



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Molecular

Ação de Anestésicos Gerais em Canais Iônicos

Juliana Mayumi Hosoume

Dissertação apresentada como requisito parcial para conclusão do
Mestrado em Biologia Molecular

Orientador
Prof. Dr. Werner Treptow

Brasília
2016

Ficha Catalográfica de Teses e Dissertações

Esta página existe apenas para indicar onde a ficha catalográfica gerada para dissertações de mestrado e teses de doutorado defendidas na UnB. A Biblioteca Central é responsável pela ficha, mais informações nos sítios:

<http://www.bce.unb.br>

<http://www.bce.unb.br/elaboracao-de-fichas-catalograficas-de-teses-e-dissertacoes>

Esta página não deve ser incluída na versão final do texto.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer muitíssimo à minha família, Eidy e Célia. Não há como expor em palavras o quanto vocês me ajudaram e ajudam durante toda a minha jornada, em todos os aspectos. Obrigada pelo apoio e atenção incondicional. À vocês tenho admiração e gratidão imensuráveis.

Ao Jonathan por todo o companheirismo e carinho, por me escutar e me dar forças sempre que preciso. Obrigada por proporcionar momentos de descanso e descontração, além de sempre me motivar a fazer planos e lutar pelo que quero.

Ao Dr. Werner Treptow, meu orientador, por todo suporte, paciência, orientação e tempo. Por sempre me receber bem, ainda que fosse por dúvidas bobas ou grandes questionamentos. Sua ajuda, orientação e disposição foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Aprendi e tenho muito ainda o que aprender contigo. Devo grande parte do que sei hoje a esse grande profissional. Muito obrigada!

Agradeço ao pessoal do LBTC (Laboratório de Biologia Teórica e Computacional) Caio, Letícia, Vinícius, Camila, Alessandra e Mônica, além do Danilo, do Leonardo e do Matheus, por todas as conversas, paciência e momentos de descontração. Por dividirem comigo todos os anseios da pesquisa. Obrigada por estarem dispostos a ajudar em tudo.

A todos da biofísica por proporcionarem uma ótima convivência. A todos também do programa de pós-graduação, por sempre atenderem e estarem dispostos a dar auxílio necessário.

Aos membros da banca por cederem tempo para leitura do trabalho e pela disposição para contribuir com trabalho.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Anestésicos gerais são diariamente utilizados em uma miríade de procedimentos cirúrgicos. Todavia o intrincado mecanismo molecular de ação desses compostos ainda é desconhecido. A hipótese mais creditada sugere uma ação de anestésicos em diferentes canais iônicos de tecidos neurais por interação em múltiplos sítios de ligação nessas proteínas de membrana. Estudos *in vitro* recentes mostram alteração na condução dos canais de potássio dependentes de voltagem pela ligação de anestésicos halogenados em múltiplas cavidades com distintas afinidades em diferentes conformações. Entre esses canais está o canal iônico dependente de voltagem de mamífero Kv1.2. Foi demonstrado que uma mutação pontual G329T nesse canal iônico confere maior sensibilidade ao anestésico geral sevoflurano. Nesse contexto, a investigação da interação envolve não somente a descoberta de regiões putativas de ligação, como também de que forma essa interação poderia alterar o equilíbrio entre as diferentes conformações do canal iônico. Contudo, a ligação do anestésico pode ser uma condição necessária, mas não suficiente para ter efeito modulatório. Sabe-se que o sevoflurano, um anestésico inalável, potencializa o canal Kv1.2, deslocando a curva de condutância-voltagem para voltagens mais negativas e aumentando a condutância máxima. Para tanto, foram realizadas simulações de dinâmica molecular do canal Kv1.2 selvagem e do canal Kv1.2 G329T em bicamada lipídica com solvente explícito, a fim de amostrar as flutuações estruturais das conformações aberta e fechada desta proteína. Uma ligeira diminuição da flutuação da cadeia do canal mutante foi conferida por análise de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) e RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) ao longo das trajetórias. Dessas simulações, foram escolhidos ao acaso 120 *frames* de cada simulação para a realização de *docking* molecular por meio do *AutoDock Vina*, assim obtidos aproximadamente 2400 modos de interação. Após o agrupamento e análise das soluções, foram eleitos os centros das nuvens de soluções de quatro potenciais sítios distintos para estruturar o complexo anestésico-canal e, então, avaliar a afinidade do ligante sítio-específica por cálculos de energia livre baseados em simulações de dinâmica molecular. Pela utilização do método LIE (*Linear Interaction Energy*), percebeu-se grande afinidade pelo sítio próximo ao filtro de seletividade, de tal forma que este pode estar favorecendo a estabilização da conformação condutiva, logo aumentando a condutância

do canal. Pela mutação estar associada com um aumento da constante de equilíbrio para um estado pré-aberto, é proposto que um conjunto de sítios podem estar desestabilizando esse estado. Como resposta ao resultado obtido e pelo desafio em conciliar os resultados microscópicos com o efeito na relação condutância-voltagem por anestésico, é apresentado um esquema teórico para avaliar múltiplos estados de ligação. Aqui, é exposta uma perspectiva inicial para uso do modelo teórico apresentado. Ao considerar, por indisponibilidade da definição precisa das outras conformações, apenas as conformações aberta e fechada do canal, além das afinidades obtidas para múltiplos sítios, foi possível calcular as densidades de probabilidades para os estados ligados e, dessa forma, encontrar um deslocamento da curva condutância-voltagem com a mesma tendência ao experimental. Os presentes dados revelam importantes regiões de interação anestésico/proteína e permite a proposição de formas de análise do intrincado mecanismo de modulação por ligantes, favorecendo assim futuros estudos experimentais dos mecanismos de ação na anestesia.

Palavras-chave: Anestésicos Gerais, Sevoflurano, Canal Iônico, Kv1.2, Dinâmica Molecular, Energia Livre de Ligação, *Docking* Molecular

Abstract

General anesthetics are daily used in a myriad of surgical procedures worldwide. Nevertheless their molecular mechanism of action remains elusive. An accredited hypothesis suggests that anesthetics modulate distinct ion channels in neural tissue by interacting in multiple binding sites in these membrane proteins. New *in vitro* studies show that halogenated anesthetics modifies the conductance/voltage relation of voltage gated potassium channels by binding to multiple cavities with different affinities in a conformation-dependent fashion. Within this context, the present investigation is focused not only on searching the putative binding sites, but also on discovering the manner by which the binding could modify the conformation energy landscape, since the binding of the anesthetic can be a necessary but not sufficient condition to have a modulatory effect. The mammal Kv1.2 channel stands as a potential target of inhalation anesthetics. Sevoflurane, a halogenated anesthetic, potentiates this channel, shifting the conductance/voltage relation leftward and increasing the maximum conductance. Recently, the G329 point mutation in this channel has been associated with an augmentation of the sensitivity to the general anesthetic sevoflurane. To explore this issue, molecular dynamics simulations of the Kv1.2 wild type and Kv1.2 G329T inserted in a phospholipidic membrane with explicit water treatment were performed. The sampling was performed to both open and closed conformations. A slightly reduction of fluctuation near the linker S4-S5 was noticed on the mutant by analysis of RMSF through the simulated trajectory. From these simulations, 120 frames were selected from each construction for running docking calculation. These approach was used in order to account for molecular flexibility of the protein. From the molecular docking applying AutoDock Vina, nearly 2400 binding modes were obtained. After clustering and analysis of solutions, four putative independent binding cavities were selected to construct the anesthetic/channel complex and then ligand site-specific affinities were estimated by free energy calculations based on molecular dynamics simulations. By employing the LIE (Linear Interaction Energy) method, a relative strong affinity by the site near the selectivity filter was noted. The interaction with this site could favor the stabilization of the conductive state, hence increasing the conductance of the channel. Since the G329T mutation is associated with an increased equilibrium constant of the

pre-open state, it is proposed that a group of sites could destabilize this state. As an answer to the issue of conciliating the obtained binding affinities with the anesthetic effect on the conductance/voltage relation, it is presented here a theoretic model to evaluate multiple binding states. In an initial attempt to analyze the accuracy of the prediction by the model, considering only the conductive open and closed conformations, since the unavailability of a detailed structure of the other relevant states, besides the calculated binding affinities, it was possible to compute probability densities for the bound states, thus estimating a leftward shift on the conductance-voltage curve. The present data reveals putative anesthetic binding regions and potential binding free energies and allows proposition of a approach to rationalize the complex mechanism of modulation by multiple binding sites with multiple occupancies.

Keywords: General Anesthesia, Sevoflurane, Ion Channel, Kv1.2, Molecular Dynamics, Binding Affinity, Binding Free Energy, Molecular Docking

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Gradiente Iônico e Potenciais Elétricos	1
1.1.1	Potencial de Repouso	2
1.1.2	Potencial de Ação	3
1.2	Canais Iônicos	5
1.3	Anestésicos	11
1.3.1	Sevoflurano	13
1.3.2	Modulação do Canal de Potássio Dependente de Voltagem Kv1.2 por Sevoflurano	14
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Etapas	21
3	Metodologia	23
3.1	Simulações de Dinâmica Molecular	23
3.1.1	Energia Potencial e Campos de Força	24
3.1.2	Condições Periódicas de Contorno	26
3.1.3	Tratamento das Interações	26
3.1.4	Equações de Movimento	27
3.1.5	Simulações à Temperatura e Pressão Constantes	28
3.1.6	RMSD e RMSF no tempo	29
3.2	Docking Molecular	30
3.2.1	Clusterização das Soluções	33
3.3	Estimativa de Afinidade de Ligação	33
3.3.1	Linear Interaction Energy (LIE)	34
3.3.2	Free Energy Perturbation (FEP)	36
3.4	Protocolos Utilizados	37
3.4.1	Protocolo das Simulações de Dinâmica Molecular	37

3.4.2	Protocolo de Docking	41
3.4.3	Protocolo das Simulações de Cálculo de Energia Livre	41
4	Resultados	42
4.1	Comparação estrutural entre Kv1.2 Selvagem e Kv1.2 G329T	42
4.1.1	<i>Root Mean Square Deviation (RMSD)</i>	42
4.1.2	<i>Root Mean Square Fluctuation (RMSF)</i>	45
4.2	Sítios Putativos de Ligação de Sevoflurano no canal Kv1.2	46
4.3	Comparação com Resultados de Afinidade do Isoflurano ao Canal NaChBac	53
4.4	Energias Livres de Ligação do Anestésico Geral Sevoflurano com o Canal de Potássio Dependente de Voltagem	58
5	Interação Molecular entre Ligantes e Proteínas de Membrana	66
5.1	Teoria e Métodos	67
5.1.1	Sistema Molecular	67
5.1.2	Constante de Ligação	67
5.1.3	Densidade de Probabilidade do Estado Ligado	70
5.1.4	Cálculos de Constante de Ligação no Contexto da Dinâmica Molecular	71
5.1.5	Detalhes Computacionais dos Cálculos de PMF	72
5.1.6	Constante de Ligação para Sítios Independentes	74
5.1.7	Energia Livre de Ligação	74
5.1.8	Densidade de Probabilidade Dependentes da Posição	75
5.2	Impacto no Equilíbrio das Conformações por Interação com Ligante	78
5.2.1	Efeito de Múltiplos Sítios no <i>Gating</i> do canal Kv1.2 Selvagem	82
6	Conclusão	87
7	Perspectivas e Trabalhos em Andamento	89
7.1	Estados Conformacionais de Canais de Potássio Dependentes de Voltagem	89
7.2	Modos de Interação de Anestésicos Gerais e suas Afinidades	90
	Referências	92
	Anexo	100
I	Artigo Científico Publicado Durante o Mestrado	101
II	Arquivo de Configuração para Dinâmica Molecular	122

Lista de Figuras

- 1.1 Representação da modificação da diferença de potencial da membrana durante o potencial de ação. Nesse processo, há entrada de íons Na^+ , por abertura de canais de sódio. Assim, ocorre a despolarização, de modo que o meio intracelular é mais positivamente carregado em relação ao meio extracelular. Em seguida, canais de potássio se abrem, enquanto os de sódio se fecham, há então saída de íons K^+ durante a repolarização. O potencial transmembrânico é reestabelecido para valores negativos. 5
- 1.2 Ilustração da região do poro do canal de potássio dependente de voltagem Kv1.2. À esquerda visão superior da proteína de membrana e à direita a visão lateral desta. A coloração indica os tipos de resíduos, de modo que verde corresponde aos resíduos polares, azul os polares carregados positivamente, vermelho os polares carregados negativamente e branco os apolares. Nota-se a região de inserção na membrana na parte no meio da proteína, identificada pelo grande número de resíduos apolares nas hélices. 6
- 1.3 Esquema da estrutura de uma subunidade do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2. Topologia com os 6 segmentos transmembrânicos. As primeiras quatro hélices (S1-S4) formam o domínio sensor de voltagem (VSD, do inglês *voltage sensor domain*), com ênfase para a hélice S4 na qual estão os diversos resíduos positivamente carregados, enquanto os dois últimos segmentos (S5 e S6) constituem o domínio do poro. Nesse domínio, pode-se ainda destacar o filtro de seletividade (SF, do inglês *selectivity filter*), importante estrutura para distinção entre os íons que podem ser conduzidos pelo canal, flanqueado por uma hélice, denominada hélice P. Entre os domínios, há uma hélice, o *linker* S4-S5 que permite o acoplamento entre os mesmos. 8

1.4	Detalhe da forma de inserção do domínio transmembrânico do canal iônico Kv1.2 na membrana (sombreado alaranjado). Para simplificar a visualização, estão apenas representadas duas subunidades do canal. Em destaque está o filtro de seletividade ocupado por dois íons, intercalados por moléculas de água.	9
1.5	Representação esquemática de conformações de canais de potássio. Estão ilustrados os estados fechado, não condutor ou inativo, pré-aberto e aberto. O estado fechado é aquele com o domínio sensor de voltagem (VSD) inativo e poro fechado, enquanto o estado pré-aberto é aquele com VSD ativo, no entanto poro fechado. A conformação aberto é a única entre as destacadas que permite propriamente a permeação iônica. O estado inativo, não condutor, especialmente os relacionados com a inativação tipo C, está associado ao bloqueio da passagem no filtro de seletividade, por restrição ou alteração da geometria das carbonilas que constituem o filtro de seletividade (SF).	10
1.6	Ilustração do canal de potássio dependente de voltagem Kv1.2 em suas duas conformações bem definidas e estudadas, a aberta e a fechada. Para facilitar a visualização, são representadas apenas duas subunidades frontais, em laranja e em vermelho. Em azul está o volume acessível à água e aos íons. Com detalhes estão representados resíduos importantes do domínio sensor de voltagem (VSD), especificamente em vermelho aqueles com negativo e em azul aqueles carregados positivamente.	10
1.7	Modelos esquemáticos da estrutura molecular de alguns anestésicos gerais, sendo eles o 1-butanol, sevoflurano, isoflurano e propofol. Em branco estão representados os átomos de hidrogênio, em ciano os de carbono, em vermelho os de oxigênio, em rosa os de flúor e, por fim, em verde os átomos de cloro.	12
1.8	(A) Condutância normalizada do canal iônico Kv1.2 em função da voltagem, na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 1mM de sevoflurano (N=6). O ajuste dos dados experimentais foi realizado de acordo com a função de Boltzmann. A normalização é feita de acordo com o valor da condutância máxima, G_{max} , antes da exposição ao anestésico. (B) Razão entre as condutâncias na ausência e na presença de sevoflurano de acordo com a voltagem. O resultado apresentado é dado pela razão entre o valor de condutância encontrado antes, G_0 , e logo em seguida da exposição ao sevoflurano, G_{Sevo} . (Adaptado de [61]).	15

1.9	Curva dose-resposta para a ação de vários anestésicos gerais no canal Kv1.2 selvagem. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill para os resultados da modulação por sevoflurano e n-butanol, visto que foram os casos com ajustes confiáveis dado a magnitude das diferenças apresentadas entre as conformações testadas. (Adaptado de [61]).	16
1.10	Relação dose-resposta para a ação de vários anestésicos gerais no canal Kv1.2 FRAKT. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill (propofol e n-butanol) e para a equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). Em virtude dos resultados muito pequenos para a modulação por clorofórmio, não foi possível obter o ajuste para esse conjunto de dados. (Adaptado de [61])	17
1.11	Relação dose-resposta para a ação do sevoflurano no canal Kv1.2 selvagem e no Kv1.2 com mutações pontuais. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill dupla. (Adaptado de [61]).	17
1.12	Condutância dos canais Kv1.2 FRAKT (vermelho) e Kv1.2 G329T (azul) em função da voltagem, em duas condições distintas, na ausência de sevoflurano (controle) e na presença de $1mM$ desse anestésico geral (Adaptado de [61]).	18
1.13	Ilustração do canal de potássio KShaw-2. À esquerda visão superior do canal tetramérico. À direita visão lateral da mesma proteína de membrana. É possível identificar o contorno da região da membrana, de tal forma que as cabeças polares dos lipídios estão ressaltados em vermelho. Em destaque, na região intracelular abaixo da membrana, está o domínio citoplasmático, denominado domínio T1.	19
1.14	(A) Condutância dos canais KShaw-2 FRAKT (vermelho) e Kv1.2 G329T (azul) em função da voltagem, em duas condições distintas, na ausência de sevoflurano (controle) e na presença de $1mM$ desse anestésico geral. (B) Razão entre as condutâncias, $(\frac{G_{Sevo}}{G_0})$, pela voltagem para o K-Shaw2 (preto) e o KShaw-2 T330G (vermelho) (Adaptado de [61]).	19

1.15	(A) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico Kv1.2 sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill de acordo com os dados para o n-butanol. (B) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico Kv1.2 FRAKT sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill (propofol e n-butanol) ou pela equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). (C) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico KShaw-2 com e sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill dupla. (Adaptado de [61]).	20
2.1	Etapas realizadas para busca do objetivo principal do trabalho. Em balões estão as estruturas atomísticas utilizadas no trabalho. Nos quadrados pretos estão os principais <i>softwares</i> usados durante a etapa proposta. . . .	22
3.1	Representação do posicionamento de uma molécula se sevoflurano em relação ao canal iônico Kv1.2. Os ângulos de Euler, Θ , Φ e Ψ , indicam a configuração relativa do ligante, enquanto θ e ϕ caracterizam a forma de ataque ao canal iônico, calculados de acordo com três pontos no ligante e três pontos no receptor	36
3.2	Representação da montagem de um sistema típico aqui simulado. O canal iônico dependente de voltagem é inserido em uma membrana de fosfatidilcolina (, em cinza) e hidratado, sendo a água tratada explicitamente pelo modelo TIP3. Na solução há uma concentração de 150mM de KCl, sendo os íons K^+ e Cl^- representados por esferas amarelas e azuis, repectivamente.	39
4.1	Resíduos que compõe o canal iônico Kv1.2, com indicações de regiões importantes. As hélices compreendem os resíduos abaixo dos esquemas indicados. Em rosa está destacado a glicina 329, a qual ao ser mutada para treonina confere maior sensibilidade a sevoflurano.	43
4.2	Valores de RMSD ao longo do tempo em trajetórias de dinâmica molecular para o canal Kv1.2 selvagem e mutante G329T, nas conformações aberta e fechada. Em preto está o RMSD dos átomos pesados de toda a proteína de membrana, em vermelho apenas da cadeia principal, em azul da região do poro e em lilás da região do <i>linker</i> entre o segmento S4 e S5. Cada valor corresponde à média do RMSD calculado para cada uma das subunidades do canal iônico, enquanto as barras de erro são referentes ao desvio padrão entre as subunidades.	44

4.3	Valores de RMSF para cada resíduo em trajetórias de dinâmica molecular para o canal Kv1.2 selvagem, em preto, e mutado, em vermelho, nas conformações aberta e fechada. Marcações em azul indicam os resíduos componentes das principais hélices do sistema e a seta em lilás aponta para o resíduo 329, alvo de uma mutação pontual de glicina para treonina. . . .	46
4.4	(A) Visão lateral do canal iônico Kv1.2, na qual os <i>blobs</i> coloridos representam as nuvens de soluções encontradas por <i>docking</i> molecular em que o número indica o sítio correspondente. As cores representam as quatro regiões com maior número de soluções, sendo elas o sensor de voltagem (preto), o <i>linker</i> S4-S5 (azul claro), o filtro de seletividade (lilás) e a cavidade central (ocre). (B) Visão aproximada na região do filtro de seletividade e extracelular.	47
4.5	Em barras pretas está o número de soluções de <i>docking</i> molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por <i>docking</i> do sevoflurano contra o canal iônico selvagem na conformação aberta. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.	49
4.6	Em barras pretas está o número de soluções de <i>docking</i> molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por <i>docking</i> do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação fechada. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.	50
4.7	Em barras pretas está o número de soluções de <i>docking</i> molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por <i>docking</i> do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 G329T na conformação aberta. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.	51
4.8	Em barras pretas está o número de soluções de <i>docking</i> molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por <i>docking</i> do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 G329T na conformação fechada. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.	52
4.9	(A) Regiões com maior ocupância de isoflurano ao longo de uma simulação de <i>flooding</i> . Em lilás está o sítio extracelular, em vermelho o sítio das janelas do canal iônico, em preto o sítio do poro e, por fim, em amarelo os sítios do <i>linker</i> . (B) Sítios de ligação encontrados por cálculos de <i>docking</i> molecular no canal NaChBac na conformação fechada. O código de cores é o mesmo utilizado em A.	55

4.10	Potenciais de interação de van der Waals (preto) e eletrostática (vermelho) pelo tempo para cada molécula de isoflurano (1, 2, 3 e 4). É discriminado o sítio, extracelular ou <i>linker</i> S4-S5, do NaChBac no qual o ligante se encontrava.	56
4.11	Potenciais de interação de van der Waals (preto) e eletrostática (vermelho) pelo tempo para as duas réplicas de sevoflurano (1 e 2) em cada sítio escolhido (3, 5, 9 e 12), dos canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T, nas conformações aberta e fechada.	60
4.12	(A) Representação de 4 regiões de ligação de sevoflurano distintos no Kv1.2, designados como sítio 3 (azul claro), 5 (azul), 9 (preto) e 12 (roxo). Cada par de subunidades é representado em laranja e verde. Mutação G329T é destacada em amarelo (B) Visão aproximada dos sítios de ligação e da mutação. (C) Constantes de ligação resolvidos pelo LIE de acordo com o canal e a conformação para cada sítio <i>i</i> . (*) Mutação G329T. O e C são as conformações aberta e fechada respectivamente. (Adaptado de [61]).	61
4.13	Sevoflurano no sítio do filtro de seletividade do canal iônico Kv1.2. (A) Visão aproximada, com ênfase no caminho de permeação dos íons e no anestésico ocupando a cavidade atrás do filtro de seletividade. (B) Visão superior do canal iônico. (C) Vista lateral do canal de potássio complexado com uma molécula de anestésico.	64
4.14	Visualização de dois canais iônicos, o Kv1.2 G329T e o NaChBac, em diferentes conformações, fechada e aberta para o canal Kv1.2 e fechada, pré-aberta e aberta para o canal NaChBac. No Kv1.2 a conformação pré-aberta do canal não é conhecida em detalhes. Os <i>blobs</i> indicam densidades de soluções de anestésicos gerais. Para o Kv1.2 G329T, são indicadas três regiões principais por <i>docking</i> molecular [61], em vermelho a densidade da região extracelular próxima ao filtro de seletividade, em marrom as soluções do sítio na interface das hélices S4-S5 entre as diferentes subunidades e em amarelo aquelas do sítio do <i>linker</i> entre as hélices S4-S5. Para o NaChBac, as soluções encontradas são resultados de análise de clusterização de simulação de <i>flooding</i> de sevoflurano que apresenta quatro sítios de ligação principais, em vermelho o sítio extracelular, em amarelo o sítio do <i>linker</i> , em laranja o sítio do <i>gate</i> de ativação, em verde o sítio na cavidade central e, por fim, em lilás o sítio das janelas [9].	65
5.1	Probabilidades de diferentes estados ligados do complexo Kv1.2/Sevoflurano, na conformação aberta, de acordo com o número de anestésicos ancorados.	84

5.2	Probabilidades de diferentes estados ligados do complexo Kv1.2/Sevoflurano, na conformação fechada, de acordo com o número de anestésicos ancorados.	84
5.3	Relação entre condutância e voltagem para o canal iônico Kv1.2 selvagem na presença e na ausência de sevoflurano. As curvas vermelha e verde são resultado de dados de eletrofisiologia [61], já a curva azul é o resultado de cálculo do canal com interação com moléculas de sevoflurano. Valores de $V_{1/2}$ e <i>gating charge</i> para a curva calculada são dados pelos parâmetros encontrados experimentalmente do canal na ausência de anestésico.. . . .	85
5.4	À esquerda, canal iônico selvagem, nas conformações aberta e fechada, em destaque as ocupâncias obtidas pelas soluções gerados pelo <i>docking</i> . Em azul estão as soluções dos sítios do <i>linker</i> S4-S5, em preto os sítios de interface entre subunidades em S5-S6 e em lilás a cavidade atrás do filtro de seletividade. À direita, perfil de densidades no eixo Z de acordo com as ocupâncias encontradas por <i>docking</i> molecular e afinidades dadas pelo método LIE.	86
7.1	Detalhes de uma molécula de sevoflurano no sítio do filtro de seletividade de uma subunidade do canal iônico Kv1.2. É possível perceber a cavidade correspondente a esse sítio em outra subunidade sendo ocupada por duas moléculas de água. Íons ocupam as posições S0-S2-S4 do filtro de seletividade.	90
7.2	Medidas de caracterização da ligação do anestésico geral sevoflurano no sítio atrás do filtro de seletividade do canal . Em azul estão medidas de distância dentre os $C\alpha$ da glicina do filtro de seletividade ($C\alpha_1$), a posição de um dos íons no caminho de permeação do canal em relação ao centro de massa das glicinas do $C\alpha_1$, número de ligações de hidrogênio com o grupo carbonil dos resíduos do $C\alpha_1$, glicina e carbonila, e rotação do grupo carbonil desses mesmos aminoácido. Em preto estão a distância da molécula de sevoflurano em relação ao centro do sítio de ligação, número de moléculas de água na cavidade atrás do $C\alpha_1$, ângulos de Euler Φ , Ψ e Θ do sevoflurano e o θ do sevoflurano ligado em relação à sua otimização estrutural no gás.	91

Lista de Tabelas

3.1	Informações gerais sobre a construção dos sistemas e estruturas dos receptores simulados por dinâmica molecular	40
4.1	Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação aberta para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de <i>docking</i> molecular.	49
4.2	Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação fechada para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de <i>docking</i> molecular	50
4.3	Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 G329T na conformação aberta para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de <i>docking</i> molecular	51
4.4	Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 G329T na conformação fechada para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de <i>docking</i> molecular	53
4.5	Energia livre de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$ calculada pelo método de <i>FEP</i> , juntamente com a constante de ligação de uma molécula de isoflurano com um sítio definido no canal iônico NaChBac [81].	54
4.6	Energia livre de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$ calculada pelo método de <i>docking</i> , juntamente com a constante de ligação de isoflurano com um sítio definido no canal iônico NaChBac	54

- 4.7 Valores calculados das médias dos potenciais de interação do isoflurano com o canal iônico NaChBac, $\langle V^{vdW} \rangle$ e $\langle V^{elet} \rangle$, juntamente com valores calculados de liberdade rotacional, ΔV , e translacional $\Delta\omega$. São também apresentadas as energias livres de ligação, $\Delta G_{ligação}$, e absoluta, $\Delta G_{ligação}^0$, obtidas pelo método LIE. Para estas estimativas, foram utilizados os potenciais do isoflurano no ambiente de referência, uma solução aquosa, na qual o valor do potencial de van der Waals equivale a $\langle V^{vdW} \rangle = -11,60 \pm 1,43 kcal/mol$ e o potencial eletrostático $\langle V^{elet} \rangle = -6,10 \pm 2,30 kcal/mol$. Os valores empíricos adotados foram $\alpha = 0,18$, $\beta = 0,34$ e $\gamma = -6,90 kcal/mol$ 57
- 4.8 Valores calculados das médias dos potenciais de interação do sevoflurano com os canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T nas conformações (Conf.) aberta (A) e fechada (F), $\langle V^{vdW} \rangle$ e $\langle V^{elet} \rangle$, juntamente com valores calculados de liberdade rotacional, ΔV , e translacional $\Delta\omega$. São também apresentadas as energias livres de ligação, $\Delta G_{ligação}$, e absoluta, $\Delta G_{ligação}^0$, obtidas pelo método LIE. Para esses cálculos, foram utilizados os potenciais do sevoflurano no ambiente de referência, uma solução aquosa, na qual o valor do potencial de van der Waals equivale a $\langle V^{vdW} \rangle = -11,39 \pm 1,49 kcal/mol$ e o potencial eletrostático $\langle V^{elet} \rangle = -8,53 \pm 2,72 kcal/mol$. Os valores empíricos adotados foram $\alpha = 0,18$, $\beta = 0,34$ e $\gamma = -6,90 kcal/mol$ 62

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AMBER** Assisted Model Building with Energy Refinement. 24
- ATP** adenosina trifosfato. 1
- Cav** canal iônico dependente de voltagem seletivo a cálcio. 5
- CHARMM** Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics. 24, 37
- FEP** Perturbação de Energia Livre, do inglês *Free Energy Perturbation*. 33, 37, 41, 53–55, 72, 90
- GROMOS** Groningen Molecular Simulation computer program package. 24
- HCN** canal iônico dependente de voltagem não seletivo. 5
- K-Shaw2** canal de potássio dependente de voltagem de *Drosophila*. 13–18, 37, 45, 58, 63
- K2P** canal iônico seletivo a potássio, *two pore domain potassium channel*. 13, 66
- Kv** canal iônico dependente de voltagem seletivo a potássio. 5
- Kv1.2** canal de potássio dependente de voltagem, subfamília A, membro 2. 7, 14–16, 18, 20, 21, 23, 37, 42–50, 52, 58, 59, 61, 63, 83, 86, 89, 91
- LIE** Energia de Interação Linear, do inglês *Linear Interaction Energy*. 33–35, 37, 52–54, 56, 58
- NaChBac** canal de sódio dependente de voltagem de *B. halodurans*. 13, 38, 53, 56, 58, 59
- NAMD** Nanoscale Molecular Dynamics program. 37
- Nav** canal iônico dependente de voltagem seletivo a sódio. 5

NPT *ensemble* com número de partículas, pressão e temperatura constantes. 28, 37

NVE *ensemble* com número de partículas, volume e energia constantes. 28

NVT *ensemble* com número de partículas, volume e temperatura constantes. 28

PBC condições periódicas de contorno, do inglês *periodic boundary conditions*. 26

PME Particle Mesh Ewald. 27, 37

PMF Potencial de Força Média, do inglês *Potential of Mean Force*. 71, 72, 74

POPC palmitoil-fosfatidilcolina. 38, 39

RMSD *Root Mean Square Deviation*. 30, 43, 44, 91

RMSF *Root Mean Square Fluctuation*. 30, 45

SF filtro de seletividade, do inglês *selectivity filter*. 6, 91

TIP3 transferable intermolecular potential 3. 37

TREK *TWIK-Related K⁺ channel*. 13

UnB Universidade de Brasília. 38

vdW *van der Waals*. 55

VMD *Visual Molecular Dynamics*. 38

VSD domínio sensível a voltagem, do inglês *voltage sensor domain*. 6, 38, 43, 47–49, 58

Capítulo 1

Introdução

Processos fisiológicos complexos, como contração muscular, batimentos cardíacos e transmissão de impulsos nervosos, dependem de fenômenos biológicos elétricos. Esses eventos se baseiam na excitabilidade celular e mudança de voltagem pela membrana para sinalização neuronal e secreção celular, por exemplo. Por conseguinte, em escala atômico/molecular, os canais iônicos apresentam papel central nas características elétricas celulares, visto que agem de maneira concertada na mediação da passagem de íons pela membrana.[46, 69, 21]

1.1 Gradiente Iônico e Potenciais Elétricos

As membranas são componentes essenciais, tanto em células procariotas quanto eucariotas. Tais membranas separam fisicamente o meio intracelular do meio extracelular, de tal forma que constituem uma barreira semipermeável. A sua seletividade é baseada nas propriedades químicas ou físicas dos compostos. Por sua natureza hidrofóbica, impede a difusão de macromoléculas, íons e outros pequenos compostos carregados ou polares, como aminoácidos, ATP, e glicose, não obstante permite a livre travessia de gases e pequenas moléculas apolares, como etanol e gás oxigênio. Assim, ocorre a movimentação livre de moléculas apolares na membrana, como hormônios esteróides, tanto influxo quanto efluxo, de modo que o movimento total resultante depende do gradiente de concentração, sem a necessidade de uma molécula intermediária para possibilitar a passagem. Já a difusão simples de solutos hidrofílicos é um processo endergônico, visto a remoção de sua camada de hidratação. Então, essa separação permite a formação de gradientes químicos e elétricos pela bicamada fosfolipídica, no entanto, como é necessária a passagem de moléculas e íons essenciais para a manutenção da célula e de seu potencial de repouso, podem ser encontradas diversas proteínas de membrana reguladoras do fluxo desses compostos. [60]

Nesse sentido, canais iônicos controlam a passagem seletiva de íons como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- de acordo com seu gradiente. Contudo, também podem ser encontradas

bombas que promovem o transporte dos solutos contra o gradiente eletroquímico. Essas estruturas proteicas são importantes para a manutenção do potencial de membrana, ou potencial de repouso. [60, 73]

1.1.1 Potencial de Repouso

A bicamada lipídica possui a característica notável de constituir um dielétrico entre os meios, de forma que impede a passagem de cargas através de sua estrutura quando há voltagem em sua região, colaborando para a formação de um gradiente elétrico. Então, ocorre a formação de um potencial em suas proximidades. Os íons, portanto, sofrem a ação de duas forças distintas, uma pelo potencial químico, dada diferença de concentração, e outra pela diferença de carga líquida entre os dois meios. Quando o gradiente químico e elétrico se igualam em magnitude, é dito que há equilíbrio eletroquímico dessa espécie iônica. Assim a passagem seletiva de íons pela membrana por meio da abertura e fechamento de canais específicos possibilita a formação do potencial de membrana.

Como o potássio é o íon de contribuição dominante para o potencial de membrana na maior parte das células, pode-se focar em sua dinâmica a fim de facilitar o entendimento do mecanismo por trás do potencial de repouso. Ao considerar uma alta concentração de potássio no meio intracelular e uma concentração menor no meio extracelular, juntamente com íons cloro, de tal forma que em ambos os meios não há diferença de voltagem, há um gradiente químico de potássio favorecendo seu fluxo para o meio extracelular. Assume-se também que nesta membrana só existem canais seletivos a potássio. Por conseguinte, os íons de potássio passam para o meio externo, contribuindo para um aumento de cargas positivas extracelulares. Assim essa separação de cargas gera um gradiente elétrico, ou seja, um campo elétrico. Esse movimento cessa quando o gradiente químico do potássio se iguala a seu gradiente elétrico. O meio intracelular, então, possui um caráter negativo em relação ao meio extracelular no equilíbrio eletroquímico do potássio.

A alta concentração de potássio é estabelecida principalmente pelas bombas de sódio-potássio. São removidos, assim, dois íons potássio do meio extracelular para o intracelular e transportados três íons sódio do meio intracelular para o meio extracelular em cada ciclo de atividade dessa proteína de membrana, de modo que o meio intracelular é decrescido de uma carga positiva. Os canais de potássio denominados *leak channels* estão constitutivamente abertos e são diretamente relacionados ao potencial de repouso por aumento da permeabilidade da membrana para esse íon específico.

O potencial de equilíbrio (V_{eq}) do potássio para um neurônio típico é de aproximadamente $-90mV$, ou seja, nessa voltagem os gradientes químico e elétrico se igualam em magnitude. Cada íon possui seu potencial de equilíbrio para o gradiente de concentração

determinado. Esse potencial de equilíbrio pode ser estimado pela Equação de Nernst,

$$V_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{extra}}{[X]_{intra}} \quad (1.1)$$

em que R é a constante dos gases, $8,314 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$, T é a temperatura do sistema em Kelvin, z é a valência do íon, F é a constante de Faraday, $96,486 C \cdot mol^{-1}$, enquanto $[X]_{extra}$ e $[X]_{intra}$ denotam as concentrações do íon em questão nos meio extracelular e intracelular respectivamente.

Geralmente o potencial de repouso das células é de aproximadamente $-70mV$, logo nenhum dos tipos iônicos estão em equilíbrio eletroquímico. Esse potencial de repouso é dado pela contribuição conjunta de diferentes íons quando há mais de um tipo de canal seletivo aberto. Nessa situação, a influência de cada tipo iônico não é determinada apenas por suas concentrações relativas, como também pela permeabilidade desses íons, assim relacionada à abertura dos seus respectivos canais. O potencial de repouso para múltiplos íons pode ser calculado pela equação de Goldman baseado nas concentrações e permeabilidades dos cátions e ânions relevantes para o sistema

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_{Cat} P_{Cat} \cdot [Cat]_{extra} + \sum_{An} P_{An} \cdot [An]_{intra}}{\sum_{Cat} P_{Cat} \cdot [Cat]_{intra} + \sum_{An} P_{An} \cdot [An]_{extra}} \right) \quad (1.2)$$

na qual p_{Cat} e p_{An} são as permeabilidades dos cátions e dos ânions respectivamente, assim como $[Cat]$ e $[An]$ se referem as concentrações dos cátions e dos ânions, nos meios extracelular ou intracelular de acordo com os subscritos *extra* e *intra*. A equação de Goldman permite não só a melhor compreensão do potencial de repouso de membrana, como também o potencial de ação. O potencial de repouso é muito importante para o funcionamento normal dos canais dependentes de voltagem, os quais no potencial de repouso estão preparados para o gatilho do potencial de ação. Além disso, o transporte ativo secundário está relacionado com o gradiente eletroquímico do potencial de membrana, por exemplo na absorção de glicose contra seu gradiente a partir da energia liberada pela movimentação de duas moléculas de sódio para dentro da célula.

1.1.2 Potencial de Ação

Como visto pela equação de Goldman, Equação 1.2, o potencial de membrana sofre grande influência da permeabilidade dos íons. Caso a permeabilidade do íon sódio seja aumentada e a do potássio diminuída, por exemplo, o potencial se aproxima do potencial de equilíbrio do sódio, consequentemente a região intracelular se torna mais positiva em relação à extracelular. Por abertura de canais de sódio, há influxo de íons sódio tanto em favor do gradiente elétrico quanto químico, essa alteração do potencial para valores po-

sitivos é denominado despolarização. Em contraste, quando a célula está despolarizada, o aumento de permeabilidade dos íons de potássio leva ao efluxo de potássio, essa perda de cargas positivas é denominada hiperpolarização. Pode-se dividir, para fins didáticos, as células em dois grupos, as não excitáveis e as excitáveis. As não excitáveis, após a modificação do potencial por aplicação de corrente, retornam diretamente para o valor de repouso ao término do estímulo, enquanto que em células excitáveis, caso o estímulo seja suficientemente grande, há uma resposta conspícua denominada potencial de ação. Entre as células excitáveis estão as musculares e neuronais. Em células excitáveis variações no potencial de membrana são utilizadas para passagem de sinais através da célula, assim há a transmissão de impulsos nervosos. A geração e passagem da sinalização elétrica ocorre por modulação da distribuição de cargas através da membrana, de forma que há uma grande despolarização da membrana, seguida por hiperpolarização até, por fim, o retorno ao potencial de repouso. [47, 24]

Pela técnica denominada *voltage clamp*, nos experimentos clássicos com axônios de lulas gigantes de Hodgkin e Huxley, foram percebidas variações nas condutâncias de sódio e potássio associadas com alterações do potencial de membrana por aplicação de estímulos elétricos, essas observações permitiram um grande avanço na área de eletrofisiologia. Foi notado que após disparo do potencial de ação há grande influxo de íons sódio na despolarização, seguido por efluxo de íons potássio. Nesse contexto, a hipótese corrente era da presença de canais que permitiam a passagem seletiva de íons e mais tarde seria estudada com mais detalhe e creditada por experimentos utilizando fármacos e uma nova metodologia denominada *patch clamp*. [84] Essa técnica criada por Erwin Neher e Bert Sakmann permite obter medidas elétricas em uma região muito pequena da membrana contendo um ou poucos canais iônicos, de forma que foi possível aferir um valor de fluxo de 10000 íons por segundo em apenas um canal iônico. Foi descoberto então que as proteínas de membrana envolvidas no potencial de ação respondiam às variações no potencial de membrana. No início da despolarização, quando a voltagem fica cada vez mais próxima à valores positivos e assim ultrapassa o limiar de excitação, os canais de sódio dependentes de voltagem abrem-se rapidamente, de tal forma a permitir uma grande entrada de sódio na célula. Nesse sentido, o potencial seria mantido próximo ao potencial do sódio, todavia ocorre inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem, assim como abertura dos canais de potássio dependentes de voltagem, logo não há manutenção da despolarização por tempo indeterminado. O potencial então é transitoriamente hiperpolarizado e enfim retorna para o potencial de repouso da membrana (Figura 1.1).

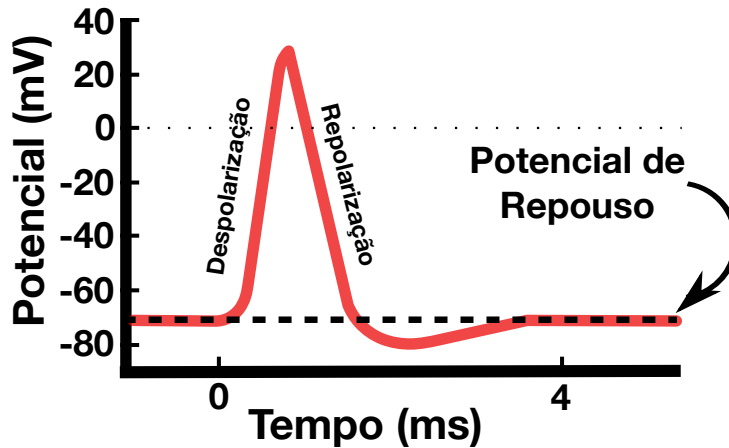


Figura 1.1: Representação da modificação da diferença de potencial da membrana durante o potencial de ação. Nesse processo, há entrada de íons Na^+ , por abertura de canais de sódio. Assim, ocorre a despolarização, de modo que o meio intracelular é mais positivamente carregado em relação ao meio extracelular. Em seguida, canais de potássio se abrem, enquanto os de sódio se fecham, há então saída de íons K^+ durante a repolarização. O potencial transmembrânico é reestabelecido para valores negativos.

1.2 Canais Iônicos

Os canais iônicos são proteínas integrais de membrana, distinguidas por sua seletividade e capacidade de abertura e fechamento de seu poro (Figura 1.2). Quando abertos, esses canais podem permitir a passagem de milhares de íons. As mudanças conformacionais, essenciais ao *gating*, podem ocorrer em resposta a alterações no potencial da membrana (voltagem), a um neurotransmissor, a uma molécula, à variação de temperatura, ao estiramento da membrana, ou às modificações pós-traducionais como fosforilações. [94, 64, 4]

Em especial, os canais iônicos dependentes de voltagem permitem o fluxo seletivo de íons, como o Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , através da membrana devido a mudanças do potencial elétrico transmembrânico. Essas proteínas são responsáveis pela geração e propagação de potenciais de ação em neurônios e podem ser encontrados em diferentes tecidos biológicos, desde tecido nervoso e muscular a tecido hematopoiético.[46] Assim sendo, estão associados a uma miríade de doenças como arritmias cardíacas, ataxias, miastenias congênitas, epilepsia, síndrome de Brugada, decorrentes de mutações nos genes de diversos canais iônicos.[59, 90]

Os canais catiônicos dependentes de voltagem podem ser subdivididos em quatro classes essencialmente: Nav (seletivos a Na^+), Cav (seletivos a Ca^{2+}), Kv (seletivos a K^+) e HCN (catiônicos não seletivos). Com o avanço das técnicas genômicas e biofísicas, melhor se conhece a estrutura dessas proteínas de membrana.[91] Diversos canais iônicos possuem estruturas resolvidas, portanto é possível estudar a nível atômico os mecanismos de fun-

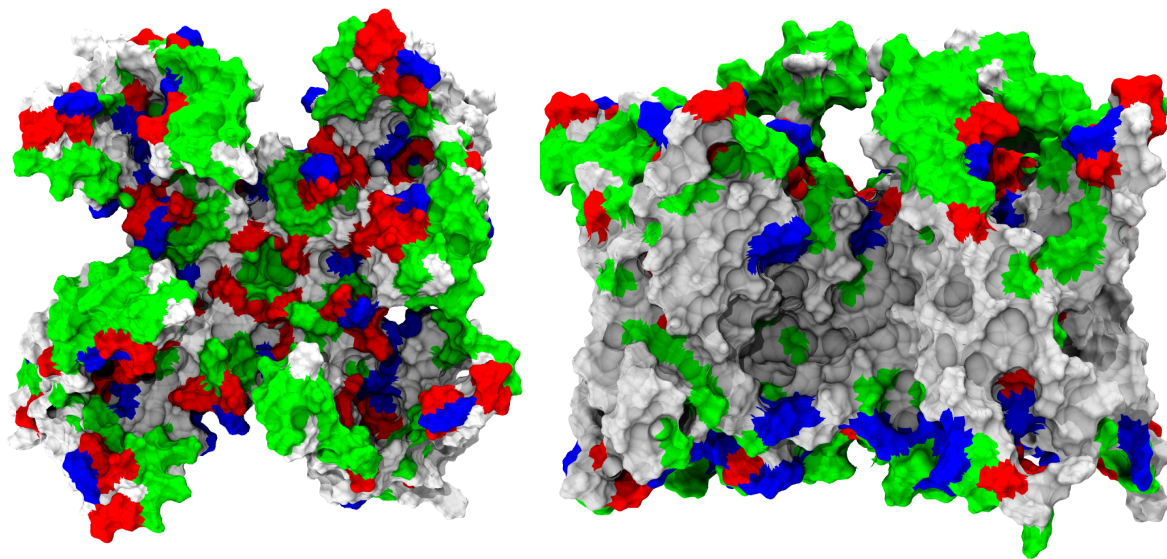


Figura 1.2: Ilustração da região do poro do canal de potássio dependente de voltagem Kv1.2. A coloração indica os tipos de resíduos, de modo que verde corresponde aos resíduos polares, azul os polares carregados positivamente, vermelho os polares carregados negativamente e branco os apolares. Nota-se a região de inserção na membrana na parte no meio da proteína, identificada pelo grande número de resíduos apolares nas hélices.

cionamento dessas proteínas. Quanto à estrutura, essas proteínas de membrana podem ser tetraméricas, ou seja, formadas por quatro subunidades, ou pseudo-tetraméricas, uma única proteína composta por quatro repetições. Cada subunidade pode ser dividida em 6 segmentos distintos, S1-S6, (Figura 1.3 e Figura 1.4). Os segmentos helicoidais S1-S4 são transmembrânicos e constituem um domínio modulador da abertura e fechamento do poro do canal em resposta a alterações no potencial de membrana, denominado domínio sensível a voltagem, do inglês *voltage sensor domain* (VSD).[19, 107] A hélice S4 contém o motivo sensor de voltagem.[18, 85, 91] As hélices S5 e S6 compõem o poro, denominadas então de domínio central do poro. Vale destacar o filtro de seletividade (SF, do inglês *selectivity filter*), o qual se encontra entre as hélices S5 e S6 e é responsável pela seleção dos íons que passam pelo canal.[29] Pela estrutura única do filtro são discriminados íons para passagem seletiva de apenas um tipo iônico, todavia essa mesma construção permite a passagem rápida da corrente por coordenação das carbonilas em geometria octaédrica de modo a mimetizar a camada de solvatação de seu tipo iônico correspondente. No entanto, diferentes canais podem possuir taxas distintas de permeação. Na região mais intracelular, abaixo do filtro de seletividade, a cavidade central é estruturada principalmente por diversos resíduos hidrofóbicos. O domínio citoplasmático, T1, é muito conservado na família dos Kvs. Esse domínio se encontra na região amino terminal da primeira hélice

transmembrânica.[91]

Em canais iônicos pode ocorrer um fluxo de 10^7 íons por segundo, de modo que aproximadamente dez canais de potássio constantemente abertos poderiam extinguir os íons de potássio em uma célula em um segundo. Portanto os canais iônicos podem sofrer processos auto-regulatórios, alterando a permeação de íons de acordo com modificações conformacionais.[46] Eles podem ser encontrados em três estados principais: repouso, inativado e ativado (Figura 1.5). Apenas no estado ativado o canal está em plena conformação de permeação do soluto. Os estados inativados e em repouso não conduzem íons, todavia podem apresentar eventos raros de baixa condutância.[91] Quando o poro está fechado e o canal encontra-se em repouso, há uma constrição e resíduos hidrofóbicos do *gate* hidrofóbico se aproximam, assim o caminho para a passagem do íon é desidratado, impedindo a permeação.

A condutância do canal iônico como apresentada em gráficos de condutância-voltagem em estudos por eletrofisiologia depende essencialmente de três fatores principais

$$G(V) = N \cdot P_o(V) \cdot \gamma \quad (1.3)$$

sendo eles o número de canais funcionais expressos na membrana N , a probabilidade de abertura dependente da voltagem aplicada $P_o(V)$ e a condutância unitária do canal iônico γ . A partir de uma certa voltagem a condutância atinge seu valor máximo e, assim, não há crescimento contínuo da condutância. O maior valor de condutância é denominado condutância máxima.

$$G_{max} = N \cdot P_o^{max} \cdot \gamma \quad (1.4)$$

A condutância máxima não depende da voltagem, influenciada principalmente pela probabilidade de abertura máxima, P_o^{max} .

Entre os canais catiônicos, o canal Kv1.2 é um canal de potássio dependente de voltagem, muito importante para os estudos atuais de eletrofisiologia. Sua estrutura foi determinada em alta resolução por MacKinnon *et al* em 2005 [63] e foi a primeira estrutura de canal dependente de voltagem de mamífero a ser resolvida (Figura 1.13). O gene associado a esse canal é denominado *Kcna2* e é expresso principalmente em diferentes regiões do axônio de neurônios cerebrais. Esse canal auxilia na regulação do limiar de excitação para disparo e propagação de potenciais de ação, bem como a repolarização. Por tudo isso e visto experimentos que envolvem a sensibilidade desse canal iônico por anestésicos gerais, ele constitui um dos importantes alvos para estudo de anestesia.

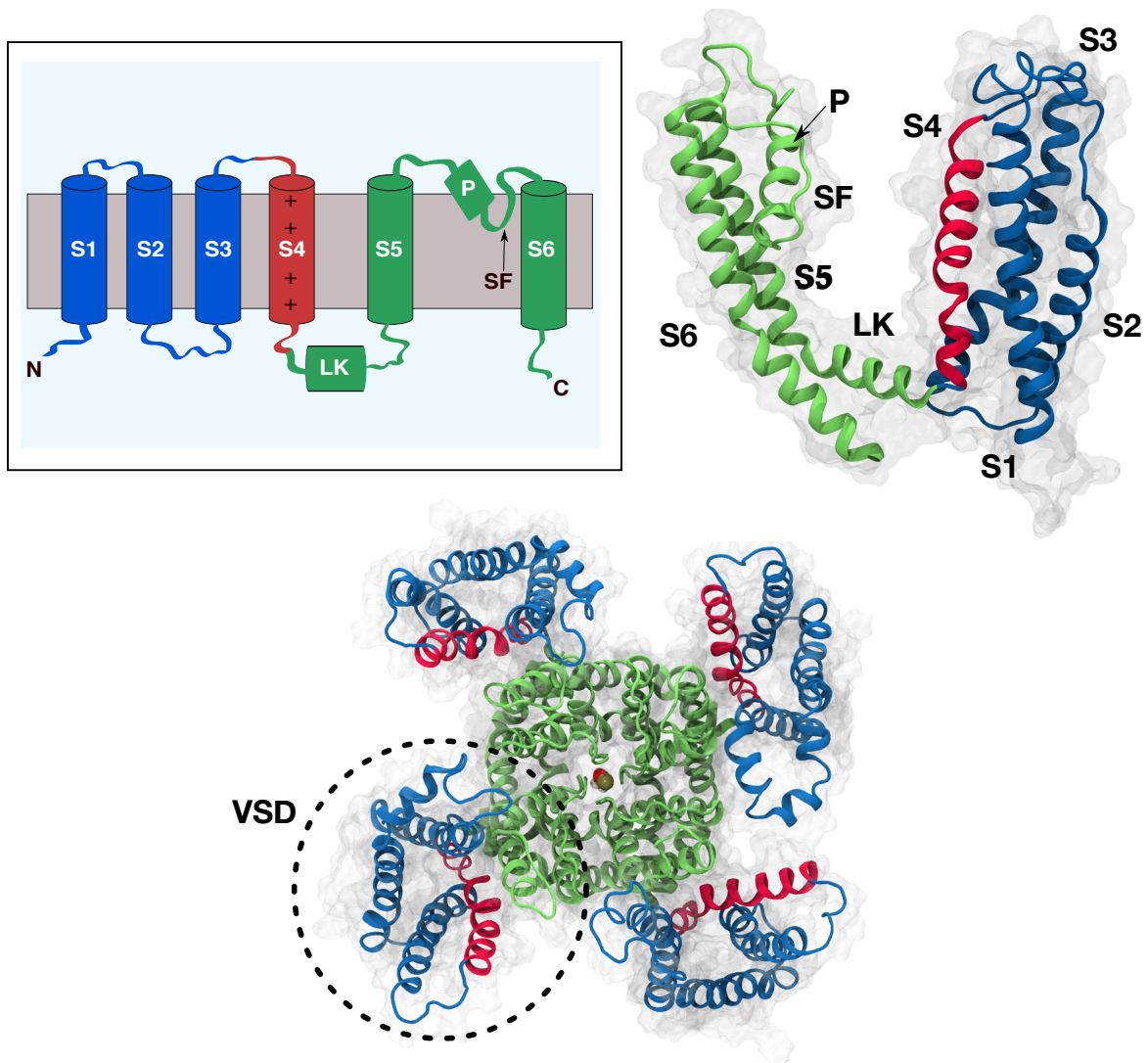


Figura 1.3: Esquema da estrutura de uma subunidade do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2. Topologia com os 6 segmentos transmembrânicos. As primeiras quatro hélices (S1-S4) formam o domínio sensor de voltagem (VSD, do inglês *voltage sensor domain*), com ênfase para a hélice S4 na qual estão os diversos resíduos positivamente carregados, enquanto os dois últimos segmentos (S5 e S6) constituem o domínio do poro. Nesse domínio, pode-se ainda destacar o filtro de seletividade (SF, do inglês *selectivity filter*), importante estrutura para distinção entre os íons que podem ser conduzidos pelo canal, flanqueado por uma hélice, denominada hélice P. Entre os domínios, há uma hélice, o *linker* S4-S5, que permite o acoplamento entre os mesmos.

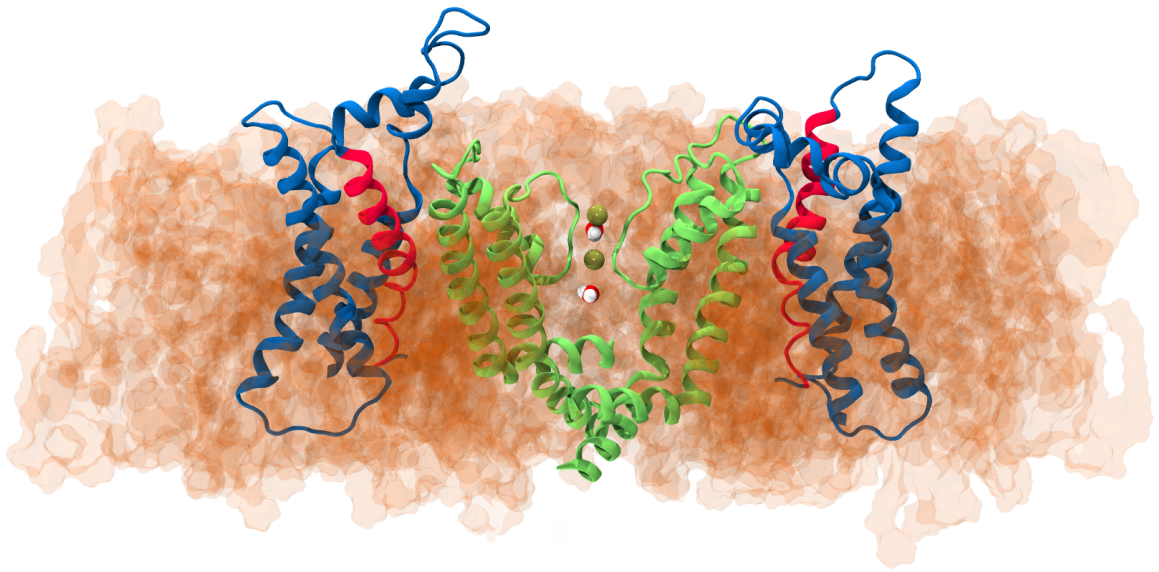


Figura 1.4: Esquema da estrutura de uma subunidade do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2. Topologia com os 6 segmentos transmembrânicos. As primeiras quatro hélices (S1-S4) formam o domínio sensor de voltagem (VSD, do inglês *voltage sensor domain*), com ênfase para a hélice S4 na qual estão os diversos resíduos positivamente carregados, enquanto os dois últimos segmentos (S5 e S6) constituem o domínio do poro. Nesse domínio, pode-se ainda destacar o filtro de seletividade (SF, do inglês *selectivity filter*), importante estrutura para distinção entre os íons que podem ser conduzidos pelo canal. Entre os domínios, há uma hélice, o *linker* S4-S5, que permite o acoplamento entre os mesmos.

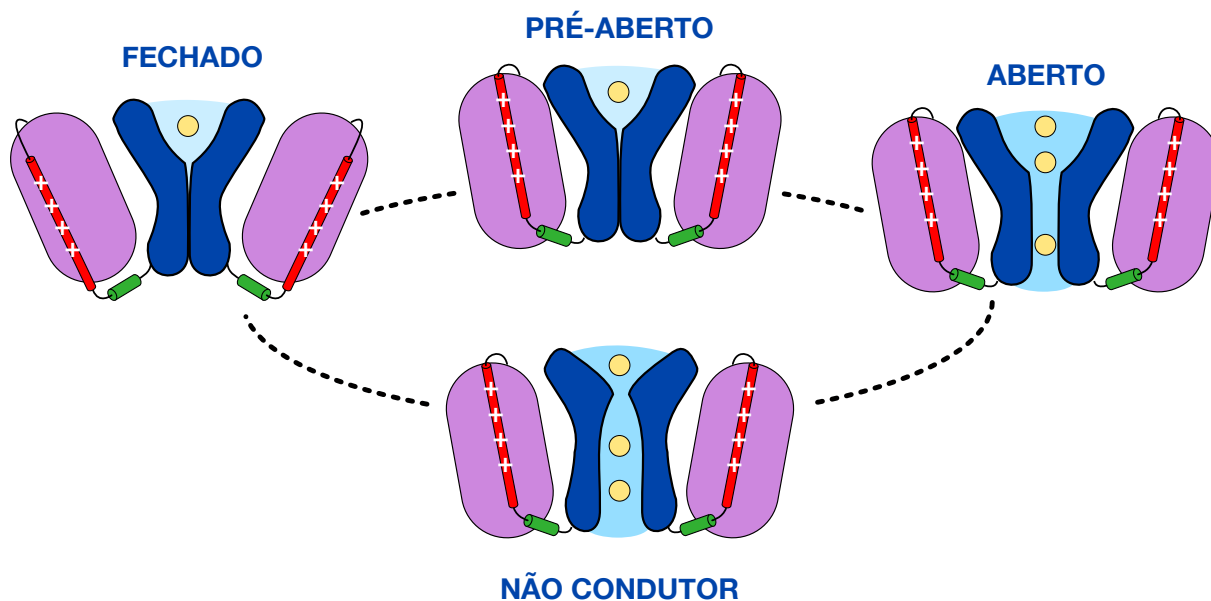


Figura 1.5: Representação esquemática de conformações de canais de potássio. Estão ilustrados os estados fechado, não condutor ou inativo, pré-aberto e aberto. O estado fechado é aquele com o domínio sensor de voltagem (VSD) inativo e poro fechado, enquanto o estado pré-aberto é aquele com VSD ativo, no entanto poro fechado. A conformação aberta é a única entre as destacadas que permite propriamente a permeação iônica. O estado inativo, não condutor, especialmente os relacionados com a inativação tipo C, está associado ao bloqueio da passagem no filtro de seletividade, por constrição ou alteração da geometria das carbonilas que constituem o filtro de seletividade (SF).

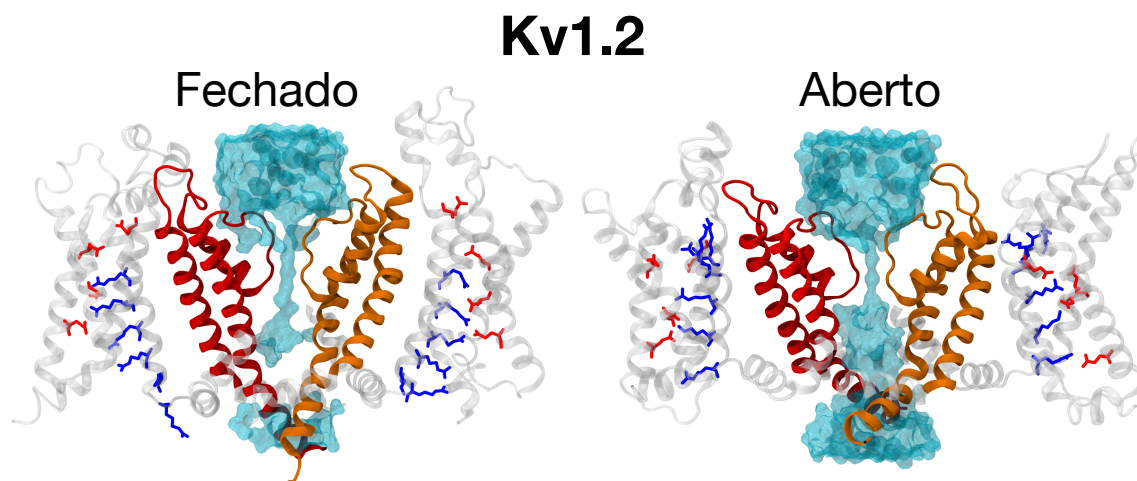


Figura 1.6: Ilustração do canal de potássio dependente de voltagem Kv1.2 em suas duas conformações bem definidas e estudadas, a aberta e a fechada. Para facilitar a visualização, são representadas apenas duas subunidades frontais, em laranja e em vermelho. Em azul está o volume acessível à água e aos íons. Com detalhes estão representados resíduos importantes do domínio sensor de voltagem (VSD), especificamente em vermelho aqueles com negativo e em azul aqueles carregados positivamente.

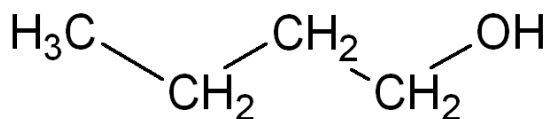
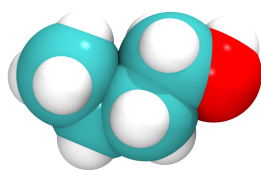
1.3 Anestésicos

Há mais de 165 anos anestésicos gerais têm sido amplamente utilizados em procedimentos cirúrgicos. Todavia os detalhes moleculares do seu mecanismo anestésico permanecem desconhecidos.[104] São moléculas capazes de deprimir o sistema nervoso central e, assim, induzir perda de consciência, amnésia, relaxamento muscular e analgesia quando administradas em doses adequadas. Ademais, os primeiros sintomas e a recuperação dos efeitos anestésicos ocorrem de maneira relativamente rápida. Conforme a administração, podem ser divididos em duas classes principais, os inaláveis e os injetáveis. Enquanto os anestésicos inaláveis são utilizados majoritariamente para manutenção do estado de anestesia geral, os injetáveis são aplicados mais comumente para induzir a anestesia. Em geral, é administrada uma combinação de anestésicos inaláveis e injetáveis em procedimentos médicos. Comuns exemplos de anestésicos inaláveis estão os voláteis como isoflurano, sevoflurano, halotano e desflurano. Há também os gases anestésicos, como o xenônio e o óxido nitroso.

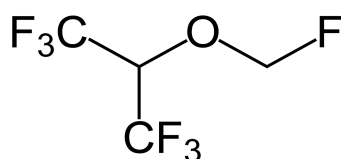
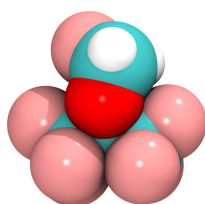
Não há nenhum grupo químico específico requerido para a execução da atividade anestésica. Existe, então, uma grande diversidade físico-química entre os anestésicos, sendo mais reconhecidos pelos efeitos fisiológicos induzidos (Figura 1.7). Em especial, os anestésicos voláteis são pequenas moléculas hidrofóbicas, apolares, sendo possível seu cruzamento da barreira hematoencefálica. Além disso, boa parte dessas moléculas são halogenadas, ou seja, possuem elementos do grupo dos halogênios como flúor, cloro, iodo e bromo.

Sabe-se que anestésicos influenciam a ação de canais iônicos e que a complexidade do estado de anestesia é consistente com a multiplicidade de alvos moleculares para modulação por essas moléculas. No entanto há duas hipóteses principais sobre como ocorre a modulação por essas moléculas. Uma delas discorre sobre a influência dos agentes anestésicos lipofílicos sobre as membranas biológicas [87], de modo que o efeito anestésico decorre de modificações do volume da bicamada lipídica pela interação com o ligante. Na correlação de Overton-Meyer é preconizado que a potenciação do efeito anestésico é proporcional ao seu coeficiente de partição para a membrana. Logo, quanto maior a afinidade do ligante por solventes hidrofóbicos, como o azeite, do que no meio aquoso, maior o efeito anestésico. Por conseguinte, podem ocorrer alterações nas propriedades físicas da membrana, de forma que há expansão da membrana e, assim, aumento de pressão lateral, além de modificação de sua fluidez, de forma que podem influenciar consideravelmente as proteínas de membrana. [33, 70, 20, 41, 72] Um dos problemas dessa hipótese é denominado efeito *cut off*, logo há um limite para o tamanho da cadeia alifática, a partir do qual não há mais ação efetiva do anestésico. [35, 1] Aliás, estudos com proteínas solúveis, como a luciferase de vaga-lumes, ou na ausência de membrana mostram uma modulação

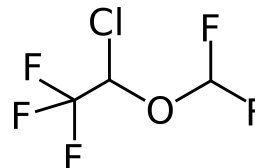
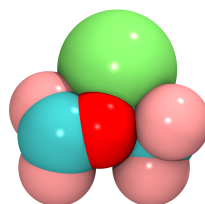
1-Butanol



Sevoflurano



Isoflurano



Propofol

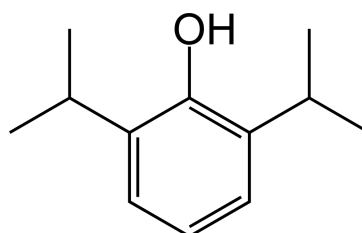
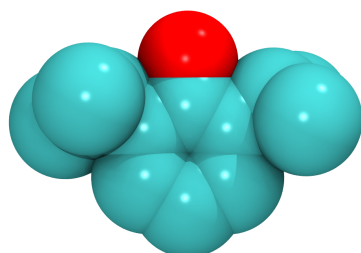


Figura 1.7: Modelos esquemáticos da estrutura molecular de alguns anestésicos gerais, sendo eles o 1-butanol, sevoflurano, isoflurano e propofol. Em branco estão representados os átomos de hidrogênio, em ciano os de carbono, em vermelho os de oxigênio, em rosa os de flúor e, por fim, em verde os átomos de cloro.

da cinética enzimática em diferentes concentrações de anestésicos. [34, 89] Experimentos posteriores mostraram ainda que efeitos semelhantes ao de disordem da membrana induzidos por anestésicos poderiam ser obtidos por modificações de temperatura. [28] Estudos com compostos quirais, como isoflurano, mostram uma maior potencia anestésica para um determinado enantiômero, ainda que o coeficiente de partição para a membrana seja o mesmo para os dois, porquanto é indicada uma preferência para um alvo molecular de reconhecimento mais específico. [36] Quantitativamente, a hipótese lipídica é inviável para concentrações clinicamente relevantes de anestésicos voláteis, visto que nessas concentrações as alterações na membrana são muito pequenas. [31] Por esses motivos foi

desenvolvida uma vertente alternativa. A hipótese de ligação a sítios proteicos, ainda que influenciada pela partição das moléculas lipofílicas pela membrana plasmática, envolve a interação dos agentes anestésicos em cavidades específicas de proteínas de membrana. Não obstante é improvável que apenas poucas famílias de canais iônicos sejam os únicos alvos de moléculas anestésicas. [37, 89, 22, 106]

A promiscuidade das moléculas anestésicas ocasiona uma série de efeitos indesejáveis. Sabe-se que elas podem interagir em alvos nos sistema respiratório e cardiovascular [98], de tal forma a estar relacionada com redução da taxa de filtração glomerular [15] e problemas de colapso pulmonar [30], por exemplo. Outro grande problema possível, mas raro, é o de necrose hepática, causado principalmente por halotano. [13]

Ainda não se sabe com precisão qual é a lista completa dos alvos moleculares de anestésicos, todavia diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* indicam que receptores ionotrópicos como os receptores GABA e NMDA, assim como canais de potássio K2P, como TREK-1 e TASK-1, possuem potenciais sítios de ligação. [37] A sensibilidade a doses clinicamente relevantes de anestésicos já foi descrita em diversos canais iônicos, como nos canais K2P, TREK e TASK [45, 78, 79], muito expressos no sistema nervoso central, no canal procarioto seletivo a sódio NaChBac [77] e no canal K-Shaw2 [14]. Ainda que a afinidade pelos canais sensíveis a voltagem seja menor do que pelos receptores ionotrópicos ou pelos canais de potássio K2P, os primeiros são relevantes por participarem nos mecanismos de potenciais de ação e também da liberação de neurotransmissores. [32] Além disso, foram demonstrados consideráveis efeitos seletivos dos anestésicos inaláveis nesses canais dependentes de voltagem. [44, 62, 11, 9] Diversos estudos mostram a suscetibilidade de modulação dos canais iônicos das famílias Kv e Nav.[51, 58, 48] Nestes, foram apontadas potencialização e inibição quando apresentados a diferentes tipos de fármacos. Tais alterações no funcionamento desses canais geram a descontinuidade da liberação de neurotransmissores na fibra pós-sináptica, conseqüentemente impedindo a transmissão do impulso nervoso. Diversos experimentos visam à elucidação desses processos. Resultados de mutações sítio dirigidas apontam alguns aminoácidos dos segmentos helicoidais do domínio transmembrânico como os responsáveis pela sensibilidade a uma séries de moléculas anestésicas. [48, 5] Outros estudos mostram a difusão de anestésicos pela membrana e sua ligação em cavidades específicas dos canais, modulando o *gating*. [8, 38] Essas recentes descobertas corroboram a hipótese central da regulação do funcionamento dos canais iônicos por ligação direta de anestésicos.

1.3.1 Sevoflurano

O sevoflurano é um anestésico geral volátil e halogenado. Possui um total de sete átomos de flúor (Figura 1.7). Atualmente é um dos anestésicos gerais mais utilizados, frequente-

mente usado em procedimentos cirúrgicos de crianças pelo seu cheiro adocicado e baixa irritação de mucosas na aplicação. Produzido sinteticamente, não é inflamável e vem sendo estudado desde aproximadamente 1975. Possui ação rápida e potente.[101]

Em experimentos *in vitro*, canais de sódio dependentes de voltagem na presença de concentrações clínicas de sevoflurano foram inibidos, de tal forma que houve alteração na condutância, estando o canal inativo em voltagens mais negativas. Por outro lado, os canais de potássio dependentes de voltagem em condições semelhantes foram modulados positivamente, com modificações na condutância máxima, além de abertura em voltagens mais positivas.

1.3.2 Modulação do Canal de Potássio Dependente de Voltagem Kv1.2 por Sevoflurano

Visto a importância do canal Kv1.2 em tecidos neurais e evidência de modulação por anestésicos gerais, foram realizados estudos *in vitro* desse canal na presença de moléculas de diferentes anestésicos gerais pelo grupo de pesquisa do Dr. Manuel Covarrubias, com ênfase na modulação por sevoflurano [61]. Nesse contexto, foram comparadas as condutâncias do canal Kv1.2 com as do canal dependente de voltagem de *Drosophila* K-Shaw2, na presença e na ausência do domínio citoplasmático T1, assim como realizadas mutações, a fim de investigar a importância dos diferentes aminoácidos na interação entre os agentes anestésicos e o canal.[62]

Em solução com $1mM$ de sevoflurano, famílias de canais de Kv1.2 tiveram modificações na condutância (Figura 1.8). É possível notar uma translação da curva de condutância-voltagem para esquerda e aumento da condutância máxima. De tal forma que o valor de $V_{1/2}$, voltagem no qual metade das canais estão na conformação aberta e metade na fechada, é alterado em aproximadamente $-4mV$. Ainda, nessas condições, a condutância máxima é aumentada em até 13%. Ao comparar a razão entre as condutâncias do canal na presença e ausência de sevoflurano percebe-se um valor aumentado em $-30mV$. Nessa voltagem, a condutância da proteína com sevoflurano é mais de duas vezes maior. Em voltagens mais positivas a potenciação é mantida, no entanto em menor magnitude. Portanto, assim como há um aumento na condutância máxima, como aumento da probabilidade de abertura em voltagens mais negativas.

De forma análoga, foram investigados os efeitos do isoflurano, halotano, clorofórmio, propofol e n-butanol ainda no canal Kv1.2, em uma voltagem estipulada de $60mV$ (Figura 1.9). O canal apresentou potenciação para sevoflurano e isoflurano, em contraste foi inibido por halotano, clorofórmio, propofol e n-butanol. Por análise da relação concentração-resposta, isoflurano já está em sua potenciação máxima em concentrações

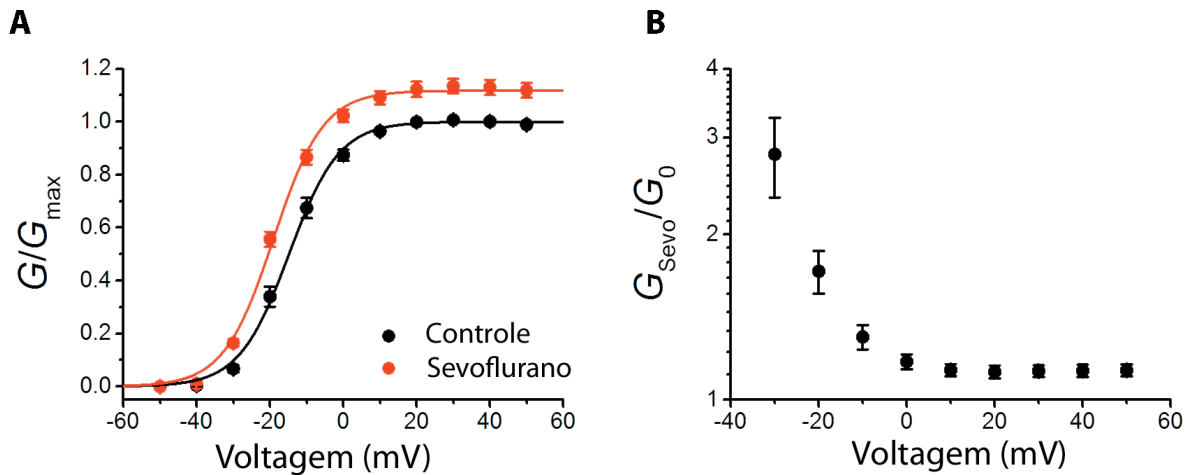


Figura 1.8: (A) Condutância normalizada do canal iônico Kv1.2 em função da voltagem, na ausência (preto) e na presença (vermelho) de $1mM$ de sevoflurano ($N=6$). O ajuste dos dados experimentais foi realizado de acordo com a função de Boltzmann. A normalização é feita de acordo com o valor da condutância máxima, G_{max} , antes da exposição ao anestésico. (B) Razão entre as condutâncias na ausência e na presença de sevoflurano de acordo com a voltagem. O resultado apresentado é dado pela razão entre o valor de condutância encontrado antes, G_0 , e logo em seguida da exposição ao sevoflurano, G_{Sevo} . (Adaptado de [61]).

próximas a 0, $1mM$, enquanto o sevoflurano apresenta saturação apenas após $1mM$. Tanto o sevoflurano quanto o isoflurano apresentaram correntes máximas muito próximas nas condições impostas. Já para os inibidores, em altas concentrações o n-butanol exibiu o maior decaimento na corrente, seguido pelo clorofórmio. Para os outros anestésicos, também houve declínio da corrente de maneira mais branda do que o n-butanol, no entanto em concentrações menores de anestésico. Em comparação com trabalhos anteriores [11], a potenciação do canal K-Shaw2 por sevoflurano é consideravelmente maior do que a do Kv1.2, assim foram investigadas as diferenças nos resíduos que compõem a região do *linker* que conecta o domínio do poro ao sensor de voltagem. [10]

Em particular, foram investigados quatorze resíduos entre as posições 317 e 330 no canal K-Shaw2 e seus correspondentes no canal Kv1.2. Foram encontradas nessa região seis substituições críticas. Por conseguinte, foram feitas mutações de tal forma que o canal Kv1.2 tivesse a sequência do *linker* semelhante à do K-Shaw2, com exceção de uma substituição letal. Esse canal Kv1.2 mutante foi denominado Kv1.2-FRAKT quimera. Diferentemente do Kv1.2 selvagem, o Kv1.2 FRAKT é potencializado não só por sevoflurano e isoflurano, como também por halotano, clorofórmio e propofol. Contudo, assim como no selvagem, o n-butanol continua tendo efeito inibidor em altas concentrações (Figura 1.10). Nesse contexto, o propofol é mais potente, com modulação em menores concentrações. No

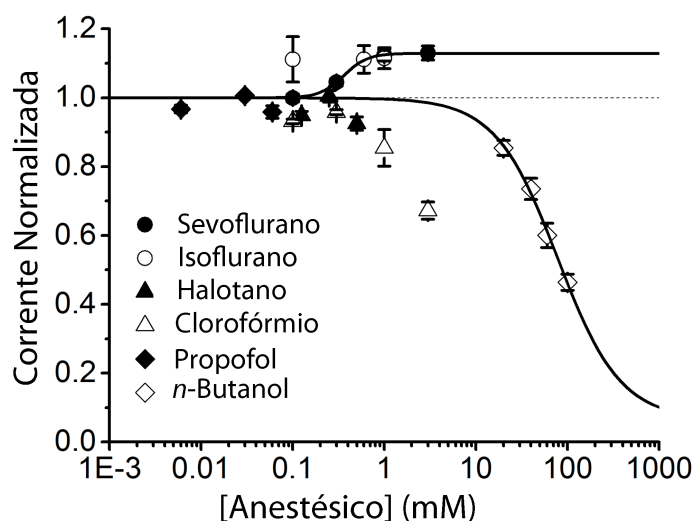


Figura 1.9: Curva dose-resposta para a ação de vários anestésicos gerais no canal Kv1.2 selvagem. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill para os resultados da modulação por sevoflurano e n-butanol, visto que foram os casos com ajustes confiáveis dado a magnitude das diferenças apresentadas entre as conformações testadas. (Adaptado de [61]).

entanto o sevoflurano é mais eficiente, de modo ao canal mutante apresentar as maiores correntes sob interação com esse anestésico. Há diferentes comportamentos da modulação do canal de acordo com a concentração do anestésico. Em concentrações mais baixas a potenciação é gradual e se intensifica com o aumento da concentração. Ao analisar esse perfil, podem ser consideradas duas classes de sítios independentes, uma com alta afinidade e sem cooperatividade, com coeficiente de Hill $n_H \approx 1$, e outra com baixa afinidade, mas altamente cooperativa, $n_H \gg 1$.

Nesse trabalho [61], cada substituição foi ainda testada individualmente com o propósito de localizar a mutação pontual responsável pelo aumento da sensibilidade (Figura 1.11). Foi descoberto que a mutação G329T recupera o comportamento apresentado pelo canal Kv1.2 FRAKT (Figura 1.12). Conquanto, tanto o canal G329T quanto o FRAKT modificam a relação condutância-voltagem, de tal forma que o Kv1.2 mutante passa a apresentar comportamento de crescimento gradual da condutância, em contraste com o rápido aumento da condutância com o crescimento da voltagem no canal selvagem. Portanto, é indicado que a mutação G329T modifica o *gating*, de modo que aparentemente essa alteração na abertura do canal está associada ao mecanismo de ação do anestésico.

De forma análoga a mutação G329T no Kv1.2, consonante à sequência do canal K-Shaw2, foi também realizada a mutação inversa, de forma a modificar a treonina na posição 330 do canal K-Shaw2 para glicina. Contudo, diferentemente da mutação G329T,

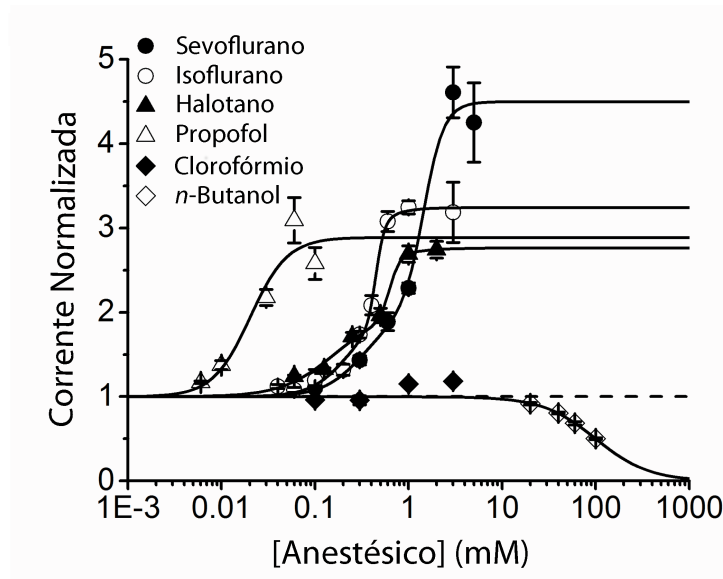


Figura 1.10: Relação dose-resposta para a ação de vários anestésicos gerais no canal Kv1.2 FRAKT. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill (propofol e n-butanol) e para a equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). Em virtude dos resultados muito pequenos para a modulação por clorofórmio, não foi possível obter o ajuste para esse conjunto de dados. (Adaptado de [61]) .

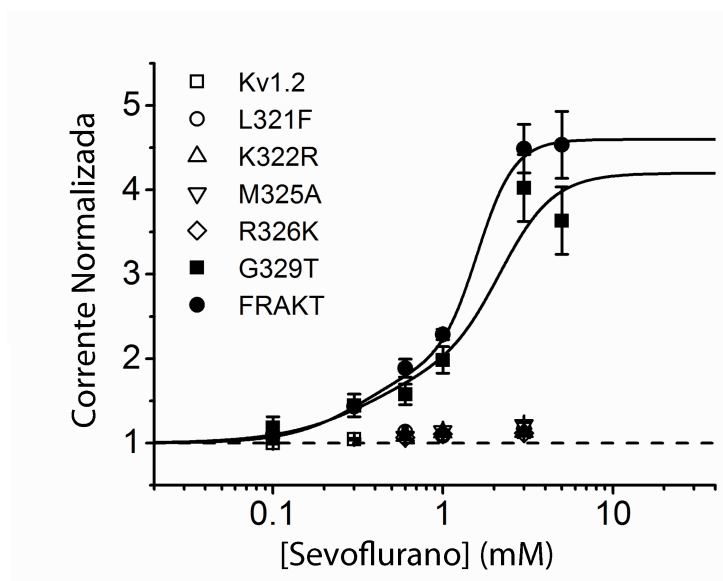


Figura 1.11: Relação dose-resposta para a ação do sevoflurano no canal Kv1.2 selvagem e no Kv1.2 com mutações pontuais. As linhas pretas contínuas são o resultado dos melhores ajustes para a equação de Hill dupla. (Adaptado de [61]).

o K-Shaw2 T330G não apresentou alteração significativa na condutância de acordo com a voltagem (Figura 1.14), ao passo que houve a interação com sevoflurano continua aumen-

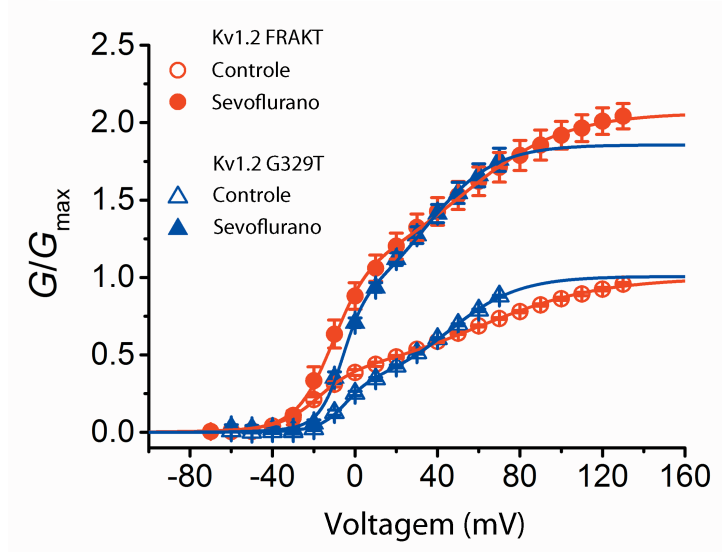


Figura 1.12: Condutância dos canais Kv1.2 FRAKT (vermelho) e Kv1.2 G329T (azul) em função da voltagem, em duas condições distintas, na ausência de sevoflurano (controle) e na presença de $1mM$ desse anestésico geral (Adaptado de [61]).

tando a condutância máxima, mas não mais transladando a curva condutância-voltagem para a esquerda. Pode-se supor, visto esse cenário, que a modulação por sevoflurano ocorre de duas formas distintas. Uma delas dependente de um resíduo específico no *linker*, associada ao controle de abertura dependente de voltagem e outra independente dessa região, relacionada ao aumento do G_{max} .

Além dos resultados previamente citados [61], foram realizados experimentos para verificar o papel do domínio T1, um domínio citoplasmático, na modulação desses canais de potássio por sevoflurano. Pôde-se concluir que o T1 é essencial para a modulação do canal K-Shaw2, como já havia sido demonstrado na literatura [102, 25], não obstante o efeito do sevoflurano nos canais Kv1.2 selvagem e Kv1.2 FRAKT parece ser independente desse domínio (Figura 1.15). Enquanto o canal K-Shaw2 sem o domínio T1, na presença de sevoflurano, não apresentou alterações na corrente, houve potenciação considerável do canal Kv1.2 nas mesmas condições.

Consideráveis avanços no entendimento dos efeitos clínicos oriundos do uso de anestésicos permitiram a consolidação da hipótese central de que a ação dessas moléculas ocorre através de interações com proteínas de membrana, via sítios de ligação, ao invés de agir diretamente nos lípidos da membrana celular.[32, 12] A fim de investigar essa intrincada interação atômica entre o anestésico e o canal iônico para o entendimento do mecanismo de modulação envolvido, são necessárias informações estruturais e dinâmicas. Para isso, é pertinente a utilização de simulações de dinâmica molecular no estudo das isoformas dos canais iônicos, sensíveis e insensíveis a anestésicos gerais. Os resultados experimentais

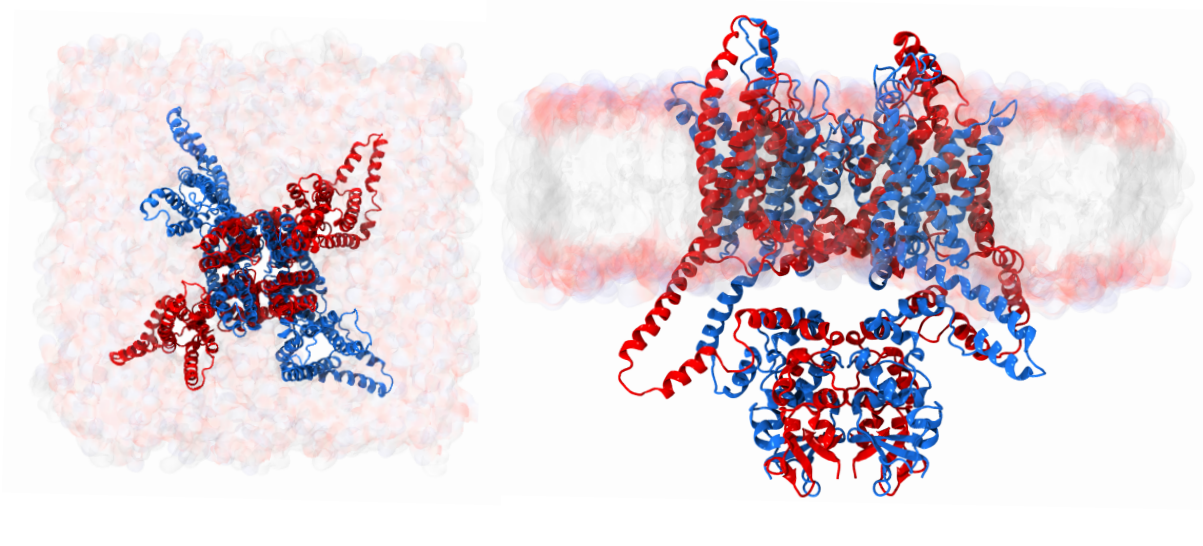


Figura 1.13: Ilustração do canal de potássio KShaw-2. À esquerda visão superior do canal tetramérico. À direita visão lateral da mesma proteína de membrana. É possível identificar o contorno da região da membrana, de tal forma que as cabeças polares dos lipídios estão ressaltados em vermelho. Em destaque, na região intracelular abaixo da membrana, está o domínio citoplasmático, denominado domínio T1.

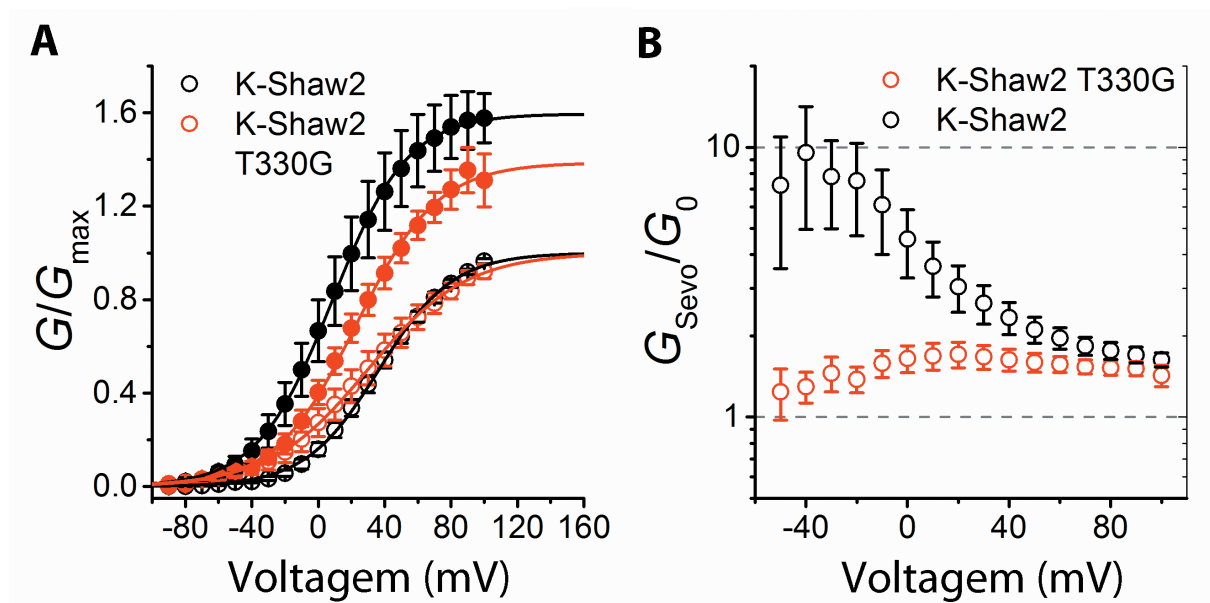


Figura 1.14: (A) Condutância dos canais KShaw-2 FRAKT (vermelho) e Kv1.2 G329T (azul) em função da voltagem, em duas condições distintas, na ausência de sevoflurano (controle) e na presença de 1mM desse anestésico geral. (B) Razão entre as condutâncias, ($\frac{G_{\text{Sevo}}}{G_0}$), pela voltagem para o K-Shaw2 (preto) e o KShaw-2 T330G (vermelho) (Adaptado de [61]).

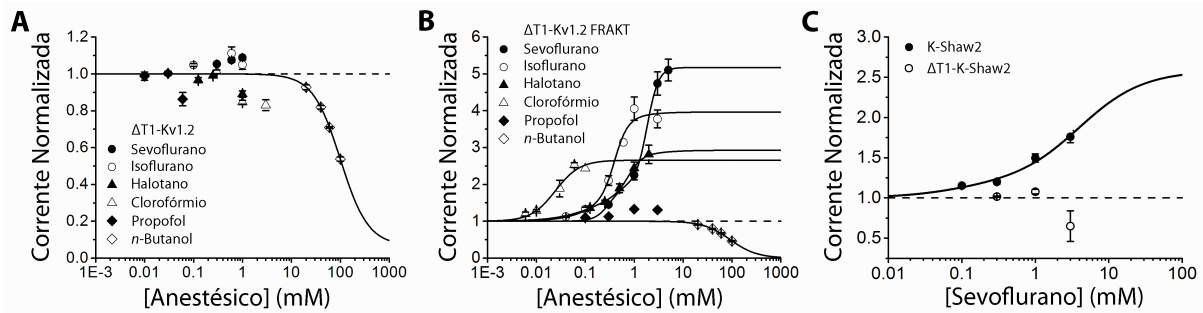


Figura 1.15: (A) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico Kv1.2 sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill de acordo com os dados para o n-butanol. (B) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico Kv1.2 FRAKT sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill (propofol e n-butanol) ou pela equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). (C) Relação entre a concentração dos anestésicos gerais e a resposta, nesse caso, a corrente, do canal iônico KShaw-2 com e sem o domínio T1. A linha contínua é o melhor ajuste obtido pela equação de Hill dupla. (Adaptado de [61]).

anteriormente descritos foram de grande importância para o desenho correto dos sistemas a serem simulados.

Procura-se, portanto, testar a hipótese de que a complexa modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem por anestésicos pode ocorrer por ligação a múltiplos sítios com distintas constantes de ligação. Além disso, foram avaliados dois possíveis mecanismos de alteração do funcionamento do canal, um alostérico, por estabilização de um dos estados do canal, outro por bloqueio do fluxo iônico, via alterações no filtro de seletividade. Por meio desta abordagem, foram explorados os possíveis sítios e quantificadas as constantes de ligação efetivas de anestésicos gerais em sítios putativos de canais iônicos por diferentes metodologias. Para tanto, foram testadas a ligação do sevoflurano, um anestésico volátil, em sítios distintos de dois sistemas principais, o canal Kv1.2 selvagem e o canal Kv1.2 G329T, um canal de potássio dependente de voltagem com mutação pontual em um resíduo no segmento S5 que confere maior sensibilidade do canal a esse anestésico.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este estudo visa investigar os detalhes moleculares da regulação de canais de potássio dependentes de voltagem por sevoflurano, a partir de técnicas de modelagem molecular e de simulações atomísticas de dinâmica molecular.

2.2 Etapas

Para este fim, as seguintes metas foram propostas (Figura 2.1):

1. Realização de simulações atomísticas dos canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T inseridos em membrana fosfolipídica e solvatados explicitamente;
2. Busca de sítios putativos de ligação, por *docking* molecular, de anestésicos gerais às estruturas dos canais;
3. Realização de simulações atomísticas dos canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T complexados com sevoflurano;
4. Cálculos de energia livre de ligação de sevoflurano aos canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T;
5. Investigação de alterações na probabilidade de mudança de estados conformacionais de canais iônicos ocasionadas dada interação com moléculas anestésicas;

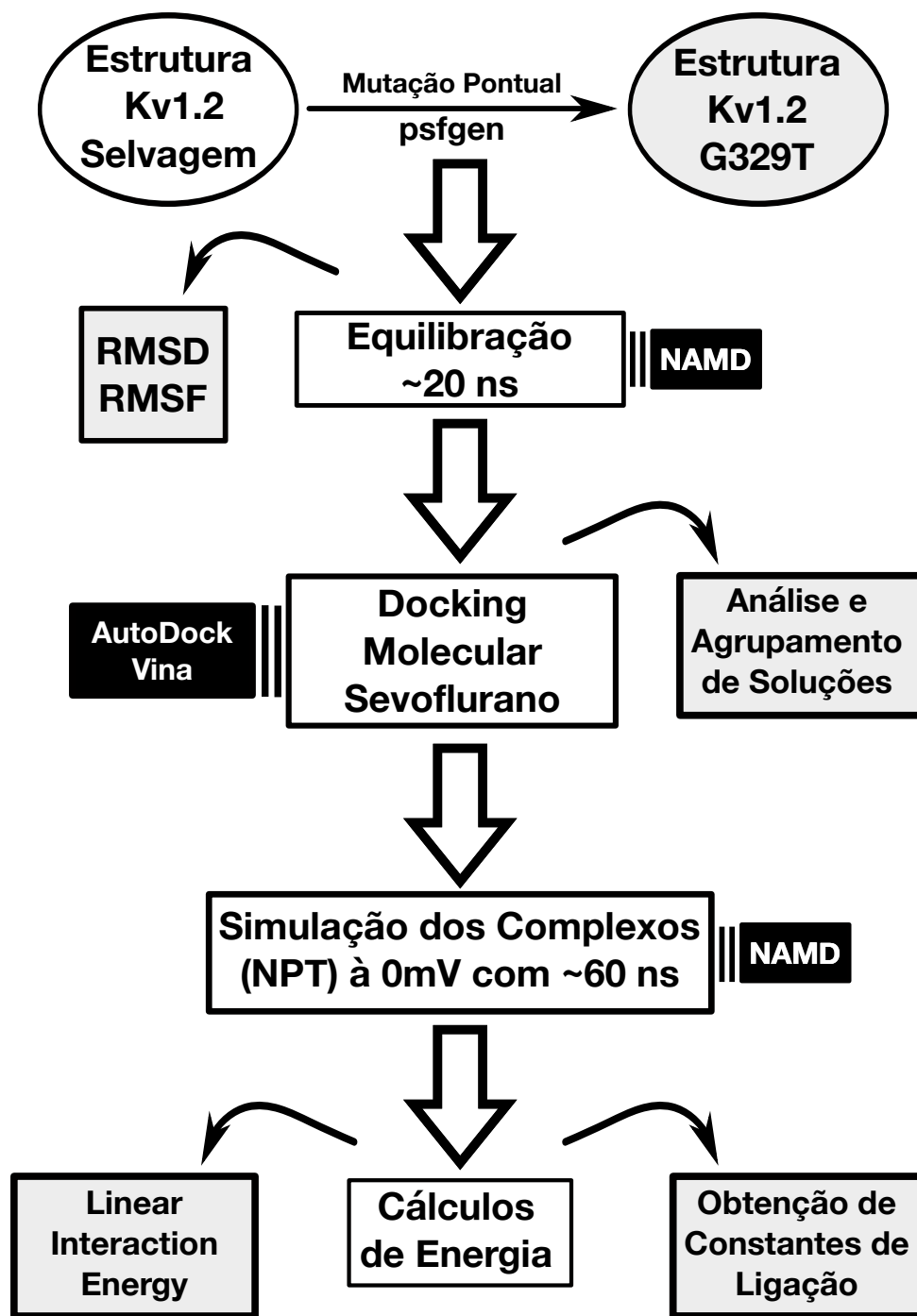


Figura 2.1: Etapas realizadas para busca do objetivo principal do trabalho. Em balões estão as estruturas atômicas utilizadas no trabalho. Nos quadrados pretos estão os principais *softwares* usados durante a etapa proposta.

Capítulo 3

Metodologia

Para investigar a interação entre ligantes e receptores é possível utilizar metodologias distintas. Frente à atual disponibilidade de estruturas cristalográficas de alta resolução por difração de raios X de canais catiônicos dependentes de voltagem e o crescente poder computacional, este trabalho aborda os mecanismos de anestesia por utilização de técnicas computacionais, como simulações de dinâmica em nível atômico/molecular, cálculos de energia livre e *docking* molecular, no entanto à luz de resultados obtidos por eletrofisiologia e dados farmacológicos. Dessa forma, nesse capítulo serão expostos os conceitos fundamentais relacionados às metodologias utilizadas.

O uso de técnicas computacionais permite estudar sistemas biológicos em resoluções diferentes do que aquelas convencionalmente usados em experimentos de bancada e em condições extremas, como baixíssimas temperaturas, próximas a $0K$, ou altas pressões. Além disso, as simulações computacionais permitem o controle de diversos parâmetros e o ajuste preciso das condições iniciais e finais do experimento.

Nesse trabalho, pela resolução escolhida, foram utilizadas simulações de dinâmica molecular em associação com cálculos de energia livre. A escolha das metodologias empregadas foi pautada pela busca da melhor acurácia, no entanto dentro da limitação computacional e temporal encontrada, portanto houve um balanço entre eficiência e rigor nos métodos utilizados. Os resultados obtidos, em conjunto com modelo teórico desenvolvido a partir das densidades de probabilidades de ligação, foram essenciais para a tentativa de reconstituir o comportamento da condutância do canal Kv1.2 em função da voltagem aplicada na presença do anestésico sevoflurano.

3.1 Simulações de Dinâmica Molecular

Para todas as metas aqui definidas, métodos teóricos em simulações de dinâmica molecular serão utilizados. No método, trajetórias atomísticas ao longo do tempo foram geradas

para um número finito de átomos, via integração das equações clássicas de movimento, regidas pelas interações interatômicas do sistema estudado. Em cada passo de tempo é calculada a força resultante para cada partícula de acordo com suas interações e, assim, é acompanhada a evolução temporal no espaço de fase do sistema, segundo as leis de Newton.

Um dos principais intuitos da obtenção de trajetórias de dinâmica é o cálculo de propriedades médias do sistema. Para tanto, uma das teorias centrais é a teoria da ergodicidade que trata da correspondência entre as médias temporais de uma trajetória e as médias por todo o espaço de fase. Assim, para um sistema ergódico as propriedades médias do sistema são calculadas como médias temporais para trajetórias suficientemente longas

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \overline{P}(t) = \langle P \rangle \quad (3.1)$$

na qual P é qualquer propriedade do sistema, $\overline{P}(t)$ é a média temporal dessa propriedade, enquanto $\langle P \rangle$ é a média termodinâmica da mesma.

3.1.1 Energia Potencial e Campos de Força

Um dos pontos críticos para acurácia da dinâmica molecular é a escolha da função de energia potencial. A complexidade da função potencial deve ser elaborada o suficiente para produção resultados precisos, no entanto sem requerer recursos computacionais exorbitantes. A energia potencial $U(\vec{r}^N)$ é dependente da posição \vec{r} de cada uma das N partículas que compõe o sistema. Para a definição das interações intra e intermoleculares do sistema são ainda considerados os parâmetros moleculares obtidos por sofisticados cálculos quânticos, *ab initio*, mas que também podem ser derivados de trabalhos experimentais. O conjunto de parâmetros moleculares e o funcional da energia potencial compõe o campo de força. [66] Atualmente existe uma miríade de campos de força disponíveis. Para dinâmica molecular de biomoléculas os campos de força mais comuns são o AMBER [103], CHARMM [66] e o GROMOS [86]. Para as trajetórias de dinâmica molecular realizadas foi escolhido o campo de força CHARMM36 por já ter sido utilizado anteriormente em simulação semelhantes. [26, 54]

Por uma descrição geral e simplificada, a função da energia potencial pode ser definida como $U = E_{\text{ligação}} + E_{\text{ângulo}} + E_{\text{diedro}} + E_{\text{Coulomb}} + E_{\text{vdw}}$ e, então, dividida em dois conjuntos, um contendo os termos de interações ligadas e o outro com os termos de interações não ligadas.

1. Termos ligados \Rightarrow correspondem à contribuição local referente à ligação química do tipo covalente entre os átomos. Na dinâmica molecular não ocorre quebra ou formação de ligações covalentes, assim não há um termo relacionado a esses eventos.

Para átomos ligados há contribuição das energias $E_{\text{ligação}}$, $E_{\text{ângulo}}$, E_{diedro} e $E_{\text{impróprio}}$. As constantes de força e valores de equilíbrio presentes a seguir dependem dos tipos químicos dos átomos envolvidos nas ligações.

- (a) $E_{\text{ligação}} = \sum k_r(r - r_0)^2$: potencial harmônico relacionado ao estiramento das ligações covalentes entre os pares de átomos, k_r é a constante de força da ligação e r_0 é a distância de equilíbrio.
- (b) $E_{\text{ângulo}} = \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2$: energia potencial associado à torção do ângulo θ definido entre três átomos ligados. Os termos k_θ e θ_0 correspondem à constante de força angular e ao ângulo de equilíbrio, respectivamente.
- (c) $E_{\text{diedro}} = \sum k_d[1 + \cos(n\omega - \omega_0)]$: energia potencial assumida como periódica e relacionada à torção do ângulo diedral ω formado pelos planos delimitados por quatro átomos ligados em que w_0 é valor de ângulo diedral de equilíbrio, também denominado fase, n a periodicidade e k_d a constante de força diedral ou barreira torsional.
- (d) $E_{\text{impróprio}} = \sum k_\psi(\psi - \psi_0)^2$: energia potencial utilizada para manutenção da quiralidade e planaridade, proveniente da torção dos ângulos diedrais ψ para o grupo de quatro átomos. ψ_0 e k_ψ corresponde ao ângulo de equilíbrio e a constante de força, respectivamente.

2. Termos não ligados \Rightarrow associados a contribuição referente apenas à dependência da distância entre dois átomos. Esse grupo é composto pelas interação E_{Coulomb} e E_{vdw}

- (a) $E_{\text{Coulomb}} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$: energia potencial referente à Lei de Coulomb. É relacionada à interação entre um par de átomos de acordo com suas cargas elétricas, q_i e q_j , enquanto ϵ é a constante dielétrica do meio e r_{ij} é a distância entre as partículas.
- (b) $E_{\text{vdw}} = \sum \epsilon[(\frac{\sigma}{r})^{12} - 2(\frac{\sigma}{r})^6]$: energia potencial decorrente da interação de van der Waals, modelada pelo potencial de Lennard-Jones 6-12. Essa interação pode ser considerada como uma das mais importantes para a estabilidade de macromoléculas biológicas. Para distância r muito pequenas ocorre uma forte repulsão entre o par de partículas, todavia para distâncias onde σ corresponde à distância de equilíbrio, ponto mínimo do potencial, a atração é máxima. Já o parâmetro ϵ é o valor mínimo para o potencia de van der Waals para esse par de partículas.

Em adição a esses termos, podem ainda existir uma contribuição adicional, como acontece no campo de força CHARMM, denominado Urey-Bradley $E_{\text{Urey-Bradley}}$.

1. $E_{Urey-Bradley} = \sum k_U(r - r_0)^2$: potencial harmônicos semelhante à energia potencial de ligação, no entanto esta é advinda do distanciamento r entre um par de átomos separados por duas ligações covalentes. k_u é a contante de força e r_0 é a distância de equilíbrio.

3.1.2 Condições Periódicas de Contorno

Ao gerar trajetórias de dinâmica se quer evitar ao máximo artefatos, assim são necessários diversos tratamentos para alcançar a máxima acurácia possível. Os sistemas biológicos modelados para as simulações usualmente são constituídos por um número finito de partículas, normalmente na ordem de 10^4 e 10^5 . Nessa condição, uma parte considerável dos átomos estão dispostos nas bordas do sistema, podendo ocorrer efeitos de contorno. Com o propósito de minimizar esse efeito, são adotadas as condições periódicas de contorno (PBC, *Periodic Boundary Conditions*). Nessa técnica, o sistema é replicado em todos os eixos, de tal forma que todas as faces da caixa de simulação são limites para uma outra réplica do sistema. Assim, quando um átomo atravessa a fronteira da caixa ele se desloca para uma nova imagem do sistema. No entanto, como essa outra imagem é uma réplica exata do sistema, é como se o átomo retornasse a caixa original pela face oposta. Visto essa identidade entre as réplicas, só é necessária a representação de uma caixa na dinâmica com a adoção da uma imagem mínima para o tratamento das interações interatômicas. Então, as interações entre as partículas são computadas de acordo com a distância mínima entre elas, ou seja, consoante as imagens mais próximas por subtração da dimensão da caixa. Contudo, o caráter pseudo-infinito desse procedimento demanda o estabelecimento de um raio de corte para os cálculos de interações intermoleculares, de modo que esse raio deve ser menor que metade do tamanho da caixa, a fim de que não haja interações de uma partícula com sua própria imagem.

3.1.3 Tratamento das Interações

Em cada passo da dinâmica molecular são calculadas as energias potenciais para cada átomo do sistema de acordo com todas as suas interações com os outros componentes. Esse é um dos passo de maior demanda dado o grande número de átomos presentes no sistema. Por conseguinte, para contabilizar os termos ligados são considerados apenas os átomos vizinhos, com uma distância de até duas ligações covalentes. No entanto, para os termos não ligados é preciso estipular uma distância limítrofe. Assim, para os átomos com uma distância menor que geralmente um *cut-off* de 10\AA a 15\AA , é calculado o potencial de Lennard-Jones. O potencial de Lennard-Jones tende a zero para distâncias muito grandes, visto o seu fraco poder atrativo, contudo esse corte de potencial, se de

maneira abrupta, pode produzir artefatos numéricos relacionados à conservação de energia do sistema. Pode-se então utilizar uma função denominada *switching function* para, de maneira mais suave e contínua, levar a função gradativamente a um valor nulo em um intervalo de distância.

As interações de Coulomb, diferentemente das de Lennard-Jones, não descem tão rapidamente a um valor nulo com o aumento da distância. Há um diferente tratamento, então, para o potencial eletrostático. Esse potencial ϕ é decomposto em dois termos principais. O primeiro termo, ϕ_{curto} , para interações de curto alcance, é calculado de forma explícita pela equação de Coulomb, considerando as partículas vizinhas e suas distâncias. Já o termo ϕ_{longo} , para interações de longo alcance, são aplicadas diferentes técnicas para sua estimação mais acurada. Para a simulação de proteínas, as somas de Ewald podem ser utilizadas. Com a adoção de sistemas periódicos, o método PME (*Particle Mesh Ewald*) é amplamente aplicado. Assim o potencial eletrostático pode ser definido como

$$\sum_{i,j} \phi_{curto}(r_j - r_i) + \sum_k \phi_{longo} |\rho(k)|^2 \quad (3.2)$$

de modo que ϕ_{longo} é a transformada de Fourier do potencial e $|\rho(k)|^2$ é a densidade de cargas, ou seja, a quantidade de cargas elétricas por unidade de volume. Essa diferenciação nos espaços de avaliação de cada componente permite uma convergência mais rápida dos tempos que compõe o potencial eletrostático.

3.1.4 Equações de Movimento

A partir da informação da energia potencial do sistema $U(\vec{r}^N)$ é possível obter sua trajetória pela integração das equações de Newton para cada partícula i como

$$\begin{aligned} m_i d^2 \frac{\vec{r}_i(t)}{dt^2} &= \vec{F}_i(t) \\ F_i(t) &= - \frac{\Delta U(\vec{r}^N)}{\Delta \vec{r}_i(t)} \end{aligned} \quad (3.3)$$

no qual, m_i é a massa atômica e \vec{F}_i é a força em i em função do tempo. Para a devida integração numérica podem ser usados diferentes integradores, entre eles estão os algoritmos de *Euler*, *Verlet* e *Leap-frog* por exemplo. O algoritmo de *Verlet* [100], o primeiro e um dos mais simples integradores, depende principalmente do conhecimento de três termos, a posição $\vec{r}_i(t)$ e a força $\vec{F}_i(t)$ no tempo atual t , assim como a posição da partícula i no passo anterior $\vec{r}_i(t - \delta t)$. De forma que a posição no próximo passo de tempo $t + \delta t$ por

expansão de Taylor é

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m}\delta t^2 + O(\delta t^4) \quad (3.4)$$

assim o erro associado ao método é da ordem de $O(\delta t^4)$. A velocidade, imprescindível para o cálculo da energia cinética $K(\vec{p})$ e da energia total do sistema $E = H(\vec{r}^N, \vec{p}^N)$, é calculada por

$$\vec{v}(t + \delta t) = \frac{\vec{r}(t + \delta t) - \vec{r}(t - \delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2) \quad (3.5)$$

com erro associado de $O(\delta t^2)$. O passo de integração escolhido, ou o intervalo de tempo δt entre dois *frames* da simulação, deve ser suficientemente pequeno para permitir a conservação da energia total do sistema, além de amostrar o evento mais rápido no deslocamento das partículas. No entanto, caso o valor seja exageradamente infinitesimal, há um custo computacional exacerbado para a propagação do movimento. Por outro lado, passos de integração muito largos podem gerar instabilidades no sistema. Por conseguinte, é frequentemente escolhido um passo de integração de 2 femtosegundos ($10^{-15}s$), visto que corresponde à frequência de vibração dos átomos da molécula de água. [39]

3.1.5 Simulações à Temperatura e Pressão Constantes

No *ensemble* microcanônico, por padrão, número de partículas, volume e energia (NVE) são conservados ao longo da trajetória de simulação. Contudo, nesse esquema, temperatura e pressão podem variar para valores extremos. Para sistemas biológicos é interessante a possibilidade de obter trajetórias com temperatura e pressão constantes e com valores definidos. Esse tipo de *ensemble*, com aplicação de termostatos e barostatos para manutenção e controle de temperatura e pressão, é denominado NPT e está mais próximo às condições experimentais.

Para manter a temperatura controlada podem ser usadas diferentes técnicas, como o termostato de Andersen, de Berendsen, Nosé-Hoover e Langevin, pela aplicação de esquemas distintos como a redefinição periódica e aleatória das velocidades atômicas de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann.[3] Ou então a introdução de uma variável extra nas equações de dinâmica, graus de liberdade não físicos, ou ainda aplicações aleatórias de forças. [75, 49]

Pela utilização do termostato de Langevin é possível obter um *ensemble* NVT canônico de forma efetiva e relativamente simples. Por meio dessa técnica é mimetizado o acoplamento do sistema em um banho térmico por alteração nas equações de propagação

do movimento de cada uma das partículas, assim

$$\begin{aligned}\vec{r}'_i &= \frac{\vec{p}'_i}{m_i} \\ \vec{p}'_i &= \vec{F}_i - \gamma \vec{p}_i + \vec{R}_i\end{aligned}\tag{3.6}$$

de forma que γ é o coeficiente de fricção de acordo com a viscosidade do meio e \vec{R}_i é relacionada a aplicação de uma força aleatória de acordo com as colisões das partículas, porquanto é considerado que ao ocorrer movimentação das grandes partículas e as pequenas partículas são empurradas, há dificuldade de movimentação por fricção.

Por essa formulação o controle decorre ora de um acréscimo no momento pelo fator \vec{R} , uma força restauradora, ora diminuição pelo termo dissipador $\gamma \vec{p}_i$. Valores para a força aleatória obedecem uma distribuição gaussiana centrada em 0 com variância unitária escalonada por

$$\sqrt{\frac{2k_B T \gamma m}{\Delta t}}\tag{3.7}$$

no qual k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura desejada, m a massa da partícula e Δt o passo de integração aplicado na simulação.

Para controle e manutenção da pressão do sistema pode ser utilizado um método semelhante ao descrito para o termostato de Langevin. Nesse caso, é adicionado uma variável às equações de movimento relacionada a uma compressão ou expansão aplicados por um pistão acoplado ao sistema. Pode assim ser alterado o volume da caixa de simulação para ajuste de acordo com a pressão escolhida de modo que

$$\begin{aligned}\vec{r}'_i &= \frac{\vec{p}'_i}{m_i} + \frac{p'_\epsilon}{W} \vec{r}_i \\ p'_\epsilon &= dV(P(t) - P_{ext}) + \frac{D}{N_f} \sum_i \frac{p_i^2}{m_i} - \gamma_P p_\epsilon + R_P\end{aligned}\tag{3.8}$$

no qual a aceleração da partícula depende não apenas da aceleração provocada pelas interações par a par, como também está associada ao momento linear e a massa do pistão acoplado ao sistema, p_ϵ e W . A força aplicada pelo pistão é influenciada pelo volume do sistema V , a pressão externa aplicada P_{ext} e a pressão instantânea $P(t)$, enquanto D é o número de dimensões do sistema e N_f o número de graus de liberdade.[68]

3.1.6 RMSD e RMSF no tempo

Para análise de modificações na estrutura dos canais ao longo da simulação e consequentemente diagnóstico da qualidade da trajetória obtida podem ser usadas diversas medidas.

A medida de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) no tempo foi calculada para estudo da estabilidade de estruturas proteicas e convergência da simulação. Ela é computada de tal forma a comparar a estrutura inicial do canal iônico com a estrutura no *frame* desejado, definindo uma medida de distância entre as estruturas. A seleção dos átomos para o cálculo, para este trabalho, compreende apenas os átomos pesados, ou seja, à exceção dos átomos de hidrogênio da proteína de todo o canal ou seleções de alguns átomos de regiões bem conhecidas dessas proteínas de membrana. Após a superimposição das estruturas a serem comparadas é solucionada a equação

$$RMSD(\vec{v}, \vec{w}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2} \quad (3.9)$$

para dois conjuntos de n pontos, sendo um conjunto para a estrutura \vec{v} e outro para a estrutura \vec{w} .

Com a finalidade de também obter uma melhor representação quantitativa da flutuação da estrutura e analisar os diferentes comportamentos do canal quando mutado, o que pode interferir na interação com o ligante, foi calculado o RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), assim foi avaliada o desvio das posições em relação a posição média adotada pelo canal iônico ao longo de toda a trajetória de simulação para todos os T *frames* gerados por dinâmica molecular, assim

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \bar{x}_i)^2} \quad (3.10)$$

no qual t_j corresponde ao *frame* que está sendo analisado, $x_i(t_j)$ a posição da partícula i no instante t_j e \bar{x}_i a média no tempo das posições da partícula em questão.

Para ambos os cálculos, a superimposição foi realizada de acordo com seleções que envolvem os átomos de nitrogênio, carbono e oxigênio da cadeia principal. Além disso, os átomos escolhidos estavam restritos aos pertencentes às hélices do domínio transmembrânico, de modo que regiões não bem estruturadas não foram consideradas para a superimposição.

3.2 Docking Molecular

É notório que diferentes drogas, pequenos ligantes, podem apresentar promiscuidade, ainda que o desejado seja a interação com apenas proteínas de interesse. Porquanto diferentes proteínas muito possivelmente apresentam uma série de cavidades, as quais podem não ter uma diversidade tão grande entre si. [88] Dessa forma, como primeiro passo

para a investigação da complexação anestésico-ligante, pode-se examinar em quais regiões da proteína há maior probabilidade de ancoragem. Uma das metodologias mais acuradas para tal pesquisa são as simulação de dinâmica molecular denominadas simulações de *flooding*. [99] Nesse caso, há a introdução de várias moléculas de ligante, de acordo com concentração de interesse, na solução a qual a proteína está inserida de maneira que os ligantes são livres para se ligar ou difundir espontaneamente pelo meio. No entanto, ainda que simples do ponto de vista de preparo para a simulação, essa técnica é muito dispendiosa computacionalmente, por requerer longo, por vezes impraticável, tempo de trajetória e amostragem da flutuação da estrutura ligantes, assim como do receptor, de tal forma a observar eventos de ligação e dissociação do sítio de interação e obter uma correta amostragem. [74] Por outro lado, uma grande vantagem da técnica é permitir acompanhar o caminho de acesso à cavidade em detalhes, bem como a influência de outras moléculas do ligante e, até mesmo, a interação concomitante de um ou mais ligantes ao mesmo sítio de interação.

O *docking* molecular, assim como o *flooding*, fornece dados qualitativos relevantes sobre o modo de interação do ligante à proteína de interesse, quando não há a estrutura do complexo em bancos de dados. Contudo, a metodologia de *docking* é significativamente mais rápida, barata e pode ser utilizada para um número maior de receptores em um tempo computacional menor do que uma dinâmica molecular tão extensiva como as simulações de *flooding*. Com o intuito de investigar interações não covalentes do ligante de interesse com diferentes regiões de um receptor, o *docking* molecular é frequentemente usado, com uma diversidade de diferentes softwares disponíveis como *FlexAID* [40], *AutoDock Vina* [96] e *FlexX* [82].

De modo geral, pela metodologia do *docking* são geradas diferentes poses e orientações do ligante em relação à proteína por algoritmos de amostragem que são diferenciados de acordo com o *software*. Em seguida as diferentes soluções obtidas são classificadas de acordo com uma *scoring function* que fornece uma medida do quão favorável é o modo de ligação encontrado. Boa parte das *scoring functions* são baseadas em campos de força, com conceitos físicos, no entanto essas funções podem ser obtidas por ajuste a um banco de dados por exemplo.

O *AutoDock Vina* foi concebido em 2009 e foi completamente reestruturado em relação aos programas *AutoDock* anteriores, de tal modo que inicialmente não era batizado de *AutoDock*. Possui a grande vantagem de ser paralelizável, assim é mais eficiente computacionalmente que seus antecessores. Versões anteriores do *AutoDock*, como o *AutoDock 4*, [71] utilizam outros algoritmos de busca, entre eles o algoritmo genético lamarquiano (*lamarckian genetic algorithm*) para a procura da melhor posição, orientação e rotação do ligante. O *AutoDock Vina*, para encontrar o melhor modo de ligação, emprega uma

técnica estocástica denominada *Local Search global optimizer*. Nessa técnica são repetidos diversos passos que envolvem mutação e otimização local, de modo que o resultado encontrado é aceito conforme o critério de Metropolis.

Como *scoring function*, o *Vina* inova ao combinar funções empíricas com funções *knowledge-based* de modo que a pontuação para uma determinada pose S é dado proporcional a um fator c correspondente às interações intermoleculares

$$S = \frac{c}{1 + wN_{rot}} \quad (3.11)$$

de modo que N_{rot} é o número de torções entre os átomos pesados e w é peso associado a esse termo. As interações intermoleculares são então computadas de acordo com

$$c = \sum_{i < j} -0,0356e^{-(d_{ij}/0,5)^2} - 0,00516e^{-[(d_{ij} - 3)/2]^2} + 0,84k - 0,0351h - 0,587b \quad (3.12)$$

no qual d_{ij} é a distância entre as superfícies

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j} \quad (3.13)$$

sendo r_{ij} a distância entre os centros dos átomos i e j , enquanto R_t é o raio de van der Waals do tipo atômico em questão t . Os três primeiros termos dessa equação, Equação 3.12, correspondem ao somatório do choque estérico, inclusive o que possui o fator k relacionado a repulsão, enquanto os dois últimos termos estão associados às interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio. Os valores de k , h e b também dependem das distâncias de modo que

$$\begin{aligned} k &= \begin{cases} d_{ij}^2, & \text{se } d_{ij} < 0\text{\AA} \\ 0, & \text{se } d_{ij} \geq 0\text{\AA} \end{cases} \\ h &= \begin{cases} 1, & \text{se } d_{ij} < 0,5\text{\AA} \\ 0, & \text{se } d_{ij} > 1,5\text{\AA} \end{cases} \\ b &= \begin{cases} 1, & \text{se } d_{ij} < -0,7\text{\AA} \\ 0, & \text{se } d_{ij} > 0\text{\AA} \end{cases} \end{aligned} \quad (3.14)$$

no qual, caso o valor de d_{ij} não esteja no intervalo estipulado, há uma interpolação linear entre os números definidos. Pode-se notar que nessa definição de *scoring function* não são considerados termos correspondentes a contribuição eletrostática, assim como a entropia é incluída de maneira mais simplista no número de torções N .

Ao considerar apenas uma conformação do receptor pode ser um empecilho para a descoberta das cavidades mais favoráveis a interação com o canal iônico, porquanto a

flexibilidade do receptor e as flutuações das cadeiras laterais podem expor ou esconder possíveis sítios de ligação. Logo, foram realizados cálculos sempre com estruturas vindas da dinâmica molecular das proteínas de membrana previamente equilibradas, de forma que foram escolhidas sempre 120 estruturas aleatórias e distintas em 6ns de simulação.

3.2.1 Clusterização das Soluções

Dada a miríade possíveis complexos advindos dos cálculos de *docking molecular*, é necessário organização e classificação dos modos de ligação que se encontram em regiões próximas na proteína. Inicialmente são agrupadas nuvens de soluções as quais se encontram próximas no espaço. Em seguida, as nuvens encontradas são agrupadas de acordo com os contatos com o receptor. O contato é definido quando o átomo de uma solução está a uma distância menor que a definida pelo *cut off* de um átomo do receptor, é, então, encontrado o resíduo ao qual esse átomo do receptor pertence e assim é armazenada a informações de quais resíduos da proteína estão próximos da solução. Pela lista dos resíduos próximos à nuvem são avaliadas quais nuvens pertencem à mesma classificação de sítio. Dessa forma, a definição pelos contatos é muito útil devido à simetria da dos canais iônicos, portanto um sítio está presente em cada uma das subunidades por possuir os mesmos resíduos constituintes. Contudo, soluções para um mesmo sítio podem não ser encontradas em todas as subunidades dada a flutuação estrutural, não estando o sítio disponível para ser ocupado em uma dada conformação.

3.3 Estimativa de Afinidade de Ligação

Visto que as energias dadas pelo *docking* podem não ser as mais acuradas, foram utilizadas outras metodologias para analisar a energia livre de ligação a partir do conhecimento dos melhores sítios de ligação fornecido pelas soluções do *AutoDock Vina*. Além disso, é conhecido que essa técnica pode apresentar soluções falsamente positivas, por conseguinte a importância da realização de mais um passo para certificar a afinidade do ligante pela região da proteína. Uma das técnicas mais rigorosas para estimar afinidades é o método de *Free Energy Perturbation* (FEP), no entanto demanda muito recurso computacional. Não tão dispendioso, o método *Linear Interaction Energy* (LIE) não precisa amostrar os estados intermediários não físicos, todavia ainda necessita de uma amostragem considerável dos estados ligado e não ligado do complexo.

3.3.1 Linear Interaction Energy (LIE)

O método semi-empírico LIE foi criado em 1994 para predição de afinidades por simulações de dinâmica molecular.[7] Em suma, é baseado na aproximação de resposta linear, de modo que há uma aproximação linear das contribuições das energias livres polares e apolares de acordo com suas médias da dinâmica molecular. Uma de suas vantagens é considerar apenas os estados fisicamente relevantes, ou seja, os estados do ligante livre em solução e complexado no sítio de interesse da proteína. Assim, a energia de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$ é uma soma ponderada da diferença da média do potencial elétrico do ligante complexado $\langle \Delta V^{Elet} \rangle_{\text{complexo}}$ em relação à média do potencial elétrico do ligante em solução aquosa $\langle \Delta V^{Elet} \rangle_{\text{água}}$ com a diferença da média do potencial de interação de *van der Waals* do ligante complexado $\langle \Delta V^{vdW} \rangle_{\text{complexo}}$ em relação à média do potencial de interação de *van der Waals* do ligante em solução aquosa $\langle \Delta V^{vdW} \rangle_{\text{água}}$

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \alpha(\langle V^{vdW} \rangle_{\text{complexo}} - \langle V^{vdW} \rangle_{\text{água}}) + \beta(\langle V^{elet} \rangle_{\text{complexo}} - \langle V^{elet} \rangle_{\text{água}}) + \gamma \quad (3.15)$$

os parâmetros empíricos α e β pesam os fatores das energias de *van der Waals* e das interações eletrostáticas do ligante, enquanto o parâmetro γ é um termo de energia livre relacionado a solvatação. A notação $\langle \dots \rangle$, aqui, representa as médias nos *ensembles*. Para o cálculo completo pelo LIE, são assim necessárias duas simulações distintas de dinâmica molecular, uma com o ligante livre em solução e outra na cavidade correspondente da proteína.

Os potenciais de interação não ligados $V(\vec{X})$ são funções da configuração microscópica do sistema, de modo que é possível o cálculo direto das médias $\langle V^{vdW} \rangle$ e $\langle V^{elet} \rangle$ das trajetórias de dinâmica molecular de cada um dos estados de referência do ligante, assim

$$V(\vec{X}) = V_{AB}(\vec{X}) - V_A(\vec{X}) - V_B(\vec{X}) \quad (3.16)$$

com $V_A(\vec{X})$ e $V_B(\vec{X})$ associados à contribuição do ligante e do ambiente na energia total do sistema $V_{AB}(\vec{X})$.

Na formulação original, não é utilizado o parâmetro γ . Aliás, inicialmente o parâmetro β era sempre igual a meio, de forma que

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \frac{1}{2} \Delta V^{Elet} + \alpha \Delta V^{vdW} \quad (3.17)$$

A variação de valores de β para melhor predição de medidas pode ser encontrada em diversos trabalhos posteriores. Valores inferiores a $\frac{1}{2}$ para esse parâmetro foram apresentados em decorrência do número de grupos -OH, visto o potencial de formação de ligação de hidrogênio por esses grupos com solventes polares.[67, 43] Outros estudos, também

utilizaram valores diferenciados para melhor ajuste aos dados experimentais.[108, 16, 58] O parâmetro α também apresenta variação de valores, por vezes definido em consonância às características do ligante como volume e tamanho de sua cadeia. [6] Quando o seu valor é ajustado conforme energia-livre de ligação experimental, α igual a 0,18 está associado não somente às interações de van der Waals, como também à outras contribuições dependentes do tamanho, como o efeito hidrofóbico e a entropia translacional e rotacional de pequenos ligantes. [2, 17] O ajuste dos parâmetros α , β e γ ainda que de suma importância para estimar as energias livres absolutas de ligação no método LIE, é, todavia, menos crítico para análise comparativa de energias livres relativas do ligante em múltiplos sítios. Para melhor amostragem do espaço de fase do ligante no determinado sítio, podem ser utilizados vieses (*bias*), a fim de manter a molécula no estado ligado. Assim, o Hamiltoniano perturbado do sistema $H^*(\vec{X}, r) = H(\vec{X}) + h(r)$ depende ainda da distância entre o ligante e a cavidade de ligação, de modo que $H(\vec{X})$ é o Hamiltoniano original do sistema e $h(r) = \frac{k}{2}(r - r^*)^2$ é o potencial externo que mantém o ligante suficientemente próximo ao sítio com uma constante de força k . Nesse esquema, as médias termodinâmicas dos potenciais $\langle V \rangle$ sem viés foram calculadas pela Equação 3.16 de acordo com

$$\langle V \rangle = \frac{\langle \frac{V}{e^{-\beta h(r)}} \rangle^*}{\langle \frac{1}{e^{-\beta h(r)}} \rangle^*} \quad (3.18)$$

no qual $\langle \dots \rangle^*$ corresponde a média do *ensemble* pela distribuição de probabilidades enviesadas como gerada pela simulação de dinâmica molecular perturbada.

A constante de equilíbrio calculada por esse método pode, de modo independente, considerar as perdas entrópicas relacionadas com a ligação do anestésico ao ser calculada como

$$K \approx \frac{\Delta v \Delta \omega}{8\pi^2} e^{-\beta \Delta G_{\text{ligação}}} \quad (3.19)$$

no qual $\Delta \omega$ e Δv são as liberdades de translação e rotação do ligante na cavidade. [65, 92, 105] Por uma aproximação quase-harmônica, as medidas $\Delta \omega$ e Δv foram estimadas pelas flutuações nos ângulos de Euler (Θ , Φ e Ψ , Figura 3.1) e pelas flutuações do ligante no sítio, respectivamente. [92] A fim de obter a energia livre absoluta a partir da constante de ligação, pode ser utilizada a seguinte relação

$$\Delta G_{\text{ligação}}^0 = -\frac{\ln[K \cdot C^0]}{k_B \cdot T} \quad (3.20)$$

no qual C^0 é a concentração padrão de 1 M.

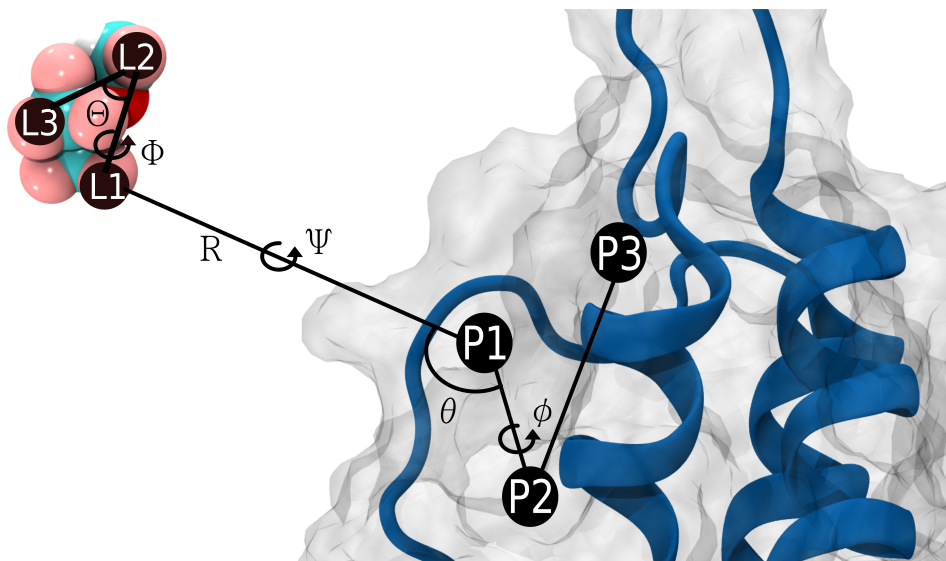


Figura 3.1: Representação do posicionamento de uma molécula de sevoflurano em relação ao canal iônico Kv1.2. Os ângulos de Euler, Θ , Φ e Ψ , indicam a configuração relativa do ligante, enquanto θ e ϕ caracterizam a forma de ataque ao canal iônico, calculados de acordo com três pontos no ligante e três pontos no receptor .

3.3.2 Free Energy Perturbation (FEP)

O método de *Free Energy Perturbation* é baseado na mecânica estatística e está centrado na equação de Zwanzig

$$\delta F_{A \rightarrow B} = -k_B T \ln \langle \exp[-\beta(H_B(\vec{r}, \vec{p}) - H_A(\vec{r}, \vec{p}))] \rangle_A \quad (3.21)$$

no qual k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, $H_A(\vec{r}, \vec{p})$ e $H_B(\vec{r}, \vec{p})$ são os Hamiltonianos dos estados A e B respectivamente. É importante notar que $\langle \dots \rangle_A$ denota a média do *ensemble* por todas as configurações representativas do estado inicial A . Um dos problemas para o cálculo correto ocorre quando não há uma boa sobreposição entre os estados de tal modo que a simulação pelo espaço de um estado não consegue amostragem suficiente do outro estado. Dessa forma, é realizada estratificação, por conseguinte são adicionados estados intermediários de maior sobreposição entre os estados iniciais e finais de interesse, não necessariamente estados físicos. Para tal objetivo, é utilizado um parâmetro de acoplamento λ . Esse parâmetro normalmente varia de 0 a 1 quando o sistema vai do estado inicial até o final. Em transformações alquímicas, o parâmetro de acoplamento está associado ao reescalonamento das interações não ligadas. Então o Hamiltoniano pode

ser considerado uma função do parâmetro λ , de modo que

$$\Delta A_{A \rightarrow B} = -k_B T \sum_{i=1}^N \ln \langle \exp[-\beta(H(\vec{r}, \vec{p}; \lambda_{i+1}) - H(\vec{r}, \vec{p}; \lambda_i))] \rangle_i \quad (3.22)$$

no qual N é o número de estágios intermediários.

Diante das diferenças ambas as metodologias, LIE e FEP, a menor demanda computacional do *docking*/LIE é uma característica crucial para metas que envolvem massivos cálculos como apresentados aqui os quais envolvem múltiplos sítios de ligação em canais e conformações distintas.

3.4 Protocolos Utilizados

As afinidades dos anestésicos gerais pelos sítios putativos em canais iônicos dependentes de voltagem foram quantificadas por meio de um conjunto de técnicas em modelagem molecular. Cálculos de *docking* foram realizados nas estruturas equilibradas em membrana dos canais Kv1.2, K-Shaw2 para identificar sítios putativos e gerar estruturas iniciais do complexo canal/anestésico. Esses complexos foram equilibrados com o uso de simulações de dinâmica molecular. Métodos avançados de cálculos de energia livre, FEP (*Free Energy Perturbation*, Perturbação de Energia Livre) e principalmente LIE (*Linear Interaction Energy*, Energia de Interação Linear), foram empregados para avaliar os modos de interação dos anestésicos com os canais, gerando constantes de afinidade comparáveis com experimentos. Este conjunto de dados permitiram selecionar os sítios com a maior probabilidade de causar efeitos sobre a mecânica dos canais. Além disso, mutações sítios dirigidas usando o pacote do *psfgen*, distribuído junto com o pacote do NAMD, foram realizadas na tentativa de alterar a sensibilidade dos canais de modo racional.

3.4.1 Protocolo das Simulações de Dinâmica Molecular

Para todas as simulações aqui realizadas, o programa utilizado foi o NAMD2 (versão 2.9) [80] em conjunto com o campo de força CHARMM [50, 66]. Essas escolhas são justificadas pelo bom desempenho do NAMD em regime massivamente paralelizado em conjunto com a boa parametrização do CHARMM com respeito a proteínas. As águas foram consideradas explicitamente pelo modelo TIP3. Foram utilizados o pistão e o termostato de Lagenvin para manutenção da pressão em $1atm$ e da temperatura em $300K$, portanto os sistemas simulados foram *ensembles* NPT. As interações de curto e longo alcance foram calculadas a cada $1fs$ e $2fs$ passos de integração respectivamente. Aliás, as interações eletrostáticas de longo alcance foram computadas a partir da metodologia PME. Com comprimento das

ligações de hidrogênio rígidos pelo algoritmo SHAKE, foi utilizado passo de integração do movimento de $2fs$ pelo algoritmo de Verlet. Os canais serão simulados inseridos em membranas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e solvatados por moléculas de água tratadas explicitamente pelo modelo TIP3 [56]. Em todos os sistemas foram aplicadas as condições periódicas de contorno para todas as dimensões, a fim de evitar efeitos de borda. As imagens e visualizações dos sistemas foram feitas com o *Visual Molecular Dynamics* (VMD) [52]. Como todos os átomos dos sistemas foram considerados explicitamente, utilizou-se clusters computacionais de pequeno e médio porte, alocados no Laboratório de Biologia Teórica e Computacional e no CPD-UnB para realização das simulações.

Após completa montagem dos sistemas com membrana lipídica e hidratação com inclusão de íons K^+ e Cl^- em concentração fisiológica de $150mM$, mas pH neutro, foram iniciadas as simulações (Tabela 3.1 e Figura 3.2). Para melhor manter a estrutura e estabilidade da proteína de membrana, foram aplicados potenciais harmônicos de valor $1kcal/mol$ na cadeia da proteína, de modo que o canal mantivesse sua posição para que a solução e a membrana se equilibrassem. O viés foi retirado gradualmente até que a proteína pudesse flutuar livremente.

Os sistemas estudados aqui são constituídos por canais iônicos obtidos por estruturas cristalográficas e modelos gerados computacionalmente. Cada um desses sistemas possuem quantidades definidas de átomos que compõe a proteína, o *bulk* e a membrana. A concentração de íons escolhida foi a fisiológica, $150mM$. Para cada uma das construções, com exceção do NaChBac, foram consideradas duas conformações, uma com o poro aberto e o VSD ativado e outra com o poro fechado e o VSD inativo.

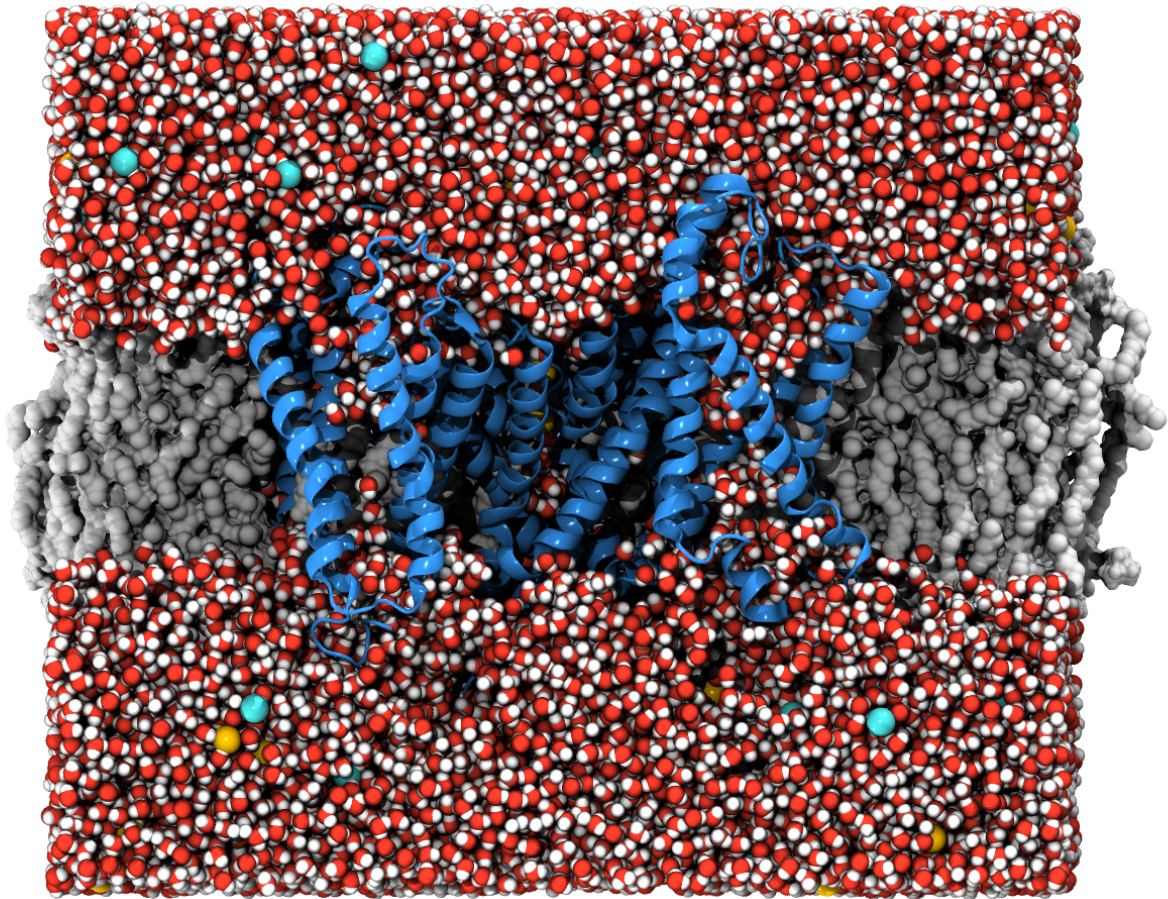


Figura 3.2: Representação da montagem de um sistema aqui simulado. O canal iônico dependente de voltagem é inserido em uma membrana de fosfatidilcolina (POPC, em cinza) e hidratado, sendo a água tratada explicitamente pelo modelo TIP3. Na solução há uma concentração de $150mM$ de KCl, sendo os íons K^+ e Cl^- representados por esferas amarelas e azuis, repectivamente.

Tabela 3.1: Informações gerais sobre a construção dos sistemas e estruturas dos receptores simulados por dinâmica molecular

Sistema	Estado	Lipídios	Cl^-	Cátion	Águas	Dimensões Å	Tempo	Código PDB	Referência
Kv1.2 Selvagem	Aberto	426	109	133 K^+	38585	138x144x99	26ns	2A79	Delemotte <i>et al.</i> , 2011 [27]
Kv1.2 Selvagem	Fechado	426	101	125 K^+	35942	128x138x107	25ns	-	Delemotte <i>et al.</i> , 2011 [27]
Kv1.2 G329T	Aberto	426	102	126 K^+	36108	138x144x95	22ns	-	Liang <i>et al.</i> , 2015 [61]
Kv1.2 G329T	Fechado	426	92	116 K^+	32449	127x139x100	30ns	-	Liang <i>et al.</i> , 2015 [61]
NaChBac	Fechado	434	130	102 Na^+	32449	127x139x100	30ns	-	Raju <i>et al.</i> , 2013 [81]

3.4.2 Protocolo de Docking

Depois de simulações por dinâmica molecular dos canais iônicos, foram escolhidas aleatoriamente 120 estruturas dos últimos 6ns de cada uma das trajetórias obtidas. Com o uso do programa *AutoDock Vina*, moléculas de sevoflurano foram ancoradas a essas estruturas obtendo assim um total de 6000 soluções para cada construção. O espaço de busca foi ajustado para considerar a proteína por inteiro. Os parâmetros de *exhaustiveness* para os cálculos foi ajustado em 400 e as ligações do anestésico foram definidas como flexíveis. As soluções foram então agrupadas e analisadas.

3.4.3 Protocolo das Simulações de Cálculo de Energia Livre

Para o cálculo das energias livres de ligação pelo método do *LIE*, foram realizados essencialmente dois tipos de simulação, uma do ligante em caixa de água e outra do ligante no sítio. Para o caso do ligante na cavidade, foi utilizado um viés de $\sim 10,0 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ para manutenção do anestésico no espaço em que se quer amostrar. A energia associada a esse viés foi contabilizada como em Equação 3.18. Por essas trajetórias, de aproximadamente 60ns, foram calculados os potenciais de interação com cada sítio e com o solvente. Os cálculos foram realizados pelo menos duas vezes para cada uma das cavidades escolhidas e o erro foi estimado de acordo com a distância entre os valores encontrados. O campo de força utilizado para o anestésico geral sevoflurano foram obtidos de Barber *et al.* [9] Já para os cálculos de energia livre pelo FEP apresentados em Perspectivas, a estratificação foi feita com modificação de λ em intervalos de 0,01, em 100 janelas, cada uma com 1000 passos de equilíbrio e 31000 passos de coleta de dados. Os parâmetros para a simulação dos cálculos de energia livre foram escolhidos como aqueles da Seção 3.4.1.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Comparação estrutural entre Kv1.2 Selvagem e Kv1.2 G329T

A simulação de dinâmica molecular é uma importante ferramenta para estudo da estrutura de proteínas e sua evolução no tempo. Todavia, para que medidas desejadas sejam avaliadas por essas trajetórias é necessário que a estrutura esteja estável e constante na conformação na qual se quer avaliar suas propriedades. Nesse estudo, as estruturas iniciais utilizadas já foram simuladas extensivamente, no entanto a mutação de uma glicina para treonina na posição 329 pode alterar o padrão estrutural da proteína (Figura 4.1). Dessa forma é importante avaliar se a estrutura está corretamente equilibrada a fim de obter medidas mais acuradas, além disso uma boa amostragem é crucial para considerar um *pool* maior de estruturas acessíveis nos cálculos subsequentes. Para todos os sistemas, Kv1.2 e Kv1.2 G329T, nas conformações com o *gate* aberto e fechado, os sistemas foram simulados inseridos em membrana fosfolipídica, embebidos em solução de moléculas de água tratadas explicitamente. O número total de moléculas de fosfolípidios e de água variou por sistema, para que se adequasse ao tamanho total da estrutura da proteína de membrana. As trajetórias tiveram duração total entre 22ns e 30ns, de modo que fosse suficiente para equilíbrio e amostragem de estruturas para *docking* molecular.

4.1.1 *Root Mean Square Deviation (RMSD)*

Com o intuito de avaliar a estabilidade e conformação dos canais iônicos, foram calculados o RMSD conforme seção 3.1.6, confrontando as estruturas obtidas com estruturas já conhecidas, de conformação bem definida, correspondentes a construção inicial do sistema [27, 95].

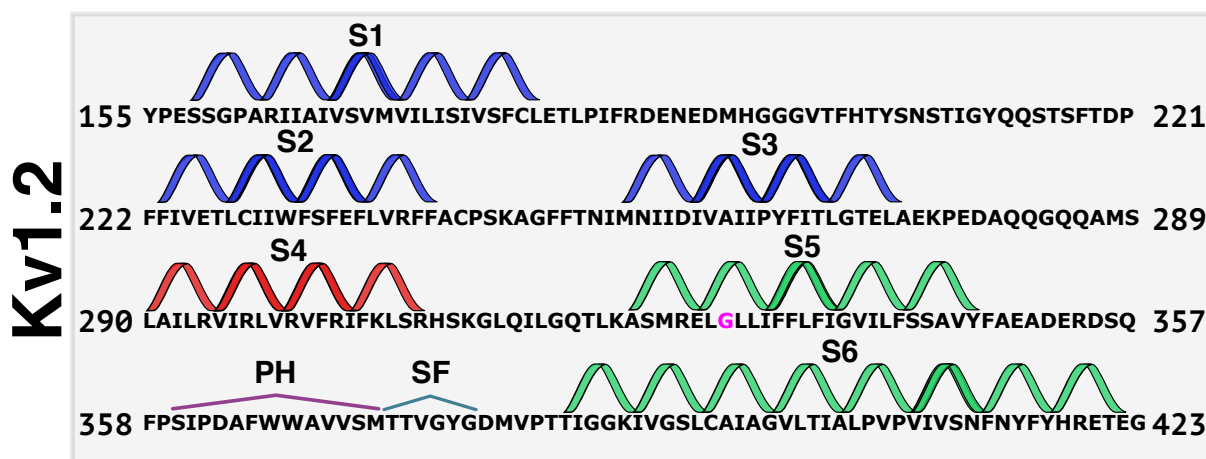


Figura 4.1: Resíduos que compõe o canal iônico Kv1.2, com indicações de regiões importantes. As hélices compreendem os resíduos abaixo dos esquemas indicados. Em rosa está destacado a glicina 329, a qual ao ser mutada para treonina confere maior sensibilidade a sevoflurano.

Para fins comparativos, foram escolhidas regiões chave da proteína, de forma que foram analisados o poro, os átomos pesados (excluindo átomos de hidrogênio), o *linker* entre as hélices S4 e S5 e a cadeia principal (todos os átomos pesados, exceto aqueles das cadeias laterais). Análise dos átomos pesados e da cadeia principal indicam a estabilidade da estrutura como um todo, enquanto averiguação do RMSD das regiões do poro e do *linker* podem informar sobre a manutenção da conformação em questão (Figura 4.2). A comparação das estruturas obtidas ao longo do tempo foi feita em relação à estrutura inicial de sua conformação correspondente.

Nos sistemas simulados, Kv1.2 selvagem e mutante, nas conformações aberta e fechada, o RMSD manteve-se com valores abaixo de 3Å, sendo que variações nesse intervalo foram correlacionadas com flutuações térmicas típicas da estrutura desses canais iônicos. [27, 55] Após 4ns de simulação, as variações em geral se mantiveram menores que 1Å para mais ou para menos, assim como não houve muita oscilação entre as subunidades, por conseguinte é considerado que as estruturas se mantiveram estáveis.

Entre as conformações, é possível notar uma maior variação na conformação aberta, tanto no Kv1.2 selvagem quanto no Kv1.2 mutante (Figura 4.2). Para a conformação aberta, os RMSDs possuíam em média valores de aproximadamente 0,5Å a mais em relação a conformação fechada. Aliás, o desvio padrão entre as subunidades é mais acentuado na conformação aberta. Essa maior variação e discrepância pode ocorrer visto a maior estabilidade poro no estado fechado [54], enquanto para o VSD ativado, o poro possui maior liberdade para alterar entre as conformações.

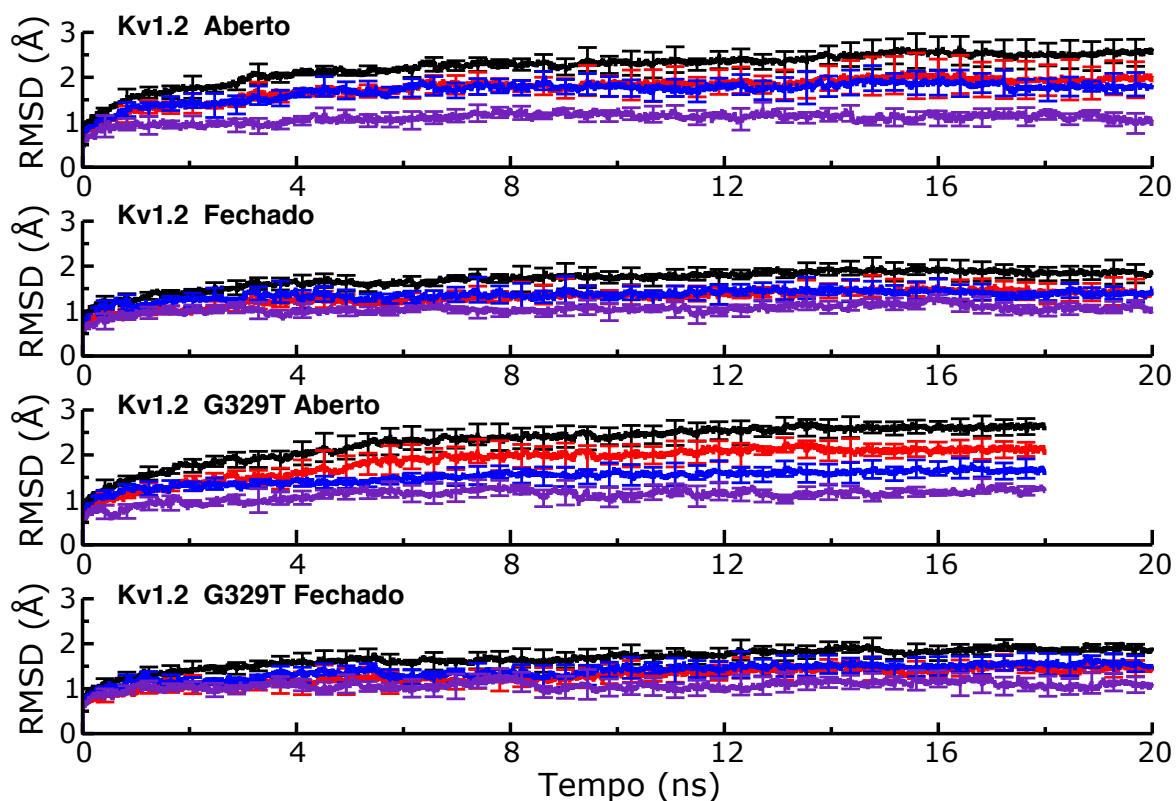


Figura 4.2: Valores de RMSD ao longo do tempo em trajetórias de dinâmica molecular para o canal Kv1.2 selvagem e mutante G329T, nas conformações aberta e fechada. Em preto está o RMSD dos átomos pesados de toda a proteína de membrana, em vermelho apenas da cadeia principal, em azul da região do poro e em lilás da região do *linker* entre o segmento S4 e S5. Cada valor corresponde à média do RMSD calculado para cada uma das subunidades do canal iônico, enquanto as barras de erro são referentes ao desvio padrão entre as subunidades.

A região do *linker* possui os menores valores de RMSD, de aproximadamente 1Å para todos os casos e, assim como ele, o poro apresentou variações menores do que se considerada a proteína de membrana por inteiro. É percebido então que durante toda a trajetória não ocorreu nenhuma modificação considerável de conformação.

Apesar da mutação pontual, o canal Kv1.2 G329T possui comportamento semelhante ao canal selvagem em relação aos valores de RMSD em ambas as conformações (Figura 4.3). Assim como o Kv1.2 selvagem, para os átomos pesados, o RMSD estabilizou-se em aproximadamente 2,5Å na conformação aberta e um pouco abaixo de 2,0Å na fechada. Na conformação fechada, não há nenhuma discrepância conspícua, todavia na conformação aberta é possível notar a região do poro possui RMSD um pouco menor no

mutante. Essa ligeira diferença é esperada em vista da mutação pontual escolhida. A alteração de uma glicina por uma treonina pode diminuir a flexibilidade de sua região na hélice S5 e, portanto, reduzir as flutuações na cadeia proteica, esse comportamento pode ser melhor apreciado por cálculos de RMSF.

4.1.2 *Root Mean Square Fluctuation (RMSF)*

A partir das medidas de RMSF de cada resíduo é possível verificar quais as regiões de maior flutuação e, logo, comparar qual a influência da mutação na movimentação da cadeia proteica. Os valores de RMSF mantiveram-se abaixo de 4Å para todos os sistemas, com exceção de um ponto no Kv1.2 aberto, entre as hélices S1 e S2 (Figura 4.3). Não houve muita distinção no RMSF do canal selvagem e mutante, de forma que o mutado acompanhou a tendência dos valores para os resíduos estudados. No ponto da mutação, o RMSF é menor em vista da substituição ser para um resíduo que permite menor movimentação, assim houve ligeiro decréscimo no valor de RMSF para a região inicial da hélice S5. A menor flexibilidade da cadeia com essa mutação poderia ficar mais perceptível caso fosse simulada a transição entre as conformações.

Nas regiões bem estruturadas das hélices S1-S6, o RMSF em geral ficou próximo ou abaixo de 2Å, em virtude da grande quantidade de contatos entre si e por estar envolto por membrana fosfolipídica, de forma que o efeito hidrofóbico mantém o enovelamento da construção. Por conseguinte, há maior manutenção da posição dos resíduos nas hélices. Em contrapartida, os *loops* entre as hélices ficam expostos diretamente ao solvente, tendo contatos principalmente com moléculas de água. Logo, possuem maior liberdade de movimentação e assim maior flutuação.

Ao contrastar as duas conformações, é averiguada na aberta maior movimentação no *loop* de conexão entre as hélices S1 e S2, local de maior valor de RMSF, sendo na fechada uma flutuação de menor intensidade. Enquanto na conformação aberta o valor de RMSF na região chega a mais que 4Å, na fechada o valor se limita a 3Å. No entanto, não há discrepância evidente entre as duas conformações nas regiões bem estruturadas.

Em suma, a mutação G329T confere menor movimentação para a região inicial da hélice S5, de modo que podem ocorrer mais evidentemente duas consequências para a funcionalidade dessa proteína de membrana. A menor liberdade pode dificultar as movimentações cooperativas para a transição do estado de repouso para o estado aberto [53], diminuindo assim a constante de equilíbrio da transição para a conformação aberta, porquanto há envolvimento de um estado denominado pré-aberto. Esse comportamento do mutante é semelhante ao do canal K-Shaw2, o qual possui essa mutação rara de uma glicina por uma treonina. Por outro lado, a substituição aumenta uma cadeia lateral na região o que pode modificar os sítios de ligação de anestésicos próximos, modificando a dis-

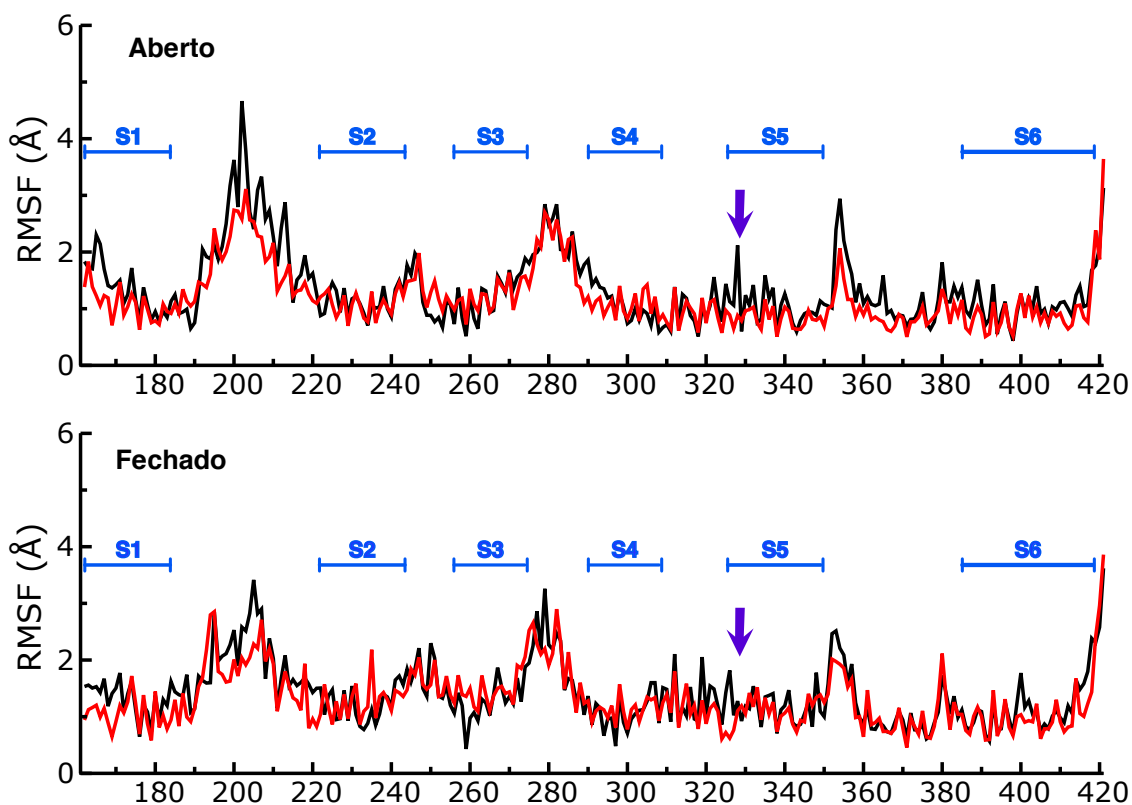


Figura 4.3: Valores de RMSF para cada resíduo em trajetórias de dinâmica molecular para o canal Kv1.2 selvagem, em preto, e mutado, em vermelho, nas conformações aberta e fechada. Marcações em azul indicam os resíduos componentes das principais hélices do sistema e a seta em lilás aponta para o resíduo 329, alvo de uma mutação pontual de glicina para treonina.

ponibilidade das cavidades. A inclusão dos estados pré-abertos do canal Kv1.2 no estudo poderia proporcionar informações cruciais sobre a ligação e alterações na disponibilidade do estado pela interação com anestésicos gerais.

4.2 Sítios Putativos de Ligação de Sevoflurano no canal Kv1.2

Para melhor avaliar as diferenças na região de ligação do anestésico nas diferentes conformações e nos diferentes canais pode ser usado o método de *docking* molecular. Regiões putativas que aparecem em apenas uma das construções podem indicar uma ligação pre-

ferencial que possivelmente alteraria o funcionamento do canal caso em solução com esse anestésico. Valores discrepantes de afinidade pela *scoring function* também apontam as preferências pelas diferentes cavidades. A partir da amostragem de estruturas possíveis adotadas pelo Kv1.2 selvagem e mutado, nas conformações aberta e fechada, foram encontradas diversas soluções possíveis para a ligação do anestésico sevoflurano nesses canais iônicos (Figura 4.4).

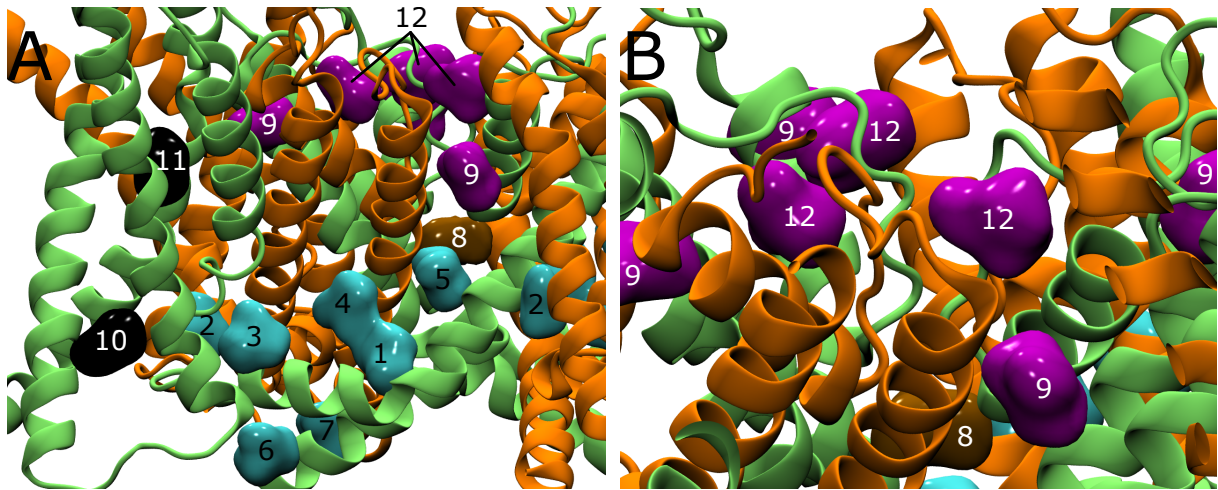


Figura 4.4: (A) Visão lateral do canal iônico Kv1.2, na qual os *blobs* coloridos representam as nuvens de soluções encontradas por *docking* molecular em que o número indica o sítio correspondente. As cores representam as quatro regiões com maior número de soluções, sendo elas o sensor de voltagem (preto), o *linker* S4-S5 (azul claro), o filtro de seletividade (lilás) e a cavidade central (ocre). (B) Visão aproximada na região do filtro de seletividade e extracelular.

Após análise qualitativa das regiões nas quais soluções foram encontradas, foi possível demarcar doze principais cavidades de ligação no canal, sete (sítios 1-7) delas voltadas para a região intracelular, próximas ao *linker* S4-S5 [10] e entre o início da hélice S5 e fim da hélice S6, uma (sítio 8) na cavidade central, no caminho de permeação do íon, duas (sítios 10 e 11) no VSD e duas (sítios 9 e 12) próximas ao filtro de seletividade, na região voltada para fora da célula.

Os sítios próximos ao *linker* podem estar diretamente associados a modulação do acoplamento entre a movimentação do S4 do VSD, por ativação ou desativação, e a abertura ou fechamento do poro. Portanto, ligação nessa região influenciaria na transição entre os estados.[97] Uma outra característica desses sítios é o acesso não prontamente disponível para ligação, dada a separação dessa região com o meio extracelular. Assim, a ligação possui influência direta da afinidade do ligante pela membrana. O sítio 5, na região inicial da hélice S5 adjacente ao *linker*, é próximo à mutação G329T, por conseguinte essa

substituição pode ser responsável por modificação de afinidade nesse sítio ou alteração de sua disponibilidade, e, então, ser crucial à sensibilidade do canal iônico ao ligante.

Presença de anestésicos na região da cavidade central pode bloquear o caminho de permeação do canal iônico, portanto estaria relacionada com uma inibição da condução. Contudo, soluções nesse volume podem ser falsos positivos, visto a dificuldade de acesso pelo anestésico à cavidade e pela alta probabilidade dela estar ocupada por íons. Quanto aos sítios no VSD, estes podem influenciar no funcionamento e sensibilidade desse domínio ao campo elétrico, além de poder modificar o perfil de hidratação característico. No entanto, a aferição da influência na ligação nesse sítio é complicada e a interação nessa região pode gerar modificações no equilíbrio conformacional do canal iônico mais complexas do que a apresentada nos resultados experimentais.

Por estar voltado à parte extracelular, a região próxima ao filtro de seletividade está prontamente exposta à ligação. Além disso, ela é associada aos estados inativos do canal, de forma à interação nessa região poder alterar o comportamento do filtro de seletividade, impedindo estericamente estados em que as carbonilas não estejam alinhadas (Figura 7.1) ou, ainda, desidratando a região e diminuindo a quantidade de pontes de hidrogênio. [76]

Para análise mais aprofundada das soluções de *docking* molecular, foram escolhidas apenas as soluções com as 50 melhores energias dadas pela *scoring function* de 120 cálculos de *docking* independentes realizados em 120 *frames* distintos de cada uma das construções. Assim, para cada um dos sistemas foram analisadas e agrupadas 6000 soluções. Após a clusterização, a nuvem de soluções foi atribuída a sua região determinada pela numeração de sítio correspondente e então foram calculados as energias de ligação médias dadas pela *scoring function* do *AutoDock Vina*. No número de soluções acumulado para cada sistema não havia um total de 6000 soluções, visto que algumas delas foram encontradas isoladas e em regiões não previamente determinadas como sítios importantes de ligação.

O sítio 9 foi preponderante entre os resultados do Kv1.2 selvagem aberto (Figura 4.5). A maior parte de suas soluções foram encontradas na região extracelular ou no VSD e poucas foram aquelas na região do *linker*. A diferença nas energias livres foi pequena, estando todas elas próximas a $-5,1 \text{ kcal/mol}$, com diferença máxima de $0,3 \text{ kcal/mol}$ (Tabela 4.1). Ao verificar os contatos em cada sítio realizados pelas soluções, é possível perceber uma grande quantidade deles com aminoácidos tipicamente hidrofóbicos, como a isoleucina e a fenilalanina, com alguns contatos com aminoácidos hidrofílicos, como serina e glutamina.

A dispersão das soluções entre os sítios foi consideravelmente diferente entre as conformações. No canal Kv1.2 selvagem na conformação fechada, o maior número de soluções foi encontrado na região do *linker* S4-S5, com uma contagem significativamente menor na região extracelular (Figura 4.6). O sítio 3 foi o de maior número de soluções, sendo mais

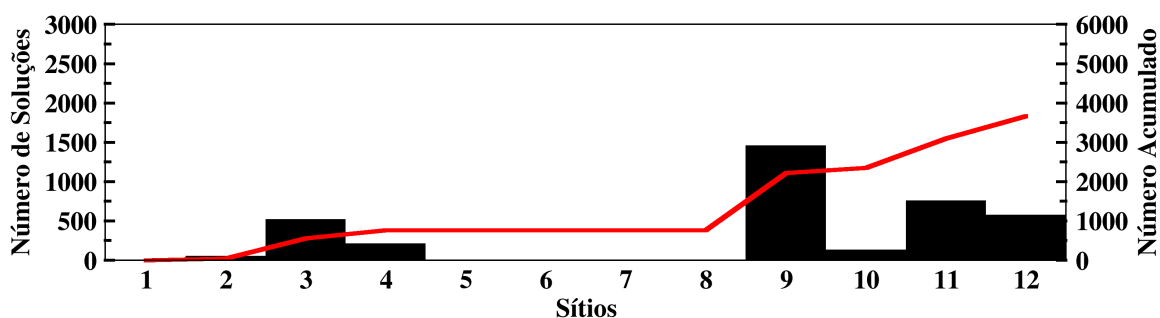


Figura 4.5: Em barras pretas está o número de soluções de *docking* molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por *docking* do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação aberta. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.

Tabela 4.1: Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação aberta para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de *docking* molecular.

Sítio	Energia [kcal/mol]	Desvio [kcal/mol]
1	-	-
2	-5.0	0.1
3	-5.1	0.2
4	-5.0	0.2
5	-5.0	0.1
6	-5.0	0.1
7	-	-
8	-	-
9	-5.1	0.2
10	-5.0	0.1
11	-5.1	0.2
12	-5.3	0.3

da metade de todos modos de ligação encontrados para a conformação fechada localizados nesse sítio. A diferença considerável entre a quantidade de soluções entre as conformações pode ocorrer pela posição do *linker* S4-S5, o qual acopla fisicamente a posição do VSD e a abertura fechamento do poro. Aliás, dado o poro estar constrito nessa conformação, foram observadas soluções no caminho de permeação do íon, no sítio 8. Do mesmo modo que o canal aberto, as energias obtidas do *docking* molecular não ajudaram a elucidar quais seriam os sítios com afinidades consideravelmente maiores (Tabela 4.2), dado que por essa análise todos os sítios possuíam energia de ligação muito similar ainda que os sítios estão

localizados em regiões muito discrepantes da proteína.

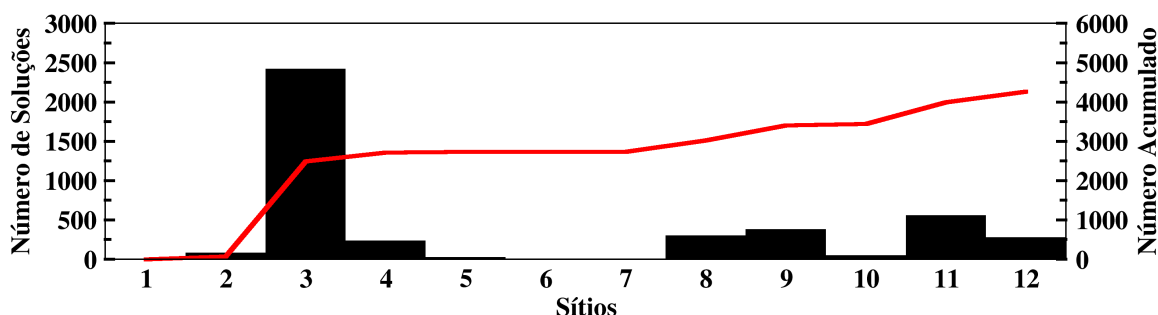


Figura 4.6: Em barras pretas está o número de soluções de *docking* molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por *docking* do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação fechada. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.

Tabela 4.2: Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 selvagem na conformação fechada para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de *docking* molecular

Sítio	Energia [kcal/mol]	Desvio [kcal/mol]
1	-	-
2	-5.2	0.2
3	-5.3	0.2
4	-5.3	0.2
5	-5.3	0.2
6	-	-
7	-	-
8	-5.2	0.1
9	-5.2	0.2
10	-5.2	0.1
11	-5.3	0.2
12	-5.3	0.2

Nas construções com a mutação era esperada uma quantidade diferencial de soluções próximas a mutação, principalmente no sítio 5 (Figura 4.7). No entanto, poucas diferenças foram encontradas entre o número de solução no selvagem e no mutante de acordo com suas respectivas conformações. Para o canal Kv1.2 G329T na conformação aberta, assim como no canal selvagem na mesma conformação, o sítio de maior número de soluções é o sítio 9, não obstante foram encontradas mais soluções no sítio 1 e menos soluções

atrás do filtro de seletividade (sítio 12.) Como nos casos anteriores, as energias não foram significativamente discrepantes, novamente estando próximas a $-5,1\text{kcal/mol}$, com exceção do sítio 7, o qual se destaca por energia livre de ligação mais baixa que os demais sítios em $-5,85\text{kcal/mol}$, ainda que o número de soluções para essa posição seja muito baixo, portanto podendo ser uma solução de baixa disponibilidade entre, dada a flutuação da arquitetura do sítio.

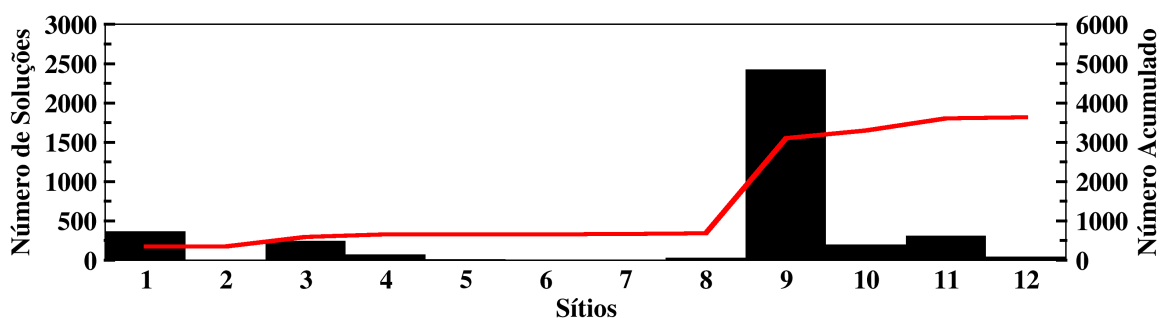


Figura 4.7: Em barras pretas está o número de soluções de *docking* molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por *docking* do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 G329T na conformação aberta. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.

Tabela 4.3: Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 G329T na conformação aberta para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de *docking* molecular

Sítio	Energia [kcal/mol]	Desvio [kcal/mol]
1	-5.1	0.2
2	-	-
3	-5.0	0.2
4	-5.0	0.1
5	-5.1	0.1
6	-5.1	0.1
7	-5.9	0.2
8	-5.2	0.2
9	-5.1	0.2
10	-5.0	0.2
11	-5.1	0.2
12	-5.2	0.3

No Kv1.2 G329T fechado, foi encontrado maior número de soluções no sítio 3, próximo ao *linker* (Figura 4.8). Esse sítio possui mais que a metade do número total de soluções encontrado. Em seguida, o sítio 11 com quase 2000, juntamente com os sítios 8 e 9 compõe o grupo dos sítios com quantidade de modos de ligação maiores que 100. Em menor número, estão a cavidade atrás do filtro de seletividade (sítio 12), um dos sítios do *linker* S4-S5 (sítio 1) e a região próxima a mutação (sítio 5). Ainda que com uma quantidade baixa de soluções no sítio 5, essa foi a construção com maior quantidade de soluções nessa cavidade. Nenhuma delas foi encontrada para o sítio 2, nem para o sítio 6. Ainda para o canal Kv1.2 G329T fechado, foi verificado que não há uma diferença relevante entre as energias livres de ligação entre os sítios, ainda que o número absoluto de soluções de menor energia seja bem variável de acordo com o sítio. Ao comparar com o canal selvagem na mesma conformação, a distinção é difícil. Em ambos, a cavidade de maior número de modos e ligação é o sítio 3, na região do *linker*. Afinal, não é possível reconhecer, entre as medidas feitas até então, a forma com a qual a mutação interfere na interação entre o canal sendo estudado e o anestésico sevoflurano.

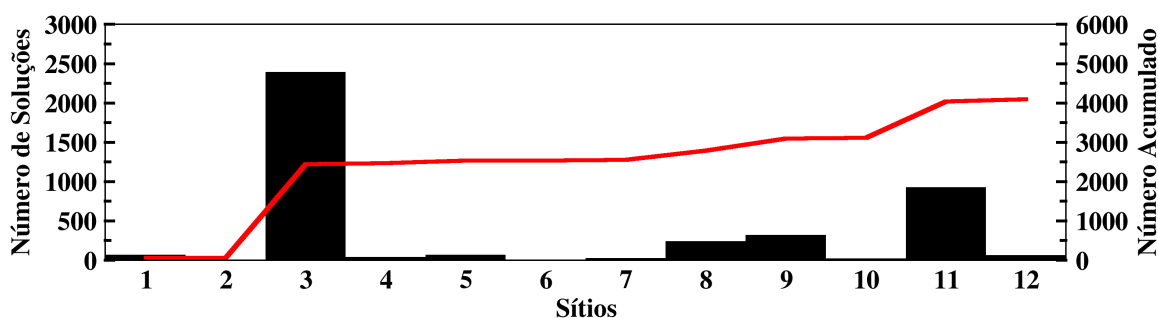


Figura 4.8: Em barras pretas está o número de soluções de *docking* molecular encontradas para cada sítio definido da proteína de membrana. As soluções foram obtidas por *docking* do sevoflurano contra o canal iônico Kv1.2 G329T na conformação fechada. Em vermelho é a curva de soluções totais acumuladas pelos sítios de ligação.

Ao avaliar os dados apresentados como um conjunto, a distribuição dos modos de ligação em cada sítio é conformação dependente, dessa forma é possível que a conformação do canal possa ser identificada por meio do arranjo do número absoluto das soluções por região. Contudo, o canal mutante não possui uma característica diferencial em relação ao canal selvagem.

A efetiva acurácia do procedimento de *docking* combinado com LIE na descrição dos modos de interação dos anestésicos foi confrontada a recente estudos realizados pelo grupo

Tabela 4.4: Médias e desvios da energia livre de ligação do sevoflurano no canal iônico Kv1.2 G329T na conformação fechada para o grupo de soluções de cada sítio de ligação definido. Os dados encontrados são referentes aos cálculos de *docking* molecular

Sítio	Energia [kcal/mol]	Desvio [kcal/mol]
1	-5.2	0.1
2	-	-
3	-5.4	0.2
4	-5.3	0.2
5	-5.3	0.2
6	-	-
7	-5.2	0.1
8	-5.2	0.1
9	-5.3	0.2
10	-5.2	0.1
11	-5.3	0.2
12	-5.4	0.2

do Dr. Klein no sistema NaChBac/Isoflurano.[81] Contudo, o *docking* molecular ainda foi um passo essencial para a definição das regiões importantes e construção dos melhores complexos para cálculos posteriores de afinidade.

4.3 Comparação com Resultados de Afinidade do Isoflurano ao Canal NaChBac

Para os cálculos de LIE, é importante que os parâmetros empíricos sejam ajustados de forma correta. Além disso, a fim de verificar quão acurados foram os resultados encontrados por *docking* molecular e para ajuda da escolha dos melhores sítios, visto a inviabilidade de cálculo da afinidade por métodos mais rigorosos para todos os sítios, foram realizados *docking* molecular de isoflurano contra estruturas equilibradas do NaChBac e em seguida cálculos das componentes de van der Waals e eletrostática da energia de ligação para comparação com resultados encontrados por Raju *et al.* [81]. Nesse estudo, os autores utilizaram longas simulações de *flooding* do canal iônico NaChBac em membrana fosfolipídica para identificar possíveis sítios de ligação de isoflurano, seguidos pela quantificação de afinidade de ligação pelo método de perturbação da energia livre (FEP).

Os resultados do *flooding* indicam quatro principais sítios, um na região do filtro de seletividade, outro na do *linker* S4-S5, um terceiro na região da cavidade central e por fim um nas janelas típicas desse canal iônico. De comportamento interessante, o sítio na região do *linker* possuiu ocupância assimétrica durante a simulação, ou seja, nem sempre esse sítio estava ocupado em todas as subunidades e, ainda, por algum tempo, a cavidade

Tabela 4.5: Energia livre de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$ calculada pelo método de *FEP*, juntamente com a constante de ligação de uma molécula de isoflurano com um sítio definido no canal iônico NaChBac [81].

Sítio	$K_{\text{ligação}}[mM^{-1}]$	$\Delta G_{\text{ligação}}[kcal/mol]$
Extracelular	1, 2	$-4, 2 \pm 0, 8$
<i>Linker</i>	0, 5	$-3, 7 \pm 0, 4$

Tabela 4.6: Energia livre de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$ calculada pelo método de *docking*, juntamente com a constante de ligação de isoflurano com um sítio definido no canal iônico NaChBac .

Sítio	$K_{\text{ligação}}[mM^{-1}]$	$\Delta G_{\text{ligação}}[kcal/mol]$
Extracelular	0, 7	$-3, 9$
<i>Linker</i>	0, 02	$-1, 7$

em uma subunidade foi ocupada por duas moléculas de isoflurano concomitantemente. A energia encontrada para a ligação de uma segunda molécula foi favorável, no entanto menos negativa que a ligação da primeira.

Para dois desses sítios localizados por *flooding*, no *linker* e na região extracelular, o grupo também realizou extensivos cálculos de FEP, a fim de atingir convergência dos cálculos. [81] As energias livres de ligação encontradas para os sítios são próximas entre si. Além disso foram estimadas as constantes de ligação, as quais estavam de acordo com valores fisiológicos (Tabela 4.5).

Aqui, foi utilizado o procedimento de busca pelos sítios de ligação do isoflurano no canal NaChBac por *docking* molecular, seguido por cálculos de afinidade pelo LIE. Logo, foi simulado por dinâmica molecular na conformação fechada o modelo do NaChBac em membrana fosfolipídica. [11] Em seguida, as estruturas obtidas foram consideradas em cálculos de *docking*. De forma independente, foi possível identificar dentre as nuvens de soluções, o grupo de sítios indicados pelo método de *flooding* (Figura 4.9). No entanto, a energia livre de ligação encontrada apenas pelo uso do *docking* não foi suficiente para recuperar a afinidade dos sítios, com diferenças na energia livre de até $2kcal/mol$ (Tabela 4.6). Novamente, a exatidão da estimativa da afinidade obtida de forma simples pela técnica de *docking* molecular é questionada. Novos esquemas para consideração das estimativas de energia livre originadas do *docking* ou evolução da *scoring function* podem solucionar a questão.

Por conseguinte, os resultados alcançados pelo *docking* permitem obter putativas estruturas do complexo canal-anestésico, todavia uma outra técnica é necessária conferir estimativas de afinidade mais acuradas. A partir dos dados de Raju *et al* [81], foi possível obter a calibração para os parâmetros para o método do LIE (Equação 3.15). Para isso, foram calculadas as energias de interação de *vdW* e eletrostática para o isoflurano no canal

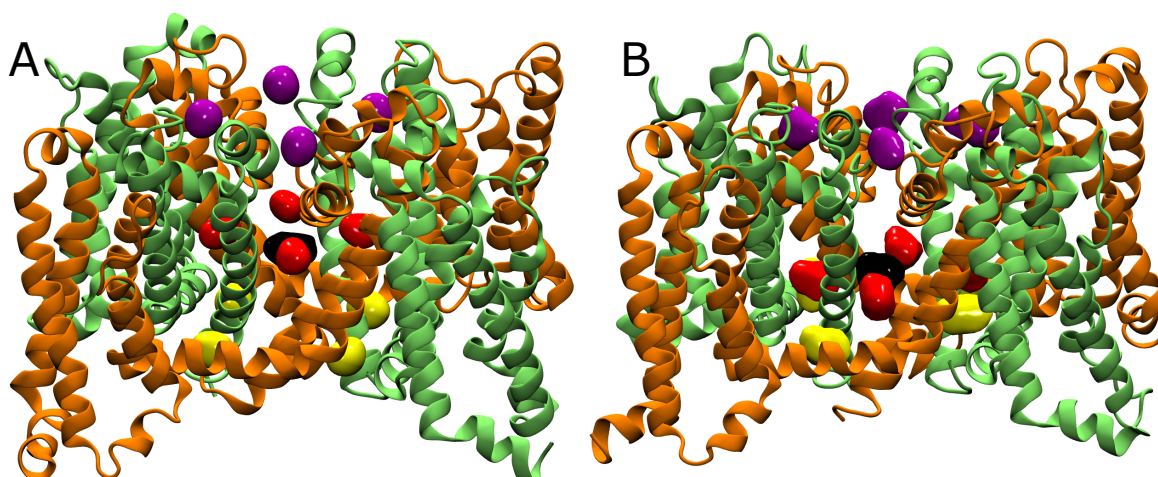


Figura 4.9: (A) Regiões com maior ocupância de isoflurano ao longo de uma simulação de *flooding*. Em lilás está o sítio extracelular, em vermelho o sítio das janelas do canal iônico, em preto o sítio do poro e, por fim, em amarelo os sítios do *linker*. (B) Sítios de ligação encontrados por cálculos de *docking* molecular no canal NaChBac na conformação fechada. O código de cores é o mesmo utilizado em A.

NaChBac fechado (Equação 3.16, Figura 4.10). Esse sistema é composto do canal iônico inserido em membrana fosfolipídica com moléculas de água tratadas explicitamente. Além disso, cada um dos quatro sítios extracelular e do *linker*, pela característica tetramérica, foi ocupado por uma molécula do anestésico geral isoflurano. Por possuir quatro réplicas de cada sítio, foi possível, em uma mesma simulação desse canal iônico, obter quatro estimativas dos potenciais de vdW e eletrostático.

Tanto para o potencial eletrostático quanto para o de vdW, nos dois sítios considerados, houveram variações na medida, sendo que em algumas réplicas a variação no potencial eletrostático chegaram a quase 10kcal/mol . Não obstante, é possível notar que para todos os casos considerados a média das energias de interação foram mantidas constantes ao longo do tempo da trajetória, sendo que em alguns pontos uma maior variação pode ocorrer pela flutuação nas cadeias laterais próximas ao sítio, modificando as interações com o ligante. O valor do potencial vdW foi sempre mais negativo do que o potencial de interação eletrostático para os dois sítios, em virtude da característica apolar do ligante. Em comparação, os sítios do *linker* apresentaram uma média mais negativa para a energia de vdW e eletrostática do que o sítio extracelular, por conseguinte, considerando apenas a contribuição dos potenciais não-ligados, é de se esperar uma energia de ligação ligeiramente mais negativa para o sítio do *linker*, em detrimento aos resultados encontrados pelo FEP. Contudo, esses mesmos resultados calculados pelo método FEP são consideravelmente próximos e se observadas suas incertezas, pode-se considerar como

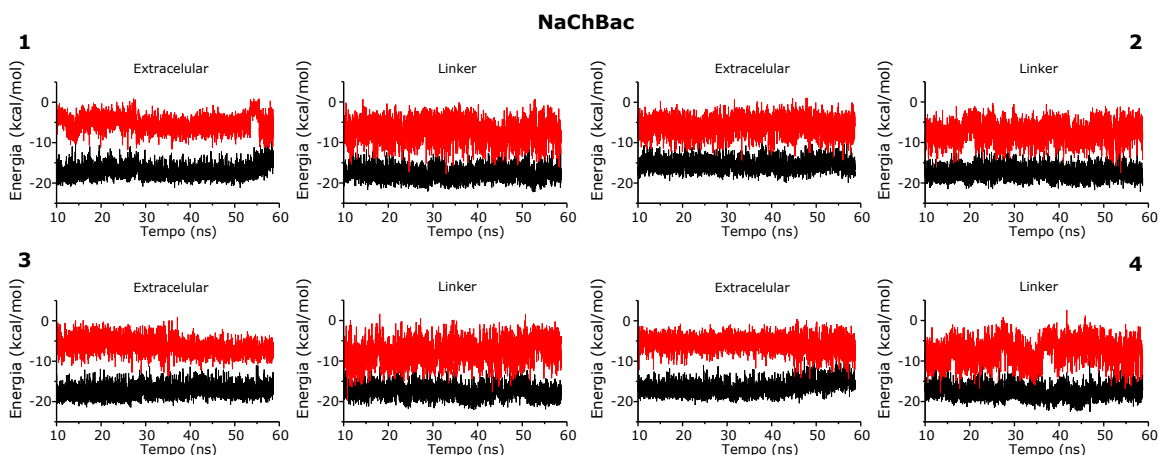


Figura 4.10: Potenciais de interação de van der Waals (preto) e eletrostática (vermelho) pelo tempo para cada molécula de isoflurano (1, 2, 3 e 4). É discriminado o sítio, extracelular ou *linker* S4-S5, do NaChBac no qual o ligante se encontrava.

os sítios possuindo a mesma energia livre de ligação.

Nesse trabalho foram escolhidos os parâmetros empíricos α e β como 0,18 e 0,34, assim como em outros trabalhos que conseguiram com sucesso reproduzir energias livres experimentais de uma variedade de complexos receptor-ligante.[108, 16, 58] Esses valores não são tão críticos, visto que pesam de forma equivalente tanto a contribuição dos potenciais de interação advindos do complexo, quanto a contribuição dos potenciais do ligante livre em solução.

Portanto, as energias livres obtidas ainda foram acrescidas de um parâmetro $\gamma = -6,9 \text{ kcal/mol}$ para que as afinidades de ligação do sistema NaChBac/isoflurano fossem devidamente alcançadas. Após cálculo da energia associada à perda entrópica rotacional e translacional foram estimadas as energias livres absolutas de ligação para os dois sítios pelo método do LIE(Tabela 4.7). Nessas condições, o sítio do *linker* foi o de maior afinidade, seguido com poucas diferenças pelo sítio extracelular. Caso sejam consideradas as incertezas, os valores encontrados são congruentes ao trabalho de Raju *et al* [81].

Em seguida a obtenção dos parâmetros de ajuste pelo método do LIE, é possível o cálculo da afinidade de outros complexos que envolvam a ligação de anestésicos gerais com sítios similares de canais iônicos. Como passo seguinte, foram escolhidos os sítios de ligação com maior potencial de modulação do canal, visto que apenas a ligação pode não influenciar a funcionalidade do canal. Logo, foram calculados as energias livres absolutas de ligação para então aplicar a teoria apresentada na tentativa de elucidar o impacto da interação do anestésico na condução iônica.

Tabela 4.7: Valores calculados das médias dos potenciais de interação do isoflurano com o canal iônico NaChBac, $\langle V^{vdW} \rangle$ e $\langle V^{elet} \rangle$, juntamente com valores calculados de liberdade rotacional, ΔV , e translacional $\Delta\omega$. São também apresentadas as energias livres de ligação, $\Delta G_{ligação}$, e absoluta, $\Delta G_{ligação}^0$, obtidas pelo método LIE. Para estas estimativas, foram utilizados os potenciais do isoflurano no ambiente de referência, uma solução aquosa, na qual o valor do potencial de van der Waals equivale a $\langle V^{vdW} \rangle = -11,60 \pm 1,43 kcal/mol$ e o potencial eletrostático $\langle V^{elet} \rangle = -6,10 \pm 2,30 kcal/mol$. Os valores empíricos adotados foram $\alpha = 0,18$, $\beta = 0,34$ e $\gamma = -6,90 kcal/mol$

Sítio	$\langle V^{elet} \rangle [kcal/mol]$	$\langle V^{vdW} \rangle [kcal/mol]$	$\Delta G_{ligação} [kcal/mol]$	$K_B [mM^{-1}]$	$\Delta V [\text{Å}^3]$	$\Delta\omega [rad^3]$	$\Delta G_{ligação}^0 [kcal/mol]$
Extracelular	$-5,4 \pm 0,4$	$-16,7 \pm 0,7$	$-7,5 \pm 0,8$	$0,44 \pm 0,05$	16,34	13,44	-3,63
Linker	$-7,50 \pm 0,05$	$-17,64 \pm 0,08$	$-8,3 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,2$	8,69	28,12	-4,59

4.4 Energias Livres de Ligação do Anestésico Geral Sevoflurano com o Canal de Potássio Dependente de Voltagem

Em virtude dos resultados experimentais [61] que indicam que o anestésico sevoflurano potencializa o canal Kv1.2 de dois modos principais, deslocando a curva condutância/voltagem para a esquerda e aumentando a condutância máxima, foram realizados cálculos de afinidade do anestésico geral sevoflurano pelo canal iônico Kv1.2. Além disso, por mutações e métodos eletrofisiológicos, foi demonstrado que esse efeito de potenciação é independente do domínio T1. Ainda, uma mutação pontual no resíduo 329, de glicina para treonina, intensifica o efeito do anestésico de forma análoga à potenciação de outro canal iônico de potássio, o K-Shaw2. Dessa forma os canais iônicos para a investigação estavam ausentes do domínio T1, aliás foi realizada a mutação indicada na estrutura de Kv1.2 e simulado esse canal mutado, assim como o canal selvagem.

À luz dos efeitos de potenciação, foram escolhidos quatro sítios para os cálculos de energia livre. Como representativo da região do *linker*, visto a semelhança com o sítio do *linker* no NaChBac [81] e o grande número de soluções de *docking* molecular, o sítio 3 foi um dos eleitos. Assim como o sítio 3, o sítio 9 é também análogo ao sítio extracelular para o canal NaChBac e possui um número considerável de soluções na conformação aberta. Dada a proximidade do sítio com a mutação G329T, foi também incluído o sítio 5. Por fim, foi analisado o sítio 12, por sua localização atrás do filtro de seletividade, podendo estar influenciando na dinâmica da inativação, de forma a alterar por exemplo a hidratação dessa região.

Não foram considerados o sítio da cavidade central, visto que a ocupação dessa cavidade essencialmente estaria bloqueando a passagem de íons e, portanto estaria relacionado a modulação negativa do canal iônico, em contrapartida aos dados de eletrofisiologia. Outrossim, os sítios do VSD não estão nem próximos a mutação, nem foram encontrados também no estudo conduzido por Raju *et al.* [81]. Ainda, quanto aos outros sítios, o baixo número de soluções encontradas foi um fator que contribuiu para considerá-los em estudos futuros apenas.

Para a efetiva conta do LIE, foram então simulados por dinâmica molecular os canais Kv1.2 selvagem e Kv1.2 G329T, nas conformações aberta e fechada, com os sítios 3, 5, 9 e 12 ocupados por moléculas de sevoflurano. Por necessitar de menor tempo de simulação, os sistemas foram construídos de tal forma a possuir dois de cada um dos sítios ocupados concomitantemente. Assim, para cada sítio e para cada construção foram obtidas duas réplicas. Os sistemas foram montados de modo que sítios muito próximos não estivessem

sido ocupados simultaneamente. Afinal, por essas trajetórias foram avaliados a energia potencial de interação de vdW e eletrostática (Figura 4.11).

Em geral, ao comparar as réplicas não há uma grande diferença no perfil dos potenciais de interação. Quanto à média das energias (Tabela 4.8), o potencial de vdW dispõe de valores mais negativos de energia de interação, entre $-19kcal/mol$ e $-14kcal/mol$, se confrontado com os valores do potencial eletrostático, entre $-10kcal/mol$ e $-1kcal/mol$. Ainda que lipofílico, por sua natureza polar e constituição de vários átomos de flúor, o sevoflurano possui um potencial de interação eletrostática com a cavidade proteica. [9]

O sítio 12 da região do filtro de seletividade apresentou os potenciais de interação mais negativos entre as cavidades, contudo possuem padrão similar entre as conformações e entre as isoformas. Por outro lado, as estimativas mais positivas foram do sítio 5. Nesse sítio próximo a mutação é possível verificar uma distinção entre as conformações, sendo o potencial eletrostático consideravelmente mais negativo na conformação fechada. Para o sítio 3, nos canais mutados os potenciais de interação foram mais negativos. Já para o sítio 9, o canal aberto mutado foi o de energia potencial mais negativa.

A partir dos resultados das energias potenciais pela simulação dos complexos, as afinidades encontradas para os sítios escolhidos são heterogêneas e variam de $0,018mM^{-1}$ até $0,408mM^{-1}$ (Figura 4.12, Tabela 4.8). Ainda que as diferenças entre as energias livres de ligação obtidas sejam pequenas, por envolver um cálculo exponencial, as constantes de ligação são consideravelmente discrepantes. As estimativas dessas constantes de ligação estão na mesma ordem de grandeza dos valores encontrados para a interação na região do *linker* do NaChBac.

O sítio de maior afinidade relativa é o sítio 12, sendo sua menor constante de ligação em torno $0,3mM^{-1}$. Tanto o potencial eletrostático, quanto o potencial de van der Waals contribuíram fortemente para as relativas altas afinidades para esse sítio, ainda que o ligante seja mais restrito nessa cavidade, dada sua característica mais enterrada e de menor volume.

Entre os sítios escolhidos, as afinidades para os sítios 3 e 9 possuem dependência conformacional modesta, todavia com preferência para o canal Kv1.2 G329T na conformação aberta. Em atenção ao sítio 9, é possível notar uma inversão para a preferência conformacional se comparadas os canais selvagem e mutante. Quando a glicina é mutada para treonina, o sevoflurano não mais possui maior afinidade por esse sítio na conformação fechada. Desse modo, a mutação pode estar relacionada a potenciação por aumento de afinidade a cavidade 9.

Em contraste, as constantes de ligação para o sítio 5 do canal na conformação fechada são aproximadamente sete vezes maiores que na conformação aberta, tanto na proteína selvagem quanto na mutante. Já para o sítio 12 não é possível notar uma conformação ou

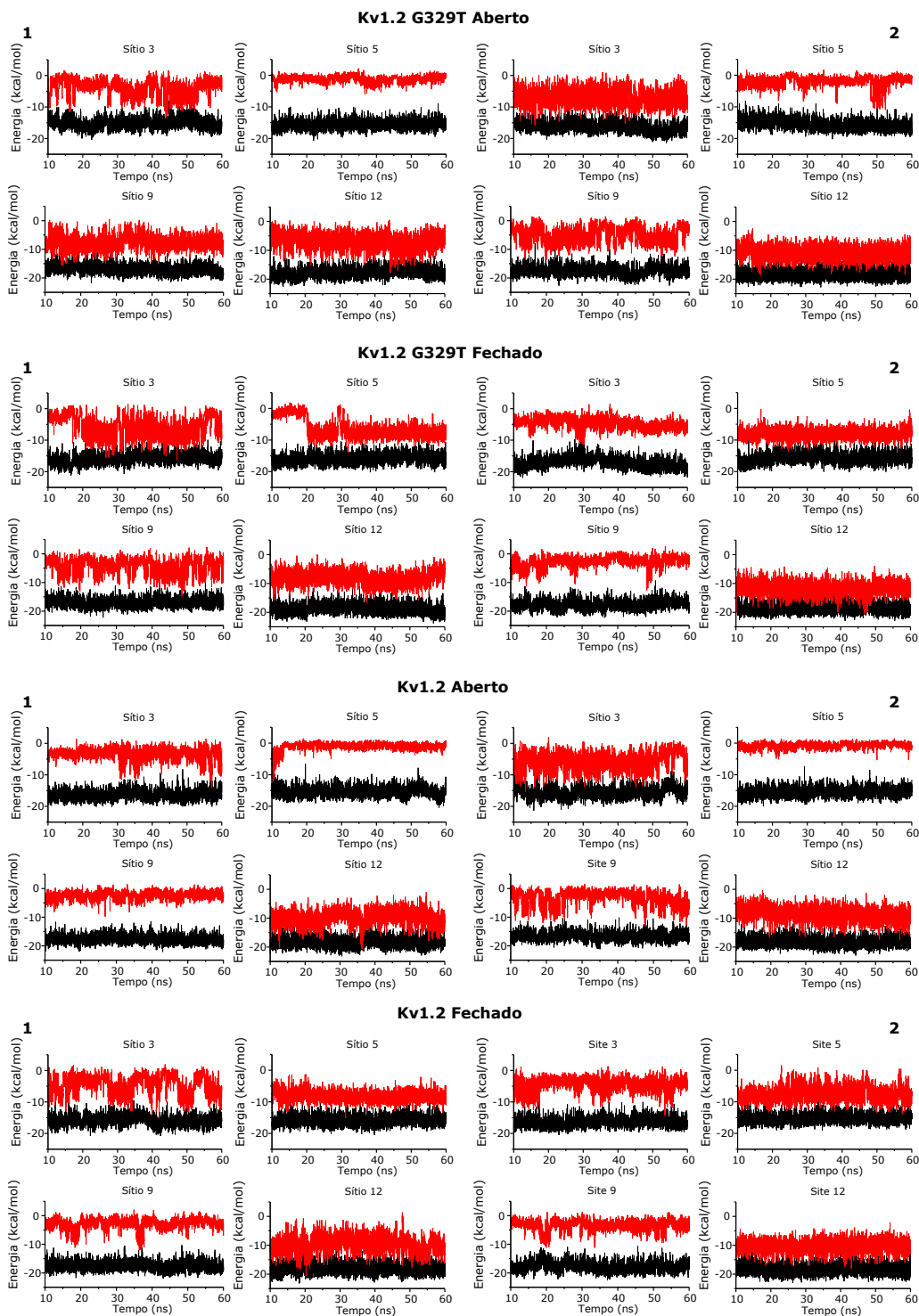


Figura 4.11: Potenciais de interação de van der Waals (preto) e eletrostática (vermelho) pelo tempo para as duas réplicas de sevoffurano (1 e 2) em cada sítio escolhido (3, 5, 9 e 12), dos canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T, nas conformações aberta e fechada.

isoforma preferencial para ligação. Esses resultados indicam que a modulação do canal Kv1.2 por sevoflurano envolve múltiplos sítios com características e afinidades distintas, contudo não é possível concluir pelas afinidades qual é o impacto da mutação na interação do canal com o anestésico geral.

Os resultados apontam uma grande afinidade de ligação do sevoflurano pelo sítio 12, maiores do que aquelas encontradas para os outros sítios, independente do estado do canal. Dado a sua proximidade ao filtro de seletividade, é provável que a alta afinidade do sevoflurano pelo sítio 12 favoreça a potenciação, de modo a estabilizar as carbonilas que coordenam os íons em um estado que favorece a permeação. Melhor conhecimento da dinâmica e estrutura dos canais não condutivos podem revelar a importância desse sítio no aumento da condutância dos canais iônicos dependentes de voltagem.

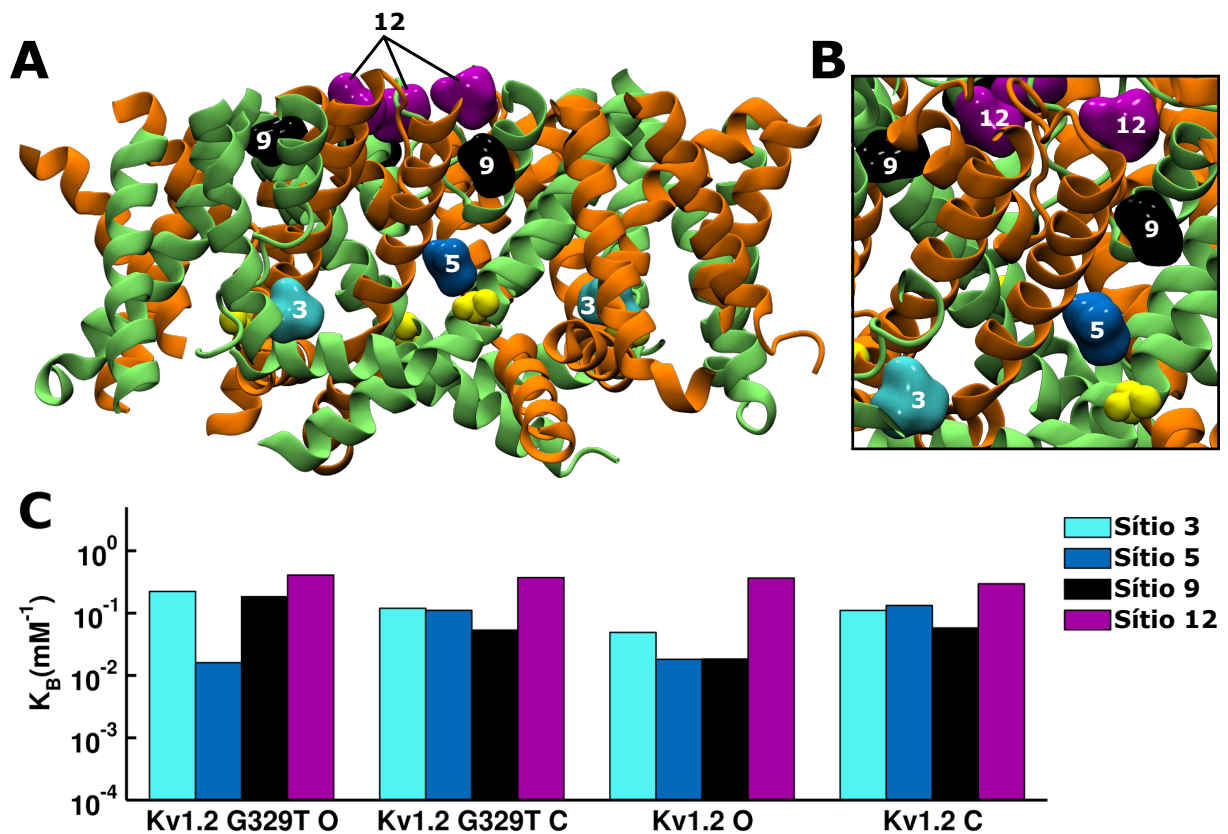


Figura 4.12: (A) Representação de 4 regiões de ligação de sevoflurano distintos no Kv1.2, designados como sítio 3 (azul claro), 5 (azul), 9 (preto) e 12 (roxo). Cada par de subunidades é representado em laranja e verde. Mutação G329T é destacada em amarelo (B) Visão aproximada dos sítios de ligação e da mutação. (C) Constantes de ligação resolvidos pelo LIE de acordo com o canal e a conformação para cada sítio i . (*) Mutação G329T. O e C são as conformações aberta e fechada respectivamente. (Adaptado de [61]).

Tabela 4.8: Valores calculados das médias dos potenciais de interação do sevoflurano com os canais Kv1.2 e Kv1.2 G329T nas conformações (Conf.) aberta (A) e fechada (F), $\langle V^{vdW} \rangle$ e $\langle V^{elet} \rangle$, juntamente com valores calculados de liberdade rotacional, ΔV , e translacional $\Delta\omega$. São também apresentadas as energias livres de ligação, $\Delta G_{ligação}$, e absoluta, $\Delta G_{ligação}^0$, obtidas pelo método LIE. Para esses cálculos, foram utilizados os potenciais do sevoflurano no ambiente de referência, uma solução aquosa, na qual o valor do potencial de van der Waals equivale a $\langle V^{vdW} \rangle = -11,39 \pm 1,49 kcal/mol$ e o potencial eletrostático $\langle V^{elet} \rangle = -8,53 \pm 2,72 kcal/mol$. Os valores empíricos adotados foram $\alpha = 0,18$, $\beta = 0,34$ e $\gamma = -6,90 kcal/mol$

Sítio	Canal	Conf.	$\langle V^{elet} \rangle [kcal/mol]$	$\langle V^{vdW} \rangle [kcal/mol]$	$\Delta G_{lig} [kcal/mol]$	$K_B [mM^{-1}]$	$\Delta V [\text{Å}^3]$	$\Delta\omega [rad^3]$	$\Delta G_{lig}^0 [kcal/mol]$
Sítio 3	G329T	A	$-6,4 \pm 0,5$	$-15,5 \pm 0,6$	-7 ± 1	$0,22 \pm 0,03$	16,36	16,06	$-3,22$
Sítio 3	G329T	F	$-5,2 \pm 0,6$	$-16,7 \pm 0,5$	-7 ± 1	$0,12 \pm 0,02$	14,17	16,27	$-2,85$
Sítio 3	Kv1.2	A	$-4,3 \pm 0,9$	$-15,4 \pm 0,9$	-6 ± 1	$0,049 \pm 0,008$	8,74	25,50	$-2,32$
Sítio 3	Kv1.2	F	$-4,7 \pm 0,1$	$-16,6 \pm 0,4$	$-6,4 \pm 0,9$	$0,11 \pm 0,02$	12,82	21,98	$-2,80$
Sítio 5	G329T	A	$-1,9 \pm 0,7$	$-15,9 \pm 0,3$	-5 ± 1	$0,010 \pm 0,003$	8,55	30,02	$-1,65$
Sítio 5	G329T	F	-7 ± 1	$-15,91 \pm 0,01$	-7 ± 1	$0,11 \pm 0,02$	3,58	26,47	$-2,81$
Sítio 5	Kv1.2	A	$-1,1 \pm 0,3$	$-15,2 \pm 0,1$	-5 ± 1	$0,018 \pm 0,004$	19,20	26,90	$-1,73$
Sítio 5	Kv1.2	F	$-8,0 \pm 0,5$	$-15,7 \pm 0,4$	-7 ± 1	$0,13 \pm 0,02$	2,64	23,24	$-2,91$
Sítio 9	G329T	A	-6 ± 1	$-17,3 \pm 0,3$	-7 ± 1	$0,18 \pm 0,03$	8,66	20,25	$-3,11$
Sítio 9	G329T	F	$-3,6 \pm 0,8$	$-17,2 \pm 0,3$	-6 ± 1	$0,053 \pm 0,009$	8,18	29,24	$-2,37$
Sítio 9	Kv1.2	A	$-3,0 \pm 0,4$	$-16,9 \pm 0,3$	-6 ± 1	$0,018 \pm 0,003$	3,90	31,41	$-1,73$
Sítio 9	Kv1.2	F	$-3,2 \pm 0,2$	$-17,7 \pm 0,1$	-6 ± 1	$0,058 \pm 0,009$	6,62	39,13	$-2,42$
Sítio 12	G329T	A	-9 ± 2	$-18,0 \pm 0,4$	-8 ± 1	$0,41 \pm 0,06$	7,62	12,60	$-3,58$
Sítio 12	G329T	F	-9 ± 2	$-18,59 \pm 0,05$	-8 ± 1	$0,37 \pm 0,05$	4,33	9,66	$-3,53$
Sítio 12	Kv1.2	A	$-8,1 \pm 0,6$	$-18,33 \pm 0,03$	$-8, \pm 1$	$0,37 \pm 0,04$	3,38	16,93	$-3,52$
Sítio 12	Kv1.2	F	$-8,9 \pm 0,8$	$-18,5 \pm 0,4$	-8 ± 1	$0,30 \pm 0,04$	3,11	14,51	$-3,39$

O efeito de potenciação induzido por anestésicos pode ser entendido como a estabilização da conformação aberta condutiva do canal, causada pela ligação da molécula anestésica. Como aberto condutivo indica os estados do *gate* e do filtro de seletividades, respectivamente, a potenciação pode então ser causada pela estabilização do *gate* aberto e/ou estabilização do filtro condutivo, visto que ele pode mudar de conformação para um estado constricto não condutor ou inativado.[10, 11] Em nível atômico, esse cenário pode depender da existência de um ou múltiplos sítios no receptor, vinculados a uma grande afinidade na conformação aberta condutiva do canal.

Uma hipótese levantada, com bases nos números encontrados e nos resultados experimentais [61], envolve a desestabilização do estado pré-aberto por ligação do sevoflurano (Figura 4.14), de forma que a curva condutância-voltagem é transladada para a esquerda. O envolvimento dessa conformação no processo é creditado pela mutação G329T, que confere maior sensibilidade a sevoflurano, está estabilizando esse estado. Contudo, esse comportamento da curva não ocorre para mutação T330G no canal K-Shaw2 e ocorre com menor intensidade no canal Kv1.2 selvagem, porém um segundo efeito, o de aumento da condutância máxima ocorre tanto para os canais selvagens, quanto para os canais mutados. Portanto, adiciona-se à hipótese o envolvimento de múltiplos sítios, sendo um grupo deles envolvidos na modificação de probabilidades do estado pré-aberto e um segundo no aumento da condutância, possivelmente por diminuição de conformações inativas. O principal sítio candidato à maior estabilidade do estado condutor do filtro de seletividade é o sítio localizado atrás do filtro de seletividade, denominado aqui como sítio 12 (Figura 4.13). A presença do anestésico nessa cavidade pode expulsar moléculas de água, desfazendo a formação de pontes de hidrogênio com as carbonilas, de modo que o filtro pode se maior por maiores períodos em uma geometria ótima para a permeação dos íons.

A partir dos resultados encontrados não foi possível concluir de forma definitiva qual ou quais os sítios diretamente responsáveis pela potenciação do canal iônico, no entanto eles indicam a ação de múltiplos sítios na modulação. A relação entre os resultados moleculares microscópicos necessitam de análise mais abrangente, não apenas das afinidades individuais, a fim de recuperar o comportamento macroscópico. Para tanto, uma base teórica que considere múltiplos sítios, com múltiplas ocupâncias e em diferentes conformações pode elucidar algum aspecto do mecanismo de ação de anestésicos gerais.

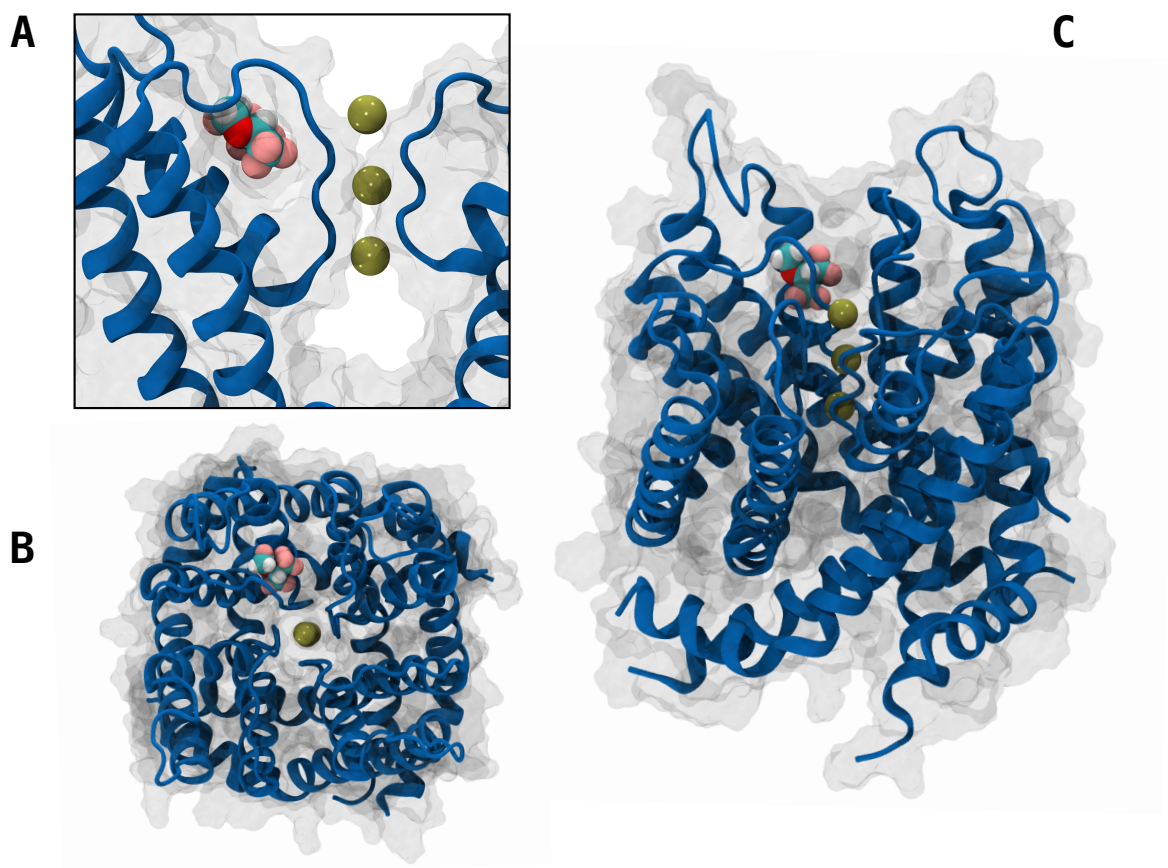


Figura 4.13: Sevoflurano no sítio do filtro de seletividade do canal iônico Kv1.2. (A) Visão aproximada, com ênfase no caminho de permeação dos íons e no anestésico ocupando a cavidade atrás do filtro de seletividade. (B) Visão superior do canal iônico. (C) Vista lateral do canal de potássio complexado com uma molécula de anestésico.

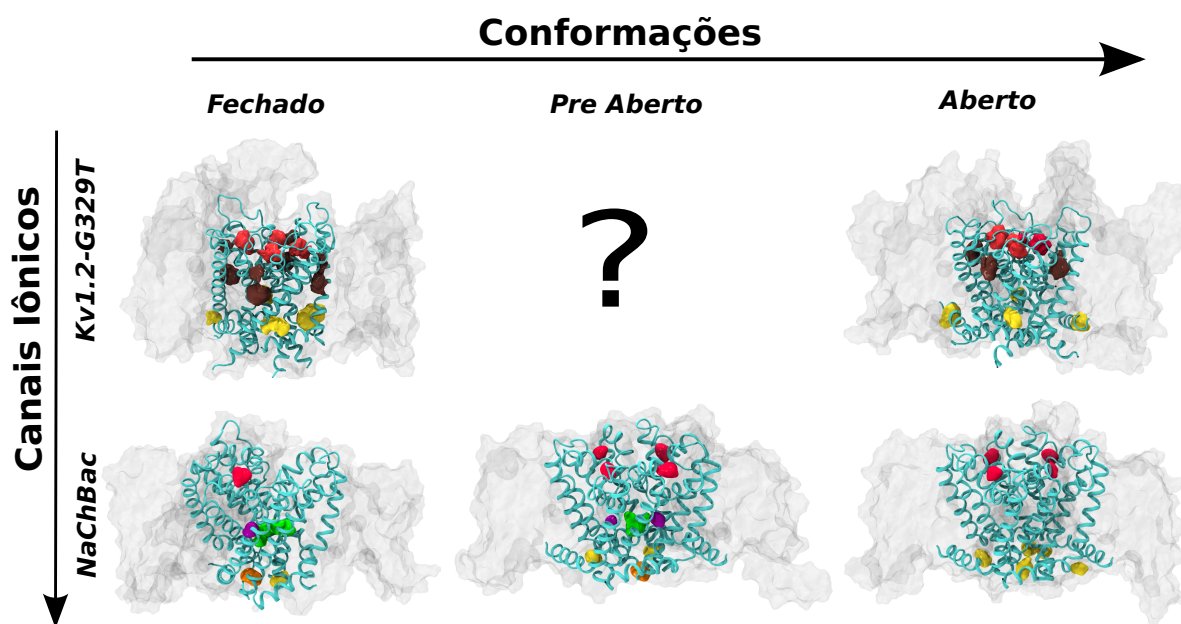


Figura 4.14: Visualização de dois canais iônicos, o Kv1.2 G329T e o NaChBac, em diferentes conformações, fechada e aberta para o canal Kv1.2 e fechada, pré-aberta e aberta para o canal NaChBac. No Kv1.2 a conformação pré-aberta do canal não é conhecida em detalhes. Os *blobs* indicam densidades de soluções de anestésicos gerais. Para o Kv1.2 G329T, são indicadas três regiões principais por *docking* molecular [61], em vermelho a densidade da região extracelular próxima ao filtro de seletividade, em marrom as soluções do sítio na interface das hélices S4-S5 entre as diferentes subunidades e em amarelo aquelas do sítio do *linker* entre as hélices S4-S5. Para o NaChBac, as soluções encontradas são resultados de análise de clusterização de simulação de *flooding* de sevoflurano que apresenta quatro sítios de ligação principais, em vermelho o sítio extracelular, em amarelo o sítio do *linker*, em laranja o sítio do *gate* de ativação, em verde o sítio na cavidade central e, por fim, em lilás o sítio das janelas [9].

Capítulo 5

Interação Molecular entre Ligantes e Proteínas de Membrana

Proteínas de membrana são estruturas centrais em diversos fenômenos celulares, entre elas a transdução de sinal, a manutenção do potencial de membrana e as trocas de soluto com o ambiente. Nesse contexto, diversos estudos mostram que uma miríade de ligantes podem modular essas proteínas, levando a alteração de conformação e da resposta funcional dessas estruturas. No entanto, é notório o intrincado mecanismo com o qual ocorre essa interação, podendo dar-se por ligação em múltiplos sítios concomitantemente, com diferentes afinidades e em distintas conformações. Um dos desafios atuais é a predição de sítios de ligação, a fim de possibilitar o *design* racional de ligantes com afinidades desejadas e, então, fabricação de medicamentos específicos. Com este propósito, um modelo teórico abrangente, a partir de primeiros princípios, que possa prever afinidades e, enfim, o impacto funcional da interação de ligantes é fundamental para o avanço nesse campo. De importância para o desenvolvimento dessa área é a contribuição com a generalização de arcabouços teóricos bem estabelecidos, como os presentes na descrição da densidade de probabilidades para ligação formulados por Roux *et al* [83] no estudo da ocupância da água em bacteriorrodopsina, estendendo-os para situações de múltiplos sítios e múltiplas ocupâncias. Diferentes canais iônicos, proteínas constituintes da membrana celular, são alvos desses moduladores. Entre os principais canais envolvidos no mecanismo de anestesia estão os K2Ps e os canais iônicos dependentes de neurotransmissores, não obstante canais sensíveis à variação na voltagem também são participantes [62]. Aqui é apresentado um arcabouço teórico em desenvolvimento, com sua aplicação ainda em progresso. Parte dos resultados apresentados anteriormente foram utilizados para ilustrar e experimentar a predição do modelo.

5.1 Teoria e Métodos

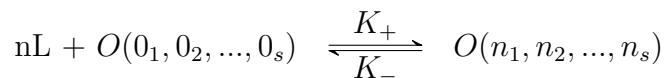
5.1.1 Sistema Molecular

Para avaliar microscopicamente a afinidade associada à interação de um ligante a seu receptor, pode-se considerar uma solução diluída constituída por M moléculas. Para tal, assumindo que o volume de solução é suficientemente grande e a concentração de receptor é pequena, o sistema é composto de um único canal iônico R, de forma ao seu centro de massa corresponder à origem das coordenadas Cartesianas do sistema. Esse receptor é inserido em uma bicamada lipídica, no entanto, por simplicidade de construção, assume-se também que a membrana e o meio aquoso formam um volume homogêneo, o *bulk*. Inseridos no *bulk* estão N ligantes indistinguíveis, espaçados aleatoriamente, tanto na membrana quanto em solução, podendo de ambos os meios particionar para qualquer sítio de ligação no receptor. Nessas condições, assume-se que o sistema está em equilíbrio termodinâmico com número fixo de partículas, pressão e temperatura definidos, pH neutro, mas na ausência de voltagem através da membrana. Então, os ligantes possuem densidade ρ e potencial químico $\bar{\mu}$ constantes, enquanto o canal permanece em um estado conformacional definido com s sítios distintos para ligação. Considera-se, ainda, que cada sítio $j = 1, 2, \dots, s$ possui um volume discreto δV_j , podendo ser ocupado por $0 \leq n_j \leq n_j^{max}$ ligantes. Como esse volume é bem definido e possui um limite de ligantes que pode comportar, há então um número máximo de estados ligados O acessíveis à proteína receptora no sistema, dado pela expressão $max(O) = \prod_{j=1}^s (n_j^{max} + 1)$. Assim, a notação $O(n_1, n_2, \dots, n_{s-1}, n_s)$ será utilizada para indicar um estado específico O , com exatos n_j ligantes em seu sítio correspondente, em um total de $n = n_1 + n_2 + \dots + n_s = \sum_{j=1}^s n_j$ ligantes nesse estado.

A energia potencial do sistema $U(\vec{r}^M)$ é função dos graus de liberdade associados a cada um dos constituintes, portanto $\vec{r}^M \equiv \{\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_{N-1}, \vec{r}_N, \vec{r}_{N+1}, \dots, \vec{r}_M\}$, no qual \vec{r}_i denota todo o conjunto de coordenadas Cartesianas dos átomos da molécula i . O cálculo da energia potencial total do sistema molecular é viável, todavia de grande importância para avaliar a afinidade do ligante pelos sítios do receptor, de forma que a probabilidade de ligação depende da energia potencial do sistema em seus diversos microestados.

5.1.2 Constante de Ligação

A constante de ligação $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$, dadas as condições definidas na seção 5.1.1, do processo de ligação de múltiplas moléculas em um receptor



em que $O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)$ denota o receptor com todos os s sítios vazios e todos os ligantes no *bulk*, é uma constante de equilíbrio definida pela razão das concentrações médias

$$K_b(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{[O(n_1, n_2, \dots, n_s)]}{[L]^n [O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)]} = \frac{K_+}{K_-} = K_d(n_1, n_2, \dots, n_s)^{-1} \quad (5.1)$$

no qual $K_d(n_1, n_2, \dots, n_s)$ é a constante de dissociação relacionada ao mesmo processo. Dessa forma, é possível descrever a constante de ligação $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$ em relação às densidades de probabilidades microscópicas de cada uma das espécies moleculares em equilíbrio. As concentrações de reagentes e produtos podem ser escritas em forma de probabilidades, com a probabilidade do ligante livre no *bulk* proporcional a sua concentração, $\rho_{lig} = [L]$, e as probabilidades do receptor vazio e ocupado por n ligantes em função da concentração total de receptor, $\rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s) = \frac{[O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)]}{[R]}$ e $\rho(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{[O(n_1, n_2, \dots, n_s)]}{[R]}$. Então

$$K_b(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{\rho(n_1, n_2, \dots, n_s)}{\rho_{lig}^n \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s)} \quad (5.2)$$

no qual, novamente, $\rho(n_1, n_2, \dots, n_s)$ é a probabilidade da proteína estar no determinado estado ligado $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$. Por essa normalização a soma das probabilidades de todos os estados de ligação acessíveis equivale a um, $\sum_{n_1, n_2, \dots, n_s} \rho(n_1, n_2, \dots, n_s) = 1$.

A medida da probabilidade de densidade $\rho(n_1, n_2, \dots, n_s)$ é fundamental para a devida descrição da constante de ligação. Pela distribuição de Boltzmann, a probabilidade de um estado do sistema em equilíbrio é função da energia desse estado em uma determinada temperatura, pode-se, assim, reescrever a Equação 5.2,

$$\rho(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{\int d\vec{r}^{\vec{M}} \delta[n_1^*(\vec{r}^{\vec{M}}) - n_1] \delta[n_2^*(\vec{r}^{\vec{M}}) - n_2] \dots \delta[n_s^*(\vec{r}^{\vec{M}}) - n_s] e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{M}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}} \quad (5.3)$$

para o sistema em uma temperatura fixa, $\beta = 1/k_B T$, em que k_B é a constante de Boltzmann. Na Equação 5.2, $n_j^*(\vec{r}^{\vec{M}})$ é uma função auxiliar que mapeia a quantidade de moléculas ligadas em um determinado sítio j para uma dada configuração em função dos centroides $\vec{R}_i(\vec{r}^{\vec{M}})$ dos ligantes. Nesse contexto, o número de anestésicos ligados, n_j^* , é definido de acordo com as posições dos centroides, $\vec{R}_i(\vec{r}^{\vec{M}})$,

$$n_j^*(\vec{r}^{\vec{M}}) = \int_{\delta V_j} d\vec{R} \left[\sum_{i=1}^N \delta(\vec{R}_i(\vec{r}^{\vec{M}}) - \vec{R}) \right] \quad (5.4)$$

Outrossim, a função delta de Kronecker

$$\delta[n_j^*(\vec{r}^{\vec{M}}) - n_j] = \begin{cases} 1, & \text{se } n_j^*(\vec{r}^{\vec{M}}) = n_j. \\ 0, & \text{se } n_j^*(\vec{r}^{\vec{M}}) \neq n_j. \end{cases} \quad (5.5)$$

assegura que a integral no numerador apenas considere aquelas configurações microscópicas definidas por $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$, enquanto o denominador se estende por todas as configurações possíveis do sistema. O delta de Kronecker foi escolhido em vez do delta de Dirac, visto ser uma função discreta com amplitude 1 para uma condição determinada, enquanto o segundo é uma função contínua com integral de valor unitário.

Por uma visão prática, determinar a constante de ligação de um estado, $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$, por cálculo direto da Equação 5.3 é inviável até mesmo no contexto dos métodos computacionais modernos. Uma descrição alternativa e pormenorizada da $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$ por uma visão microscópica pode ser formulada especificando os intervalos de integração para regiões bem definidas dos sítios, δV_j , e do volume do *bulk*

$$\rho(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\vec{r}^{n_1} \int_{\delta V_2} d\vec{r}^{n_2} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{r}^{n_s} \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-n} \int d\vec{r}^{M-N} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{M}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}} \quad (5.6)$$

como resultado da condição imposta pelos deltas de Kronecker da Equação 5.3. O primeiro fator $\frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!}$ é inserido ao considerar as múltiplas maneiras de se obter configurações equivalentes em razão da indistinguibilidade dos ligantes, lembrando que $N \neq n$, N é o número de ligantes no *bulk* e n é o número total de ligantes vinculados à proteína. Cada fator, $\int_{\delta V_j} d\vec{r}^{n_j}$, é uma integral no volume definido pelo sítio j para todos os n_j ligantes nesse sítio, enquanto $\int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-n}$ é responsável por considerar todos aqueles ligantes livres no *bulk*. O termo $\int d\vec{r}^{M-N}$, por outro lado, não especifica o espaço, posto que é referente à todas as outras moléculas no sistema que não sejam os N ligantes elencados.

Como a densidade do estado $O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)$ também pode ser escrita como

$$\rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s) = \frac{\int_{V_{bulk}} d\vec{r}^N \int d\vec{r}^{M-N} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{M}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}} \quad (5.7)$$

e a partir da Equação 5.6, pode-se ainda elaborar a Equação 5.2 como

$$K_b(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\rho_{lig}^n} \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\vec{r}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{r}^{n_s} \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-n} \int d\vec{r}^{M-N} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int_{V_{bulk}} d\vec{r}^N \int d\vec{r}^{M-N} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}} \quad (5.8)$$

em termos de integrações em configurações específicas dos estados ligados $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$ e vazios $O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)$ da proteína. Afinal, é obtida uma expressão bem definida para a constante de ligação para um dado estado em função dos fatores de Boltzmann, com integrais em volumes definidos do espaço, a qual permite elaborações adicionais para a avaliação quantitativa dessa constante do equilíbrio.

5.1.3 Densidade de Probabilidade do Estado Ligado

Na presente formulação, como visto em 5.1.2, o conhecimento das constantes de ligação permite obter a probabilidade de qualquer um dos estados ligados

$$\rho(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{\rho_{lig}^{n_1+n_2+\dots+n_s} K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)}{\sum_{n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#} \rho^{n_1^\#+n_2^\#+\dots+n_s^\#} K_b(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#)} \quad (5.9)$$

na qual a notação $n_i^\#$ é para permitir referenciar ocupâncias na soma por todo o espaço possível de quantidade de ligantes, independentemente da ocupância analisada, dessa maneira a normalização se estende desde a o estado de ocupância nula $O(0_1, 0_2, \dots, 0_s)$ até estados de ocupância máxima $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$. A probabilidade de estado na forma Equação 5.9 é viável para cálculo, em detrimento do grande desafio de obter uma estimativa pela Equação 5.3 ou pela Equação 5.6 dado o imenso número de microestados a serem analisados.

Conhecimento das probabilidades de cada estado é de especial relevância por permitir obter médias do *ensemble* de qualquer propriedade termodinâmica do sistema em questão. Então, a média de uma propriedade A é dada por

$$\langle A \rangle = \sum_{n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#} A_{(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#)} \rho(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#) \quad (5.10)$$

em que $A_{(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#)}$ é o valor da probabilidade de interesse no estado $O(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#)$. Por exemplo, o número médio de ligantes $\langle n \rangle$ nos sítios pode ser estimado por

$$\langle n \rangle = \sum_{n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#} n_{(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#)} \rho(n_1^\#, n_2^\#, \dots, n_s^\#) \quad (5.11)$$

em condições do equilíbrio.

5.1.4 Cálculos de Constante de Ligação no Contexto da Dinâmica Molecular

Para avaliar computacionalmente a constante de ligação, é essencial calcular de forma acurada a energia livre absoluta relacionada a esse estado, um dos desafios da biologia computacional. A energia é uma propriedade do sistema, por conseguinte a diferença entre a energia em dois estados definidos não depende de seus estados intermediários. Para tanto, o Potencial de Força Média, do inglês *Potential of Mean Force* (PMF) elaborado por Kirkwood, 1935 [57], definido a partir de uma coordenada de reação λ , de tal forma a ser expresso em termos da densidade de probabilidades no equilíbrio na coordenada definida

$$W(\lambda) = W(\lambda^*) - \frac{\ln \rho(\lambda)}{\beta} \quad (5.12)$$

em que $W(\lambda^*)$ é uma constante, pode ser computado pela utilização de simulações de dinâmica molecular e cálculos de perturbação de energia livre. O PMF é uma estimativa central nos estudos de sistemas moleculares por permitir calcular propriedades do equilíbrio. Assim, considerando o potencial de força média $W(\vec{R}^n)$ associado à configuração dos n ligantes, de maneira a avaliar seus centroides $\vec{R}^n \equiv \{\vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_n\}$, a Equação 5.8 pode ser calculada por

$$K_b(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\rho_{lig}^n} \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\vec{R}_1 \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}_s e^{-\beta W(\vec{R}^N)}}{\int_{V_{bulk}} d\vec{R}^N e^{-\beta W(\vec{R}^N)}} \quad (5.13)$$

com o PMF definido como

$$e^{-\beta W(\vec{R}^n)} = \frac{\int d\vec{r}_1 \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1) - \vec{R}_1] \int d\vec{r}_2 \delta[\vec{R}_2^*(\vec{r}_2) - \vec{R}_2] \dots \int d\vec{r}_n \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n) - \vec{R}_n] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-n} e^{-\beta U(\vec{r}^M)}}{\int d\vec{r}_1 \delta[\vec{R}_1^{\#}(\vec{r}_1) - \vec{R}_1^{\#}] \int d\vec{r}_2 \delta[\vec{R}_2^{\#}(\vec{r}_2) - \vec{R}_2^{\#}] \dots \int d\vec{r}_n \delta[\vec{R}_n^{\#}(\vec{r}_n) - \vec{R}_n^{\#}] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-n} e^{-\beta U_o(\vec{r}^M)}} \quad (5.14)$$

em que a energia potencial de referência $U_o(\vec{r}^M)$ é determinada para o sistema com todas as interações dos n ligantes com as demais moléculas do sistema desligadas. O conjunto $\{\vec{R}_1^{\#}, \vec{R}_2^{\#}, \dots, \vec{R}_n^{\#}\}$ é referência para posições arbitrárias dos n ligantes no sistema. Por esta definição, o potencial de força média, $W(\vec{R}^n)$, corresponde à variação de energia livre associada à transferência dos n ligantes da fase gasosa para seus sítios correspondentes. Pela definição adotada, o potencial de força média para apenas um ligante $W(\vec{R}_i)$ para qualquer posição \vec{R}_i no ambiente do *bulk* é proporcional ao potencial químico $\bar{\mu}$, de modo que $e^{-\beta W(\vec{R}_i)} = e^{-\beta \bar{\mu}}$. Então, a integral avaliada no volume do *bulk* isotrópico, por não depender da direção a ser analisada, e homogêneo, por não diferenciar sua posição no

espaço, relacionada a Equação 5.13 torna-se

$$\int_{V_{bulk}} d\vec{R}^n e^{-\beta W(\vec{R}^n)} = \int_{V_{bulk}} d\vec{R}_1 d\vec{R}_2 \dots d\vec{R}_n e^{-\beta[W(\vec{R}_1)+W(\vec{R}_2)+\dots+W(\vec{R}_n)]} = V_{bulk}^n e^{-\beta n\bar{\mu}} \quad (5.15)$$

dados a fraca influência entre os ligantes em um volume de solução grande em condições diluídas, $W(\vec{R}^n) \approx W(\vec{R}_1) + W(\vec{R}_2) + \dots + W(\vec{R}_n)$. Portanto, a Equação 5.13, torna-se

$$K_b(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\rho_{lig}^n} \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} e^{-\beta W(\vec{R}^M)}}{V_{bulk}^n e^{-\beta n\bar{\mu}}} \quad (5.16)$$

lembrando que $[L] = \rho_{lig} = N/V_{bulk}$, a equação pode ser simplificada ainda mais. Porquanto, para o limite termodinâmico, no qual para um grande volume $V \rightarrow \infty$, tão grande será o número de partículas do sistema, de maneira a razão entre os dois valores permanecer inalterada, compara-se $N \gg n$, assim é factível aproximar $\frac{N!}{(N-n)!} \approx N^n$. O fator $\frac{1}{\rho_{lig}^n} \frac{N!}{n_1!n_2!\dots n_s!(N-n)!} = \frac{V_{bulk}^n}{N^n} \frac{N^n}{n_1!n_2!\dots n_s!}$ se reduz a $\frac{V_{bulk}^n}{n_1!n_2!\dots n_s!}$. A Equação 5.16 é reescrita como

$$K_b(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1!n_2!\dots n_s!} \int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} \int_{V_{bulk}} d\vec{R}^{N-n} \int d\vec{R}^{M-N} e^{-\beta[W(\vec{R}^M)-n\bar{\mu}]} \quad (5.17)$$

5.1.5 Detalhes Computacionais dos Cálculos de PMF

É possível calcular o potencial químico $e^{-\beta n\bar{\mu}}$ sem grandes entraves. Pelo método de perturbação de energia livre alquímico (FEP), por exemplo, é possível estima-lo por acoplamento ou desacoplamento do ligante em solução aquosa. Por outro lado, avaliar o PMF, $W(\vec{R}^M)$, pode ser uma tarefa complicada caso não seja conhecido o caminho tomado pelo ligante até o sítio de acordo com a coordenada de reação. Logo, métodos AFEP são muito utilizados nessas situações. Nessa abordagem, o ligante é reversivelmente desacoplado do sistema, ou seja, são desligadas suas interações com o meio. Todavia, por não mais possuir as interações não ligadas, a molécula pode movimentar-se livremente por todo o sistema, de forma a escapar do volume definido do sítio. Por não mais se restringir à região de interesse, há dificuldade em acoplar novamente o ligante no exato volume do sítio. Como solução para esse problema, é comum a adoção de um potencial auxiliar externo para garantir amostragem correta na cavidade estudada. Um dos potenciais que podem ser utilizados é o potencial harmônico aplicado ao ligante i

$$u^*(\vec{R}_i) = \frac{1}{2} k_j [\vec{R}_i - \vec{R}_i^*]^2 \quad (5.18)$$

em função de uma posição de referência \vec{R}_i^* no sítio de ligação. Consequentemente, à reação de acoplamento do ligante L ao sítio no receptor R



é adicionando um passo intermediário com a aplicação de um viés



Portanto,

$$\begin{aligned} & \int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} e^{-\beta[W(\vec{R}^{\vec{M}})]} = \\ & \int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} \cdot \left[\frac{\int d\vec{r}_1^\rightarrow \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1^\rightarrow) - \vec{R}_1^\rightarrow] \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n^\rightarrow) - \vec{R}_n^\rightarrow] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{N}} \int d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta[U_O(\vec{r}^{\vec{M}}) + \sum_{j=1}^n u^*(\vec{R}_j)]}} \right. \\ & \quad \left. \frac{\int d\vec{r}^{\vec{N}} \int d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta[U_O(\vec{r}^{\vec{M}}) + \sum_{j=1}^n u^*(\vec{R}_j)]}}{\int d\vec{r}_1^\rightarrow \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1^\rightarrow) - \vec{R}_1^\rightarrow] \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n^\rightarrow) - \vec{R}_n^\rightarrow] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta U_O(\vec{r}^{\vec{M}})}} \right] = \\ & \int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} \cdot \left[\frac{\int d\vec{r}_1^\rightarrow \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1^\rightarrow) - \vec{R}_1^\rightarrow] \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n^\rightarrow) - \vec{R}_n^\rightarrow] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{N}} \int d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta[U_O(\vec{r}^{\vec{M}}) + \sum_{j=1}^n u^*(\vec{R}_j)]}} \right. \\ & \quad \left. \frac{\int d\vec{r}_1^\rightarrow e^{-\beta u^*(\vec{R}_1^\rightarrow)} \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow e^{-\beta u^*(\vec{R}_n^\rightarrow)}}{\int d\vec{r}_1^\rightarrow \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1^\rightarrow) - \vec{R}_1^\rightarrow] \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n^\rightarrow) - \vec{R}_n^\rightarrow]} \right] = \\ & \quad \left(\prod_{i=1}^n \frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \int_{\delta V_1} d\vec{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\vec{R}^{n_s} \cdot \\ & \quad \left[\frac{\int d\vec{r}_1^\rightarrow \delta[\vec{R}_1^*(\vec{r}_1^\rightarrow) - \vec{R}_1^\rightarrow] \dots \int d\vec{r}_n^\rightarrow \delta[\vec{R}_n^*(\vec{r}_n^\rightarrow) - \vec{R}_n^\rightarrow] \int_{V_{bulk}} d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{M}})}}{\int d\vec{r}^{\vec{N}} \int d\vec{r}^{N-\vec{n}} \int d\vec{r}^{M-\vec{N}} e^{-\beta[U_O(\vec{r}^{\vec{M}}) + \sum_{j=1}^n u^*(\vec{R}_j)]}} \right] = \\ & \quad \left(\prod_{i=1}^n \frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} e^{-\beta W^*(\vec{R}^{\vec{n}})} \quad (5.19) \end{aligned}$$

onde $W^*(\vec{R}^{\vec{n}})$ é a energia livre de n ligantes ocuparem sítios específicos em relação a um estado no qual esses mesmos ligantes estão na fase gasosa (desacoplados). Já $(\frac{2\pi}{\beta k_i})^{\frac{3}{2}}$ representa o volume efetivo dos ligantes nos sítios. Esse fator é obtido por resolução da segunda igualdade na Equação 5.19, de forma que é transformado $(\vec{r}^{\vec{n}}) \rightarrow (\vec{R}^{\vec{n}}, \vec{\omega}^{\vec{n}}, \vec{I}^{\vec{n}})$ de acordo com os centroides $\vec{R}^{\vec{n}}$, as orientações $\vec{\omega}^{\vec{n}}$ e graus de liberdade internos $\vec{I}^{\vec{n}}$ dos n ligantes. Nesse caso, o Jacobiano da transformação não depende dos $\vec{R}^{\vec{n}}$ graus de liberdade permitindo que as contribuições de $\vec{\omega}^{\vec{n}}$ e $\vec{I}^{\vec{n}}$ sejam canceladas. Assim é obtido

$$K(n_1, n_2, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1! n_2! \dots n_s!} \prod_{i=1}^n C^0 \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{\vec{n}}) - n\bar{\mu}]} \quad (5.20)$$

5.1.6 Constante de Ligação para Sítios Independentes

Para o caso especial dos sítios de ligação serem independentes, de forma que a presença de ligante em um sítio não influencia a afinidade por outro sítio, o PMF $W(\vec{R}^n)$ para o estado no qual n moléculas estão ligadas é o somatório

$$W(\vec{R}^n) = W(\vec{R}^{n_1}, \vec{R}^{n_2}, \dots, \vec{R}^{n_s}) \approx W(\vec{R}^{n_1}) + W(\vec{R}^{n_2}) + \dots + W(\vec{R}^{n_s}) \quad (5.21)$$

Dessa maneira, a constante de ligação $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$ pode ser formulada como o produto de constantes do equilíbrio independentes

$$K_b(n_1, n_2, \dots, n_s) = K_b(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \cdot K_b(0_1, n_2, \dots, 0_s) \cdot \dots \cdot K_b(0_1, 0_2, \dots, n_s) \quad (5.22)$$

onde

$$\begin{aligned} K_b(n_1, 0_2, \dots, 0_s) &= \frac{1}{n_1!} \left[\prod_{i=1}^{n_1} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_1}) - n_1 \bar{\mu}]} \\ K_b(0_1, n_2, \dots, 0_s) &= \frac{1}{n_2!} \left[\prod_{i=1}^{n_2} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_2}) - n_2 \bar{\mu}]} \\ &\dots \\ K_b(0_1, 0_2, \dots, n_s) &= \frac{1}{n_s!} \left[\prod_{i=1}^{n_s} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_s}) - n_s \bar{\mu}]} \end{aligned} \quad (5.23)$$

denotam as constante de ligação específicas para a ocupância de n_j ligantes apenas no sítio j da proteína, enquanto os outros $s - 1$ sítios permanecem sem ligação da molécula de interesse. Nesse cenário, é possível calcular constantes de ligação por uma série de cálculos de energia livre independentes e concomitantes, utilizando otimamente recursos computacionais disponíveis para estimar as afinidades de ligação individuais, as quais poderão ser multiplicadas a fim de fornecer constantes de ligação para estados mais complexos.

Assim como as constantes de ligação, as densidades de probabilidades podem ser obtidas para cada sítio individualmente, $\rho(n_j)$ é derivada de $K(0_1, \dots, 0_{j-1}, n_j, 0_{j+1}, \dots, 0_s)$ simplesmente por

$$\rho(n_j) = \frac{\rho^{n_j} K(0_1, \dots, 0_{j-1}, n_j, 0_{j+1}, \dots, 0_s)}{\sum_{n_i^*} \rho^{n_i^*} K(0_1, \dots, 0_{i-1}, n_i^*, 0_{i+1}, \dots, 0_s)} \quad (5.24)$$

do estado $O(0_1, \dots, 0_{j-1}, n_j, 0_{j+1}, \dots, 0_s)$.

5.1.7 Energia Livre de Ligação

A energia livre de ligação absoluta é associada à constante de equilíbrio em condições padrão. Portanto, a energia livre absoluta $\Delta G^0(n_1, n_2, \dots, n_s)$ para o estado ligado $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$

é

$$\Delta G^0(n_1, n_2, \dots, n_s) = -k_B T \ln[K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)(C^0)^n] \quad (5.25)$$

definida como a energia livre de ligação de n com o receptor, a partir de um sistema de referência com concentração padrão $C^0 = 1M = \frac{1}{1660\text{Å}^3}$. Como derivada nas equações da 5.1.2, $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)$ possui unidades de densidade Å^n dependente do número n de moléculas ligadas no estado estudado, por isso a necessidade de multiplicar pela concentração padrão $(C^0)^n$ para definir a energia livre absoluta de ligação como o logaritmo da quantidade adimensional $K_b(n_1, n_2, \dots, n_s)(C^0)^n$. Pela equação (Equação 5.20), a energia livre

$$\Delta G^0(n_1, n_2, \dots, n_s) = [W^*(\vec{R}^n) - n\bar{\mu}] - k_B T \ln\left[\prod_{i=1}^n C^0 \left(\frac{2\pi}{\beta k_i}\right)^{\frac{3}{2}}\right] - k_B T \ln\left[\frac{1}{n_1! n_2! \dots n_s!}\right] \quad (5.26)$$

possui três contribuições principais:

$[W^*(\vec{R}^n) - n\bar{\mu}]$ A variação de energia livre de retirar n ligantes da fase gasosa para as regiões dos sítios do receptor com auxílio de potenciais de restrição.

$[-k_B T \ln[\prod_{i=1}^n C^0 (\frac{2\pi}{\beta k_i})^{\frac{3}{2}}]]$ A diferença de energia livre relacionada a restrição imposta pelo potencial harmônico em relação ao volume ocupado quando livre em solução

$[-k_B T \ln[\frac{1}{n_1! n_2! \dots n_s!}]]$ Energia livre dada a degeneração dos estados obtidos

Para o caso de apenas uma molécula estar ligada em um determinado sítio j do receptor enquanto as demais cavidades mantêm-se vazias, a Equação 5.26 torna-se mais simples e é a formulação mais comum para os cálculos de FEP, $\Delta G^0(n_j = 1) = [W^*(\vec{R}) - \bar{\mu}] - k_B T \ln[\frac{V_{efetivo}}{V_0}]$.

5.1.8 Densidade de Probabilidade Dependentes da Posição

Assim como formuladas as derivações de probabilidades para cada estado ocupado do receptor por ligantes, $\rho(n_1, n_2, \dots, n_s)$, é possível explorar as densidades de probabilidade para posições no espaço dos ligantes do sistema $\rho(\vec{R})$, tal que $\rho(\vec{R})$ é a probabilidade de qualquer ligante i ocupar a posição \vec{R} no sistema, independente da posição dos $N - 1$ outros ligantes. A densidade de probabilidades em função da posição é então

$$\rho(\vec{R}) = \frac{N}{\int d\vec{r}^M e^{-\beta U(\vec{r}^M)}} \int d\vec{r}^M \delta[\vec{R}_i(\vec{r}^M) - \vec{R}] e^{-\beta U(\vec{r}^M)} \quad (5.27)$$

onde N considera que qualquer um dos N ligantes indistinguíveis pode estar na posição de interesse \vec{R} . No numerador há uma função delta de Kronecker a fim de restringir a

integração a apenas os microestados em que há um ligante na posição \vec{R} , de outro modo o denominador abarca todos os microestados possíveis para o sistema. Em atenção ao fato do volume do *bulk* ser homogêneo, não há separação entre a fase aquosa e o lipídio. Os ligantes, então, possuem uma densidade definida no *bulk*, ρ_{lig} , tal que $\rho(\vec{R})$ simplifica a

$$\rho(\vec{R}) = \begin{cases} \rho_j(\vec{R}), & \forall \vec{R} \exists \delta V_j \\ \rho_{lig}, & \text{demais casos.} \end{cases} \quad (5.28)$$

para $\rho_j(\vec{R})$ todo sítio $j = 1, 2, \dots, s$ da proteína receptora. De forma a ser mais fácil estimar $\rho(\vec{R})$ pelo conhecimento dessas densidades de probabilidades sítio-específicas. Assim

$$\rho_j(\vec{R}) = \frac{N}{\int dr^{\vec{M}} e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}} \int dr^{\vec{M}} \overbrace{\left[\sum_{n_j=0}^{n_j^{max}} \delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] \right]}{=1} \delta[\vec{R}_i(r^{\vec{M}}) - \vec{R}] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})} \quad (5.29)$$

a $\rho_j(\vec{R})$ é a probabilidade do ligante ocupar um ponto do espaço δV_j delimitado para o sítio j . Nesse caso, são utilizadas duas funções delta de Kronecker. A primeira como uma função auxiliar a fim de facilitar a formulação da Equação 5.30, já que o somatório sempre será um valor unitário para qualquer microestado avaliado. Enquanto a outra é aplicada a fim de assegurar que, no numerador, para um microestado descrito por $r^{\vec{M}}$, a integração só contabilizará se o ligante i estiver no sítio. Multiplicando a Equação 5.29 por $\frac{dr^{\vec{M}} \delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}}{dr^{\vec{M}} \delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}}$

$$\rho_j(\vec{R}) = \sum_{n_j=0}^{n_j^{max}} \frac{dr^{\vec{M}} \delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}}{\int dr^{\vec{M}} e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}} \frac{\int dr^{\vec{M}} [\delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] \delta[\vec{R}_i(r^{\vec{M}}) - \vec{R}] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})]]}{dr^{\vec{M}} \delta[n_j^*(r^{\vec{M}}) - n_j] e^{-\beta U(r^{\vec{M}})}} \quad (5.30)$$

pode-se rescrever $\rho_j(\vec{R})$ em função da probabilidade do estado

$$\rho_j(\vec{R}) = \sum_{n_j=0}^{n_j^{max}} \rho(n_j) \cdot \rho_{n_j}(\vec{R}) \quad (5.31)$$

no qual $\rho_{n_j}(\vec{R})$ é a densidade nos arredores do sítio j quando ocupado por exatas n_j moléculas, bem como $\rho(n_j)$ é a probabilidade do estado com n_j moléculas, como expresso na equação Equação 5.24.

Como formulado, $\rho_{n_j}(\vec{R})$ descreve a densidade local do ligante no equilíbrio, especificamente para o sítio j , condicional ao número de ligantes no sítio n_j . Nesse caso, a

probabilidade $\rho_{n_j}(\vec{R})$ satisfaz

$$\int_{\delta V_j} d\vec{R} \rho_{n_j}(\vec{R}) = n_j \quad (5.32)$$

Por outro lado,

$$\rho(n_j) = \sum_{n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*} \delta[n_j^* - n_j] \rho(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*) \quad (5.33)$$

denota a densidade de probabilidade do sítio estar ocupado por n_j ligantes independente da ocupância nos outros $s - 1$ sítios, assim a partir da Equação 5.9

$$\rho(n_j) = \frac{\sum_{n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*} \delta[n_j^* - n_j] \rho_{lig}(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*) K(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*)}{\sum_{n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*} \rho_{lig}(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*) K(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*)} \quad (5.34)$$

é possível ser obtido diretamente da constante de equilíbrio $K(n_1, n_2, \dots, n_s)$ do estado $O(n_1, n_2, \dots, n_s)$. Quando os sítios são independentes, essa probabilidade pode ser expressa pela Equação 5.24.

Assim como a densidade de probabilidade dos estados permite avaliar propriedades médias do sistema, também pode-se alcançá-las a partir das probabilidades espaciais. A Equação 5.28 e a Equação 5.31 estabelecem uma clara relação entre a densidade de probabilidade espacial e a densidade de probabilidade dependente de estado. Ambas envolvem o conjunto de constantes do equilíbrio $K(n_1, n_2, \dots, n_s)$. Por esse resultado é possível combinar a densidade de probabilidade de estados de múltiplas ocupâncias do receptor em $\rho(\vec{R})$. Nesse contexto,

$$\langle A \rangle = \int_{\vec{R}} d\vec{R} \langle A \rangle_{\vec{R}} \rho(\vec{R}) \quad (5.35)$$

é a expressão para se obter a média do *ensemble* de qualquer propriedade termodinâmica do sistema $A(\vec{R})$ de acordo com a posição do ligante. Em particular, vale ressaltar que

$$\langle n \rangle = \int_{\delta V_j} d\vec{R} \rho_j(\vec{R}) \quad (5.36)$$

e

$$\langle n \rangle = \sum_{j=1}^s \langle n_j \rangle \quad (5.37)$$

correspondem, respectivamente, ao número médio de ligantes em um único sítio j e em todo o receptor no equilíbrio. Por fim, no entanto de grande relevância para comparação com experimentos de alta resolução, a Equação 5.28 e a Equação 5.31 são úteis para análise de projeções espaciais. O perfil de densidade dos ligantes ao longo do eixo de

simetria do receptor, eixo Z perpendicular a membrana, pode ser obtido por

$$\begin{aligned} \rho(z) = \int_{bulk} d\vec{R} \delta[z^*(\vec{R}) - z] \rho_{lig}(\vec{R}) + \sum_{j=1}^s \left[\int_{\delta V_j} d\vec{R} \delta[z^*(\vec{R}) - z] \rho_j(\vec{R}) \right] = \\ A \rho_{lig} + \sum_{j=1}^s \sum_{n_j=0}^{n_j^{max}} \rho(n_j) \int_{\delta V_j} d\vec{R} \delta[z^*(\vec{R}) - z] \rho_{n_j}(\vec{R}) \end{aligned} \quad (5.38)$$

em que $A = \Delta x \cdot \Delta y$ é a área total do sistema ao longo dos eixos x e y Cartesianos, perpendiculares ao eixo da projeção que está sendo avaliada. A função delta de Kronecker

$$\delta[z^*(\vec{R}) - z] = \begin{cases} 1, & \text{se } z^*(\vec{R}) = z \\ 0, & \text{se } z^*(\vec{R}) \neq z. \end{cases} \quad (5.39)$$

garante a avaliação apenas se a região \vec{R} estiver compreendida superfície correspondente ao valor escolhido do eixo z .

5.2 Impacto no Equilíbrio das Conformações por Interação com Ligante

Investigar a associação entre a ligação de uma molécula e seu impacto no funcionamento do receptor é complexo pela miríade de forças intermoleculares envolvidas e as mudanças de conformação resultantes. Contudo, a simples interação entre o ligante e o receptor não é garantia de modificação na atuação molecular de sua proteína, nem ao menos para determinar a efetividade de uma droga, por exemplo. Para apurar o impacto funcional da interação do quimiotipo, será considerada a situação de um receptor proteico com múltiplas conformações. Especificamente, será utilizada uma análise do ciclo termodinâmico de ligação para quantificar o impacto da ligação na energética de um canal iônico dependente de voltagem. Dessa forma, levando-se em conta o sistema ilustrado na 5.1.1, não obstante considerando o canal iônico dependente de voltagem como um receptor embebido na bicamada lipídica e submetido ao potencial elétrico de Nernst. Esse potencial de membrana é induzido pela distribuição assimétrica dos íons na entre os meios intra e extracelular. Já que a membrana celular é uma barreira para a difusão desses íons, há um gradiente de concentração e elétrico, originando o potencial de Nernst. A proteína possui uma natureza capacitiva, ou seja, não há uma grande liberdade dos íons em sua constituição básica, como ocorre com elétrons delocalizados em estruturas metálicas, dessa forma o potencial de Nernst induz um diferença de potencial V não somente pela membrana, mas também pela região do canal.

Primeiramente, denotar-se-á todas as coordenadas Cartesianas do sistema como \vec{r}^M , em seguida os átomos específicos da proteína como \vec{r}^P , de tal forma que os graus de liberdade restantes são dados por \vec{r}^{M-P} . Por conseguinte, a energia potencial do sistema é governada por três contribuições principais $U(\vec{r}^M) = U(\vec{r}^P) + U(\vec{r}^{M-P}) + U(\vec{r}^P, \vec{r}^{M-P})$ sendo que $U(\vec{r}^P)$, $U(\vec{r}^{M-P})$ e $U(\vec{r}^P, \vec{r}^{M-P})$ são, respectivamente, a energia interna da proteína, a energia interna do ambiente e, por fim, a energia de interação entre a proteína e o ambiente. Por essa definição, para uma configuração microscópica fixa da proteína, \vec{r}^P , a energia livre dessa proteína de membrana $F(\vec{r}^P, V)$ em função da diferença de voltagem V

$$e^{-\beta F(\vec{r}^P, V)} = \frac{\int d\vec{r}^{M-P} e^{-\beta[U(\vec{r}^P) + U(\vec{r}^{M-P}) + U(\vec{r}^P, \vec{r}^{M-P})]}}{\int d\vec{r}^{M-P} e^{-\beta U(\vec{r}^{M-P})}} \quad (5.40)$$

é dado pela energia potencial da proteína e seu acoplamento com o meio. Note que a integração ocorre pelas coordenadas Cartesianas dos átomos que não compõe a proteína \vec{r}^{M-P} . A energia livre $F(\vec{r}^P, V)$ pode ser decomposta em dois fatores

$$F(\vec{r}^P, V) = F(\vec{r}^P, 0) + VQ(\vec{Y}) \quad (5.41)$$

uma energia química e a outra relacionada a voltagem do sistema, de modo que $Q(\vec{Y})$ é a quantidade de *gating charge* para essa conformação, nesse sentido a energia potencial efetiva é

$$U_{eff} = U(\vec{r}^P) + Q(\vec{r}^P)V \quad (5.42)$$

quando há acoplamento ao potencial de membrana V , tendo a proteína uma carga efetiva $Q(\vec{r}^P)$. Para os canais iônicos dependentes de voltagem, esse é um dos principais descritores de seu funcionamento e está relacionado com alterações estruturais nessas proteínas, movimentação de resíduos, de forma que hélices são transladadas, modificando a conformação do canal. Então, para uma conformação específica da proteína \vec{Y} , estabelecida para um conjunto de configurações que satisfazem sua definição $\vec{Y} = \vec{R}(\vec{r}^P)$, assim é estipulada uma função delta de Kronecker

$$\delta[Y^*(\vec{r}^P) - \vec{Y}] = \begin{cases} 1, & \text{se } \vec{r}^P \text{ está contido nas configurações possíveis de } \vec{Y} \\ 0, & \text{se } \vec{r}^P \text{ não está contido nas configurações possíveis de } \vec{Y} \end{cases} \quad (5.43)$$

A partir da Equação 5.40, a energia livre nessa conformação específica é proporcional a

$$e^{-\beta F(\vec{Y}, V)} \propto \int d\vec{r}^P \delta[Y^*(\vec{r}^P) - \vec{Y}] e^{-\beta[U(\vec{r}^P) + Q(\vec{r}^P)V]} \quad (5.44)$$

A probabilidade da conformação \vec{Y} em uma determinada diferença de voltagem V é

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{e^{-\beta F(\vec{Y}, V)}}{\int d\vec{r}^{\vec{P}} e^{-\beta F(\vec{r}^{\vec{P}}, V)}} \quad (5.45)$$

tal que a normalização ocorre de acordo com a função de partição por todo o conjunto de conformações possíveis do canal. Para facilitar o problema, pode-se considerar um canal iônico dependente de voltagem com apenas dois estados conformacionais bem definidos, \vec{X} e \vec{Y} ,



porquanto a Equação 5.45 se resume a

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{e^{-\beta F(\vec{Y}, V)}}{e^{-\beta F(\vec{X}, V)} + e^{-\beta F(\vec{Y}, V)}} \quad (5.46)$$

em que $e^{\beta F(\vec{X}, V)}$ é definido para a conformação \vec{X} assim como feito para \vec{Y} em Equação 5.45. Ao definir a diferença de energia livre dada a aplicação de tensão elétrica através da membrana

$$e^{-\beta \Delta F(\vec{Y}, V)} = \frac{\int d\vec{r}^{\vec{P}} \delta[\vec{Y}^*(\vec{r}^{\vec{P}}) - \vec{Y}] e^{-\beta[U(\vec{r}^{\vec{P}}) + Q(\vec{r}^{\vec{P}})V]}}{\int d\vec{r}^{\vec{P}} e^{-\beta U(\vec{r}^{\vec{P}})}} \quad (5.47)$$

a probabilidade de densidades, visto Equação 5.46 então é

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{e^{-\beta[F(\vec{Y}, 0) + \Delta F(\vec{Y}, V)]}}{e^{-\beta[F(\vec{X}, 0) + \Delta F(\vec{X}, V)]} + e^{-\beta[F(\vec{Y}, 0) + \Delta F(\vec{Y}, V)]}} \quad (5.48)$$

em termos da energia energia livre química dependente de estado $F(\vec{X}, 0)$ e $F(\vec{Y}, 0)$ e o excesso de energia livre conforme os estados $\Delta F(\vec{X}, V)$ e $\Delta F(\vec{Y}, V)$. Os termos independentes de voltagem, $F(\vec{X}, 0)$ e $F(\vec{Y}, 0)$, correspondem à energia potencial microscópica da proteína e suas energias de solvatação, tanto polar quanto apolar, enquanto as contribuições dependentes de voltagem, $\Delta F(\vec{X}, V)$ e $\Delta F(\vec{Y}, V)$, são proporcionais a voltagem e a carga efetiva da proteína em seu respectivo estado conformacional. Para simplificar a Equação 5.48 é possível verificar que a razão entre as probabilidades dos estados conformacionais é

$$\frac{\rho(\vec{Y}, V)}{\rho(\vec{X}, V)} = \frac{e^{-\beta F(\vec{Y}, V)}}{e^{-\beta F(\vec{X}, V)}} = e^{-\beta[F(\vec{Y}, 0) - F(\vec{X}, 0)]} \cdot e^{-\beta V(Q(\vec{X}) - Q(\vec{Y}))} \quad (5.49)$$

em que $Q(\vec{X}) - Q(\vec{Y}) = \Delta Q$ é a diferença de *gating charge* resultante da mudança na carga efetiva da proteína em cada estado conformacional, assim

$$\Delta F(\vec{Y}, V) - \Delta F(\vec{X}, V) = V\Delta Q \quad (5.50)$$

Para um potencial específico, denominado $V_{1/2}$, metade das proteínas estão na conformação \vec{Y} e a outra metade no estado \vec{X} , de modo que

$$\frac{\rho(\vec{X}, V_{1/2})}{\rho(\vec{Y}, V_{1/2})} = 1 \Rightarrow V = V_{1/2} \quad (5.51)$$

portanto

$$F(\vec{Y}, 0) - F(\vec{X}, 0) = -V_{1/2}\Delta Q \quad (5.52)$$

assim, a constante de equilíbrio, independente da voltagem, entre os estados conformacionais é

$$K(V = 0) = e^{\beta V_{1/2}\Delta Q} \quad (5.53)$$

Logo, dividindo todos os fatores da direita da Equação 5.48 por $e^{-\beta[F(\vec{Y}, 0) + \Delta F(\vec{Y}, V)]}$, obtém-se a conhecida equação de Boltzmann de dois estados

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{1}{1 + e^{\beta[V - V_{1/2}]\Delta Q}} \quad (5.54)$$

A constante do equilíbrio entre os estados \vec{X} e \vec{Y} de acordo com o potencial elétrico é

$$K(V) = \frac{\rho(\vec{Y}, V)}{\rho(\vec{X}, V)} = e^{-\beta[V - V_{1/2}]\Delta Q} \quad (5.55)$$

Agora, ao considerar o canal iônico em um ambiente com ligantes, pode ocorrer alteração nas probabilidades entre os estados. Então, o efeito do ligante é analisado por meio da análise de um ciclo termodinâmico com todos os estados de ligação da molécula na proteína de membrana incluindo o estado não ligado. Nessa situação, as densidades de probabilidades das conformações da proteína são

$$\rho(\vec{X}, V) = \sum_{(n_1, n_2, \dots, n_s)} \rho(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X}, V) \quad (5.56)$$

e

$$\rho(\vec{Y}, V) = \sum_{(n_1, n_2, \dots, n_s)} \rho(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y}, V) \quad (5.57)$$

em que as probabilidades de cada estado podem ser reescritas as probabilidades de acordo com a probabilidade do estado de referência $\rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{X}, V)$, lembrando da Equação

ção 5.2 em que $\rho(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X}, V) = K_b(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X}, V) \cdot \rho_{lig}^n \cdot \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{X}, V)$, por exemplo

$$\begin{aligned} \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V) &= K(V) \cdot \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{X}, V) \\ \rho(1_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V) &= K(1_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V) \cdot \rho_{lig} \cdot K(V) \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{X}, V) \\ \rho(1_1, 1_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V) &= \frac{K(1_1, 1_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V)}{K(1_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V)} \cdot K(1_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{Y}, V) \rho_{lig}^2 \cdot K(V) \rho(0_1, 0_2, \dots, 0_s, \vec{X}, V) \\ &\dots \end{aligned} \tag{5.58}$$

As funções de partição que se estendem por todo o conjunto de estados ligados para as conformações \vec{X} e \vec{Y} são

$$Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X}) = \sum_{n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*} \rho_{lig}^{n_1^* + n_2^* + \dots + n_s^*} K(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*, \vec{X}) \tag{5.59}$$

e

$$Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y}) = \sum_{n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*} \rho_{lig}^{n_1^* + n_2^* + \dots + n_s^*} K(n_1^*, n_2^*, \dots, n_s^*, \vec{Y}) \tag{5.60}$$

de tal forma que

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{\rho(\vec{Y}, V)}{\rho(\vec{Y}, V) + \rho(\vec{X}, V)} = \frac{K(V) \cdot Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y})}{Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X}) + K(V) Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y})} \tag{5.61}$$

simplifica a

$$\rho(\vec{Y}, V) = \frac{1}{1 + \frac{Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X})}{Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y})} e^{\beta \Delta Q[V - V_{1/2}]}} \tag{5.62}$$

a equação de Boltzmann de dois estados, com a contribuição adicional da energia livre de ligação

$$e^{\beta \Delta \Delta G_{bind}} = \frac{Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{X})}{Z(n_1, n_2, \dots, n_s, \vec{Y})} \tag{5.63}$$

5.2.1 Efeito de Múltiplos Sítios no *Gating* do canal Kv1.2 Selevagem

Como forma de desenvolver uma primeira ilustração para o esquema anteriormente descrito, são aqui apresentados resultados preliminares de modulação do canal Kv1.2 por sevoflurano. A partir dos resultados, como as liberdades rotacional e translacional, além das energias encontrados pelo método do LIE, foi possível estimar as constantes de ligação

para diferentes estados ocupados do canal pela Equação 3.19 assumindo independência dos sítios, semelhante a Equação 5.23, e com base no somatório das energias livres de ligação (Equação 5.21), de modo que

$$K(n_1, n_2, \dots, n_s) \approx \frac{1}{n_1! \dots n_s!} \frac{(\delta V_1)^{n_1} \dots (\delta V_s)^{n_s} (\delta \Omega_1)^{n_1} \dots (\delta \Omega_s)^{n_s}}{(8\pi^2)^n} e^{-\beta[W(n_1, \dots, n_s) - n\bar{\mu}]} \quad (5.64)$$

e assim

$$\begin{aligned} K_b(n_1, 0_2, \dots, 0_s) &= \frac{1}{n_1!} \frac{(\delta V_1)^{n_1} \cdot (\delta \Omega_1)^{n_1}}{(8\pi)^1} e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_1}) - n_1\bar{\mu}]} \\ K_b(0_1, n_2, \dots, 0_s) &= \frac{1}{n_2!} \frac{(\delta V_2)^{n_2} \cdot (\delta \Omega_2)^{n_2}}{(8\pi)_2^n} e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_2}) - n_2\bar{\mu}]} \\ &\dots \\ K_b(0_1, 0_2, \dots, n_s) &= \frac{1}{n_s!} \frac{(\delta V_s)^{n_s} \cdot (\delta \Omega_s)^{n_s}}{(8\pi)_s^n} e^{-\beta[W^*(\vec{R}^{n_s}) - n_s\bar{\mu}]} \end{aligned} \quad (5.65)$$

e, conseqüentemente, aplicando a Equação 5.9. A distribuição dos ligantes no canal iônico foi computada levando em conta os resultados obtidos por *docking* molecular. Além disso, a densidade considerada foi como aquela calculada para as interações do ligante livre em solução, ou seja, de uma molécula em uma caixa de água de aproximadamente 70Å de lado.

Diante desse arcabouço teórico, foram estimadas as densidades de probabilidades dos estados ligados para a molécula de sevoflurano no canal Kv1.2 selvagem. Nessa análise, foram considerados apenas os sítios 3, 5, 9 e 12, pela disponibilidade das informações. Por conseguinte, como formulado em Equação 5.24, a probabilidade de um determinado número de ligantes estar interagindo com o canal difere de acordo com a conformação (Figura 5.1 e Figura 5.2).

A distribuição de ligantes nas conformações se distinguem essencialmente na quantidade de anestésicos nas cavidades. Os estados mais prováveis na conformação aberta apresentam um total de três ligantes com interação com o canal, enquanto para a conformação fechada esse número sobe para quatro ligantes. Há maior espalhamento das probabilidades no canal fechado. O maior número de ligantes na conformação fechada pode pesar mais para essa conformação, no entanto a maior probabilidade de ligação dos três sevofluranos na conformação aberta contribuiu mais para a partição de energia de cada estado. Ao considerar as partições, foi estimado uma reação macroscópica consoante às afinidades encontradas por aplicação da Equação 5.63 (Figura 5.3).

A tendência obtida para a curva calculada (azul em Figura 5.3) vai ao encontro do resultado experimental com sevoflurano, de forma que em menores voltagens a condução é maior que na ausência de sevoflurano. Contudo, é fácil notar que a curva não é tão deslocada para voltagens negativas quanto o resultado experimental na presença do

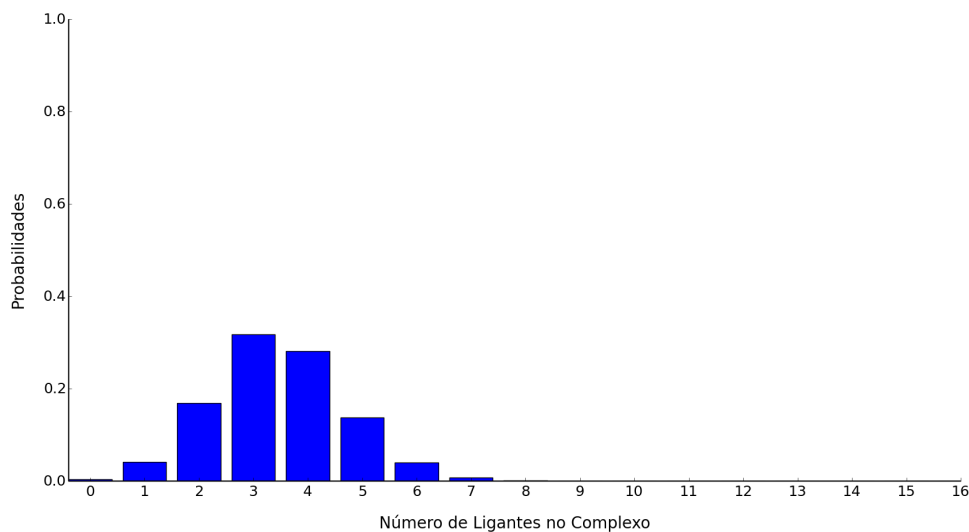


Figura 5.1: Probabilidades de diferentes estados ligados do complexo Kv1.2/Sevoflurano, na conformação aberta, de acordo com o número de anestésicos ancorados.

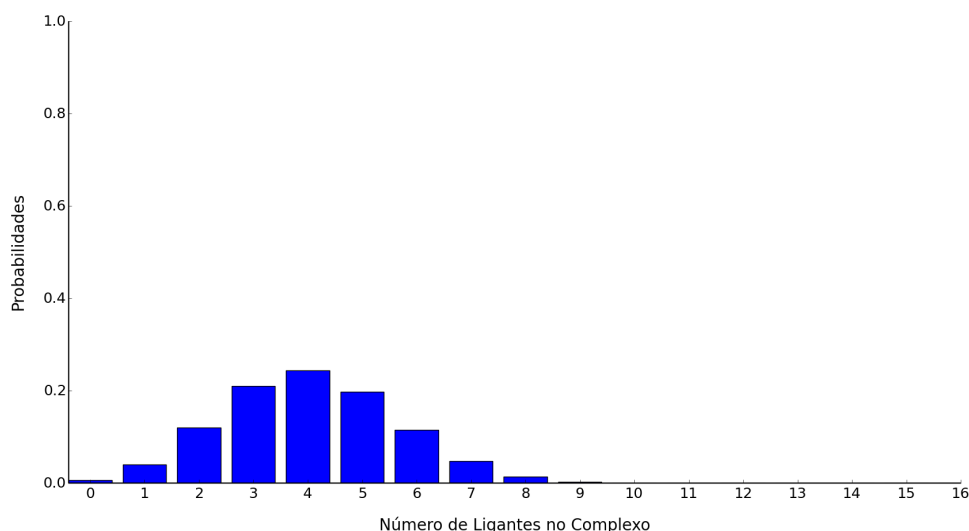


Figura 5.2: Probabilidades de diferentes estados ligados do complexo Kv1.2/Sevoflurano, na conformação fechada, de acordo com o número de anestésicos ancorados.

anestésico. Ademais, não houve aumento da condutância máxima. Esse comportamento ocorre principalmente por considerar apenas duas conformações, a aberta e a fechada. Ao considerar, também, as conformações pré-aberta e os estados inativos poderia ser possível reproduzir de forma mais exata a curva experimental. Além disso, não foram investigadas as ocupâncias múltiplas de cada sítio, sendo estes encontrados em simulações de *flooding* com energias apreciáveis. [81] Incluir as afinidades de ligação de uma segunda molécula em um mesmo sítio poderia modificar a probabilidade para conformações que propiciam

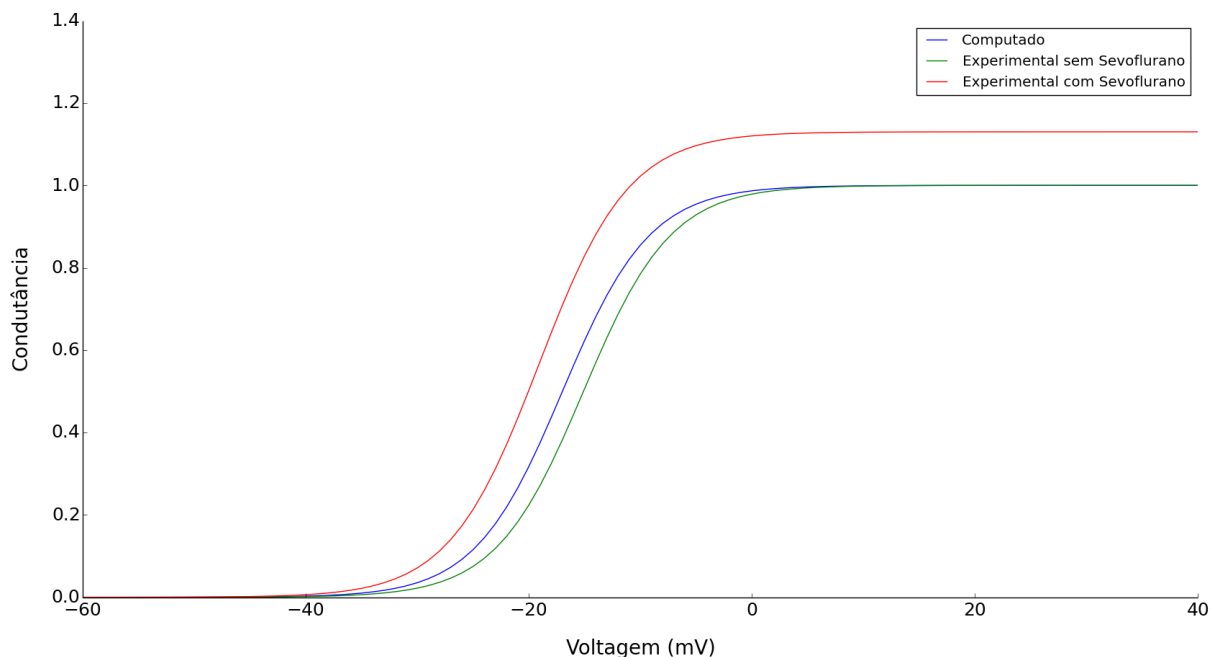


Figura 5.3: Relação entre condutância e voltagem para o canal iônico Kv1.2 selvagem na presença e na ausência de sevoflurano. As curvas vermelha e verde são resultado de dados de eletrofisiologia [61], já a curva azul é o resultado de cálculo do canal com interação com moléculas de sevoflurano. Valores de $V_{1/2}$ e *gating charge* para a curva calculada são dados pelos parâmetros encontrados experimentalmente do canal na ausência de anestésico..

um maior volume de sítios efetivos.

Com as distribuições espaciais, juntamente com as probabilidades dos estados, foi calculado o perfil de densidade dos ligantes em um eixo paralelo eixo de simetria do canal iônico, o eixo Z (Equação 5.38, Figura 5.4). O perfil de probabilidades voltada para o meio extracelular é consideravelmente mais conspicuo na conformação aberta, contrariamente a conformação fechada é pautada por maior distribuição na região no *linker* S4-S5. Esse comportamento é resposta aos resultados de distribuição obtidos pelo *docking* molecular. O pico mais agudo de probabilidades na região do filtro de seletividade é acentuado pela boa afinidade encontrada para o sitio atrás do filtro de seletividade. Esse resultado além de ilustrar como seriam as interações do sevoflurano com o canal de forma tridimensional, podem indicar uma comparação com resultados de interferometria quando projetados no eixo Z ([42]).

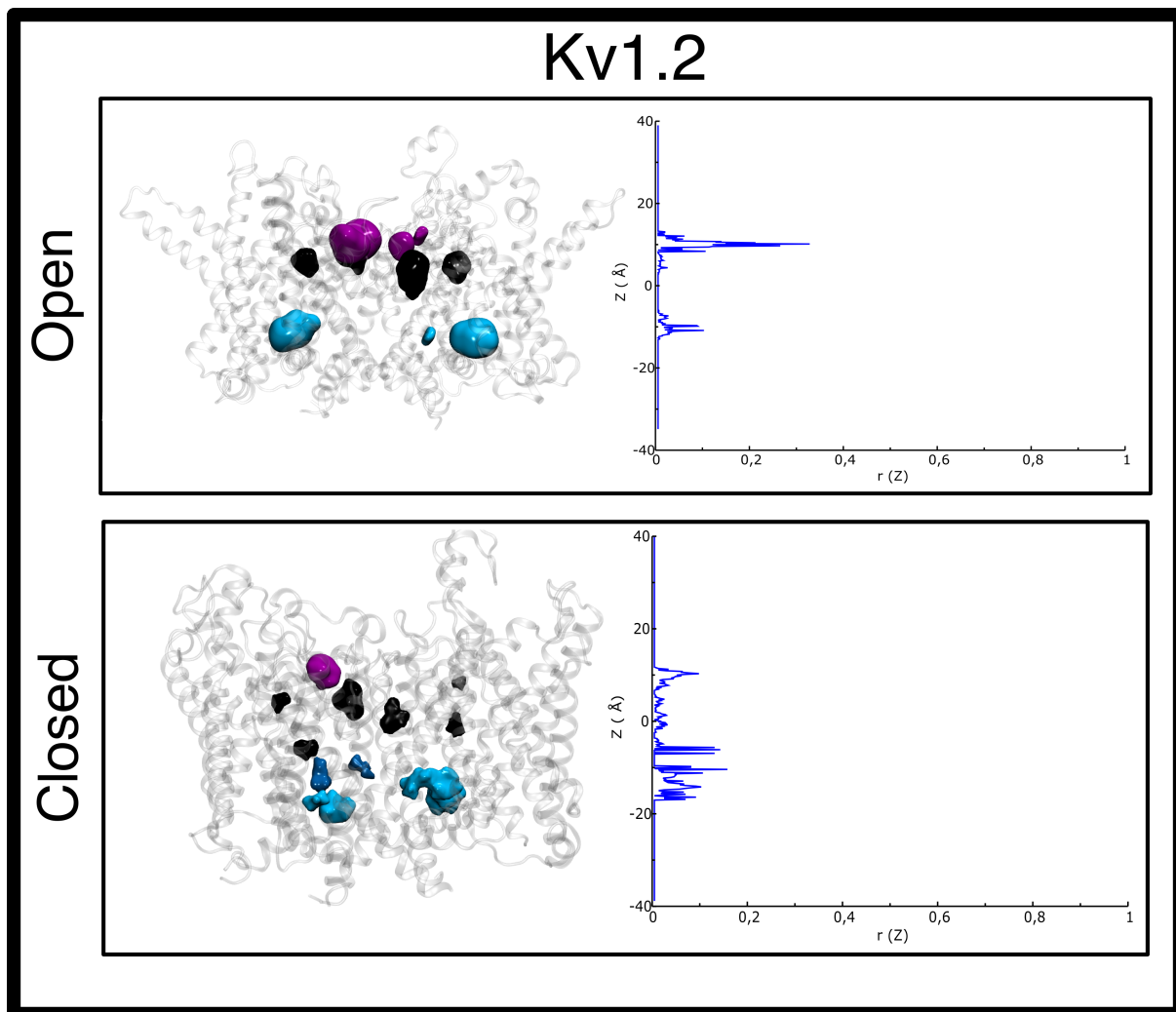


Figura 5.4: À esquerda, canal iônico Kv1.2 selvagem, nas conformações aberta e fechada, em destaque as ocupâncias obtidas pelas soluções gerados pelo *docking*. Em azul estão as soluções dos sítios do *linker* S4-S5, em preto os sítios de interface entre subunidades em S5-S6 e em lilás a cavidade atrás do filtro de seletividade. À direita, perfil de densidades no eixo Z de acordo com as ocupâncias encontradas por *docking* molecular e afinidades dadas pelo método LIE.

Capítulo 6

Conclusão

Neste trabalho foi avaliado o padrão de ligação do anestésico geral, sevoflurano, no canal dependente de voltagem Kv1.2. Com base em resultados encontrados por eletrofisiologia, foi também estudada uma isoforma do canal Kv1.2, a qual apresentava uma mutação pontual no resíduo 329 de glicina para treonina, que confere maior sensibilidade ao anestésico. Para estas finalidades, foram empregadas técnicas de dinâmica molecular, em conjunto com *docking* molecular para exploração dos modos de ligação do sevoflurano e a metodologia do LIE para cálculo das energias livres de ligação.

Pode-se perceber que tanto o canal Kv1.2 quanto o Kv1.2 G329T possuem menor flutuação estrutural na conformação fechada, visto a maior estabilidade dessa conformação. Ademais, no canal mutante, a região entre a porção final do *linker*, a qual está relacionada ao acoplamento da movimentação do domínio sensor de voltagem com o poro, e a do início da hélice S5 foi ligeiramente mais estável. Esse comportamento modifica o equilíbrio conformacional do estado pré-aberto, de modo que sítios de ligação podem estar mais disponíveis com essa mutação. Estudos da cinética do *gating* do canal mutado poderiam evidenciar de forma mais clara o impacto da mutação na estrutura.

Foram identificados doze sítios de ligação, espalhados em quatro regiões da proteína, a extracelular, a do *linker* S4-S5, do domínio sensor de voltagem e da cavidade central. Cálculos de *docking* molecular indicaram ligação conformação dependente dos conjuntos de sítios do *linker* e da região extracelular. Na conformação aberta, foram encontrados maior número de modos de ligação nos sítios próximos ao filtro de seletividade, enquanto na conformação fechada as soluções ficaram dispersas na região do *linker*, tanto no canal selvagem quanto no mutado.

Foi possível verificar que o *docking* molecular da forma como utilizado nesse trabalho pode prover boas estruturas do anestésico ligado ao canal iônico, no entanto as energias de ligação fornecidas não estão entre as mais acuradas. Assim, os resultados do *docking* foram importantes pela ausência de estruturas cristalográficas do complexo, proporcionando as

estruturas iniciais para metodologias mais rigorosas de afinidade.

As estimativas da energia livre de ligação para os quatro sítios, dois na região *linker* e dois na região extracelular, indicam que a modulação positiva do canal por sevoflurano ocorre por dois processos distintos e envolve múltiplos sítios. O aumento da condutância em menores voltagens possivelmente ocorre por interações alostéricas em múltiplos sítios, alterando a estabilidade de um estado pré-aberto não condutivo, o qual é mais conspícuo no canal mutado. Já o aumento da condutância máxima pode ocorrer por ligação ao sítio atrás do filtro de seletividade, estabilizando conformações condutoras.

A associação entre as afinidades encontradas e resultados macroscópicos de alteração da relação condutância/voltagem não é direta. Por conseguinte, foi utilizado um esquema teórico que considera a relação de múltiplas interações de várias moléculas do anestésico com o equilíbrio de diferentes estados do canal iônico. Por aplicação desse esquema com as constantes de ligação encontradas para o canal Kv1.2 selvagem pela metodologia *docking*/LIE, foi obtida a mesma tendência de modulação de dados experimentais. Contudo, há necessidade de refinar os cálculos, de modo a considerar outros estados conformacionais relevantes e múltiplas ocupâncias para um mesmo sítio, a fim de conseguir reproduzir com sucesso a relação entre condutância e voltagem na presença do anestésico sevoflurano.

Capítulo 7

Perspectivas e Trabalhos em Andamento

7.1 Estados Conformacionais de Canais de Potássio Dependentes de Voltagem

Diversos estudos têm se concentrado na elucidação das estruturas inativas de canais iônicos. [93, 76, 23] A cristalização ou boa definição de modelos dos estados inativos podem ser essenciais para a investigação à nível molecular do mecanismo de ação de anestésicos gerais. Explorar os diferentes sítios e afinidades nessas conformações pode ajudar a esclarecer o efeito experimental de aumento de condutância máximo do canal Kv1.2 por sevoflurano. O sítio na cavidade na região atrás do filtro de seletividade parece estar intimamente associado à estabilidade de estados condutores do canal iônico (Figura 7.1). Para confirmar a hipótese, estudos futuros de energia livre entre os estados condutores e não condutores do filtro de seletividade, assim como descrição da hidratação se mostram indispensáveis. Além disso, melhor descrição dos estados intermediários entre as conformação de repouso (domínio sensor de voltagem inativo e poro fechado) e aberta (domínio sensor de voltagem ativo e poro aberto) são cruciais para analisar com mais detalhes a forma como a mutação G329T modifica a sensibilidade do canal Kv1.2.

Nesse intuito, uma simulação do canal Kv1.2 selvagem na ausência de qualquer viés, em que a cavidade atrás do filtro de seletividade em cada subunidade é ocupada por uma molécula de sevoflurano, está sendo estendida e analisada. De forma preliminar, são averiguados dois padrões de ligação principais, nos quais o anestésico permanece ligado por toda a simulação. Em um deles a molécula de sevoflurano impede a presença de moléculas de água, de forma que na maior parte da simulação o sítio fica protegido. No outro padrão, há entrada de moléculas de água que ocupam concomitantemente o sítio

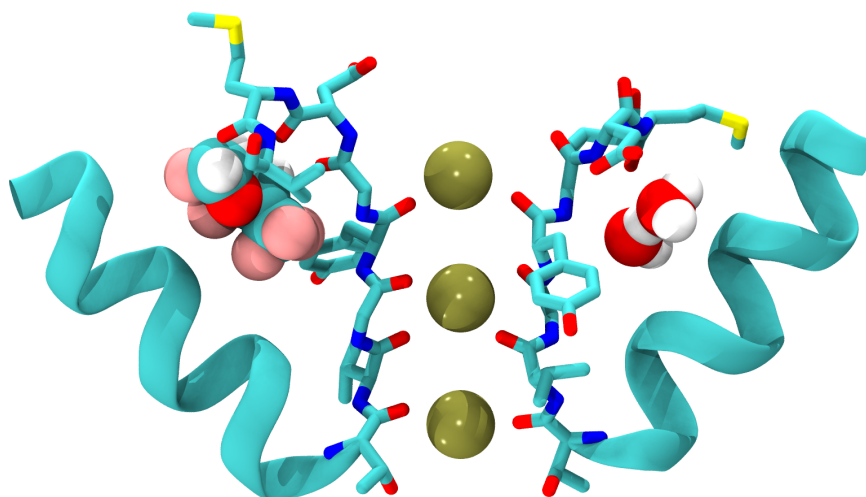


Figura 7.1: Detalhes de uma molécula de sevoflurano no sítio do filtro de seletividade de uma subunidade do canal iônico Kv1.2. É possível perceber a cavidade correspondente a esse sítio em outra subunidade sendo ocupada por duas moléculas de água. Íons ocupam as posições S0-S2-S4 do filtro de seletividade.

(Figura 7.2).

É possível observar que mesmo quando o sítio permanece com a cavidade seca e ocupada por sevoflurano, há movimentação das carbonilas da valina, um dos importantes constituintes do filtro de seletividade. Aliás, não foram encontradas ligações de hidrogênio entre as carbonilas da cadeia principal do filtro de seletividade. O anestésico não apresenta muita rotação e permanece com uma distância média de 2\AA do centro do sítio. Um dos indicadores que o filtro de seletividade permanece em uma conformação não constricta, é a distância entre o carbono alfa estar acima de 7\AA . São necessários outros estudos para determinar se e, então, como a interação nesse sítio altera probabilidade de abertura do canal.

7.2 Modos de Interação de Anestésicos Gerais e suas Afinidades

Como desenvolvido na Seção 5.1.5, a metodologia FEP (Seção 3.3.2) é adequada ao esquema teórico, além de possuir maior acurácia de cálculo. Em continuidade a este trabalho, extensivos cálculos de energia livre estão sendo realizados para cada um dos sítios encontrados, de forma a obter as melhores estimativas para a interação com essas cavidades. Para esses novos cálculos, os sítios correspondentes em cada uma das subunidades

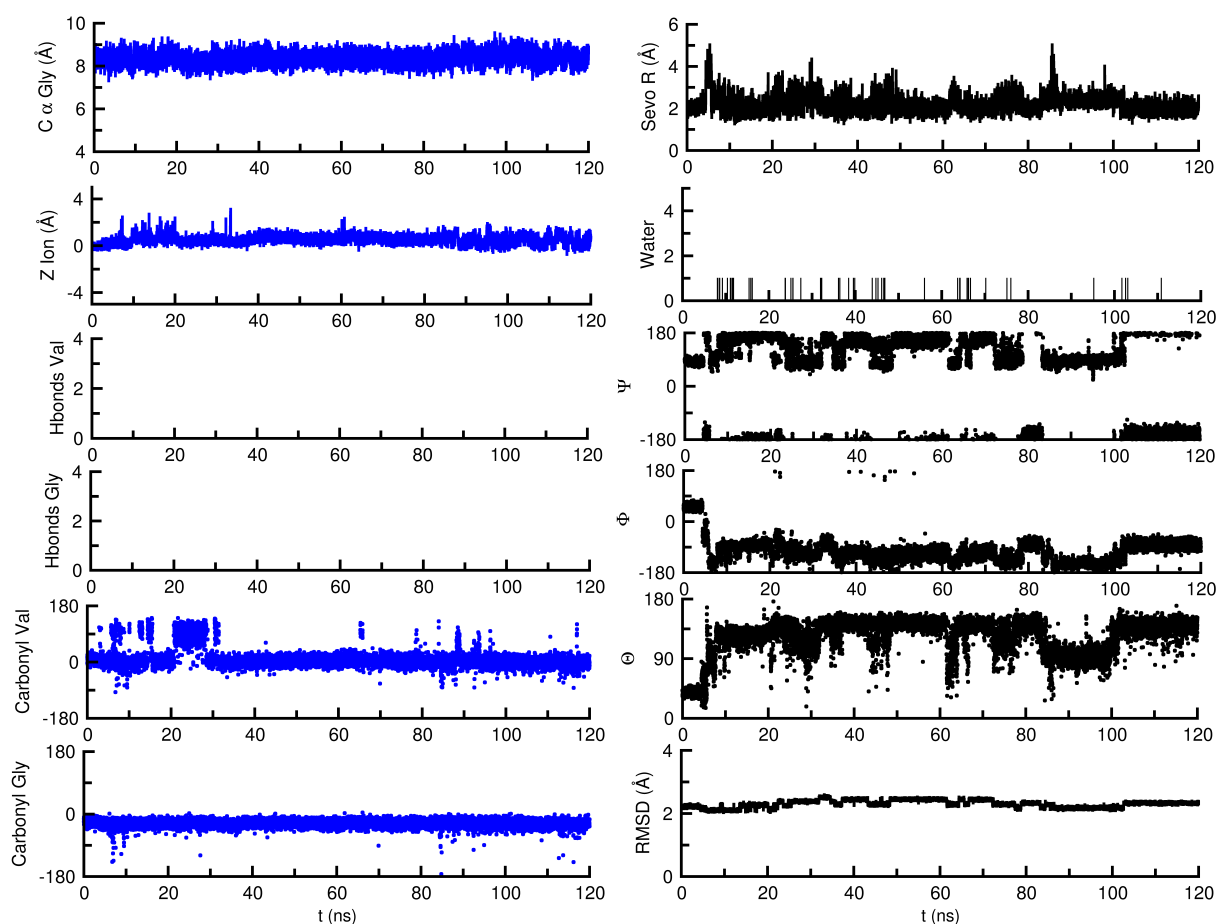


Figura 7.2: Medidas de caracterização da ligação do anestésico geral sevoflurano no sítio atrás do filtro de seletividade do canal Kv1.2. Em azul estão medidas de distância dentre os $C\alpha$ da glicina do filtro de seletividade (SF), a posição de um dos íons no caminho de permeação do canal em relação ao centro de massa das glicinas do SF, número de ligações de hidrogênio com o grupo carbonil dos resíduos do SF, glicina e carbonila, e rotação do grupo carbonil desses mesmos aminoácido. Em preto estão a distância da molécula de sevoflurano em relação ao centro do sítio de ligação, número de moléculas de água na cavidade atrás do SF, ângulos de Euler Φ , Ψ e Θ do sevoflurano e o RMSD do sevoflurano ligado em relação à sua otimização estrutural no gás.

estão sendo considerados independentemente. Ainda, cálculos de *docking* molecular foram realizadas para investigar múltiplas ocupâncias para cada sítio de ligação. Foram encontradas maior ocorrência de dupla ocupância na região do *linker* S4-S5, assim como no sítio entre as subunidades adjacentes. Análises dos resultados encontrados e cálculos de energia livre de múltiplas ocupâncias ainda estão sendo realizadas. Além desses cálculos, para medidas mais precisas, pode ser necessária a comparação da energia livre de ligação da saída do anestésico da membrana para a cavidade para sítios em contato direto com fosfolipídios.

Referências

- [1] ALIFIMOFF, J. K., FIRESTONE, L. L., AND MILLER, K. W. Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *British Journal of Pharmacology* 96, 1 (Jan. 1989), 9–16. 11
- [2] ALMLÖF, M., CARLSSON, J., AND ÅQVIST, J. Improving the Accuracy of the Linear Interaction Energy Method for Solvation Free Energies. *Journal of Chemical Theory and Computation* 3, 6 (Nov. 2007), 2162–2175. 35
- [3] ANDERSEN, H. C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of Chemical Physics* 72, 4 (Feb. 1980), 2384–2393. 28
- [4] ANDERSON, P. A., AND GREENBERG, R. M. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 129, 1 (May 2001), 17–28. 5
- [5] ANDRES-ENGUIX, I., CALEY, A., YUSTOS, R., SCHUMACHER, M. A., SPANU, P. D., DICKINSON, R., MAZE, M., AND FRANKS, N. P. Determinants of the anesthetic sensitivity of two-pore domain acid-sensitive potassium channels: molecular cloning of an anesthetic-activated potassium channel from *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 29 (July 2007), 20977–20990. 13
- [6] AQVIST, J., AND MARELIUS, J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4, 8 (Dec. 2001), 613–626. 35
- [7] AQVIST, J., MEDINA, C., AND SAMUELSSON, J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering* 7, 3 (Mar. 1994), 385–391. 34
- [8] ARMSTRONG, C. M. Interaction of Tetraethylammonium Ion Derivatives with the Potassium Channels of Giant Axons. *The Journal of General Physiology* 58, 4 (Oct. 1971), 413–437. 13
- [9] BARBER, A. F., CARNEVALE, V., KLEIN, M. L., ECKENHOFF, R. G., AND COVARRUBIAS, M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 18 (May 2014), 6726–6731. xvi, 13, 41, 59, 65
- [10] BARBER, A. F., LIANG, Q., AMARAL, C., TREPTOW, W., AND COVARRUBIAS, M. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophysical journal* 101, 7 (Oct. 2011), 1613–1622. 15, 47, 63

- [11] BARBER, A. F., LIANG, Q., AND COVARRUBIAS, M. Novel Activation of Voltage-gated K⁺ Channels by Sevoflurane. *Journal of Biological Chemistry* 287, 48 (Nov. 2012), 40425–40432. 13, 15, 54, 63
- [12] BAYLISS, D. A., AND BARRETT, P. Q. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 11 (Nov. 2008), 566–575. 18
- [13] BERTHOUD, M. C., AND REILLY, C. S. Adverse effects of general anaesthetics. *Drug Safety* 7, 6 (Dec. 1992), 434–459. 13
- [14] BHATTACHARJI, A., KLETT, N., GO, R., AND COVARRUBIAS, M. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 K^v channel: Research paper. *British Journal of Pharmacology* 159, 7 (2010), 1475–1485. 13
- [15] BURCHARDI, H., AND KACZMARCZYK, G. The effect of anaesthesia on renal function. *European Journal of Anaesthesiology* 11, 3 (May 1994), 163–168. 13
- [16] CARLSSON, J., BOUKHARTA, L., AND AQVIST, J. Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 9 (May 2008), 2648–2656. 35, 56
- [17] CARLSSON, J., AND ÅQVIST, J. Calculations of solute and solvent entropies from molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* 8, 46 (Nov. 2006), 5385–5395. 35
- [18] CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 1 (Apr. 2000), 13–25. 6
- [19] CHANDA, B., AND BEZANILLA, F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *The Journal of General Physiology* 120, 5 (Nov. 2002), 629–645. 6
- [20] CHEN, J., CHEN, L., WANG, Y., WANG, X., AND ZENG, S. Exploring the Effects on Lipid Bilayer Induced by Noble Gases via Molecular Dynamics Simulations. *Scientific Reports* 5 (Nov. 2015), 17235. 11
- [21] CHOE, S. Potassium channel structures. *Nature Reviews. Neuroscience* 3, 2 (Feb. 2002), 115–121. 1
- [22] COVARRUBIAS, M., VYAS, T. B., ESCOBAR, L., AND WEI, A. Alcohols Inhibit a Cloned Potassium Channel at a Discrete Saturable Site INSIGHTS INTO THE MOLECULAR BASIS OF GENERAL ANESTHESIA. *Journal of Biological Chemistry* 270, 33 (Aug. 1995), 19408–19416. 13
- [23] CUELLO, L. G., JOGINI, V., CORTES, D. M., AND PEROZO, E. Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature* 466, 7303 (July 2010), 203–208. 89

- [24] CURTIS, H. J., AND COLE, K. S. Membrane action potentials from the squid giant axon. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 15, 2 (Apr. 1940), 147–157. 4
- [25] CUSHMAN, S. J., NANAQ, M. H., JAHNG, A. W., DERUBEIS, D., CHOE, S., AND PFAFFINGER, P. J. Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nature Structural & Molecular Biology* 7, 5 (May 2000), 403–407. 18
- [26] DARRÉ, L., AND DOMENE, C. Binding of Capsaicin to the TRPV1 Ion Channel. *Molecular Pharmaceutics* 12, 12 (Dec. 2015), 4454–4465. 24
- [27] DELEMOTTE, L., TAREK, M., KLEIN, M. L., AMARAL, C., AND TREPTOW, W. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15 (Apr. 2011), 6109–6114. 00046 PMID: 21444776. 40, 42, 43
- [28] DICKINSON, R., FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Thermodynamics of anesthetic/protein interactions. Temperature studies on firefly luciferase. *Biophysical Journal* 64, 4 (Apr. 1993), 1264–1271. 12
- [29] FAVRE, I., MOCZYDŁOWSKI, E., AND SCHILD, L. On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. *Biophysical Journal* 71, 6 (Dec. 1996), 3110–3125. 6
- [30] FERREYRA, G., LONG, Y., AND RANIERI, V. M. Respiratory complications after major surgery. *Current Opinion in Critical Care* 15, 4 (Aug. 2009), 342–348. 13
- [31] FRANKS, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology* 147, S1 (Jan. 2006), S72–S81. 12
- [32] FRANKS, N. P. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews. Neuroscience* 9, 5 (May 2008), 370–386. 13, 18
- [33] FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 300, 5892 (Dec. 1982), 487–493. 11
- [34] FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310, 5978 (1984), 599–601. 12
- [35] FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature* 316, 6026 (July 1985), 349–351. 11
- [36] FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science (New York, N.Y.)* 254, 5030 (Oct. 1991), 427–430. 12
- [37] FRANKS, N. P., AND LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367, 6464 (Feb. 1994), 607–614. 13

- [38] FRENCH, R. J., AND SHOUKIMAS, J. J. Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. *Biophysical Journal* 34, 2 (Jan. 1981), 271–291. 13
- [39] FRENKEL, D., AND SMIT, B. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*, 2nd ed ed. No. 1 in Computational science series. Academic Press, San Diego, 2002. 28
- [40] GAUDREAU, F., AND NAJMANOVICH, R. J. FlexAID: Revisiting Docking on Non-Native-Complex Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling* 55, 7 (July 2015), 1323–1336. 31
- [41] GOLDSTEIN, D. B. The Effects of Drugs on Membrane Fluidity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 24, 1 (1984), 43–64. 11
- [42] GUPTA, S., DURA, J. A., FREITES, J. A., TOBIAS, D. J., AND BLASIE, J. K. Structural Characterization of the Voltage-Sensor Domain and Voltage-Gated K⁺-Channel Proteins Vectorially Oriented within a Single Bilayer Membrane at the Solid/Vapor and Solid/Liquid Interfaces via Neutron Interferometry. *Langmuir* 28, 28 (July 2012), 10504–10520. 85
- [43] HANSSON, T., MARELIUS, J., AND AQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 12, 1 (Jan. 1998), 27–35. 34
- [44] HEROLD, K. F., AND HEMMINGS JR., H. C. Sodium Channels as Targets for Volatile Anesthetics. *Frontiers in Pharmacology* 3 (Mar. 2012). 13
- [45] HERVIEU, G. J., CLUDERAY, J. E., GRAY, C. W., GREEN, P. J., RANSON, J. L., RANDALL, A. D., AND MEADOWS, H. J. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 103, 4 (2001), 899–919. 13
- [46] HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal* 22, 2 (May 1978), 283–294. 1, 5, 7
- [47] HODGKIN, A. L., AND HUXLEY, A. F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 3651 (Oct. 1939), 710–711. 4
- [48] HOLMGREN, M., SMITH, P. L., AND YELLEN, G. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *The Journal of General Physiology* 109, 5 (May 1997), 527–535. 13
- [49] HOOVER, N. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review. A* 31, 3 (Mar. 1985), 1695–1697. 28
- [50] HUANG, J., AND MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry* 34, 25 (Sept. 2013), 2135–2145. 37

- [51] HUANG, P.-T., SHIAU, Y.-S., AND LOU, K.-L. The interaction of spider gating modifier peptides with voltage-gated potassium channels. *Toxicon* 49, 2 (Feb. 2007), 285–292. 13
- [52] HUMPHREY, W., DALKE, A., AND SCHULTEN, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996), 33–38. 38
- [53] ISHIDA, I. G., RANGEL-YESCAS, G. E., CARRASCO-ZANINI, J., AND ISLAS, L. D. Voltage-dependent gating and gating charge measurements in the Kv1.2 potassium channel. *The Journal of General Physiology* 145, 4 (Apr. 2015), 345–358. 45
- [54] JENSEN, M. , JOGINI, V., EASTWOOD, M. P., AND SHAW, D. E. Atomic-level simulation of current–voltage relationships in single-file ion channels. *The Journal of General Physiology* 141, 5 (May 2013), 619–632. 24, 43
- [55] JOGINI, V., AND ROUX, B. Dynamics of the Kv1.2 Voltage-Gated K⁺ Channel in a Membrane Environment. *Biophysical Journal* 93, 9 (Jan. 2007), 3070–3082. 43
- [56] JORGENSEN, W. L., CHANDRASEKHAR, J., MADURA, J. D., IMPEY, R. W., AND KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 79, 2 (July 1983), 926–935. 38
- [57] KIRKWOOD, J. G. Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *The Journal of Chemical Physics* 3, 5 (May 1935), 300–313. 71
- [58] KRASZEWSKI, S., TAREK, M., TREPTOW, W., AND RAMSEYER, C. Affinity of C60 neat fullerenes with membrane proteins: a computational study on potassium channels. *ACS nano* 4, 7 (July 2010), 4158–4164. 13, 35, 56
- [59] KULLMANN, D. M., AND HANNA, M. G. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. *The Lancet. Neurology* 1, 3 (July 2002), 157–166. 5
- [60] LEHNINGER, A. *Princípios de bioquímica*. Sarvier, São Paulo, 2006. 1, 2
- [61] LIANG, Q., ANDERSON, W. D., JONES, S. T., SOUZA, C. S., HOSOUME, J. M., TREPTOW, W., AND COVARRUBIAS, M. Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLoS ONE* 10, 11 (Nov. 2015), e0143363. xii, xiii, xiv, xvi, xvii, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 40, 58, 61, 63, 65, 85
- [62] LIUDYNO, M. I., BIRCH, A. M., TANAKA, B. S., SOKOLOV, Y., GOLDIN, A. L., CHANDY, K. G., HALL, J. E., AND ALKIRE, M. T. Shaker-Related Potassium Channels in the Central Medial Nucleus of the Thalamus Are Important Molecular Targets for Arousal Suppression by Volatile General Anesthetics. *The Journal of Neuroscience* 33, 41 (Oct. 2013), 16310–16322. 13, 14, 66
- [63] LONG, S. B., CAMPBELL, E. B., AND MACKINNON, R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* 309, 5736 (Aug. 2005), 897–903. 7

- [64] LU, Z., KLEM, A. M., AND RAMU, Y. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 6858 (Oct. 2001), 809–813. 5
- [65] LUO, H., AND SHARP, K. On the calculation of absolute macromolecular binding free energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 16 (Aug. 2002), 10399–10404. 35
- [66] MACKERELL, A. D., BASHFORD, D., BELLOTT, M., DUNBRACK, R. L., EVANSECK, J. D., 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., ROUX, B., SCHLENKRICH, M., SMITH, J. C., STOTE, R., STRAUB, J., WATANABE, M., WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J., YIN, D., AND KARPLUS, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 18 (Apr. 1998), 3586–3616. 24, 37
- [67] MARELIUS, J., HANSSON, T., AND ÅQVIST, J. Calculation of ligand binding free energies from molecular dynamics simulations. *International Journal of Quantum Chemistry* 69, 1 (Jan. 1998), 77–88. 34
- [68] MARTYNA, G. J., TOBIAS, D. J., AND KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics* 101, 5 (Sept. 1994), 4177–4189. 29
- [69] MILLER, C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology* 1, 4 (Oct. 2000), reviews0004. 1
- [70] MILLER, K. W., FIRESTONE, L. L., ALIFIMOFF, J. K., AND STREICHER, P. Nonanesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 3 (Feb. 1989), 1084–1087. 11
- [71] MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S., AND OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30, 16 (Dec. 2009), 2785–2791. 31
- [72] MOSS, G. W., LIEB, W. R., AND FRANKS, N. P. Anesthetic inhibition of firefly luciferase, a protein model for general anesthesia, does not exhibit pressure reversal. *Biophysical Journal* 60, 6 (Dec. 1991), 1309–1314. 11
- [73] MOYES, C. D., AND SCHULTE, P. M. *Principles of animal physiology*, 2nd ed ed. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA, 2008. 2
- [74] MUS-VETEAU, I. *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*. Springer, June 2014. 31
- [75] NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics* 52 (1984), 255–268. 28

- [76] OSTMEYER, J., CHAKRAPANI, S., PAN, A. C., PEROZO, E., AND ROUX, B. Recovery from slow inactivation in K⁺ channels is controlled by water molecules. *Nature advance online publication* (July 2013). 48, 89
- [77] OUYANG, W., JIH, T.-Y., ZHANG, T.-T., CORREA, A. M., AND HEMMINGS, H. C. Isoflurane Inhibits NaChBac, a Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322, 3 (Sept. 2007), 1076–1083. 13
- [78] PATEL, A. J., HONORÉ, E., LESAGE, F., FINK, M., ROMEY, G., AND LAZDUNSKI, M. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience* 2, 5 (1999), 422–426. 13
- [79] PATEL, A. J., HONORÉ, E., MAINGRET, F., LESAGE, F., FINK, M., DUPRAT, F., AND LAZDUNSKI, M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *The EMBO Journal* 17, 15 (1998), 4283–4290. 13
- [80] PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALÉ, L., AND SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26, 16 (2005), 1781–1802. 37
- [81] RAJU, S. G., BARBER, A. F., LEBARD, D. N., KLEIN, M. L., AND CARNEVALE, V. Exploring Volatile General Anesthetic Binding to a Closed Membrane-Bound Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel via Computation. *PLoS Comput Biol* 9, 6 (June 2013), e1003090. xviii, 40, 53, 54, 56, 58, 84
- [82] RAREY, M., KRAMER, B., LENGAUER, T., AND KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of molecular biology* 261, 3 (Aug. 1996), 470–489. 31
- [83] ROUX, B., NINA, M., POMÈS, R., AND SMITH, J. C. Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophysical Journal* 71, 2 (Aug. 1996), 670–681. 66
- [84] SAKMANN, B., AND NEHER, E. Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annual Review of Physiology* 46, 1 (1984), 455–472. 4
- [85] SATO, C., UENO, Y., ASAI, K., TAKAHASHI, K., SATO, M., ENGEL, A., AND FUJIYOSHI, Y. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409, 6823 (Feb. 2001), 1047–1051. 6
- [86] SCHULER, L. D., DAURA, X., AND VAN GUNSTEREN, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* 22, 11 (Aug. 2001), 1205–1218. 24
- [87] SEEMAN, P. The Membrane Actions of Anesthetics and Tranquilizers. *Pharmacological Reviews* 24, 4 (Dec. 1972), 583–655. 11

- [88] SKOLNICK, J., GAO, M., ROY, A., SRINIVASAN, B., AND ZHOU, H. Implications of the small number of distinct ligand binding pockets in proteins for drug discovery, evolution and biochemical function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 6 (Mar. 2015), 1163–1170. 30
- [89] SLATER, S. J., COX, K. J. A., LOMBARDI, J. V., HO, C., KEILY, M. B., RUBIN, E., AND STUBBS, C. D. Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364, 6432 (July 1993), 82–84. 12, 13
- [90] SOKOLOV, S., SCHEUER, T., AND CATTERALL, W. A. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 446, 7131 (Mar. 2007), 76–78. 5
- [91] STOCK, L., SOUZA, C., AND TREPTOW, W. Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels. *Biochemistry* 52, 9 (Mar. 2013), 1501–1513. 5, 6, 7
- [92] SWANSON, J. M. J., HENCHMAN, R. H., AND MCCAMMON, J. A. Revisiting Free Energy Calculations: A Theoretical Connection to MM/PBSA and Direct Calculation of the Association Free Energy. *Biophysical Journal* 86, 1 (Jan. 2004), 67–74. 35
- [93] THOMSON, A. S., HEER, F. T., SMITH, F. J., HENDRON, E., BERNÈCHE, S., AND ROTHBERG, B. S. Initial steps of inactivation at the K⁺ channel selectivity filter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Apr. 2014), 201317573. 89
- [94] TREPTOW, W., MAIGRET, B., CHIPOT, C., AND TAREK, M. Coupled Motions between Pore and Voltage-Sensor Domains: A Model for Shaker B, a Voltage-Gated Potassium Channel. *Biophysical Journal* 87, 4 (Oct. 2004), 2365–2379. 5
- [95] TREPTOW, W., AND TAREK, M. Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* 90, 9 (May 2006), L64–L66. 42
- [96] TROTT, O., AND OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31, 2 (Jan. 2010), 455–461. 31
- [97] VARDANYAN, V., AND PONGS, O. Coupling of Voltage-Sensors to the Channel Pore: A Comparative View. *Frontiers in Pharmacology* 3 (July 2012). 47
- [98] VATNER, S. F. Effects of anesthesia on cardiovascular control mechanisms. *Environmental Health Perspectives* 26 (Oct. 1978), 193–206. 13
- [99] VEMPARALA, S., DOMENE, C., AND KLEIN, M. L. Interaction of Anesthetics with Open and Closed Conformations of a Potassium Channel Studied via Molecular Dynamics and Normal Mode Analysis. *Biophysical Journal* 94, 11 (June 2008), 4260–4269. 31
- [100] VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* 159, 1 (July 1967), 98–103. 27

- [101] WALLIN, R. F., REGAN, B. M., NAPOLI, M. D., AND STERN, I. J. Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent. *Anesthesia and Analgesia* 54, 6 (Dec. 1975), 758–766. 14
- [102] WANG, G., AND COVARRUBIAS, M. Voltage-dependent Gating Rearrangements in the Intracellular T1–T1 Interface of a K⁺ Channel. *The Journal of General Physiology* 127, 4 (Apr. 2006), 391–400. 18
- [103] WANG, J., WOLF, R. M., CALDWELL, J. W., KOLLMAN, P. A., AND CASE, D. A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 25, 9 (July 2004), 1157–1174. 24
- [104] WEISER, T. G., REGENBOGEN, S. E., THOMPSON, K. D., HAYNES, A. B., LIPSITZ, S. R., BERRY, W. R., AND GAWANDE, A. A. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet* 372, 9633 (July 2008), 139–144. 11
- [105] WOO, H.-J., AND ROUX, B. Calculation of absolute protein–ligand binding free energy from computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19 (May 2005), 6825–6830. 35
- [106] WOOD, S. C., TONNER, P. H., DE ARMENDI, A. J., BUGGE, B., AND MILLER, K. W. Channel inhibition by alkanols occurs at a binding site on the nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology* 47, 1 (Jan. 1995), 121–130. 13
- [107] YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 6902 (Sept. 2002), 35–42. 6
- [108] ÅQVIST, J., LUZHKOV, V. B., AND BRANDSDAL, B. O. Ligand Binding Affinities from MD Simulations. *Accounts of Chemical Research* 35, 6 (June 2002), 358–365. 35, 56

Anexo I

Artigo Científico Publicado Durante o Mestrado

RESEARCH ARTICLE

Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: *Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action*

Qiansheng Liang¹, Warren D. Anderson¹, Shelly T. Jones¹, Caio S. Souza³, Juliana M. Hosoume³, Werner Treptow³, Manuel Covarrubias^{1,2*}

1 Department of Neuroscience, Sidney Kimmel Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America, **2** Farber Institute for Neuroscience, Sidney Kimmel Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America, **3** Laboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

* Manuel.Covarrubias@jefferson.edu



OPEN ACCESS

Citation: Liang Q, Anderson WD, Jones ST, Souza CS, Hosoume JM, Treptow W, et al. (2015) Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: *Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action*. PLoS ONE 10(11): e0143363. doi:10.1371/journal.pone.0143363

Editor: Randall Lee Rasmusson, University at Buffalo, UNITED STATES

Received: March 26, 2015

Accepted: November 4, 2015

Published: November 24, 2015

Copyright: © 2015 Liang et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: The work was supported by the following: National Institutes of Health, <http://www.nih.gov/>, GM055876, Dr. Roderic Eckenhoff (University of Pennsylvania); and the National Council of Technological and Scientific Development, <http://www.cnpq.br/web/guest/geral>, 470406/2011-9, Dr. Werner Treptow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Inhalational general anesthesia results from the poorly understood interactions of haloethers with multiple protein targets, which prominently includes ion channels in the nervous system. Previously, we reported that the commonly used inhaled anesthetic sevoflurane potentiates the activity of voltage-gated K⁺ (Kv) channels, specifically, several mammalian Kv1 channels and the *Drosophila* K-Shaw2 channel. Also, previous work suggested that the S4-S5 linker of K-Shaw2 plays a role in the inhibition of this Kv channel by *n*-alcohols and inhaled anesthetics. Here, we hypothesized that the S4-S5 linker is also a determinant of the potentiation of Kv1.2 and K-Shaw2 by sevoflurane. Following functional expression of these Kv channels in *Xenopus* oocytes, we found that converse mutations in Kv1.2 (G329T) and K-Shaw2 (T330G) dramatically enhance and inhibit the potentiation of the corresponding conductances by sevoflurane, respectively. Additionally, Kv1.2-G329T impairs voltage-dependent gating, which suggests that Kv1.2 modulation by sevoflurane is tied to gating in a state-dependent manner. Toward creating a minimal Kv1.2 structural model displaying the putative sevoflurane binding sites, we also found that the positive modulations of Kv1.2 and Kv1.2-G329T by sevoflurane and other general anesthetics are T1-independent. In contrast, the positive sevoflurane modulation of K-Shaw2 is T1-dependent. *In silico* docking and molecular dynamics-based free-energy calculations suggest that sevoflurane occupies distinct sites near the S4-S5 linker, the pore domain and around the external selectivity filter. We conclude that the positive allosteric modulation of the Kv channels by sevoflurane involves separable processes and multiple sites within regions intimately involved in channel gating.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Every year, millions of patients around the world undergo general anesthesia to perform major surgeries. However, the mechanisms of general anesthesia, which involve multiple targets, are poorly understood. Also, although general anesthesia is considered generally safe, the drugs currently used lack specificity and have narrow therapeutic indices. Thus, it is necessary to understand anesthesia at all levels to help develop specific, effective and less toxic general anesthetics. Diverse ion channels in the nervous system are likely to be major targets of general anesthetics [1]. Among them, neurotransmitter-gated ion channels and non-gated K^+ channels have received most of the attention [1, 2]; however, recent work continues to suggest that voltage-gated ion channels are also important players in general anesthesia [3–7].

In particular, recent discoveries have reassessed the likely role of certain Kv1 channels in general anesthesia [7–9]. Kv1.2 channels encoded by *Kcna2* gene are widely expressed in the brain and mainly localize in the axon initial segment, the juxtaparanodal region of myelinated axons and axon terminals [10–12]. In these locations, heteromultimeric Kv channels including Kv1.1 and Kv1.2 subunits help regulate action potential threshold, repolarization, propagation and firing patterns [12]. *Kcna2*-null mice exhibit a severe brainstem seizure phenotype, which is often lethal [12]. The findings of Alkire et al. [8] and Lioudyno et al. [9] are especially significant. Whereas the first study found that infusion of an anti-Kv1.2 antibody into the CMT of the rat reverses anesthesia, the second reported a similar result upon infusion of a specific neurotoxin to block Kv1.1, Kv1.3 and Kv1.6 channels. Moreover, tonic firing of action potentials in neurons of the CMT is inhibited by sevoflurane, which lengthens the interspike interval, and this inhibition is prevented by the aforementioned Kv1-specific neurotoxin.

Sevoflurane is commonly used in human general anesthesia and is a unique positive modulator of several Kv1 channels and the *Drosophila* K-Shaw2 channel in heterologous expression systems [7, 9]. At relevant concentrations, it induces a negative shift in the conductance-voltage relation and increases the maximum conductance. By contrast, most other common general anesthetics either interact weakly or inhibit Kv channels (namely, K-Shaw2). Since K^+ channel activity opposes excitation, the unique potentiation of Kv channels by sevoflurane could contribute to anesthesia. Here, we investigated the structural basis of this positive modulation in the mammalian Kv1.2 channel. Previous work strongly implicated the S4-S5 linker as a determinant of the inhibition of K-Shaw2 by general anesthetics [6, 13]. The S4-S5 linker connects the voltage-sensing domain to the pore domain of the Kv channels and is responsible for the electromechanical coupling that controls voltage-dependent gating [14, 15]. In this study, we investigated the contributions of the S4-S5 linker to the positive modulation of the Kv1.2 and K-Shaw2 channels by sevoflurane. The results revealed that discrete structural changes in this linker drastically affect the response of these Kv channels to the anesthetic by altering electromechanical coupling. Other results strongly suggest additional novel sites, which are necessary to fully explain the modulation of Kv channels by sevoflurane. Supporting a multisite model of general anesthetic action, molecular dynamics, docking simulations and free energy estimations demonstrate two significant classes of sevoflurane binding sites. One set in the pore domain (including the C-terminal side of the S4-S5 linker) and another near the external selectivity filter of the Kv1.2 channel. We propose that positive multisite allosteric modulation of Kv channel gating by sevoflurane plays a significant role in general anesthesia.

Materials and Methods

Molecular biology and heterologous expression

Plasmid maintenance, mutagenesis, sequence, RNA synthesis and oocyte microinjection were carried out as previously described [6, 7].

Ethics Statement

Xenopus laevis surgeries were performed according to a protocol approved by the Thomas Jefferson University IACUC.

Electrophysiology

Whole-oocyte currents were recorded at room temperature (21–23°C) under two-electrode voltage-clamp conditions (OC-725C, Warner Instrument, Hamden, CT) according to established procedures [6, 7]. Data acquisition, leak subtraction and initial analysis were performed using pClamp 9.2 and 10.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The pipette was filled with 3 M KCl. The extracellular solution was ND96 (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 2.5 sodium pyruvate, adjusted to pH 7.4 with NaOH. ND96 and *n*-butanol were delivered using a gravity-driven perfusion system. Volatile anesthetics were delivered manually using a Hamilton gastight syringe (Hamilton, Reno, NV). The preparation and dilution of all drugs were done as previously described [6, 7].

Data analysis

Data analysis, plotting and curve-fitting were performed in Origin 9.1 (OriginLab, Northampton, MA).

G-V relations. Peak chord conductance ($G = I/[V_c - V_r]$) was determined assuming -95 mV as the reversal potentials (V_r). I is the peak current and V_c is the command voltage. $G-V$ relations were then described by assuming this form of the Boltzmann equation:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + e^{\frac{V_c - V_{1/2}}{k}}}$$

or the double Boltzmann equation:

$$G = \frac{G_{max1}}{1 + e^{\frac{V_c - V_{1/2,1}}{k_1}}} + \frac{G_{max2}}{1 + e^{\frac{V_c - V_{1/2,2}}{k_2}}}$$

where G_{max} is the maximum conductance; $V_{1/2}$ is the voltage at which the conductance is at 50% of its maximal amplitude; and k is the slope factor. The following equation was used to calculate the equivalent gating charge: $z = RT/Fk = 25.5/k$, where R , T and F are the gas constant, absolute temperature and Faraday constant, respectively. The V_{med} was also determined to evaluate multiphasic $G-V$ relations in a curve fitting-independent manner. V_{med} is the voltage at which the total conductance ($G_{max1} + G_{max2}$) is at its midpoint (median). This determination allowed semiquantitative assessment of multiphasic $G-V$ relation shifts without the ambiguity typically associated with curve-fitting involving a large number of correlated adjustable parameters.

All $G-V$ data were obtained from paired sets (same oocyte in the absence and presence of sevoflurane). Measurement of the control $G-V$ relation was followed by determination of a stable response to sevoflurane (current evoked by a depolarizing step to +60 mV, before and after

exposure to sevoflurane) and subsequent measurement of the experimental G - V relation. All parameters extracted from the analysis of these relations were compared in a pairwise manner.

To display the results from different oocytes and estimate the magnitude of relative changes (before and after exposure to sevoflurane), individual G - V relations were normalized to the control G_{\max} before exposure to sevoflurane (G/G_{\max}). Accordingly, a relative $G/G_{\max} = 1, <1$ and >1 indicates no change, inhibition and potentiation, respectively (Table A in [S1 File](#)). Conductance ratio (G_{Sevo}/G_0 , conductance in the presence of sevoflurane over control conductance) vs. voltage plots were additionally generated to directly visualize the G - V relation change (e.g., [Fig 1C](#)). All results were reported as mean \pm SEM, and the paired Student t -test was used to evaluate the statistical significance of apparent differences, unless stated otherwise.

Concentration-response relations. Normalized dose-inhibition relations were described by assuming this form of the Hill equation:

$$\frac{I}{I_0} = A_1 + \frac{x^{n_H}}{K^{n_H} + x^{n_H}}$$

or a double Hill equation:

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \frac{1 + A_1}{1 + \left(\frac{K_1}{x}\right)^{n_{H1}}} + \frac{1 + A_2}{1 + \left(\frac{K_2}{x}\right)^{n_{H2}}}$$

where, I/I_0 is the normalized current and x is the drug concentration, K (apparent dissociation equilibrium constant) is the drug concentration that induces 50% inhibition/potentiation, and n_H is the index of cooperativity or Hill coefficient ([Table 1](#)). We do not report SEM for the estimated best-fit Hill equation parameters because complete concentration-response relations and the corresponding best-fit function cannot be constructed from an individual oocyte. Although the action of all anesthetics tested is generally reversible [7], it is often difficult to obtain complete washout of inhaled anesthetics when testing multiple concentrations on the same oocyte. This complication would produce a cumulative effect, which distorts the concentration-response relation. To avoid this problem, each data point on the concentration-response relation represents the mean \pm SEM from several independent determinations on different oocytes at the indicated concentrations. For each anesthetic, therefore, there is only one best-fit estimate that collectively describes the combined results from several oocytes individually tested at different concentrations. This approach has produced reproducible results as reported previously [6, 7].

Computational Methods

Kv1.2 models in the closed/resting and open/activated states were obtained from Delemotte et al. [16] and Treptow & Tarek [17]. Each model was previously acquired via molecular dynamics (MD) simulations of the published x-ray crystal structure [18]. Details and validation of the models are as reported in the original papers mentioned above. Structural models of the Kv1.2-G329T mutant were built on the basis of the mentioned Kv1.2 constructs using the *psfgen* package implemented in VMD [19]. After insertion in a lipid bilayer, each of the structures was equilibrated by MD runs using the program NAMD 2.9 [20] and applying CHARMM 36 force field [21]. Specifically, sevoflurane molecules were then docked against the generated ensemble of membrane-equilibrated channel structures in order to explore putative binding sites using *AutoDock Vina* [22]. The Linear Interaction Energy (LIE) method [23] was adopted for calculation of the binding free energies and, thus, the corresponding binding constants. Assuming that the predicted binding sites act independently, these binding constants

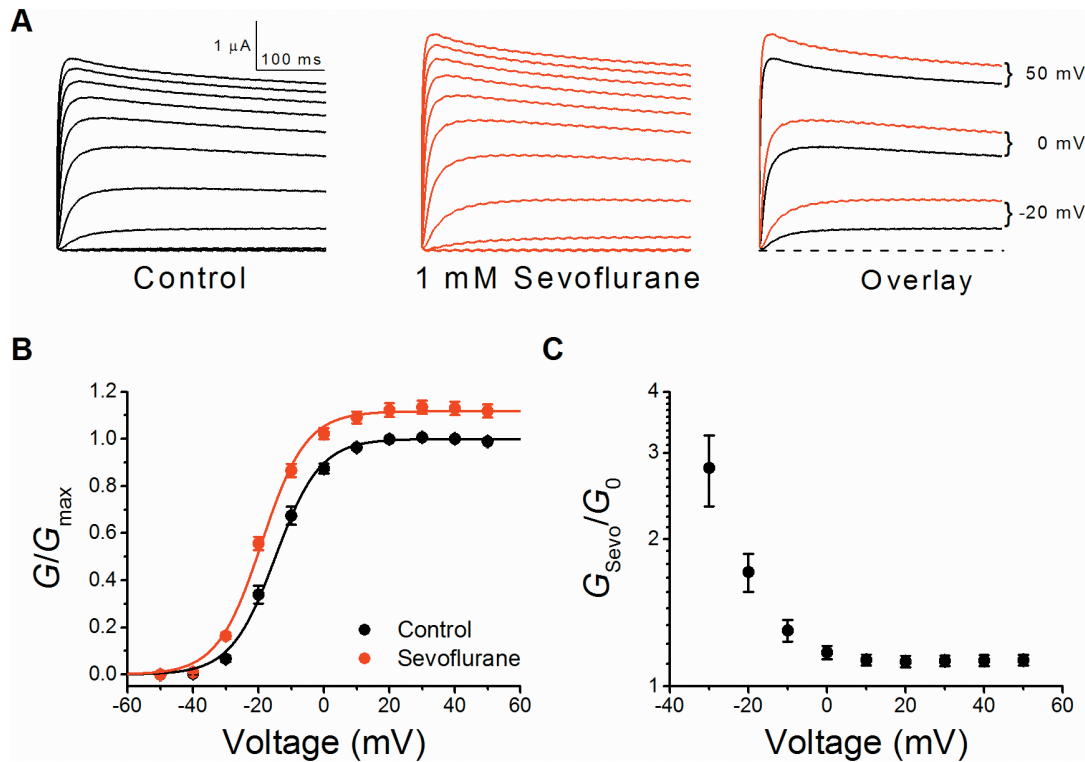


Fig 1. Positive modulation of the Kv1.2 conductance by sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte Kv1.2 currents before (*left*) and after exposure to 1 mM sevoflurane (*center*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The steps were delivered in increments of 10 mV from -50 to +50 mV. The overlay (*right*) directly compares selected currents in the absence (*black*) and presence (*red*) of sevoflurane (currents evoked by steps to the indicated voltages). (B) Normalized G - V relations of Kv1.2 in the absence (*black*) and presence of 1 mM sevoflurane (*red*) ($N = 6$). The solid lines are the best-fit Boltzmann functions. G_{max} is the control maximum conductance before exposure to sevoflurane ([Materials and Methods](#)). The mean best-fit parameters are summarized in Table A in [S1 File](#). (C) The voltage dependence of the Kv1.2 conductance ratio (G_{Sevo}/G_0). This ratio was calculated from paired measurements of the G - V relations before (G_0) and after exposure to sevoflurane (G_{Sevo}).

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g001

were computed for individual sites in different functional conformations. Additional details are provided under [S1 File](#).

Results

Screening the effects of general anesthetics on the Kv1.2 current

Previous studies showed that several heterologously expressed Kv1 channels are potentiated by anesthetic concentrations of sevoflurane [7, 9]. This modulation results primarily from shifting the G - V relation to the left and increasing the G_{max} (e.g., Kv1.2; [Fig 1](#)). Sevoflurane shifts the Kv1.2 $V_{1/2}$ by -4 mV and increases the G_{max} by 13% (Figs [1A](#), [1B](#) and [2A](#); Table A in [S1 File](#)). A close examination of the Kv1.2 G_{Sevo}/G_0 -voltage relation also shows a substantial sevoflurane-induced potentiation of the conductance at -30 mV (~180%) and a sustained potentiation at positive membrane potentials, which corresponds to the increase in G_{max} ([Fig 1C](#)). The potentiation at -30 mV is particularly significant because it is within the range where sevoflurane could affect action potential firing.

To additionally screen isoflurane, halothane, chloroform, propofol and *n*-butanol, we tested their effects on the Kv1.2 current at +60 mV ([Fig 3](#)). Sevoflurane and isoflurane (1 mM) modestly potentiate the Kv1.2 conductance by $12.4 \pm 1.7\%$ and $11.5 \pm 3.1\%$, respectively ([Fig 3B](#)). For sevoflurane, K and n_H are 360 μ M and 3.3, respectively, which demonstrates relevant

Table 1. Concentration-response parameters of the modulation of selected Kv channels by sevoflurane and other general anesthetics.

	K_1 (mM)	n_{H1}	A_1	K_2 (mM)	n_{H2}	A_2
Kv1.2						
Sevofurane	0.36	3.3	1.13			
<i>n</i> -butanol	78.4	1.3				
Kv1.2 FRAKT						
Sevofurane	0.33	2.0	1	1.45	4.0	2.50
Isoflurane	0.23	2.2	1	0.47	9.4	1.24
Halothane	0.16	1.6	1	0.63	7.9	1.24
Propofol	0.02	2.2	2.89			
<i>n</i> -butanol	100.5	1.5				
$\Delta T1$-Kv1.2 FRAKT						
Sevofurane	0.32	2.9	1	1.84	3.8	3.17
Isoflurane	0.22	1.2	1	0.40	3.4	1.96
Halothane	0.23	1.0	1	0.77	3.4	0.93
Propofol	0.02	1.7	2.66			
<i>n</i> -butanol	91.9	1.6				
Kv1.2 G329T						
Sevofurane	0.40	1.6	1	2.2	2.8	2.20
K-Shaw2*						
Sevofurane	0.06	1	0.59	4	1	1.23
Isoflurane	1.69	2.1				
Halothane	0.26	1.3				
Chloroform	0.70	1.4				
Propofol	0.06	1.6				
<i>n</i> -butanol	10.1	1.8				
$\Delta T1$-K-Shaw2						
Halothane	0.38	1.4				
<i>n</i> -butanol	16.4	1.5				

* Sevoflurane tested at -20 mV, from Barber et al. [7].

doi:10.1371/journal.pone.0143363.t001

pharmacological potency and apparent cooperativity (Fig 3B and Table 1). Potentiation by isoflurane was already maximal at 100 μ M and apparent binding parameters were not estimated. By contrast to sevoflurane and isoflurane, halothane, chloroform and propofol displayed only modest inhibitory effects, while high concentrations of *n*-butanol produced a more robust inhibition (Fig 3B). Focusing on sevoflurane, we noticed that the previously reported potentiation of K-Shaw2 at +60 mV is ~3-fold greater than that of Kv1.2 [7]. Based on earlier work [6], we hypothesized that differences in the linker connecting the voltage-sensing domain to the pore domain (S4-S5 linker) might explain the differential responses to sevoflurane.

A single amino acid substitution in the Kv1.2 S4-S5 linker (G329T) confers dramatic potentiation by general anesthetics

To investigate the role of the S4-S5 linker in the modulation of Kv1.2 by general anesthetics, we focused on fourteen residues between positions 317 and 330 in K-Shaw2. Within the equivalent region in Kv1.2, there are six substitutions (Fig 4A). The Kv1.2-G319I mutation is, however, lethal (not shown). Therefore, to test the impact of the remaining differences, we converted the S4-S5 linker of Kv1.2 into that of K-Shaw2 between the corresponding Kv1.2 positions

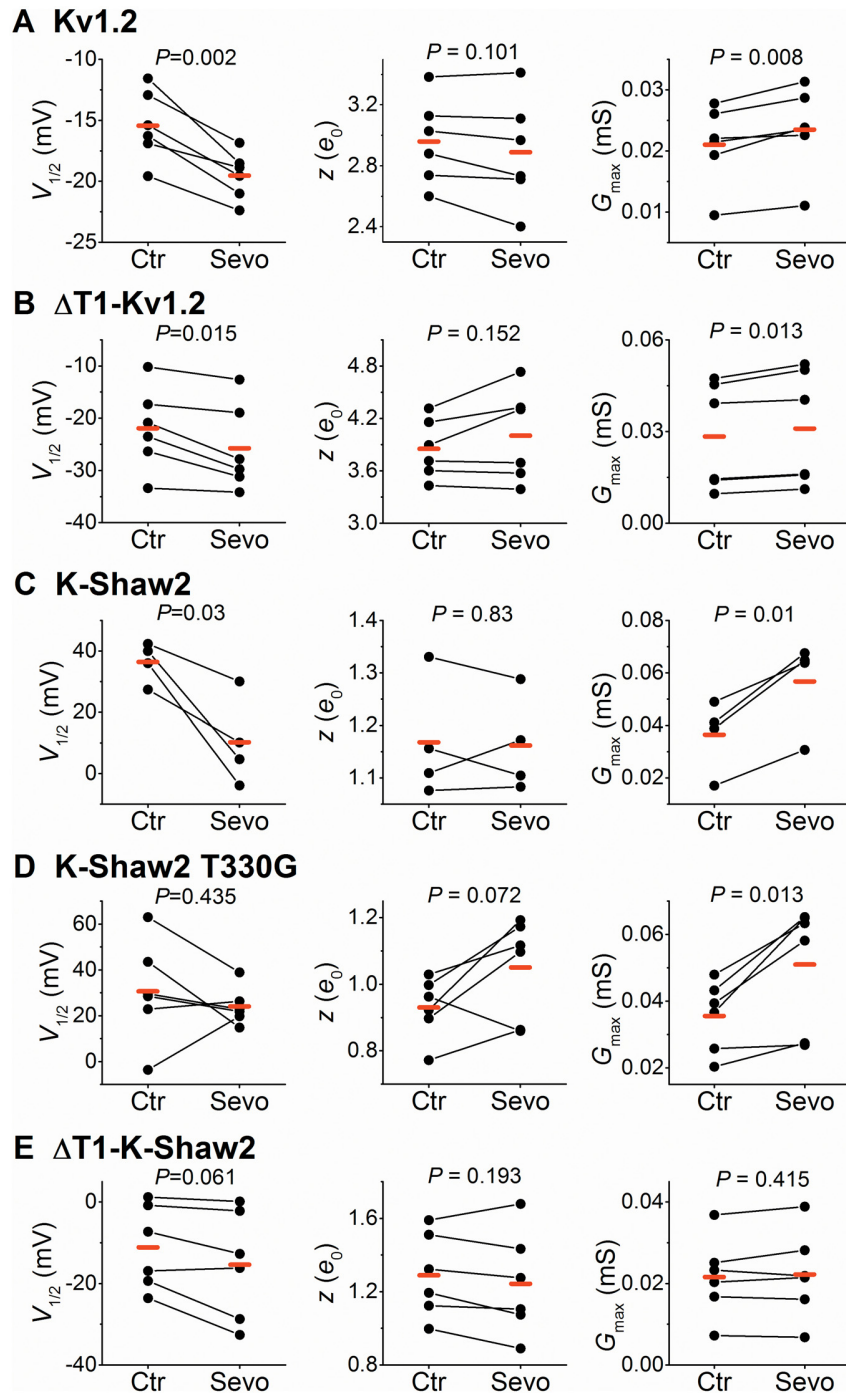


Fig 2. Analysis of G-V relations from Kv1.2, $\Delta T1$ -Kv1.2, K-Shaw2, K-Shaw2 T330G and $\Delta T1$ -K-Shaw2. (A) Best-fit Boltzmann parameters ($V_{1/2}$, z and G_{max}) from individual paired measurements before (Ctr) and after exposure to 1 mM sevoflurane (Sevo). Each pair of symbols connected by a solid line represents an individual paired experiment (Materials and Methods). The G_{max} graphs depict raw values before normalization (in mS). The P value resulting from a paired Student- t test is shown above each graph, and the red marks indicate the mean values of the sample. (B)–(E) are as described for panel A. The number oocytes examined for each Kv channel was 6, 6, 4, 6 and 6, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g002

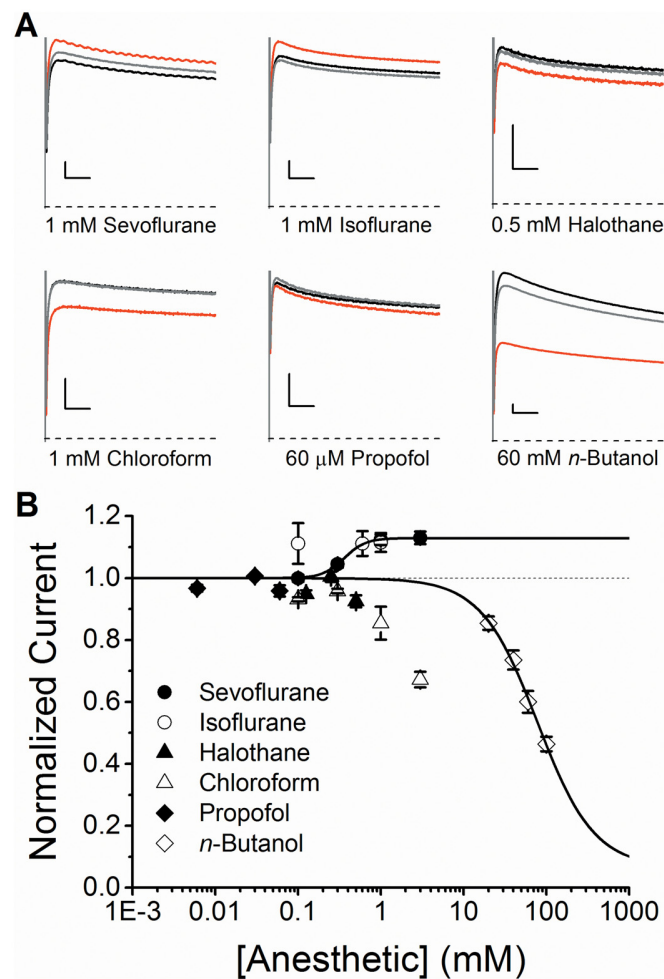


Fig 3. Modulation of the Kv1.2 channel by general anesthetics. (A) Effects of general anesthetics on the whole-oocyte Kv1.2 currents evoked by a voltage step to +60 mV from a holding voltage of -100 mV. *Black, red and grey* current traces correspond to control, anesthetic-exposed, and washout, respectively. The scale bars indicate 50 ms and 0.5 μ A. (B) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on the Kv1.2 channel. *Solid lines* are the best fits assuming the Hill equation for sevoflurane and *n*-butanol (Materials and Methods). Considering the magnitude of the change and the concentrations tested, only sevoflurane and *n*-butanol produced reliable Hill equation fits. N = 5–7 oocytes for each concentration. Best-fit parameters are summarized in Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g003

(residues 319–329) to create the Kv1.2-FRAKT chimera. Kv1.2-FRAKT currents evoked by a depolarizing step to +60 mV exhibit a dramatically different pattern of responses to various general anesthetics (Fig 4B and 4C). Sevoflurane, isoflurane, halothane, chloroform and propofol all potentiate the conductance to various degrees, while the inhibitory response to *n*-butanol remained unaffected. Also, the concentration-potential relations for sevoflurane, isoflurane and halothane exhibit complex profiles, which are reminiscent of the previously described potentiation of the K-Shaw2 channel by sevoflurane [7]. The concentration dependence of the potentiation is a biphasic phenomenon, occurring gradually at low concentrations and sharply at higher concentrations (Fig 4C). To empirically characterize this behavior, we assumed two classes of independent binding sites exhibiting (Materials and Methods; Fig 4C): 1) apparent high affinity and no cooperativity ($n_H \approx 1$); and 2) apparent low affinity and highly cooperative

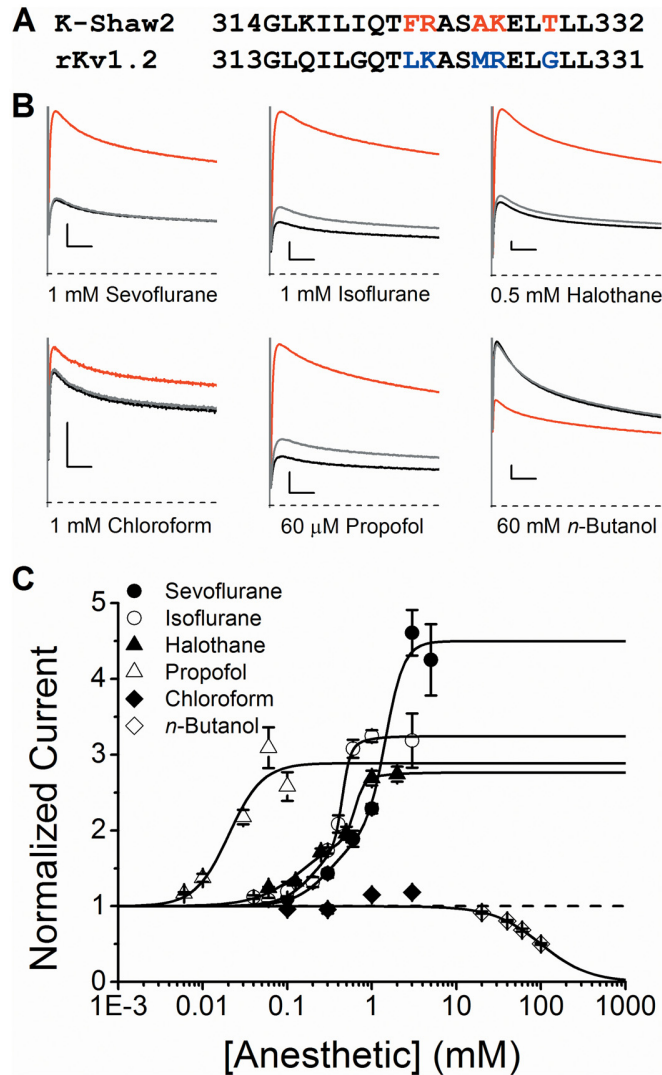


Fig 4. Modulation of Kv1.2 FRAKT by general anesthetics. (A) Sequence alignment of the S4-S5 linker from K-Shaw2 (314–332) and Kv1.2 (313–331) channels. Starting and ending residue numbers of the shown segments are indicated. In Kv1.2, the blue colored residues were swapped for the red colored residues in K-Shaw2 to create the Kv1.2 FRAKT mutant channel. (B) Effects of general anesthetics on whole-oocyte Kv1.2-FRAKT currents evoked by a voltage step to +60 mV from a holding voltage of -100 mV. *Black, red and grey* current traces correspond to control, anesthetic-exposed, and washout, respectively. The scale bars indicate 50 ms and 0.5 μ A. (C) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on the Kv1.2 FRAKT channel. *Solid* lines are the best fits assuming the Hill equation (propofol and *n*-butanol) or a double Hill equation (sevoflurane, isoflurane, and halothane) (Materials and Methods). Due to the small magnitude of the chloroform results, no reliable Hill equation fit could be obtained. $N = 5-8$ oocytes for each concentration. Best-fit parameters are summarized in Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g004

interactions ($n_H \gg 1$). Although propofol is the most potent, sevoflurane exhibits the highest efficacy followed by isoflurane, halothane and chloroform (Fig 4C and Table 1). Maximum potentiation by propofol, isoflurane and halothane is, however, similar (2.7 to 3.3-fold above control; Table 1). Although the S4-S5 mutations conferred enhanced potentiation of Kv1.2 by sevoflurane that is similar to that previously observed with K-Shaw2, they also introduced novel potentiation by other general anesthetics. Thus, discrete structural changes in the S4-S5

linker can dramatically influence the ways in which general anesthetics interact with Kv channels. Since sevoflurane is clinically relevant and is the most efficacious positive modulator on Kv1.2-FRAKT and K-Shaw2, we focused on this anesthetic to dissect the structural basis of the potentiation.

To determine the specific amino acid(s) responsible for the dramatic sevoflurane potentiation of Kv1.2-FRAKT, we tested each substitution individually by creating the following Kv1.2 mutants: L321F, K322R, M325A, R326K and G329T. Whereas the potentiation of L321F, K322R, M325A, R326K is similar to that of wild type Kv1.2, G329T exhibited dramatic potentiation not significantly different from that of Kv1.2-FRAKT (two-way ANOVA, $P > 0.05$; [Fig 5](#) and [Table 1](#)). These results suggest that a single residue in the S4-S5 linker is a critical determinant of the potentiation of the Kv1.2 current by sevoflurane.

Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T exhibit novel voltage dependent gating

The G329T mutation could have affected voltage-dependent gating and thereby allosterically (depending on conformation) influence the interaction of sevoflurane with the channel. Although the mutations do not appear to have gross effects on the overall current kinetics, Kv1.2-FRAKT and G329T dramatically remodel the G - V relation ([Materials and Methods](#)). Within a narrow range of membrane potentials (10–20 mV), the wild type Kv1.2 G - V relation sharply rises to the maximum conductance (G_{\max}) between +20 and +40 mV ([Fig 1B](#)). By contrast, the G - V relations of Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T rise to the G_{\max} in a more gradual manner and exhibit two distinct components ([Fig 6A](#)). These G - V relations approach G_{\max} at voltages $> +100$ mV and require the sum of at least two Boltzmann terms to adequately describe them ([Fig 6B](#)). Moreover, the G - V relations of Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T have similar profiles, albeit there are some quantitative differences ([Fig 6](#); [Table A in S1 File](#)). For Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T: the median voltages (V_{med}) are 22 ± 2 and 28 ± 2 mV, respectively ([Fig 6](#)). Relative to Kv1.2-FRAKT, Kv1.2-G329T modestly depolarizes $V_{1/2,1}$ by ~ 13 mV and induces a 16 mV negative shift of $V_{1/2,2}$ ([Fig 6](#); [Table A in S1 File](#)). The corresponding equivalent gating charges (z_1 and z_2) increase from 2.7 ± 0.1 to $4.8 \pm 0.1 e_0$, and from 0.9 ± 0.1 to $1.5 \pm 0.1 e_0$ ([Fig 6](#); [Table A in S1 File](#)). Nevertheless, among all individual FRAKT mutations, G329T is the only one that closely recapitulates the behavior of the Kv1.2-FRAKT indicating that it plays the most critical role in determining the novel gating phenotype of the chimera. Individual mutations of other residues (L321F, K322R, M325A, R326K) had little to no effect on Kv1.2 G - V relation ([Fig A in S1 File](#)).

Upon exposure to 1 mM sevoflurane, the G - V relations of Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T display changes that are qualitatively similar to those observed with Kv1.2 wild type; however, the net magnitudes are substantially larger ([Fig 7A and 7B](#); [Table A in S1 File](#)). ΔV_{med} shifts to the left by ~ 15 and ~ 20 mV, respectively. On Kv1.2-FRAKT, sevoflurane induced small-modest changes in $V_{1/2,1}$, z_1 and z_2 ; however, sevoflurane most noticeably doubles the total conductance ($G_{\text{TOTAL}} = G_{\max 1} + G_{\max 2} = 2.07$) as a result of increasing $G_{\max 1}$ (0.37 to 0.99) and $G_{\max 2}$ (0.63 to 1.07) ([Fig 7A](#); [Table A in S1 File](#)). Kv1.2-G329T, in contrast, displayed more selective effects on the bimodal G - V relation. The $V_{1/2,1}$ and z_1 are not affected, whereas the sevoflurane-induced negative $\Delta V_{1/2,2}$ is substantial (-11 mV, with no change in z_2). Additionally, as found with Kv1.2-FRAKT, sevoflurane nearly doubles the total Kv1.2-G329T conductance ($G_{\text{TOTAL}} = 1.89$) ([Fig 7B](#); [Table A in S1 File](#)). These results demonstrate that G329T alone markedly alters gating and concomitantly enhances the potentiation by sevoflurane, suggesting a strong link between voltage-dependent gating and anesthetic action.

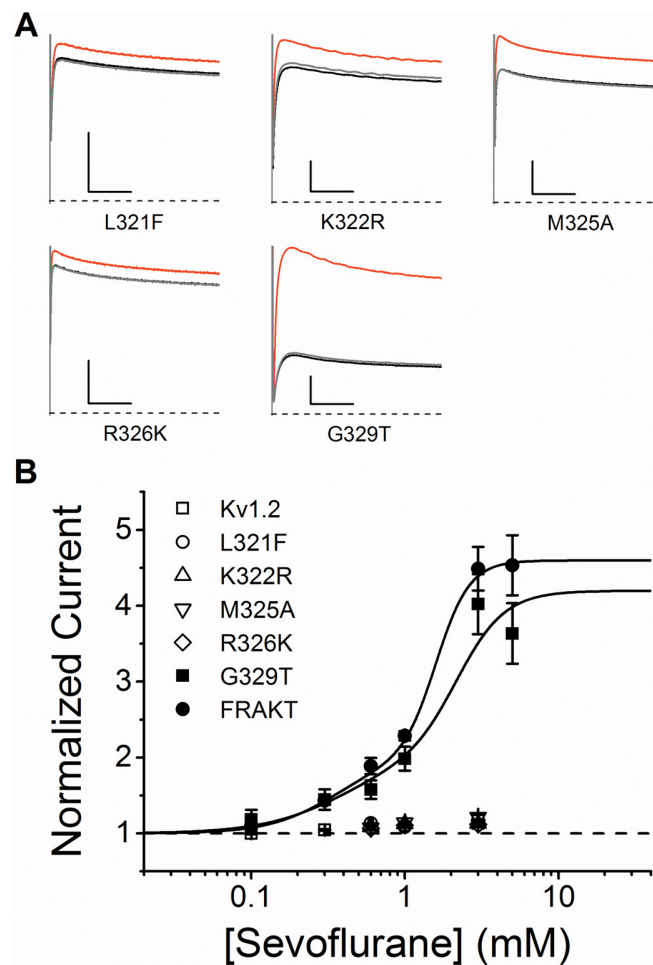


Fig 5. Kv1.2 G329T recapitulates the magnified positive modulation of Kv1.2 FRAKT by sevoflurane. (A) Effects of 1 mM sevoflurane on mutant whole-oocyte Kv1.2 currents evoked by a voltage step to +60 mV from a holding voltage of -100 mV. *Black, red and grey* current traces correspond to control, anesthetic-exposed, and washout, respectively. The scale bars indicate 50 ms and 1 μ A. (B) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on wild type and mutant Kv1.2 currents. *Solid lines* are the best fits assuming the double Hill equation (Materials and Methods). N = 4–8 oocytes for each dose. Best-fit parameters are summarized in Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g005

K-Shaw2-T330G eliminates the sevoflurane-induced voltage-dependent shift without affecting the sevoflurane-induced increase in G_{max}

Since G329 in Kv1.2 critically controls voltage-dependent activation and keeps positive modulation by sevoflurane in check, we asked whether the reverse mutation in K-Shaw2 (T330G) would inhibit the naturally robust potentiation of this Kv channel by sevoflurane. In contrast to Kv1.2-G329T, K-Shaw2-T330G does not significantly affect the G - V relation (Fig 2; Table A in S1 File); however, it abolishes the sevoflurane-induced leftward shift of the G - V relation (Figs 2, 8A and 8B; Table 1; Table A in S1 File). Accordingly, T330G dramatically inhibits the potentiated conductance ratio (G_{Sevo}/G_0) from ~ 10 to ~ 1.3 at -40 mV (Fig 8C). However, the sevoflurane-induced increase in the G_{max} of K-Shaw2-T330G and wild type K-Shaw2 are very similar (1.4- and 1.6-fold, respectively; Table A in S1 File). Accordingly, the G_{Sevo}/G_0 of wild type and mutant channels converge toward a similar value at +100 mV (~ 1.5 ; Fig 8C). This

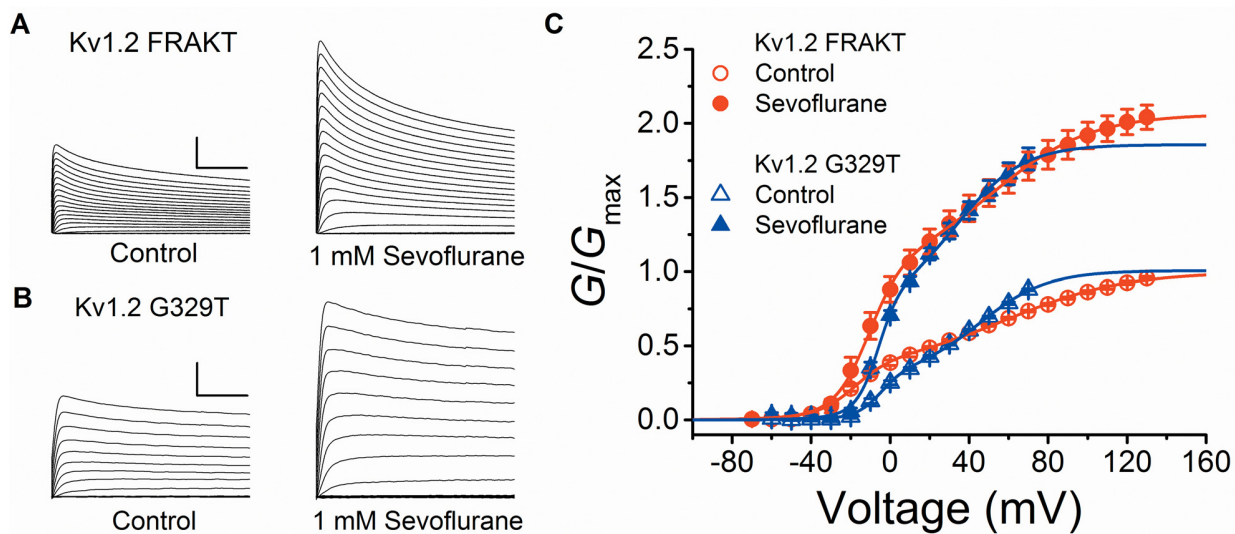


Fig 6. Novel G-V relations of Kv1.2 FRAKT and Kv1.2 G329T in the absence and presence of sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte Kv1.2 FRAKT currents in the absence (*left*) and presence of 1 mM sevoflurane (*right*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The steps were delivered in increments of 10 mV from -90 to 130 mV. The scale bars indicate 100 ms and 2 μ A. (B) Families of whole-oocyte Kv1.2 G329T currents in the absence (*left*) and presence of 1 mM sevoflurane (*right*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The steps were delivered in increments of 10 mV from -90 to 70 mV. The scale bars indicate 100 ms and 1 μ A. (C) G-V relations of Kv1.2 FRAKT (*red*) and Kv1.2 G329T (*blue*) under control (*open*) or with 1 mM Sevoflurane (*filled*) (N = 6, 4, respectively). *Solid* lines are the best fits assuming a double Boltzmann equation ([Materials and Methods](#)). The best-fit parameters are summarized in Table A in [S1 File](#).

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g006

result suggests that the positive modulation induced by sevoflurane has two separable components. One depends on the role of a specific residue in the S4-S5 linker that controls voltage-dependent gating, whereas the other is independent of that residue and namely affects the G_{max} .

The role of the T1 domain on the modulations of Kv1.2, Kv1.2-FRAKT and K-Shaw2 by sevoflurane

Previous studies strongly suggest that the intracellular regulatory T1 domain of Kv channels plays a significant role in gating [24–28]. Thus, we asked whether the T1 domain might also contribute to the positive modulation of Kv1.2, Kv1.2-FRAKT and K-Shaw2, by sevoflurane. In Δ T1-Kv1.2 and Δ T1-Kv1.2-FRAKT, residues 2–122 are missing; and Δ T1-K-Shaw2 lacks residues 2–155. Δ T1-Kv1.2 and Δ T1-Kv1.2-FRAKT exhibited G-V relations and responses to general anesthetics that are similar to those from their full-length counterparts (Figs 2B, 7C, 9A and 9B; Fig B and Table A in [S1 File](#)). Sevoflurane shifted the Δ T1-Kv1.2 $V_{1/2}$ by -4 mV, and increased the G_{max} by 10%. It also shifted the Δ T1-Kv1.2-FRAKT V_{med} by -19 mV and nearly doubled the G_{TOTAL} (1.9-fold). By contrast, Δ T1-K-Shaw2 exhibited a substantially leftward shifted G-V relation (-48 mV; data not shown) and no positive effect of sevoflurane on $V_{1/2}$ and G_{max} (Fig 2; Table A in [S1 File](#)). These results suggest that voltage-dependent gating of Kv1.2 and Kv1.2-FRAKT and their modulation by general anesthetics are independent of the T1 domain. K-Shaw2 gating and its positive modulation by sevoflurane are, however, completely dependent on the presence of the T1 domain, suggesting specialized interactions between the T1 domain and the gating apparatus of the K-Shaw2 channel. Thus, we can infer that the dual positive modulation of the Kv1.2 channel by sevoflurane (leftward shifted G-V relation and increased G_{max}) only implicates regions directly involved in gating (the voltage-sensing and pore domains). Based on this outcome, we created minimal atomic models of

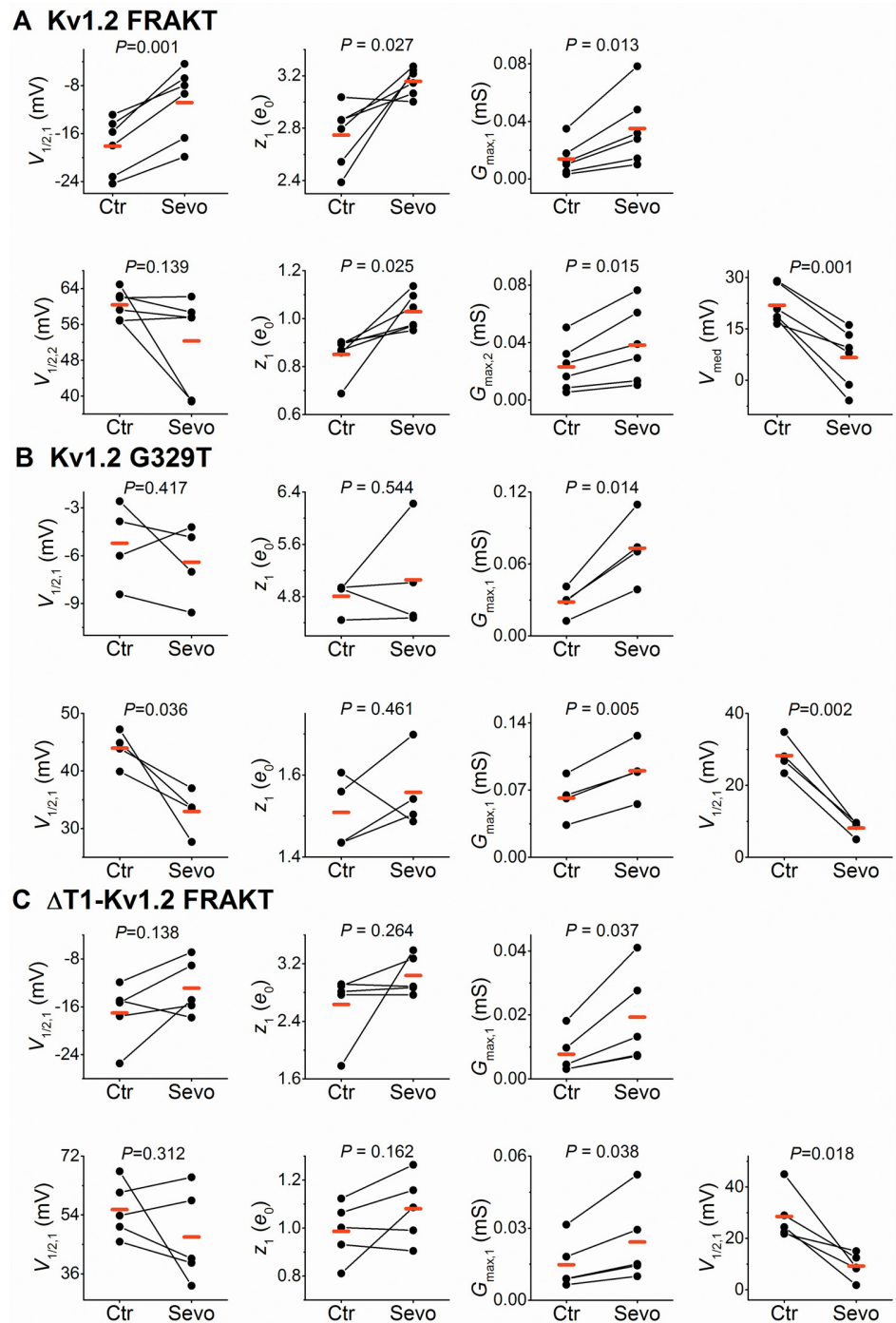


Fig 7. Analysis of bimodal G-V relations from Kv1.2 FRAKT, Kv1.2 G329T and ΔT1-Kv1.2 FRAKT. (A) Best-fit double Boltzmann parameters ($V_{1/2,1}$, Z_1 , $G_{max,1}$, $V_{1/2,2}$, Z_2 , $G_{max,2}$) and V_{med} from individual paired measurements before (Ctr) and after exposure to 1 mM sevoflurane (Sevo). Each pair of symbols connected by a solid line represents an individual paired experiment (Materials and Methods). The G_{max} graphs depict raw values before normalization (in mS). The P value resulting from a paired Student-t test is shown above each graph, and the red marks indicate the mean values of the sample. (B)–(C) are as described for panel A. The number oocytes examined for each Kv channel was 6, 4, 5, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g007

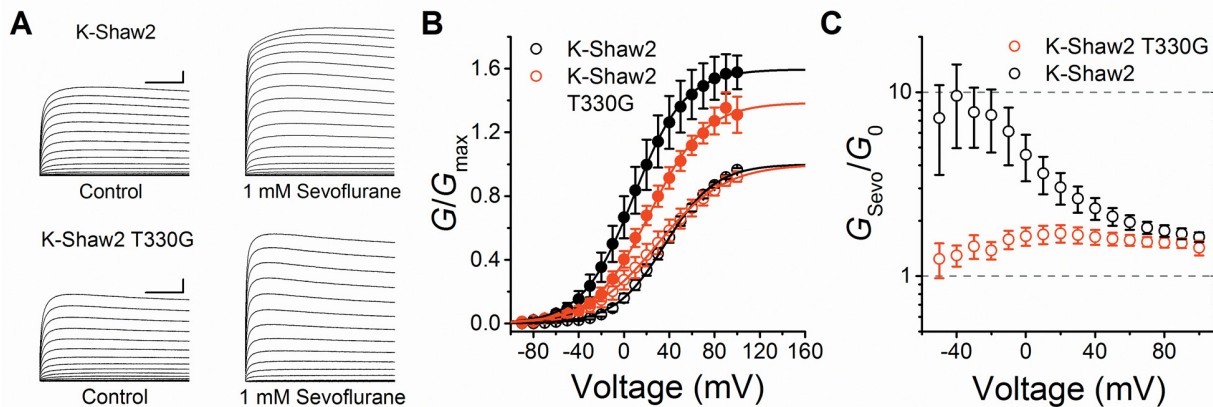


Fig 8. The T330G mutation eliminates the voltage-dependent potentiation of the K-Shaw2 conductance by sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte K-Shaw2 (N = 4) and K-Shaw2 T330G (N = 6) currents in the absence (*left*) and presence of 1 mM sevoflurane (*right*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The steps were delivered in increments of 10 mV from -90 to +100 mV. The scale bars indicate 100 ms and 1 μ A. (B) G-V relations of K-Shaw2 (*black*) and K-Shaw2 T330G (*red*) in the absence (*open*) and presence of 1 mM sevoflurane (*filled*). Solid lines are the best-fits to the Boltzmann equation. Best-fit parameters are summarized in Fig 2 and Table A in S1 File. (C) The voltage dependence of the conductance ratio (G_{Sevo}/G_0) K-Shaw2 (*black*) and K-Shaw2 T330G (*red*).

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g008

Δ T1-Kv1.2 and Δ T1-Kv1.2 G329T to explore putative *in-silico* interaction sites in the trans-membrane regions of the channel.

Putative sevoflurane binding sites in Δ T1-Kv1.2 and Δ T1-Kv1.2-G329T

The results so far demonstrate that 1) sevoflurane potentiates the Kv1.2 current with relevant apparent affinity and cooperativity and is independent of the T1 domain; 2) sevoflurane interacts with two independent classes of sites in K-Shaw2, Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T (with apparent high and low affinities); 2) G329T is sufficient to confer dramatic positive modulation by sevoflurane and other general anesthetics; 3) the potentiation of Kv1.2-G329T by sevoflurane resembles the action of this anesthetic on K-Shaw2; 4) G329T fully recapitulates the electrophysiological and pharmacological phenotype of the Kv1.2-FRAKT chimera, which is

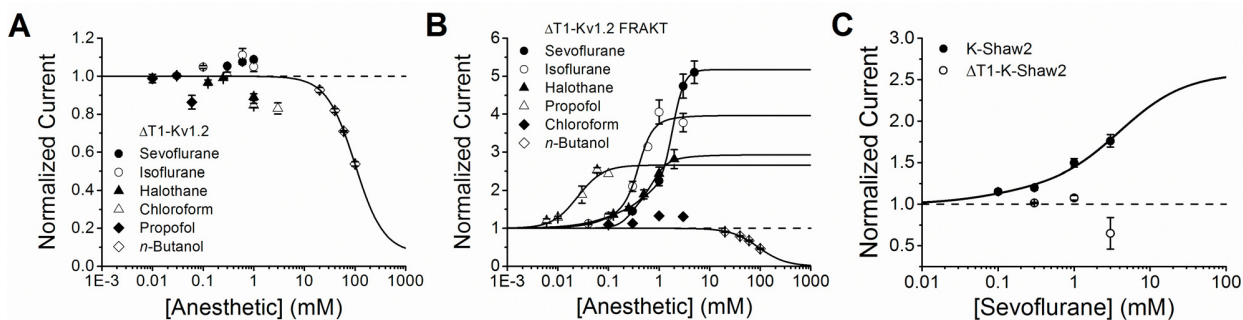


Fig 9. Positive modulation by sevoflurane is T1 domain-independent in Kv1.2 and Kv1.2-FRAKT, and T1 domain-dependent in K-Shaw2. (A) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on Δ T1-Kv1.2. Solid line is the best fit to the Hill equation for *n*-butanol. (B) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on Δ T1-Kv1.2 FRAKT. Solid lines are the best fits to the Hill equation (propofol and *n*-butanol) or double Hill equation (sevoflurane, isoflurane, and halothane). Best-fit parameters for results in panels A and B are summarized in Table 1. (C) Concentration-response relations of sevoflurane acting on K-Shaw2 and Δ T1-K-Shaw2. Solid line is the best-fit double Hill equation to the K-Shaw2 data with the following parameters: $K_1 = 0.08$ mM, $A_1 = 0.18$, $n_{H1} = 1$, $K_2 = 4$ mM, $A_2 = 1.4$, $n_{H2} = 1$. These parameters are similar to those previously published for wild type K-Shaw2 (Table 1) [7]. K-Shaw2 and Δ T1-K-Shaw2 were tested at +60 mV. N = 2–8 oocytes for each dose.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g009

also independent of the T1 domain; 5) the reverse K-Shaw2-T330G mutation at a position equivalent to that of G329 in Kv1.2 nearly eliminates the sevoflurane-induced leftward shift of the K-Shaw2 *G-V* relation. These results suggest that G329 in the S4-S5 linker plays a key role controlling the potentiation of the Kv1.2 current by sevoflurane. In the light of these observations, we explored putative sites of sevoflurane action in the Kv1.2 channel to help elucidate a working mechanism of anesthetic action. To identify putative sevoflurane binding sites with atomic resolution, we applied docking and MD-based free-energy calculations. Specifically, we docked sevoflurane against an ensemble of 120 membrane-equilibrated structures of Δ T1-Kv1.2 and Δ T1-Kv1.2-G329T in the activated-open and resting-closed conformations (Materials and Methods and S1 File). The sampling of an ensemble accounts for the molecular flexibility of the protein. Then, starting from sevoflurane-bound channel structures, we carried out free-energy calculations using the LIE method to resolve site-specific affinities of sevoflurane (S1 File). This calculation assumes that individual sites are independent. Also, because electrophysiological experiments do not measure actual binding of the anesthetics to the Kv channels, we made no attempt to quantitatively compare an “apparent” affinity (electrophysiological estimate) against the calculated affinities of multiple putative sites (LIE estimates). To learn about relative properties of putative sites, we only compared calculated affinities between different classes of sites in putative resting-closed and activated-open conformations.

Sevoflurane is found at four distinct locations on the Kv channel structures, hereafter called sites 1–4 (Fig 10A). Sites 1 and 2 are located near the S4-S5 linker at the internal face of the channel; site 3 is formed in the S5-S6 interface of adjacent subunits; and site 4 involves discrete pockets around the selectivity filter at the extracellular face of the channel. Sites 1 and 2 are near G329T in the mutant channel (Fig 10B). Despite a similar pattern of binding sites in Kv1.2 and Kv1.2-G329T, the LIE analysis of interaction energies revealed subsets of non-overlapping sites with relatively low and high affinities (Fig 10C; Table B in S1 File). Sites 1–3 involving the S4-S5 linker and pore domain exhibit relatively low-affinities with binding constants ranging between 0.01–0.2 mM⁻¹; and site 4 around the selectivity filter exhibits relatively high-affinity ranging between 0.3–0.4 mM⁻¹. In addition, the binding constants of sites 1 and 3

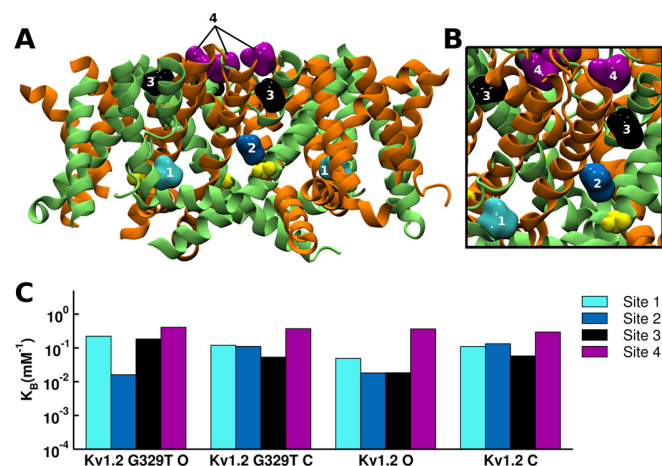


Fig 10. Putative sevoflurane binding sites in the Kv1.2 channel. (A) Representation of four distinct sevoflurane binding locations on Kv1.2: site 1 (light blue), 2 (blue), 3 (black) and 4 (purple). Each pair of subunits is represented in green and orange. Mutation G329T is highlighted yellow. (B) Close-up view of ligand binding sites and mutation. Note that site 2 is in close proximity to the mutated residue G329T. (C) Binding constants of individual sevoflurane sites. These estimates were obtained using the LIE method as described under S1 File. O and C stand for activation-open and resting-closed conformations of the channel.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g010

display modest conformation dependence, with a slight preference for the open state in Kv1.2-G329T. In contrast, the site 2 binding constants in the resting-closed conformation are ~7-fold greater than in the fully open conformation, for both wild type Kv1.2 and Kv1.2-G329T. Site 4 exhibits the largest binding constants, but no conformation dependence (Fig 10C; Table B in S1 File). These results are consistent with a scenario in which the modulation of Kv1.2 channels by sevoflurane results from multiple interactions with distinct classes of sites. A subset of these sites is possibly responsible for leftward shifting the G - V relation and another potentially contributing to the net increase in G_{\max} . However, since the calculated binding constants of wild type Kv1.2 and Kv1.2-G329T are generally similar (ranging between 0.02–0.4 mM⁻¹), additional factors probably determine the larger efficacy of sevoflurane acting on the mutant channel.

Discussion

Distinct gating processes in Kv channels

Shaker-related Kv1 channels undergo complex and strongly voltage-dependent activation gating involving sequential transitions between multiple closed states and a final cooperative opening step [29–31]. This mechanism has two major steps. The first corresponds to a major conformational change of the voltage sensors, which unlocks the gating machinery; and the second corresponds to a final cooperative rearrangement of the voltage sensors, which ultimately opens the intracellular activation gate [32, 33]. Whereas the first step is associated with movement of a large gating charge (14–16 e_0), the second only involves movement of a small gating charge (~1 e_0). Therefore, tightly coupled voltage-dependent gating is typically dominated by the first component. The previously investigated Shaker-ILT voltage sensor mutant clearly unveiled the second step by greatly shifting its voltage dependence toward depolarized voltages [32, 33]. The K-Shaw2 channel is a special case where the weakly voltage-dependent component is sufficient to control activation gating and can be described as a simple first-order equilibrium [34, 35]. Here, we showed that mutations that converted the S4-S5 linker of Kv1.2 into that of K-Shaw2 exhibit a Shaker-ILT-like gating phenotype, albeit the separation of the two activation components is further exaggerated. These mutations do not have much effect on the first sharp component of the G - V relation (Table A in S1 File). In contrast, the second gating component of the mutant G - V relations becomes clearly evident as a result of a robust depolarizing shift of its voltage dependence. Remarkably, the profile and voltage dependence of this depolarized component resembles the K-Shaw2 G - V relation. We propose that the G329T mutation at the C-terminal end of the S4-S5 linker induces these changes by greatly reducing the weakly voltage-dependent equilibrium constant of the cooperative opening transition. Such a reduction could directly result from hampering protein backbone flexibility caused by the glycine to threonine substitution at a critical position. The flexibility conferred by glycine at this position might create a critical pivot point generally conserved in a majority of Kv channels (Fig C in S1 File). The rare natural substitution of glycine for threonine at the equivalent position in wild type K-Shaw2 might help determine the unusual gating properties of K-Shaw2 and its distinctive strong positive modulation by sevoflurane [7].

Putative mechanism of sevoflurane action on Kv channels

The positive modulation of Kv channels by sevoflurane is associated with two separable effects. One shifts the G - V relation leftward and the other increases the G_{\max} . Sevoflurane might thus simultaneously influence two separable processes by acting at two distinct sites. We propose that sevoflurane shifts the G - V relation leftward by having a positive influence on the final weakly voltage-dependent component of gating that ultimately controls the opening of the Kv

channel. The anesthetic might achieve this by interacting with the S4-S5 linker and the pore domain. The Kv channel's S4 voltage sensor transmits its final concerted conformational change to the S4-S5 linker, which in turn acts on the intracellular activation gate to open it [14, 15, 18]. This idea helps explain quantitatively distinct sevoflurane modulations of Kv1.2 and K-Shaw2 channels and how S4-S5 linker mutations have profound effects on the final gating component and the positive modulation by sevoflurane and other general anesthetics. K-Shaw2 gating is dominated by the concerted conformational change transmitted by the S4-S5 linker, (in contrast to more conventional gating in Kv1 channels; see section above), and sevoflurane might selectively influence this process. Therefore, sevoflurane appears to have a greater effect on the voltage dependence of K-Shaw2 than on that of Kv1.2. However, upon introducing the G329T mutation at the C-terminal end of the Kv1.2 S4-S5 linker, the final gating component appears rightward shifted and magnified. Consequently, the potentiation of the Kv1.2-G329T by sevoflurane is also magnified, which seems to namely result from selectively leftward shifting the final gating component. To cause this shift, sevoflurane might increase the equilibrium constant of the opening step by destabilizing the pre-open closed state, as previously proposed for the wild-type K-Shaw2 [6] (see below). Supporting these ideas further, the reverse K-Shaw2 T330G mutation conversely eliminates the sevoflurane-induced leftward shift of the G - V relation, albeit has no significant effect on voltage-dependent gating (Fig 8). Additionally, this experiment surprisingly revealed that T330 is only a critical determinant of the sevoflurane effect on voltage dependence because the T330G mutation did not significantly affect the sevoflurane-induced increase in G_{\max} . This selectivity strongly suggests that another site is independently responsible for the sevoflurane-induced increase in the G_{\max} . Given the quick onset and reversibility of the positive modulation [7], we propose that, rather than increasing the number of functional channels, sevoflurane probably increases the maximum open probability and/or the unitary conductance. The potentiation of the ShakerB Kv channel by isoflurane results from the combination of both effects [36]. Further work is needed to investigate the biophysical and molecular underpinnings of the sevoflurane-induced increase in G_{\max} .

Exploring putative sevoflurane binding sites and mechanisms of action in the Kv1.2 channel

We gained more specific insights into sites and mechanisms of sevoflurane action from atomic level simulations of a membrane-equilibrated Kv1.2 model in the resting closed and open states. In silico docking of sevoflurane to these conformations, along with free-energy calculations, revealed putative sites with distinct binding affinities in regions experimentally implicated in anesthetic action by the comparative study of the Kv1.2 and K-Shaw2 channels. Sites 1 and 2 are in close proximity to the S4-S5 linker. Sevoflurane binding to site 2 in Kv1.2 and Kv1.2-G329T is, however, significantly weaker in the open state than in the resting closed state (~7-fold). Thus, a simple stabilization of the open state alone does not explain the sevoflurane-induced leftward shift in the G - V relation. Rather, this shift might result from the crosstalk among various interacting sites, which globally destabilizes the pre-open closed state. Further modeling of sevoflurane binding sites in the pre-open closed state will be necessary to examine this possibility.

Why does Kv1.2-G329T exhibit greater sevoflurane-induced potentiation than the wild type counterpart? The G329T mutation alone might stabilize the pre-open closed state and consequently the voltage dependence of the opening step is better resolved as a separate depolarized gating component of the G - V relation (see above). That is, actual opening of the channel becomes harder. If sevoflurane binds to a pre-open closed state displaying an increased

presence in the G329T mutant, it might have greater influence on its stability. Presumably, binding of sevoflurane to interacting sites in the tetrameric Kv1.2-G329T opposes the negative effect of the mutation by destabilizing the pre-open closed state, which results in the observed sevoflurane-induced leftward shift of the G - V relation's second gating component. Essentially, sevoflurane might act similarly on wild type Kv1.2. In this case, however, the tight coupling between voltage-dependent activation and channel opening blurs the separation of the gating components in the G - V relation. This implies that, relative to the G329T, the relative availability of binding sites in the pre-open closed state of wild type Kv1.2 is more limited. Therefore, the dynamic range for positive modulation of wild type Kv1.2 by sevoflurane is more restricted and the potentiation less efficacious.

Sharply in contrast to sites 1–3, site 4 located externally around the selectivity filter displays the strongest binding constants (on average, ~5-fold stronger than the highest affinity of site 2), but little state dependence. Binding of sevoflurane to this site is particularly interesting because it might affect the stability of the selectivity filter, which plays a role in a mechanism of Kv channel inactivation [37]. Stabilization of the open conducting conformation of the selectivity filter following sevoflurane binding to site 4 could help explain the sevoflurane-induced increase in the G_{\max} . Further experimental validation would, however, be necessary to test this hypothesis. Multiple binding sites with distinct binding constants is consistent with the presence of low- and high-affinity components of the Kv1.2-FRAKT and Kv1.2-G329T concentration-potentiation relations for various inhaled anesthetics (Figs 4 and 5). However, no quantitative relationships could be made at this time.

Surprisingly, the positive modulation of K-Shaw2 by sevoflurane is T1 domain-dependent, whereas that of Kv1.2-FRAKT is not. This observation suggests that other interactions contribute to the ability of sevoflurane to influence the final opening step. Supporting this idea, the T1 domain scaffolding of Kv1.2 and K-Shaw2 channels exhibit significant differences in regions that have been implicated in gating [28, 38].

Concluding remarks

Three major mechanistic conclusions emerge from this study. First, the positive modulation of Kv1.2 channels by general anesthetics depends on a single S4-S5 linker residue (G329). G329T confers dramatic positive modulation by sevoflurane. Threonine is the residue naturally found at the equivalent position in the K-Shaw2 (T330), a Kv channel that normally exhibits strong positive modulation by sevoflurane. Underscoring the critical role of T330, the converse mutation T330G abolished voltage-dependent potentiation of K-Shaw2 by sevoflurane without affecting the sevoflurane-induced increase in G_{\max} . Such a differential effect suggests separable sites of sevoflurane action, which is consistent with modeling results. The location of G329 and T330 in the S4-S5 linker of these Kv channels suggests that this position is a critical pivot point of voltage-dependent gating. Second, depending on Kv channel specific interactions, the cytoplasmic T1 domain may additionally contribute to the positive modulation of K-Shaw2 by sevoflurane. Third, molecular modeling suggests that positive modulation results from allosteric interactions between sites 1–3, the pore domain and the S4-S5 linker—a critical moving part involved in activation gating. These interactions might favorably influence pore opening. Additionally, binding to site 4 might stabilize the open state. These mechanisms serve as framework to explain how Kv1 channels might play a role in general anesthetic action.

Supporting Information

S1 File. Liang et al Supporting Information.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Drs. Annika F. Barber and Roderic G. Eckenhoff (University of Pennsylvania) for critically reading the manuscript and helpful discussions. W.T. thanks Antonio Pereira De Araujo (University of Brasilia) for comments and discussions. Also, we thank members of the Covarrubias lab for support and feedback throughout the preparation of this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: QL WT MC. Performed the experiments: QL WDA STJ CSS JMH. Analyzed the data: QL WDA STJ CSS JMH WT MC. Wrote the paper: QL WT MC.

References

1. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(5):370–86. doi: [10.1038/nrn2372](https://doi.org/10.1038/nrn2372) PMID: [18425091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425091/)
2. Kopp Lugli A, Yost CS, Kindler CH. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. *Eur J Anaesth*. 2009; 26(10):807–20. doi: [10.1097/EJA.0b013e32832d6b0f](https://doi.org/10.1097/EJA.0b013e32832d6b0f) PMID: [19494779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19494779/); PubMed Central PMCID: [PMC2778226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2778226/).
3. Hemmings HC Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth*. 2009; 103(1):61–9. doi: [10.1093/bja/aep144](https://doi.org/10.1093/bja/aep144) PMID: [19508978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19508978/)
4. Herold KF, Hemmings HC Jr. Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Front Pharmacol*. 2012; 3:50. Epub 2012/04/06. doi: [10.3389/fphar.2012.00050](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00050) PMID: [22479247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22479247/); PubMed Central PMCID: [PMC3316150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3316150/).
5. Barber AF, Carnevale V, Klein ML, Eckenhoff RG, Covarrubias M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(18):6726–31. Epub 2014/04/23. doi: [10.1073/pnas.1405768111](https://doi.org/10.1073/pnas.1405768111) PMID: [24753583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24753583/); PubMed Central PMCID: [PMC4020080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4020080/).
6. Barber AF, Liang Q, Amaral C, Treptow W, Covarrubias M. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys J*. 2011; 101(7):1613–22. doi: [10.1016/j.bpj.2011.08.026](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.026) PMID: [21961587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21961587/)
7. Barber AF, Liang Q, Covarrubias M. Novel activation of voltage-gated K⁺ channels by sevoflurane. *J Biol Chem*. 2012; 287(48):40425–32. Epub 2012/10/06. doi: [10.1074/jbc.M112.405787](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405787) PMID: [23038249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23038249/); PubMed Central PMCID: [PMC3504757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3504757/).
8. Alkire MT, Asher CD, Franciscus AM, Hahn EL. Thalamic microinfusion of antibody to a voltage-gated potassium channel restores consciousness during anesthesia. *Anesthesiology*. 2009; 110(4):766–73. Epub 2009/03/27. PMID: [19322942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19322942/).
9. Liudyno MI, Birch AM, Tanaka BS, Sokolov Y, Goldin AL, Chandy KG, et al. Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics. *J Neurosci*. 2013; 33(41):16310–22. Epub 2013/10/11. doi: [10.1523/jneurosci.0344-13.2013](https://doi.org/10.1523/jneurosci.0344-13.2013) PMID: [24107962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24107962/); PubMed Central PMCID: [PMC3792466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3792466/).
10. Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol*. 2004; 66:477–519. PMID: [14977411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977411/)
11. Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(7):548–62. PMID: [16791144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16791144/)
12. Robbins CA, Tempel BL. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia*. 2012; 53 Suppl 1:134–41. doi: [10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x) PMID: [22612818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22612818/).
13. Bhattacharji A, Klett N, Go RC, Covarrubias M. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(7):1475–85. doi: [10.1111/j.1476-5381.2010.00642.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00642.x) PMID: [20136839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20136839/)
14. Blunck R, Batulan Z. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol*. 2012; 3:166. doi: [10.3389/fphar.2012.00166](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00166) PMID: [22988442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22988442/)
15. Chowdhury S, Haehnel BM, Chanda B. Interfacial gating triad is crucial for electromechanical transduction in voltage-activated potassium channels. *J Gen Physiol*. 2014; 144(5):457–67. doi: [10.1085/jgp.201411185](https://doi.org/10.1085/jgp.201411185) PMID: [25311635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25311635/); PubMed Central PMCID: [PMC4210428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4210428/).

16. Delemotte L, Tarek M, Klein ML, Amaral C, Treptow W. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(15):6109–14. doi: [10.1073/pnas.1102724108](https://doi.org/10.1073/pnas.1102724108) PMID: [21444776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444776/); PubMed Central PMCID: PMC3076833.
17. Treptow W, Tarek M. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys J*. 2006; 90(9):L64–L6. PMID: [16533847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533847/)
18. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science*. 2005; 309:903–8. PMID: [16002579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16002579/)
19. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996; 14(1):33–8, 27–8. PMID: [8744570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8744570/).
20. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. 2005; 26(16):1781–802. PMID: [16222654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222654/)
21. Huang J, MacKerell AD Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*. 2013; 34(25):2135–45. doi: [10.1002/jcc.23354](https://doi.org/10.1002/jcc.23354) PMID: [23832629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23832629/); PubMed Central PMCID: PMC3800559.
22. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010; 31(2):455–61. doi: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334) PMID: [19499576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19499576/); PubMed Central PMCID: PMC3041641.
23. Aqvist J, Medina C, Samuelsson JE. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng*. 1994; 7(3):385–91. PMID: [8177887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8177887/).
24. Wang G, Covarrubias M. Voltage-dependent gating rearrangements in the intracellular T1-T1 interface of a K⁺ channel. *J Gen Physiol*. 2006; 127(4):391–400. PMID: [16533897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16533897/)
25. Wang G, Strang C, Pfaffinger PJ, Covarrubias M. Zn²⁺-dependent redox switch in the intracellular T1-T1 interface of a Kv channel. *J Biol Chem*. 2007; 282(18):13637–47. PMID: [17331952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17331952/)
26. Cushman SJ, Nanao MH, Jahng AW, DeRubeis D, Choe S, Pfaffinger PJ. Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nat Struct Biol*. 2000; 7(5):403–7. PMID: [10802739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802739/)
27. Robinson JM, Deutsch C. Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron*. 2005; 45(2):223–32. PMID: [15664174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15664174/)
28. Minor DL, Lin YF, Mobley BC, Avelar A, Jan YN, Jan LY, et al. The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*. 2000; 102(5):657–70. PMID: [11007484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11007484/)
29. Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science*. 1992; 255(5052):1712–5. PMID: [1553560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1553560/)
30. Schoppa NE, Sigworth FJ. Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *J Gen Physiol*. 1998; 111(2):313–42. PMID: [9450946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9450946/)
31. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol*. 1994; 103(2):321–62. PMID: [8189208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8189208/)
32. Pathak M, Kurtz L, Tombola F, Isacoff E. The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J Gen Physiol*. 2005; 125(1):57–69. PMID: [15623895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15623895/)
33. Ledwell JL, Aldrich RW. Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J Gen Physiol*. 1999; 113(3):389–414. PMID: [10051516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10051516/)
34. Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW. Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*. 1998; 111(3):421–39. PMID: [9482709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9482709/)
35. Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW. Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*. 1998; 111(3):399–420. PMID: [9482708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9482708/)
36. Li J, Correa AM. Single-channel basis for conductance increase induced by isoflurane in Shaker H4 IR K⁺ channels. *Am J Physiol—Cell Physiol*. 2001; 280(5):C1130–C9. PMID: [11287326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11287326/)
37. Hoshi T, Armstrong CM. C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: pore constriction or dilation? *J Gen Physiol*. 2013; 141(2):151–60. doi: [10.1085/jgp.201210888](https://doi.org/10.1085/jgp.201210888)
38. Bixby KA, Nanao MH, Shen NV, Kreusch A, Bellamy H, Pfaffinger PJ, et al. Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels. *Nat Struct Biol*. 1999; 6(1):38–43. PMID: [9886290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886290/)

Anexo II

Arquivo de Configuração para Dinâmica Molecular

Apresentação de um dos arquivos de configuração padrão para as simulações de dinâmica molecular utilizando o NAMD em conjunto com os parâmetros do CHARMM.

```
1
2
3 # Structures
4 coordinates kv1.10.0.pdb
5 structure kv1.10.0.psf
6
7
8 # Restart files (Only for restart!!)
9 bincoordinates kv1.10.13r.coor
10 extendedsystem kv1.10.13r.xsc
11 binvelocities kv1.10.13r.vel
12
13
14 # Initial parameters
15 set temp 300
16 #temperature $temp ;# Only for initial
17 seed 12345
18
19
20 # Periodic Boundary Conditions
21 #cellBasisVector1 138 0.0 0.0
22 #cellBasisVector2 0.0 144 0.0
23 #cellBasisVector3 0.0 0.0 95
24 #cellOrigin 1.51 0.12 10.18
25
26
```

```

27 # Harmonic constraints
28 constraints off
29 consexp 2
30 consref kv1.10.1.hrm
31 conskfile kv1.10.1.hrm
32 conskcol B
33 constraintScaling 1.0
34
35
36 # Output params
37 binaryoutput no
38 outputname kv1.10.14
39 outputenergies 10000
40 outputtiming 10000
41 outputpressure 10000
42 binaryrestart yes
43 dcdfile kv1.10.14.dcd
44 dcdfreq 5000
45 XSTFreq 5000
46 restartname kv1.10.14r
47 restartfreq 5000
48
49
50 # PME parameters
51 PME on
52 PMETolerance 10e-6
53 PMEInterpOrder 4
54 PMEGridSpacing 1.2
55
56
57 # Temperature control and equilibration
58 langevin on
59 langevintemp $temp
60 langevindamping 0.1
61 #reassignfreq 100 ;# Only for initial
62 #reassigntemp 273 ;# Only for initial
63 #reassignincr 0.06775 ;# Only for initial
64 #reassignhold $temp ;# Only for initial
65
66
67 # Pressure control
68 usegrouppressure yes
69 useflexiblecell yes
70 langevinpiston on
71 langevinpistontarget 1

```

```

72 langevinpistonperiod 200
73 langevinpistondecay 100
74 langevinpistontemp $temp
75 surfacetensiontarget 0.0
76 strainrate 0. 0. 0.
77
78
79 # External electric field
80 efieldon no
81 efield 0.0 0.0 0.1
82
83
84 # brnch_root_list_opt
85 splitpatch hydrogen
86 hgroupcutoff 2.8
87
88
89 # Integrator params
90 timestep 2.0
91 fullElectFrequency 2
92 nonbondedfreq 1
93
94 # COLVARS SECTION
95 #colvars on
96 #colvarsConfig colvar.conf
97
98
99 # Force field params
100 paratypecharmm on
101 parameters /home/wtreptow/jhosoume/repository/charmm/toppar_water_ions.str
102 parameters /home/wtreptow/jhosoume/repository/charmm/par_all36_prot.prm
103 parameters /home/wtreptow/jhosoume/repository/charmm/par_all36_lipid.prm
104 exclude scaled1-4
105 1-4scaling 1.0
106 rigidbonds all
107 rigiditytolerance 0.00001
108 rigiditerations 400
109 cutoff 11.0
110 pairlistdist 13.0
111 stepspercycle 16
112 switching on
113 switchdist 8.0
114
115
116 # Run

```

```
117 #minimize 800           ;# Only for initial
118
119 run 500000
```