and a scoring function are combined to predict the structure. Pathak et al. performed the first effort to build up a molecular model of Kv1.2 in the resting closed state by successfully using Rosetta in combination with



**Figure 3.** Molecular views of the activated and deactivated VSD structures. S1–S3 are shown as green helices, and S4 is shown as a red helix. The top structure is the activated VSD conformation from the membrane-equilibrated crystal structure shown in ref 38. The bottom structures are proposed models for the deactivated state. From left to right, the assessed S4 displacement throughout deactivation was of approximately 8, 15, 15, and 12 Å, respectively. Despite these differences, the measured gating charges for the models agree with the values of 12–14 e estimated for *Shaker*-like channels (see refs 12–14). The middle structures are three possible VSD intermediates along the activation pathway as described in ref 58. Notice the sliding motion involved in the process and the gradual crossing of arginines past F<sup>233</sup>.

applied constraints derived from fluorescence scans.<sup>64</sup> More recently, in another study employing Rosetta, Henrion et al. proposed a “C3” resting state model reached via constraints based on experimentally probed metal ion bridges (Cys–Cd<sup>2+</sup>–Cys and Cys–Cd<sup>2+</sup>–Glu/Asp) between VSD forming helices of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel.<sup>65</sup>

Ab initio modeling is a rather low-resolution technique; as a consequence, it is often followed by MD refinements. In a subsequent study, Khalili-Araghi et al. utilized the resting state model developed by Pathak et al. as an input system for optimization via MD simulations of the channel in an explicit membrane–solvent environment.<sup>66</sup> In view of the relatively low total gating charge identified by Pathak’s early model as determined in this simulation, further refinements were then employed to bring S4 to a deeper position within the VSD via steered molecular dynamics (SMD) simulations. Specifically, the authors simulated a nonequilibrium process in which a

biasing potential of the form  $h[\zeta(t)] = 0.5 \times k[\lambda(x,t) - \zeta(t)]^2$  was used to pull down the S4 charge R<sub>1</sub> along the reaction coordinate  $\lambda(x,t)$ , corresponding to the TM direction. The biasing potential was coupled to the system with a force constant  $k$  of 5 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, moving according to  $\zeta(t) = \zeta(0) - vt$  with constant velocity  $v = 0.5$  Å/ns. Note that in SMD one simulates a system with a perturbed Hamiltonian  $H(x,t) = H_0(x) + h[\zeta(t)]$  in which  $x = x(r,p)$  specifies the position  $r$  and momentum  $p$  of the system and  $H_0(x)$  is the original unperturbed Hamiltonian. This formulation has proven to be very useful for exploring system dynamics along any given reaction coordinate, as considered in refs 67 and 68.

**Simulations of Kv1.2 under Applied TM Voltage Differences.** The TM electric field is in essence the driving force for the response of Kv1.2 to membrane polarization. Accordingly, in one ambitious set of MD studies, simulators tried to explore the atomic-level time-resolved gating process of

Kv1.2 under applied TM voltage differences,  $V$ .<sup>57,58,69–72</sup> For a channel–membrane system, an applied value of  $V$  is defined as the difference  $\Phi_{\text{int}} - \Phi_{\text{ext}}$  between the  $\Phi(z)$  values at the internal and external system electrolytes; here,  $\Phi(z)$  corresponds to the electrostatic potential profile along the membrane normal, and it is computed as the average of the electrostatic potential (see eq 3) over the membrane plane  $\rho(z)$  or as a double integral of the charge distribution of all atoms averaged over  $\rho(z)$ , as  $\Phi(z) - \Phi(0) = \iint \rho(z'') dz'' dz'$ .

In these MD studies, two fundamentally different approaches, based on an applied external electric field or charge imbalance protocol, have been employed to reach physiologically relevant ranges of  $V$ . In a system composed of a membrane of thickness  $d$  and bathed by two disconnected bulk solutions, the experimentally applied voltage results in (i) an effective zero field in the bulk and (ii) a constant electrical field  $E = V/d$  across the bilayer. For computer simulations, the electric field  $E$ , which will induce the desired range of  $V$ , is generated by applying a force  $F$  on every charged atom  $q_i$  of the system, in such a way that  $F = q_i E$ . The effectiveness of this method has been demonstrated in pioneering simulations of Kv channels.<sup>73</sup> It is noteworthy that, because of the use of periodic boundary conditions (PBC) in MD simulations, the applied field is rather a function of  $L_Z$ , the box size along  $Z$ ; i.e.,  $E = V/L_Z$ .<sup>74,75</sup> More recently, alternative approaches based on charge imbalance between two disconnected aqueous baths of explicit electrolytes have also been considered in simulation studies.<sup>76,77</sup> In these schemes, the channel–membrane system is bathed with explicit Nernst–Planck ion concentrations and  $V$  is imposed on the system by displacing ions from one aqueous compartment to the other, while keeping the overall concentration of the bulk phases constant. Because the system behaves as a condenser, the generated net charge imbalance  $q_0$ , between the upper and lower electrolytes, creates  $V$  according to the equation  $V = q_0/AC$ , in which  $A$  and  $C$  are the membrane area and capacitance, respectively. Because of the use of PBC, special simulation setups based on a twin lipid bilayer system with two bulk phases<sup>76</sup> or on a reduced system with a single bilayer and air–water interfaces on both sides of the membrane have been proposed to impose  $V$  via explicit charge imbalance.<sup>77</sup>

In response to an applied voltage, MD simulations limited to time scales of 1  $\mu\text{s}$  succeeded in providing insights into early transition events of the Kv1.2 voltage sensor.<sup>57,69,70,72</sup> The applied voltages were scaled up to 6 times larger than physiological values ( $\sim 100$  mV) to promote a faster response of the system within accessible simulation time scales. Only recently, in one specific simulation, reaching extraordinarily long time scales<sup>71</sup> within the range of hundreds of microseconds, the membrane-equilibrated structure of the Kv1.2–Kv2.1 paddle chimera<sup>37</sup> was shown to be fully deactivated spontaneously in the presence of an applied electric field. The authors of this study benefited from the special-purpose machine designed for high-speed MD simulations (see Molecular Dynamics Simulations). The deactivation process uncovered by this study followed a complex mechanism encompassing many VSD transitions occurring on characteristic time scales, as devised by previous kinetic models describing the time course of gating currents (Figure 3).<sup>78–82</sup> As formerly found in another independent study,<sup>58</sup> in which the VSD deactivation was fully uncovered in a voltage-driven MD simulation combined with SMD, the mechanism was shown to proceed via a downward motion of the S4 basic residues

forming sequential and metastable ion pairing with VSD acidic residues and membrane lipid headgroups. Importantly, these simulations also described another key structural modification taking place during deactivation, namely the sequential transfer of the S4 charges across the catalytic center. Naturally, having followed the deactivation mechanism of such channels, both studies from Delemotte et al. and Jensen et al. also proposed models for the resting state of the channel (see below).

**Atomistic Models of the VSD Resting State.** There are at present several proposed molecular models for the physiologically relevant deactivated or resting closed state of Kv channels (Figure 3). In the model by Pathak et al.,<sup>64</sup> S4 is  $\sim 8$  Å inwardly positioned relative to its up state; moreover, salt bridge interactions are thought to be formed between  $R_1$  and  $E^{226}$  and between  $R_2$  and  $E^{226}$  and  $D^{259}$ , and  $R_3$  would be slightly below  $D^{259}$  while being exposed to intracellular water. The models of Delemotte et al.<sup>58</sup> and Jensen et al.<sup>71</sup> show a larger vertical inward displacement of S4 relative to the up state, i.e.,  $\sim 15$  Å. In these models,  $R_1$  is more deeply embedded within the VSD, satisfying very recent experiments showing its proximity to the catalytic center  $F^{233}$  ( $F^{290}$  in the Kv1.2–Kv2.1 chimera),<sup>83</sup> and arginines  $R_2$ – $R_4$  are positioned beneath the phenyl center. The model of Delemotte et al. shows further the interaction of  $R_4$  with the lipid  $\text{PO}_4^-$  headgroups. Finally, in the model by Henrion et al. (C3),<sup>65</sup> the up–down S4 displacement is  $\sim 12$  Å, and the salt bridge pairs of  $R_1$  and  $E^{283}$  ( $E^{226}$  in Kv1.2) and  $R_2$  and  $E^{293}$  ( $E^{236}$  in Kv1.2) above and below the phenyl center, respectively, are said to be formed in the resting state. In the same study, another VSD conformation (C4) thought to be reached solely under enduring hyperpolarized pulses was further considered to match experimental data. In C4, S4 is more deeply located within the domain ( $\sim 17$  Å), favoring interactions between  $R_1$  and  $E^{293}$ , all inward to  $F^{290}$  ( $F^{233}$  in Kv1.2). Importantly, the structures account for much of the experimental data as suggested by a recent analysis investigating the consensual nature of some of the available resting state models.<sup>84</sup>

**Structure-Based Computation of Gating Charges (Q).** To evaluate the structural robustness and gating activation motions, the aforementioned models were tested against structure-based gating charge measurements. Distinct theoretical methods have been developed to compute gating charge  $Q$  associated with the activated open and resting closed conformations of Kv1.2. For instance, Khalili-Araghi et al.<sup>66</sup> have used the “Q-route” to quantify  $Q$  in the simulation in which an applied external electric field was used to ensure a constant  $V$ . In this formulation,  $Q$  is written simply as  $Q = \langle Q_d \rangle_{R,V} - \langle Q_d \rangle_{A,V}$ ,<sup>85</sup> where  $\langle Q_d \rangle_{R,V}$  and  $\langle Q_d \rangle_{A,V}$  are the ensemble averages of the channel charges in the deactivated and activated conformational states, respectively

$$\langle Q_d \rangle_{s,V} = \left\langle \sum_{i=1}^N q_i \frac{z_i^u}{L_Z} \right\rangle_{s,V} \quad (6)$$

where  $L_Z$  is the size of the simulation box along the  $Z$  axis, normal to the bilayer, and  $q_i$  and  $Z_i$  are the partial charge of atom  $i$  and its unwrapped coordinate along  $Z$ , respectively. Alternatively, the “direct measurement” was used by Delemotte et al. to compute  $Q$  in the Kv1.2 simulations in which the charge imbalance protocol was used to apply  $V$ .<sup>57,58</sup> In this approach, the charge imbalance across the membrane due to protein charges in a given conformation is linearly related to  $V$ , so that

$$q_0^{\text{protein}}(t) = -q_0^{\text{ion}}(t) + ACV(t) \quad (7)$$

where  $q_0^{\text{protein}}$  and  $q_0^{\text{ion}}$  are the contributions of protein charges and ions, respectively, to the total charge imbalance  $q_0(t) = q_0^{\text{protein}}(t) + q_0^{\text{ion}}(t)$ ,  $A$  is the membrane area, and  $C$  is the membrane capacitance, which is constant for the channel–membrane system<sup>86</sup> and amounts to  $\sim 0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , as measured from MD simulations.<sup>57</sup> Accordingly,  $Q$  associated with two conformations of the channel,  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ , can be thus obtained as

$$Q = -\frac{1}{2}[q_0^{\text{protein}}(\lambda_2) - q_0^{\text{protein}}(\lambda_1)] \quad (8)$$

where  $q_0^{\text{protein}}(\lambda_1)$  and  $q_0^{\text{protein}}(\lambda_2)$  are the charge imbalance due to protein charges in  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$ , respectively. Finally, a more general and free energy-based approach, the “G-route”,<sup>85</sup> was also used in different publications to make concrete connections between the models and experiments.<sup>50,57,58,61,62,66,71,87,88</sup> In this calculation,  $Q$  is linked to the microscopic state of the channel through

$$Q = \frac{\Delta G(\lambda_2, V) - \Delta G(\lambda_1, V)}{V} \quad (9)$$

where, for each  $\lambda$  conformation,  $\Delta G(\lambda, V)$  is the excess free energy of the channel due to the applied voltage. It relates the conformation of the channel to  $\phi_{\text{mp}}(i)$

$$\Delta G(\lambda, V) = G(\lambda, V) - G(\lambda, 0) = V \sum_i q_i \phi_{\text{mp}}^\lambda(i) \quad (10)$$

which represents the coupling of the  $i$ th channel charge  $q_i$  to the transmembrane potential. In practice, for a given conformation of the channel,  $\phi_{\text{mp}}^\lambda(i)$  has been estimated following different strategies: (i) by means of a continuum electrostatic approximation based on the Poisson–Boltzmann equation modified to account for the effect of the transmembrane voltage (eq 4),<sup>50,61</sup> (ii) by means of perturbation MD simulations as the charging free energy of  $q_i$  at two different voltages,<sup>66,71,85</sup> and (iii) alternatively in the so-called “energetic formalism” approach,<sup>57</sup> a less time-costly computation of  $\phi_{\text{mp}}^\lambda(i)$  that can also be obtained in the form of the “electrical distance” (eq 5).<sup>61,62</sup> It is noteworthy that within the framework of the Ramo–Schokley theorem,  $Q$  could also be expressed as a function of starting and ending locations of all particles bearing charges  $q_i$  and  $\phi_i^\lambda(r)$ , which is another formulation identical to that following eqs 9 and 10.<sup>89</sup>

When tested against experimental estimates of  $Q$  measurements for *Shaker*-like channels (12–14 e), the resting closed models of Kv1.2 (or the Kv1.2–Kv2.1 paddle chimera) were all found to be in fine agreement with the experimental assessments.<sup>12–14</sup> With the  $Q$  route and direct measurement, the formal free energy approach was particularly advantageous, allowing the identification of several S2–S3 negatively charged residues along with the S4 basic residues that contribute to the Kv1.2 gating charges as well as quantification of their specific contributions to  $Q$ . These results are consistent with experiments showing that mutations of the S2–S3 and S4 residues influence  $Q$ .<sup>13,86,90–93</sup>

**Emerging Picture for VSD Activation.** The same general electric properties determined for the activated open conformation of Kv1.2 (see above) were also found when analyzing a resting VSD model,<sup>58</sup> suggesting that the electric field within the domain is not drastically reshaped during its structural transition. This result was of particular interest, given

the long-lasting controversy concerning the “static” or “remodeled” nature of the electric field in VGCCs. Currently, though not refuting key features of the paddle or transporter models, i.e., the S3b–S4 forming paddle, hydration of the VSD and field focalization, the emerging picture from the Kv1.2 structure and its manifold studies depicts major characteristics of the sliding helix model. Accordingly, S4 moves from 10 to 15 Å in the TM direction throughout activation, traversing its own protein-lined pathway and forming conformation-dependent salt bridges between its basic residues and neighboring countercharges.<sup>94</sup>

**Pore Opening and Coupling with the VSD.** The structural studies of Kv channels indicate so far that pore opening involves transient hydration of the ionic conduction pathway, allowing the diffusion of ions throughout a hydrophilic environment, such as that encountered in the open gate of Kv1.2.<sup>38</sup> Here, sophisticated free energy calculations were integral to the study of the energetics of ion conduction through the channel. These calculations were made with the free energy profile or potential of mean force (PMF). The PMF along any given reaction coordinate  $\lambda$  is related to the equilibrium probability density  $P(\lambda)$ :

$$G(\lambda) = -\frac{1}{\beta} \ln P(\lambda) + G_0 \quad (11)$$

where  $\beta^{-1} = kT$ ,  $G(\lambda)$  is the free energy of the state defined by a specific value of  $\lambda$ , and  $G_0$  is a constant. A detailed description of the vast repertoire of free energy methods in the context of MD simulations can be found in refs 95 and 96.

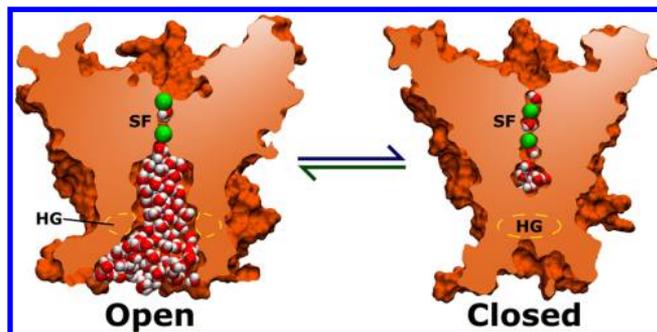
In one of the first approaches, Beckstein et al. have used umbrella sampling with the weighted histogram analysis method (WHAM) to estimate the  $G(\lambda)$  profile for ion permeation through nanopore models with various radii.<sup>97</sup> In their approach, an external potential of the form  $U(\lambda) = k/2(\lambda - \lambda_i)^2$ , typically used in the method, was employed to efficiently bias the equilibrium distribution of the ion along the permeation pathway  $\lambda$ . In practice, this was done following a stratification approach by performing several independent simulations with the ion initially positioned at different  $\lambda_i$  values. From each of these simulations, the WHAM method was then used to reconstruct the unbiased density  $P_i(\lambda)$  from the biased one, with the main goal of combining all  $P_i(\lambda)$  values into the equilibrium probability density  $P(\lambda)$ , from which the PMF was computed according to eq 11. Later, using MD simulations and the adaptive-biasing-force (ABF) method,<sup>98,99</sup> Treptow and Tarek estimated the PMF of ion conduction through the more complex activation gate of Kv1.2.<sup>100</sup> The method corresponds to the usual thermodynamic integration (TI) scheme (eq 12), except for the explicit dependence on the volume element in generalized coordinates.

$$\frac{dG(\lambda)}{d\lambda} = \left\langle \frac{\partial U(r^N)}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda = -\langle F_\lambda \rangle_\lambda \quad (12)$$

The ABF method computes the mean force  $\langle F_\lambda \rangle_\lambda$  at a given position of  $\lambda$  by applying an iterative biasing force  $F^{\text{ABF}}$  that allows the system to overcome free energy barriers. As the estimation of  $\langle F_\lambda \rangle_\lambda$  is improved during the simulation, it adapts to match precisely the free energy barrier, promoting a uniform sampling by diffusing the system on a flat energy surface. In their computation, authors have evaluated the PMFs for ion conduction over a pathway of 27 Å, ranging from the cytoplasmic entrance of the pore to the central cavity of the

channel, and a stratification of nine windows was adopted to minimize statistical errors. A homogeneous sampling along the reaction coordinate, in which at least 20000 values of the force were collected for averaging, ensured convergence of the PMF.

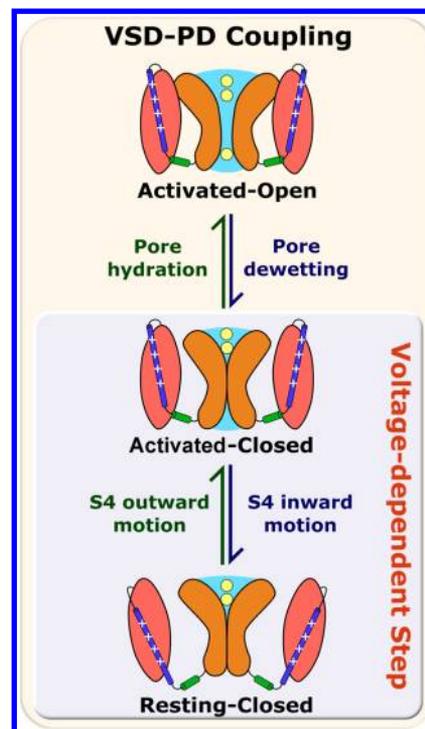
These free energy calculations showed independently that narrowing of a hydrophobic gate dehydrates the permeation pathway, restraining ion diffusion (Figure 4).<sup>97,100</sup> Computa-



**Figure 4.** Pore narrowing and dehydration at the hydrophobic gate stop the ionic flow. The intrinsic pore gating mechanism acts via constriction of the hydrophobic gate and leads to dehydration of the ionic permeation pathway. Abbreviations: HG, hydrophobic gate; SF, selectivity filter.

tions based on the finite difference Poisson–Boltzmann equation (eq 2) have pointed out that the free energy barrier for conduction results from the reaction field energy, corresponding essentially to a dehydration penalty.<sup>54,97</sup> The reaction field energy is the difference between the electrostatic energies of the channel with the permeating ion and the ion far away in bulk. Overall, as demonstrated by such structural studies, hydrophobic gates act as efficient devices in the control of ion transport. In fact, a number of other ion channels also present hydrophobic gates: nicotinic receptors,<sup>101</sup> the bacterial mechanosensitive MscS channel,<sup>102</sup>  $K_{2P}$  channels,<sup>103</sup> and NaChBac.<sup>104</sup> Furthermore, hydrophobic gates seem to equip the channel pore with an intrinsic gating mechanism, qualifying the construct to operate autonomously. Indeed, recent microsecond-long MD simulations of rat Kv1.2 showed that, starting from an open conformation, the pore region may go through a dewetting transition, followed by channel closing by means of an intrinsic hydrophobic gating mechanism.<sup>105</sup> Dewetting results from capillary evaporation alternated with capillary condensation of water within the pore, which is a common feature of hydrophobic nanopores in general.<sup>106</sup>

A major question of how the electrically driven or dewetting-driven motions of VSD and PD could be joined cooperatively to generate the open–closed transitions of the entire channel arises. While easily viewed as two autonomic operating devices, the pore and the VSD cast a synergistic functional machine. So far, this matter has been approached via site-directed mutations, revealing that the S4–S5 linker residues took part in such a process.<sup>107–110</sup> Only recently have long molecular dynamics simulations provided the very first structural and dynamical insights on the subject (Figure 5). Jensen et al. studied the deactivation and activation pathways of the Kv1.2–Kv2.1 paddle chimera channel.<sup>71</sup> As indicated by the simulation, activation follows a well-described path: starting from a closed deactivated state, depolarization-driven S4 upward displacements occur along with a final cooperative S4 motion to bring the S4–S5 linker to a tense conformation. This tension results



**Figure 5.** Schematic representation of the voltage sensor–pore coupling during  $K^+$  channel gating, as revealed by the extremely long molecular dynamics simulation of ref 71.

in perturbation and weakening of the linker–S6 interaction, permitting, at first, opening of the pore lower gate accompanied by partial pore hydration; ions then enter the cavity, inducing progressive rehydration of the conducting pore along with complete pore opening. The deactivation event follows somewhat the reverse path: under hyperpolarization, an early downward movement of S4 precedes pore dewetting and its subsequent collapse. Only after complete pore closure does VSD reach a fully down state. Also, the simulation illustrates that to complete the pore opening process, all four VSDs are required to be fully activated. Closing, on the other hand, solely requires rearrangements of a single VSD. Despite the detailed description of the pathway unveiled for the Kv1.2–Kv2.1 chimera, the matter is still under discussion for other channels such as KCNQ1, for which it is proposed that activation results from sequential transitions unconditioned to a concerted motion of all four VSDs.<sup>111</sup> KCNQ1 illustrates the role sequence diversity may have in generating potentially different mechanisms between the various channels

## ■ FUTURE DIRECTIONS

After more than 50 years of study and with the aforementioned models in mind, one major challenge is to place all the structural and functional data into a unified framework so it can be applied to other appealing topics.

**Toward other VGCCs.** In 2011, the X-ray structure of a voltage-gated sodium channel from the bacterium *Arcobacter butzleri*, NavAb, was determined at 2.7 Å,<sup>6</sup> featuring a closed PD and the four VSDs seemingly activated (Figure 1). The structure, which was interpreted as being representative of the pre-open state of the channel, has offered the first high-resolution structural template available for the investigation of other much less frequently studied  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  channels. Because of their structural similarity, members of the VGCC

family are expected to exhibit a voltage sensing and gating mechanism similar to those discovered in Kv1.2. Large variations might exist for some specific channels, such as the HCN channel, for which the S4-mediated process follows an opposite voltage dependence.<sup>112</sup> For NavAb and related bacterial channels, results from site-directed spin labeling and EPR spectroscopy support the notion that its voltage sensing pathway may be highly similar to several K<sup>+</sup> channels.<sup>113</sup> Therefore, established experimental and theoretical approaches can be applied to characterize the active and resting states of NavAb and to elucidate the structural similarities and divergence between them. As described in the following, this proposition has been strengthened with recent publications.

On the basis of the analysis of disulfide locking of Cys double mutants, Catterall and co-workers have described an extensive set of state-dependent interactions between S4 charges and their countercharged residues in neighboring VSD segments for the orthologous NaChBac channel. By using the Rosetta method, authors have combined the set of interactions with structural data available for related channels, including the Kv1.2–Kv2.1 chimera and NavAb, to construct structural models of resting, intermediate, and activated states of NaChBac.<sup>27</sup> In another recent study, Amaral et al. considered two specific structures of Kv1.2, in the activated open<sup>49</sup> and resting closed<sup>58</sup> conformations, as guide templates to drive a series of biased and equilibrium MD simulations that aimed to explore the activation open pathway of NavAb.<sup>114</sup> The biasing simulations were accomplished by means of target molecular dynamics (TMD),<sup>115</sup> in which a selection of *N* atoms of the channel was guided to the reference structures by an applied potential  $U_{\text{TMD}} = 1/2(k/N)[\text{rmsd}(t) - \text{rmsd}^*(t)]^2$ , with root-mean-square deviations  $\text{rmsd}(t)$  and  $\text{rmsd}^*(t)$  corresponding to instantaneous and target deviations between structures, respectively. Specifically, by using a force constant *k* of 4.5 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> and a velocity of 0.25 Å/ns for the target deviation  $\text{rmsd}^*(t)$ , authors have sampled channel conformations potentially related to the resting closed and activated open states, a result strongly consistent with the recently published X-ray crystal structures of the orthologous channels NavRh<sup>8</sup> and NavMs.<sup>9</sup>

In many instances, acquisition of structural data for different members of the superfamily of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels is highly desirable and actually required to extend our knowledge on other appealing topics. In this context, the X-ray structures and atomistic models available for distinct conformations of Kv1.2, NavAb, and other channels provide a valuable set of templates that can be further aided by comparative protein modeling to built-up models of structurally unknown channels. Consistent with this notion, homology models for the TM domain of K-Shaw<sup>116</sup> and the VSD of the mammalian Nav1.4 channel<sup>117</sup> have been successfully built and recently considered in studying the regulation and dysfunction of VGCCs (see below). The success of these approaches templated on Kv1.2 and NavAb relied on the significant level of sequence similarity shared by channels within the TM segments.

**Structural Details of the Inactivation State.** Inactivation is another voltage-dependent process involving complex structural rearrangements of VGCCs, ultimately hindering the passage of ions through the channel. To date, key aspects of this process have been unveiled for K<sup>+</sup> channels, indicating that these rearrangements are described by two main mechanisms: a fast inactivation occurring on the millisecond time scale and a slow, or C-type, inactivation occurring under lingering

depolarized conditions or repetitive firing of potentials. The fast inactivation relates to the clogging of the intracellular opening of the pore by the N-terminus of the channel.<sup>118</sup> Metadynamics MD simulations,<sup>119</sup> and subsequent experiments,<sup>120</sup> revealed that slow inactivation is achieved through structural defects in the selectivity filter, leading to unusual dihedral angle conformations. Whether the hydrophobic gating mechanism described for the pore of Kv1.2 (see above) corresponds as well to an intrinsic inactivation mechanism in Kv channels remains to be validated.

In this regard, much is still unanswered when it comes to structural details of the inactivation mechanisms of sodium channels. For the mammalian Nav channels, the fast inactivation has been shown to occur via a “hinged lid” mechanism performed by an intracellular inactivation gate that binds to the mouth of the pore, whereas the slow inactivation is much more poorly characterized.<sup>121</sup> For bacterial Nav channels, which do not present the mammalian relative inactivation machinery, a variant inactivation is likely to derive from closure of the intracellular gate of the main pore,<sup>122–126</sup> which seems to be similar to the hydrophobic gating mechanism described for Kv1.2. Indeed, the X-ray structures of NavAb<sup>7</sup> and NavRh,<sup>8</sup> featuring a closed PD, have recently been described as potentially inactivated structures of the channel. As previously highlighted, a detailed characterization of fully activated–inactivated structures, and even the pathway by which the transition is accomplished, are significant in terms of a more profound understanding of other fundamental topics such as conduction and channel modulation by ligands.

**Channel Modulation.** Another fascinating topic relates to the modulation of voltage-gated channels (VGCCs). This subject concerns the possibility of investigating how ligands such as divalent cations, peptides, free sulfhydryl modifiers, general and local anesthetics, and toxins may alter VGCC function. Indeed, a series of studies have already been, and are still being, conducted in this regard. For instance, in a recent study, alanine scanning experiments along with MD docking calculations succeeded in identifying binding sites for inhaled anesthetics both at the S4–S5 linker and at the activation gate of K-Shaw.<sup>116</sup> Moreover, other structural studies were also conducted to investigate the functional and structural effects engendered by pore-blocking toxins<sup>127</sup> and gating modifier peptides<sup>128</sup> binding to VGCCs. In light of this scenario and the just released sodium channel structures, studies with these template structures are thought to be of great value for further investigations of binding of the ligand to VGCCs. In fact, the anesthetic sensitivity of NavAb-related channels, such as NaChBac,<sup>129</sup> suggests that NavAb is a useful model for studies of the action of general anesthetics. Furthermore, given the key role of Nav channels in generating the upstroke of the action potential, toxins act at six or more distinct receptor sites on these channels compared to only two sites on Kv.<sup>130</sup>

**Channel Dysfunctions.** Finally, in view of the great structural progress that has been made so far, we are reaching a critical point where it is possible to tackle more intricate and relevant questions, such as the molecular origins of VGCC-related dysfunctions. It is remarkable that such a deep issue can be investigated in the context of atomic-level structural studies. A series of recent MD investigations<sup>71,131,132</sup> address the interplay between S4 helix mutations and inheritable channelopathies, e.g., epilepsy, paralyzes, and long QT syndrome. By considering the Kv1.2 channel, these studies demonstrated that specific S4 mutations disarrange the VSD

electrostatic network, giving rise to leakage of cations, the so-called “omega” or “gating pore” currents,<sup>133,134</sup> through an off-pore conduction pathway within the voltage sensor domain. Here, similar studies yet to be conducted on sodium channels will likely be very instructive in understanding the molecular properties underlying inheritable genetic diseases. In this direction, initial modeling efforts have suggested that the hydrophobic septum that isolates the intracellular and extracellular media within the VSDs of Nav1.4 is ~2 Å long, which is similar to the length of that encountered in the VSD of Kv channels.<sup>117</sup> This structural pattern rationalizes the existence of gating pore currents on the Nav1.4 channel.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Laboratório de Biofísica Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brazil, CEP 70910-900. E-mail: treptow@unb.br. Phone: +55.61.3107.3098.

### Author Contributions

L.S. and C.S. contributed equally to this work.

### Funding

W.T. thanks the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for research support (Grant 470406/2011-9) and graduate fellowships to L.S. and C.S.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Jensen, Dr. V. Carnevale, and E. Palovcak for useful comments on an early version of the manuscript.

## REFERENCES

- Hille, B. (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed., Sinauer, Sunderland, MA.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999) Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiol. Rev.* 79, 1317–1372.
- Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S., and Avoli, M. (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 9, 413–424.
- Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80, 555–592.
- Horn, R. (2000) Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* 39, 15653–15658.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Payandeh, J., El-Din, T. M. G., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2012) Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135–139.
- Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., Wang, J., Clapham, D. E., and Yan, N. (2012) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486, 130–134.
- McCusker, E. C., Bagn eris, C., Naylor, C. E., Cole, A. R., D’Avanzo, N., Nichols, C. G., and Wallace, B. A. (2012) Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* 3, 1102.
- Sakmann, B., and Neher, E. (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 455–472.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 473–496.

- Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A., and Sigworth, F. J. (1992) The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 255, 1712–1715.

- Aggarwal, S. K., and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K channel. *Neuron* 16, 1169–1177.

- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., and Bezanilla, F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16, 1159–1167.

- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., and Minamino, N. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.

- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.

- Islas, L. D., and Sigworth, F. J. (1999) Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 114, 723–742.

- Yang, N., George, A. L. J., and Horn, R. (1996) Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 16, 113–122.

- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., and Isacoff, E. Y. (1996) Transmembrane movement of the Shaker K<sup>+</sup> Channel S4. *Neuron* 16, 387–397.

- Starace, D. M., Stefani, E., and Bezanilla, F. (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 19, 1319–1327.

- Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M., and Isacoff, E. Y. (1996) Direct physical measurement of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271, 213–216.

- Papazian, D. M., Shao, X. M., Seoh, S.-A., Mock, A. F., Huang, Y., and Wainstock, D. H. (1995) Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 14, 1293–1301.

- Tiwari-Woodruff, S. K., Schulteis, C. T., Mock, A. F., and Papazian, D. M. (1997) Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K<sup>+</sup> channel subunits. *Biophys. J.* 72, 1489–1500.

- Wu, D., Delaloye, K., Zaydman, M. A., Nekouzadeh, A., Rudy, Y., and Cui, J. (2010) State-dependent electrostatic interactions of S4 arginines with E1 in S2 during Kv7.1 activation. *J. Gen. Physiol.* 135, 595–606.

- DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Sharp, E. M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2009) Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 22498–22503.

- DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2011) Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na<sup>+</sup> channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18825–18830.

- Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P. G., Westenbroek, R. E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W. A. (2012) Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E93–E102.

- Blaustein, R. O., and Miller, C. (2004) Ion channels: Shake, rattle or roll? *Nature* 427, 499–500.

- Guy, H. R., and Seetharamulu, P. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 508–512.

- Catterall, W. A. (1986) Voltage-dependent gating of sodium channels: Correlating structure and function. *Trends Neurosci.* 9, 7–10.

- Keynes, R. D., and Elinder, F. (1999) The screw-helical voltage gating of ion channels. *Proc. Biol. Sci.* 266, 843–852.

- Gandhi, C. S., and Isacoff, E. Y. (2002) Molecular Models of Voltage Sensing. *J. Gen. Physiol.* 120, 455–463.

- Cha, A., Ruben, P. C., George, A. L., Fujimoto, E., and Bezanilla, F. (1999) Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 813–817.

- (34) Starace, D. M., and Bezanilla, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548–553.
- (35) Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F., and Selvin, P. R. (2005) Small vertical movement of a K<sup>+</sup> channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* 436, 848–851.
- (36) Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423, 33–41.
- (37) Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- (38) Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309, 897–903.
- (39) Ingólfsson, H. I., Li, Y., Vostrikov, V. V., Gu, H., Hinton, J. F., Koeppel, R. E., Roux, B., and Andersen, O. S. (2011) Gramicidin A backbone and side chain dynamics evaluated by molecular dynamics simulations and nuclear magnetic resonance experiments. I: Molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 115, 7417–7426.
- (40) Frenkel, D., and Smit, B. (2001) *Understanding Molecular Simulation, Second Edition: From Algorithms to Applications*, Academic Press, San Diego.
- (41) MacKerell, A. D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Jr., Evanseck, J., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., III, Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., and Karplus, M. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102, 3586–3616.
- (42) MacKerell, A. D., Jr., Feig, M., and Brooks, C. L., III (2004) Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 698–699.
- (43) Cornell, W., Cieplak, P., Bayly, C., Gould, L., Merz, K., Ferguson, D., Spellmeyer, D., Fox, T., Caldwell, J., and Kollman, P. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.
- (44) Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., and Van Gunsteren, W. F. (2011) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* 40, 843–856.
- (45) Ponder, J. W., and Case, D. A. (2003) Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* 66, 27–85.
- (46) Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
- (47) Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26, 1701–1718.
- (48) Shaw, D., Deneroff, M., Dror, R., Kuskin, J., Larson, R., Salmon, J., Young, C., Batson, B., Bowers, K., Chao, J., Eastwood, M., Gagliardo, J., Grossman, J., Ho, R., Ierardi, D., Kolossváry, I., Klepeis, J., Layman, T., McLeavey, C., Moraes, M., Mueller, R., Priest, E., Shan, Y., Spengler, J., Theobald, M., Towles, B., and Wang, S. (2007) Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation. *Proceedings of the 34th Annual International Symposium on Computer Architecture*, 1–12.
- (49) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 90, L64–L66.
- (50) Jogini, V., and Roux, B. (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K<sup>+</sup> channel in a membrane environment. *Biophys. J.* 93, 3070–3082.
- (51) Kobertz, W. R., and Miler, C. (1999) K<sup>+</sup> channels lacking the “tetramerization” domain: Implications for pore structure. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1122–1125.
- (52) Sands, Z. A., and Sansom, M. S. (2007) How does a voltage sensor interact with a lipid bilayer? Simulations of a potassium channel domain. *Structure* 15, 235–244.
- (53) Krepiy, D., Mihailescu, M., Freites, J. A., Schow, E. V., Worcester, D. L., Gawrisch, K., Tobias, D. J., White, S. H., and Swartz, K. J. (2009) Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* 462, 473–479.
- (54) Jogini, V., and Roux, B. (2005) Electrostatics of the intracellular vestibule of K<sup>+</sup> channels. *J. Mol. Biol.* 354, 272–288.
- (55) Aksimentiev, A., and Schulten, K. (2005) Imaging  $\alpha$ -hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys. J.* 88, 3745–3761.
- (56) Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A., and MacKinnon, R. (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science* 328, 67–73.
- (57) Treptow, W., Tarek, M., and Klein, M. L. (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2107–2109.
- (58) Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6109–6114.
- (59) Stevens, C. F. (1978) Interactions between intrinsic membrane protein and electric field. An approach to studying nerve excitability. *Biophys. J.* 22, 295–306.
- (60) Sigworth, F. J. (1994) Voltage gating of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 27, 1–40.
- (61) Roux, B. (1997) Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophys. J.* 73, 2980–2989.
- (62) Islas, L. D., and Sigworth, F. J. (2001) Electrostatic and the gating pore of Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 117, 69–89.
- (63) Yarov-Yarovsky, V., Schonbrun, J., and Baker, D. (2006) Multipass membrane protein structure prediction using Rosetta. *Proteins* 62, 1010–1025.
- (64) Pathak, M. M., Yarov-Yarovsky, V., Agarwal, G., Roux, B., Barth, P., Kohout, S., Tombola, F., and Isacoff, E. Y. (2007) Closing in on the resting state of the shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 56, 124–140.
- (65) Henrion, U., Renhorn, J., Börjesson, S. I., Nelson, E. M., Schwaiger, C. S., Bjelkmar, P., Wallner, B., Lindahl, E., and Elinder, F. (2012) Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, DOI:10.1073/pnas.1116938109.
- (66) Khalili-Araghi, F., Jogini, V., Yarov-Yarovsky, V., Tajkhorshid, E., Roux, B., and Schulten, K. (2010) Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel. *Biophys. J.* 98, 2189–2198.
- (67) Jensen, M. U., Park, S., Tajkhorshid, E., and Schulten, K. (2002) Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6731–6736.
- (68) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) K<sup>+</sup> conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. *Biophys. J.* 91, L81–L83.
- (69) Nishizawa, M., and 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.
- (70) Bjelkmar, P., Niemelä, P. S., Vattulainen, I., and Lindahl, E. (2009) Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000289.
- (71) Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012) Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* 336, 229–233.
- (72) Denning, E. J., Crozier, P. S., Sachs, J. N., and Woolf, T. B. (2009) 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.
- (73) Treptow, W., Maigret, B., Chipot, C., and Tarek, M. (2004) Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: A model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel. *Biophys. J.* 87, 2365–2379.

- (74) Tarek, M. (2005) Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. J.* 88, 4045–4053.
- (75) Gumbart, J., Khalili-Araghi, F., Sotomayor, M., and Roux, B. (2012) Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 294–302.
- (76) Sachs, J. N., Crozier, P. S., and Woolf, T. B. (2004) Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. *J. Chem. Phys. B* 121, 10847–10851.
- (77) Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., and Tarek, M. (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J. Chem. Phys. B* 112, 5547–5550.
- (78) Fedida, D., and Hesketh, J. C. (2001) Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 75, 165–199.
- (79) Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103, 3121–362.
- (80) Schoppa, N. E., and Sigworth, F. J. (1998) Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.* 111, 313–342.
- (81) Loboda, A., and Armstrong, C. M. (2001) Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation. *Biophys. J.* 81, 905–916.
- (82) Sigg, D., Bezanilla, F., and Stefani, E. (2003) Fast gating in the Shaker K<sup>+</sup> channel and the energy landscape of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7611–7615.
- (83) Lin, M. A., Hsieh, J.-Y., Mock, A. F., and Papazian, D. M. (2011) R1 in the Shaker S4 occupies the gating charge transfer center in the resting state. *J. Gen. Physiol.* 138, 155–163.
- (84) Vargas, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2011) In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron* 72, 713–720.
- (85) Roux, B. (2008) The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys. J.* 95, 4205–4216.
- (86) Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994) Gating of Shaker K<sup>+</sup> channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66, 996–1010.
- (87) Lecar, H., Larsson, H. P., and Grabe, M. (2003) Electrostatic model of S4 motion in voltage-gated ion channels. *Biophys. J.* 85, 2854–2864.
- (88) Grabe, M., Lecar, H., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17640–17645.
- (89) Nonner, W., Peyser, A., Giles, D., and Eisenberg, B. (2004) Relating microscopic charge movement to macroscopic currents: The Ramo-Schockley Theorem applied to ion channels. *Biophys. J.* 87, 3716–3722.
- (90) Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349, 305–310.
- (91) Baker, O. S., Larsson, H. P., Mannuzzu, L. M., and Isacoff, E. Y. (1998) Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of S4 domain in K channels gating. *Neuron* 20, 1283–1294.
- (92) Tiwari-Woodruff, S. K., Lin, M. A., Schulteis, C. T., and Papazian, D. M. (2000) Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 115, 123–138.
- (93) Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. V., Patten, C. D., and Montal, M. (1995) Mutation of conserved negatively charged residues in the S2 and S3 transmembrane segments of a mammalian K<sup>+</sup> channel selectively modulates channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9422–9426.
- (94) Vargas, E., Yarov-Yarovoy, V., Khalili-Araghi, F., Catterall, W. A., Klein, M. L., Tarek, M., Lindahl, E., Schulten, K., Perozo, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2012) An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* 140, 587–594.
- (95) Chipot, C., and Pohorille, A., Eds. (2007) *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*, Springer, Berlin.
- (96) Pohorille, A., Jarzynski, C., and Chipot, C. (2010) Good practices in free-energy calculations. *J. Phys. Chem. B* 114, 10235–10253.
- (97) Beckstein, O., Tai, K., and Sansom, M. S. (2004) Not ions alone: Barriers to ion permeation in nanopores and channels. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14694–14695.
- (98) Darve, E., and Pohorille, A. (2001) Calculating free energies using average force. *J. Chem. Phys.* 115, 9169–9183.
- (99) Hénin, J., and Chipot, C. (2004) Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 121, 2904–2914.
- (100) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) Molecular restraints in the permeation pathway of ion channels. *Biophys. J.* 91, L26–L28.
- (101) Nury, H., Poitevin, F., Renterghem, C. V., Changeux, J. P., Corringer, P. J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010) One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6275–6280.
- (102) Sotomayor, M., and Schulten, K. (2004) Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance MscS. *Biophys. J.* 87, 3050–3065.
- (103) Treptow, W., and Klein, M. L. (2010) The membrane-bound state of K2P potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8145–8151.
- (104) Barber, A. F., Carnevale, V., Raju, S. G., Amaral, C., Treptow, W., and Klein, M. L. (2012) Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2120–2125.
- (105) Jensen, M. U., Borhani, D. W., Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Jogini, V., Eastwood, M. P., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2010) Principles of conduction and hydrophobic gating in K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5833–5838.
- (106) Beckstein, O., and Sansom, M. S. P. (2004) The influence of geometry, surface character, and flexibility on the permeation of ions and water through biological pores. *Phys. Biol.* 1, 42–52.
- (107) Yifrach, O., and MacKinnon, R. (2002) Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel. *Cell* 111, 231–239.
- (108) Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- (109) Van Slyke, A. C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C. R., and Claydon, T. W. (2010) Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K<sup>+</sup> channels. *Biophys. J.* 99, 2841–2852.
- (110) Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011) Mode shift of the voltage sensors in Shaker K<sup>+</sup> channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.
- (111) Meisel, E., Dvir, M., Haitin, Y., Giladi, M., Peretz, A., and Attali, B. (2012) KCNQ1 channels do not undergo concerted but sequential gating transitions in both the absence and the presence of KCNE1 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 34212–34224.
- (112) Kwan, D. C. H., Prole, D. L., and Yellen, G. (2012) Structural changes during HCN channel gating defined by high affinity metal bridges. *J. Gen. Physiol.* 140, 279–291.
- (113) Chakrapani, S., Sompornpisut, P., Intharathep, P., Roux, B., and Perozo, E. (2010) The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5435–5440.
- (114) Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L., and Treptow, W. (2012) 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.
- (115) Schlitter, J., Engels, M., and Krüger, P. (1994) Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *J. Mol. Graphics* 12, 84–89.

(116) Barber, A. F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W., and Covarrubias, M. (2011) Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys. J.* 101, 1613–1622.

(117) Gosselin-Badaroudine, P., Delemotte, L., Moreau, A., Klein, M. L., and Chahine, M. (2012) Gating pore currents and the resting state of Nav1.4 voltage sensor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 19250–19255.

(118) Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., and MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657–661.

(119) Domene, C., Klein, M. L., Branduardi, D., Gervasio, F. L., and Parrinello, M. (2008) Conformational Changes and Gating at the Selectivity Filter of Potassium Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9474–9480.

(120) Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., and Perozo, E. (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Nature* 466, 203–208.

(121) Catterall, W. A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13–25.

(122) Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A., and Clapham, D. E. (2002) The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac. *J. Gen. Physiol.* 120, 845–853.

(123) Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2004) A gating hinge in Na<sup>+</sup> channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41, 859–865.

(124) Zhao, Y., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2004) 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, 17873–17878.

(125) Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P., and French, R. J. (2005) The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel. *Biophys. J.* 89, 232–242.

(126) Irie, K., Kitagawa, K., Nagura, H., Imai, T., Shimomura, T., and Fujiyoshi, Y. (2010) Comparative Study of the Gating Motif and C-type Inactivation in Prokaryotic Voltage-gated Sodium Channels. *J. Biol. Chem.* 285, 3685–3694.

(127) Eriksson, M. A. L., and Roux, B. (2002) Modeling the structure of Agitoxin in complex with the Shaker K<sup>+</sup> channel: A computational approach based on experimental distance restraints extracted from thermodynamic mutant cycles. *Biophys. J.* 83, 2595–2609.

(128) Wang, J., Yarov-Yarovoy, V., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2011) Mapping the receptor site for  $\alpha$ -scorpion toxins on a Na<sup>+</sup> channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 15426–15431.

(129) Ouyang, W., Jih, T. Y., Zhang, T. T., Correa, A. M., and Hemmings, H. C. J. (2007) Isoflurane inhibits NaChBac, a prokaryotic voltage-gated sodium channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 1076–1083.

(130) Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124–141.

(131) Delemotte, L., Treptow, W., Klein, M. L., and 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.

(132) Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E., Roux, B., and Schulten, K. (2012) Molecular Dynamics Investigation of the  $\omega$ -Current in the Kv1.2 Voltage Sensor Domains. *Biophys. J.* 102, 258–267.

(133) Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2005) Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* 45, 379–388.

(134) Tombola, F., Pathak, M. M., Gorostiza, P., and Isacoff, E. Y. (2007) The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain. *Nature* 445, 546–549.