



Universidade de Brasília – UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR - CEL

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA TEÓRICA E COMPUTACIONAL – LBTC

**INTERAÇÕES MOLECULARES COMPLEXAS
NA ORIGEM DA MODULAÇÃO DIRETA DE
CANAIS IÔNICOS NEURONAIS POR
ANESTÉSICOS GERAIS.**

Aluna: Letícia Stock Vieira

Orientador: Prof. Dr. Werner Treptow

BRASÍLIA, DF – MARÇO DE 2018

INTERAÇÕES MOLECULARES COMPLEXAS NA ORIGEM DA MODULAÇÃO DIRETA DE CANAIS IÔNICOS NEURONAIS POR ANESTÉSICOS GERAIS

Aluna: Letícia Stock Vieira

Orientador: Prof. Dr. Werner Treptow

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como exigência parcial para obtenção do grau de doutora em Biologia Molecular.

BRASÍLIA, DF – MARÇO DE 2018

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo suporte – emocional, afetivo e material – incondicional e por me proporcionarem a oportunidade de prosseguir na carreira que eu escolhi. Vocês são meu porto seguro. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Dr. Werner Treptow, pelo imenso aprendizado. Por me apresentar perguntas fascinantes e mostrar que podemos respondê-las.

Às professoras Dra Sonia Maria de Freitas e Dra Graziella Joanitti, por terem aberto as portas da pesquisa científica para mim, e por me guiarem e inspirarem até hoje.

Aos colegas de laboratório, LBTceanos, pela convivência maravilhosa ao longo de todos esses anos. O caminho até aqui foi mais fácil graças a vocês.

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dispensado. Pelas discussões frutíferas e pertinentes ao melhoramento da versão final deste documento.

Ao departamento de Biologia Celular e ao Programa de pós-graduação em Biologia Molecular por fornecer uma estrutura de excelência para produção de conhecimento científico de qualidade.

Às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 140845/2014-3; Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes): pelo apoio financeiro.

Ao meu namorado, Daniel Paiva Agostinho, por todo cuidado, amor e paciência. É com muito carinho e gratidão que eu digo que essa conquista também é sua. ♡

RESUMO

Anestesia geral é um recurso fundamental na medicina moderna. Em contraste com o uso de anestésicos há mais de 100 anos, seus alvos e mecanismo de ação moleculares ainda são largamente desconhecidos. Porquanto não se descarte a hipótese de que essas moléculas exerçam seus efeitos por meio de alterações de propriedades físico-químicas de membranas celulares, um conjunto crescente de evidências sugere um cenário alternativo. Neste, o estado de anestesia seria induzido pela modulação direta de múltiplos receptores proteicos. Entre os potenciais receptores, estudos de eletrofisiologia e em modelos animais demonstram que o canal iônico neuronal dependente de voltagem de mamíferos Kv1.2 é modulado diretamente pelo anestésico geral sevoflurano. Esses estudos sugerem que sevoflurano se liga a múltiplos sítios em Kv1.2, resultando em um aumento na probabilidade de abertura do canal, e em um aumento da sua condutância máxima. Nesse contexto, o presente trabalho se propõe a identificar sítios de ligação de sevoflurano nas conformações aberta e fechada de Kv1.2 e investigar quanto da modulação da proteína pode ser explicada pela ligação direta do anestésico, no contexto de um modelo de dois estados. Preambular a essa investigação, no entanto, está o desenvolvimento do arcabouço teórico necessário ao tratamento concentração-dependente da interação de pequenas moléculas a múltiplos sítios de ligação saturáveis, para que se possa quantificar o impacto do modulador no equilíbrio entre conformações da proteína. Da forma como foram descritas, as equações são gerais e facilmente transponíveis a diferentes sistemas de interação proteína-ligante. O estudo mostra, sob uma perspectiva atomística molecular, que sevoflurano se liga com dependência conformacional a Kv1.2. A estabilização do estado aberto promovida pela ligação da molécula anestésica é capaz de recapitular o aumento da probabilidade de abertura do canal verificado experimentalmente. Ademais, os sítios de ligação de sevoflurano a Kv1.2 sugeridos pela estratégia aqui desenvolvida se encontram próximos a resíduos de aminoácido identificados como relevantes à modulação por meio de estudos de mutagênese e marcação com ligantes fotoativos. Em conjunto, os resultados apresentados corroboram a hipótese da modulação direta e contribuem uma perspectiva microscópica para se compreender os efeitos causados por sevoflurano.

ABSTRACT

Anesthetics are routinely used in medical procedures for almost two centuries. Despite its ubiquity, the molecular mechanism leading to the endpoint of anesthesia remains unknown. While anesthetics might also act by altering cellular membranes' physicochemical properties, recent studies favor direct allosteric modulation of multiple proteins targets. One such target, evidenced by electrophysiology and in vivo experiments, is the voltage-gated channel Kv1.2. Investigations on sevoflurane, a major general anesthetic, suggest the molecule potentiates Kv1.2 by binding to multiple independent sites, causing a left-shift to the open probability curve (increasing open probability), while also increasing its maximum conductance. Here, we set out to identify Kv1.2 sevoflurane binding sites and quantify the impact of direct modulation in Kv1.2 potentiation. For that, we have developed an original theoretical framework to investigate concentration-dependent interaction of small ligands to multiple saturable protein binding sites which allow for thorough calculation of the functional impact of such binding to equilibrium between well-known conformational states, i.e. open and closed Kv1.2 structures. Anesthetic's local distribution and binding affinities are evaluated by a combination of docking and free-energy-perturbation calculations. The results suggest sevoflurane binds Kv1.2 in conformation-dependent manner. Also, the calculated ligand-effected open-conformation stabilization agrees with experimental measurements, successfully recovering open-probability leftward shift from microscopic data alone. Key binding sites identified by the docking-FEP strategy are also found to be in close proximity to residues identified as relevant by recent photolabeling and mutagenesis experiments. Altogether, results support the direct modulation hypothesis and contributes to understanding sevoflurane effects from a molecular standpoint. Moreover, the theory developed in this work is general and could be applied to various ligand-receptor systems.

SUMÁRIO

I. PARTE 1: Modulação alostérica concentração-dependente de proteínas de membrana.....	1
I.1.INTRODUÇÃO.....	2
I.1.1.Modulação alostérica.....	2
I.1.2.Proteínas de membrana como alvos moleculares de pequenas moléculas.....	2
I.2.OBJETIVOS.....	4
I.2.1.Objetivo geral.....	4
I.2.2.Objetivos específicos.....	4
I.3.MÉTODOS.....	5
I.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	5
I.4.1. Considerações Iniciais e Pressupostos.....	5
I.4.2. Constante de Ligação $K_X(n_1, \dots, n_s)$	6
I.4.3. Densidade de probabilidade dos estados ligados.....	11
I.4.4. Marginalização das probabilidades.....	12
I.4.5. Densidade de probabilidade posição-dependente.....	13
I.4.6. Variação de energia livre padrão.....	14
I.4.7. Constante de Equilíbrio dependente de Voltagem $K(V)$	15
I.4.8. Impacto Funcional: Efeito do Ligante em $K(V)$	18
I.4.9. Considerações gerais e discussão.....	20
II PARTE 2: Modulação direta de canais iônicos neuronais por anestésicos gerais.....	22
II.1. INTRODUÇÃO.....	23
II.1.1. Potencial elétrico transmembrânico.....	23
II.1.2. Canais Iônicos.....	24
II.1.3. Estados Funcionais e Mecanismos Intrínsecos de Modulação da Condução.....	26
II.1.3.1. <i>Gate</i> Hidrofóbico.....	27
II.1.3.2. Filtro de Seletividade.....	31
II.1.4 Modulação de Canais Iônicos por Ligantes.....	35
II.1.4.1. Anestésicos Gerais.....	35
II.1.4.2. Modulação de Canais Iônicos por Anestésicos Gerais.....	36
II.1.4.3. Sevoflurano e Canais de Potássio.....	38
II.2. OBJETIVOS.....	40
II.2.1. Objetivo geral.....	40

II.2.2. Objetivos específicos.....	40
II.3. TEORIA E MÉTODOS.....	41
II.3.1. Simulações de Dinâmica Molecular (DM).....	41
II.3.1.1. Desvio Quadrático Médio (RMSD).....	43
II.3.1.2. Steered Molecular Dynamics (SMD).....	44
II.3.2. <i>Docking</i> Molecular.....	44
II.3.3. Cálculos de energia livre.....	45
II.3.3.1. Free energy perturbation (FEP).....	46
II.3.3.2. Umbrella Sampling (US).....	49
II.3.4. Sobreposição sítio-específica da amostragem de FEP nas conformações F e A.....	52
II.4. PROTOCOLOS.....	53
II.4.1. Protocolo Geral de Simulação.....	53
II.4.2. <i>Docking</i> Molecular.....	53
II.4.3. Free Energy Perturbation (FEP).....	54
II.4.4. Umbrella Sampling.....	55
II.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
II.5.1. Sevoflurano se liga a múltiplos sítios em Kv1.2.....	58
II.5.1.1. Sítios de ligação a sevoflurano.....	58
II.5.1.2. Energia livre de ligação e constantes de equilíbrio.....	60
II.5.1.3. Distribuição espacial do ligante nos estados aberto e fechado de Kv1.2.....	65
II.5.1.4. Probabilidades de ligação concentração-dependente de sevoflurano a Kv1.2 e efeitos de saturação.....	68
II.5.2. Sevoflurano impacta a energética do canal em baixas concentrações.....	72
II.5.3. Sítios e Afinidades Recapitulam Dados Experimentais Independentes.....	75
III. CONCLUSÕES.....	77
IV. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	78
IV.1. Limitações da amostragem por <i>docking</i> molecular.....	78
IV.2. Modelo simplificado de dois estados.....	78
IV.2.1. Estado não-condutor: DSV ativado, poro fechado.....	79
IV.2.2. Estado não-condutor: Inativação do filtro de seletividade.....	80
IV.3. Investigação do Estado Inativado do FS de Kv1.2.....	81
IV.4. Conexão entre resultados microscópicos e efeitos fisiológicos.....	83
V. REFERÊNCIAS.....	85

ANEXOS.....	95
Anexo 1: Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. Stock, L., Hosoume, J. & Treptow, W. <i>Scientific Reports</i> 7, 5734 (2017). doi:10.1038/s41598-017-05896-8.....	95
Anexo 2: Binding of general anesthetics to ion channels. Stock, L., Hosoume, J., Cirqueira, L., and Treptow, W. <i>BioRxiv</i> 266809 (2018). doi:10.1101/266809.....	95

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição de alvos de fármacos humanos separados por família gênica.....	3
Figura 2. Ilustração do sistema considerado.....	5
Figura 3. Equilíbrio conformacional dependente de voltagem.....	15
Figura 4. Desafio da modulação alostérica.....	18
Figura 5. Ciclo termodinâmico considerando três estados conformacionais.....	21
Figura 6. Estrutura geral de canais iônicos.....	26
Figura 7. Controle da condução via gate hidrofóbico.....	28
Figura 8. Estrutura do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2.....	29
Figura 9. Funcionamento de Canais Iônicos Dependentes de Voltagem.....	30
Figura 10. Filtros de seletividade de canais iônicos.....	31
Figura 11. Filtro de seletividade do canal iônico KcsA em dois estados.....	34
Figura 12. Ilustração dos estados funcionais de canais iônicos dependentes de voltagem.....	35
Figura 13. Estrutura do sevoflurano.....	36
Figura 14. Potenciação do canal Kv1.2 por 1mM de sevoflurano.....	39
Figura 15. Ciclo termodinâmico empregado nos cálculos de FEP para obtenção da energia livre de ligação.....	55
Figura 16. Identificação de sítios de ligação via Docking Molecular de sevoflurano nas conformações aberta e fechada de Kv1.2.....	59
Figura 17. Detalhe das interações moleculares entre sevoflurano e seus sítios de ligação em Kv1.2 nas conformações F (esquerda) e A (direita).....	64
Figura 18. Análise da sobreposição sítio-específica da distribuição dos centros geométricos do ligante.....	67

Figura 19. Probabilidade dos estados ligados a sevoflurano em diferentes concentrações do ligante no banho.....	69
Figura 20. Probabilidades marginais de ligação de sevoflurano nos estados F e A em concentrações crescentes de sevoflurano no banho.....	70
Figura 21. Representação da probabilidade espacial de ligação de sevoflurano nos estados fechado e aberto em diferentes concentrações do ligante.....	71
Figura 22. Probabilidade de abertura do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2 na presença de sevoflurano em diversas concentrações.....	72
Figura 23. Decomposição do efeito de sevoflurano no equilíbrio $F \leftrightarrow A$	74
Figura 24. Distâncias médias entre sevoflurano e resíduos de aminoácido sugeridos por experimentos	76
Figura 25. Produção do potencial estado não-condutor.....	82
Figura 26. Superfície de energia livre bidimensional (R e Z) associada à permeação de íons K^+ em diferentes conformações do filtro de seletividade.....	83

Lista de tabelas

Tabela 1. Estimativa da concentração (em mM) de íons livres em células humanas musculares esqueléticas e neurônios.(Hille, 1992).....	23
Tabela 2: Parâmetros computacionais dos cálculos de FEP.....	54
Tabela 3: Energias e constantes de ligação de uma e duas moléculas de sevoflurano ao sítio j na conformação fechada de Kv1.2.....	62
Tabela 4: Energias e constantes de ligação de uma e duas moléculas de sevoflurano ao sítio j na conformação aberta de Kv1.2.....	62

I. PARTE 1: Modulação alostérica concentração-dependente de proteínas de membrana

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Modulação alostérica

Modulador alostérico é a molécula capaz de alterar a função de determinado receptor ao se ligar a um sítio de interação diferente do sítio de ligação primário (*ortostérico*). Esse sítio é denominado *alostérico*. Nesse sentido, a teoria alostérica se fundamenta na ideia de que a molécula alostérica é capaz de se ligar seletivamente a sítios secundários e alterar a estrutura do receptor de forma que a interação do ligante endógeno com o sítio ortostérico seja modulada. Em termos gerais essa modulação pode ser de dois tipos: positiva ou negativa. Moduladores alostéricos positivos se ligam ao receptor para aumentar a afinidade do ligante primário pelo seu sítio, como consequência a atividade do receptor é aumentada. Moduladores alostéricos negativos por sua vez tem efeitos contrários, reduzindo a afinidade do ligante primário pelo sítio ortostérico e ocasionando uma diminuição da atividade do receptor. Uma vez que, segundo essa definição, o modulador alostérico altera a resposta do receptor ao seu ligante endógeno, tais moduladores raramente teriam efeito na ausência do ligante primário.(Abdel-Magid, 2015)

Mais recentemente, o termo alosteria tem sido utilizado de forma mais abrangente para indicar a modulação conformação-dependente da atividade do receptor via ligação em sítios secundários, seja no próprio receptor, seja fora dele (*off-target*). A ligação de moléculas alostéricas estabiliza determinada conformação proteica e, desta forma, o equilíbrio entre conformações é alterado pela estabilização promovida pelo modulador. Em última análise, o efeito causado pelo ligante alostérico e pelo novo equilíbrio conformacional depende da classe de proteína e que função ela exerce.(Ballesteros and Ransom, 2006; Westen et al., 2014; 2015; Liang et al., 2015)

I.1.2. Proteínas de membrana como alvos moleculares de pequenas moléculas

Proteínas de membrana compõem aproximadamente 20% do genoma humano e são alvo de mais de 40% dos pequenos fármacos atualmente utilizados.(Almén et al., 2009; Overington et al., 2006; Santos et al., 2017) Entre os principais alvos de ligantes, destacam-se as famílias de proteínas: receptores associados a proteína G (GPCR), receptores nucleares, receptores ionotrópicos e canais iônicos dependentes de voltagem.(Santos et al., 2017) Desses, apenas os

receptores nucleares não são proteínas de membrana (Figura 1). Consistente com sua super-representação nesse tipo de levantamento de dados, proteínas de membrana estão na fronteira de todas as células e são responsáveis pela mediação e processamento de sinalizações intra e extracelulares.

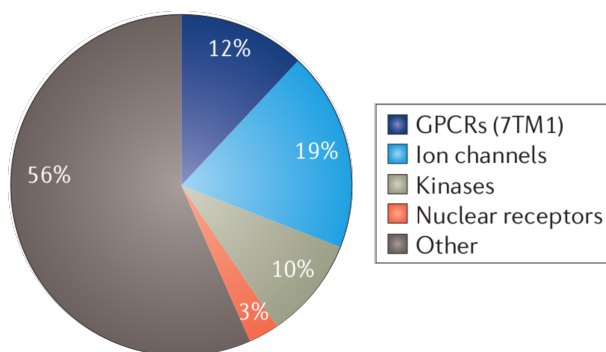


Figura 1. Distribuição de alvos de fármacos humanos separados por família gênica. GPCR: receptores associados a proteína G; Ion channels: canais iônicos; Kinases: cinases; Nuclear receptors: receptores nucleares; Other: outros. Adaptado de (Santos et al., 2017)

Naturalmente, grandes esforços são realizados no sentido de compreender os mecanismos subjacentes à regulação e modulação por ligantes desse grupo relevante de proteínas. O primeiro passo para alcançar tal objetivo envolve o conhecimento da estrutura molecular do complexo proteína-ligante. Apesar de grandes avanços nas técnicas de cristalografia de raio-X, e mais recentemente no aumento de resolução de dados de crioeletromicrografia, é bem aceito que a obtenção de estruturas de alta resolução de proteínas transmembrânicas ainda representa um desafio para a biofísica estrutural.

Ainda, no contexto da modulação alostérica, proteínas de membrana podem apresentar diversos sítios de ligação secundários (e.g.: GPCRs). Nesses casos, estratégias experimentais tradicionais podem apresentar limitações quanto ao tratamento de múltiplos sítios de ligação não idênticos, fornecendo afinidades globais obtidas a partir de medidas indiretas. Além disso, determinados ligantes apresentam altas constantes de dissociação, adicionando um dificultador às análises.(Woll et al., 2016)

Diante disso, estratégias computacionais surgem como uma alternativa para a investigação das interações entre proteínas e ligantes com resolução microscópica. De posse das estruturas moleculares dos complexos, novas vertentes teóricas e experimentais, se abrem para aprofundar conhecimentos a respeito do funcionamento de proteínas de membrana na presença de ligantes.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo geral

Desenvolver um arcabouço teórico capaz de quantificar o impacto de moléculas alostéricas na constante de equilíbrio entre duas conformações proteicas.

I.2.2. Objetivos específicos

- Definir uma constante de ligação generalizada para o caso de ligantes que interagem com múltiplos sítios de ligação em múltiplos estados de ocupância;
- Utilizar as aproximações necessárias para tornar o cálculo viável diante da atual capacidade computacional de processamento;
- Desenvolver equações para as densidades de probabilidades de estados ligados e suas marginalizações;
- Derivar uma expressão matemática que combine a dependência de voltagem e a ligação das moléculas para descrever o equilíbrio entre as conformações aberta e fechada de canais iônicos.

I.3. MÉTODOS

A parte I desta tese se propõe a derivar equações para descrever a interação de moléculas alostéricas em múltiplos sítios de ligação proteicos, bem como o impacto dessa ligação no equilíbrio entre duas conformações. Tal desenvolvimento expande os esforços iniciados por Roux e colaboradores no contexto da ligação de moléculas de água na cavidade da bacteriorodopsina (Roux et al., 1996); e consiste em uma inovação metodológica fundamental à descrição da complexidade da modulação alostérica de proteínas de membrana. Isto posto, os resultados apresentados a seguir compõem eles mesmos a metodologia do trabalho. Todas as equações desenvolvidas e aplicadas ao sistema-teste apresentado na parte II foram escritas em linguagens de programação no Laboratório de Biologia Teórica e Computacional da Universidade de Brasília.

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto dos resultados apresentados nos capítulos I e II foram publicados e estão disponíveis para consulta em seus respectivos jornais ou ao final da tese (anexos I e II). (Stock et al., 2017, 2018).

Desenvolvimento do arcabouço teórico

I.4.1. Considerações Iniciais e Pressupostos

Considere um sistema microscópico formado por M espécies moleculares. A energia potencial do sistema é $U_X(\mathbf{r}^M)$, onde $\mathbf{r}^M \equiv \{\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_{N+1}, \dots, \mathbf{r}_M\}$ são os graus de liberdade das M moléculas e \mathbf{r}_i indica as coordenadas cartesianas da molécula i . O sistema é composto por uma proteína ou receptor R , fixo no centro do sistema de coordenadas, inserido em uma bicamada lipídica hidratada. Imersos nesse sistema estão N ligantes idênticos. Considera-se ainda que o sistema está em condições diluídas e em equilíbrio termodinâmico, com número de partículas, pressão e temperatura constantes, pH neutro e sem diferença de voltagem através da membrana. Nessas condições, é possível assumir que o receptor se mantém em uma conformação estável bem definida X , na qual há s sítios de interação disponíveis para os ligantes.

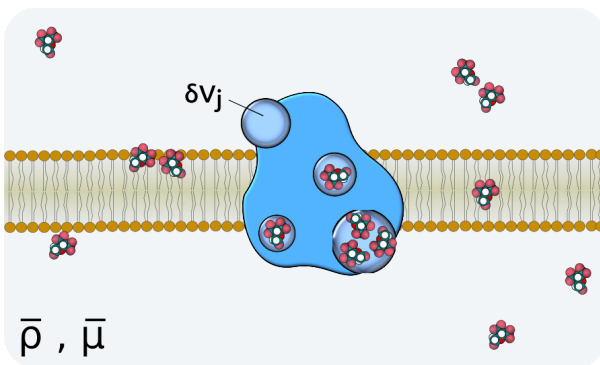


Figura 2. **Ilustração do sistema considerado.** O receptor R transmembrânico (azul) com s sítios (esferas) com volume definido (δV_j). Ligantes em rosa, verde e branco se distribuem homoganeamente entre solvente e membrana, definindo densidade $\bar{\rho}$ e excesso de potencial químico $\bar{\mu}$ constantes.

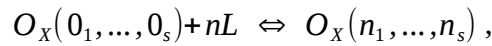
Nessa etapa do desenvolvimento da teoria, assume-se que o ligante está uniformemente particionado entre o solvente e a membrana, e pode acessar os sítios de ligação da proteína de ambos meios. Na prática, solvente e membrana são tratados como um volume homogêneo (doravante referido como banho), ocupado pelos N ligantes, definindo uma densidade constante $\bar{\rho}$ e excesso de potencial químico $\bar{\mu}$. (Figura 2)

Cada sítio de ligação $j=1, \dots, s$ possui um volume discreto δV_j que pode ser ocupado por

$0 \leq n_j \leq n_j^{max}$. Assim, há um número máximo de estados ligados O_X , e um não ligado, acessíveis ao receptor, dado por $max(O_X) = \prod_{j=1}^s (n_j^{max} + 1)$. Cada estado específico, contendo n_j moléculas ligadas ao sítio j correspondente, é denotado por $O_X(n_1, \dots, n_s)$. O total de ligantes associados à proteína nesse estado corresponde a $n = (n_1 + n_2 + \dots + n_s)$.

I.4.2. Constante de Ligação $K_X(n_1, \dots, n_s)$

Compreender a ligação concomitante de múltiplos ligantes (genericamente denominados L) em s sítios requer determinar a constante de ligação generalizada $K_X(n_1, \dots, n_s)$ para o processo:



onde $O_X(0_1, \dots, 0_s)$ representa o estado onde o receptor está vazio (estado não ligado) e todos os ligantes se encontram no banho, e $O_X(n_1, \dots, n_s)$ um estado específico com n_j moléculas em cada sítio j . Por construção, este é um sistema diluído e, como consequência, a constante de ligação pode ser escrita como uma relação entre as densidades de probabilidades de cada um dos constituintes do sistema naquele estado, segundo:

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^{(n_1 + \dots + n_s)}} \times \frac{\rho_X(n_1, \dots, n_s)}{\rho_X(0_1, \dots, 0_s)}, \quad (1)$$

tal que $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ e $\rho_X(0_1, \dots, 0_s)$ são respectivamente a probabilidade de encontrar o receptor nos estados $O_X(n_1, \dots, n_s)$ e $O_X(0_1, \dots, 0_s)$. Ainda, $\bar{\rho}^{(n_1 + \dots + n_s)} = \bar{\rho}^n$ é a densidade de probabilidade de n ligantes se encontrarem no banho.

O número de ligantes associados a cada sítio j do receptor é uma função dependente da configuração do sistema, denotado por $n_j'(\mathbf{r}^M)$. Por simplicidade, essa quantidade pode ser escrita em função dos centros geométricos \mathbf{R}_i de cada um dos N ligantes do sistema como $\mathbf{R}_i(\mathbf{r}^M)$ (cf. equação 10). Dito isso, $n_j'(\mathbf{r}^M)$ é:

$$n_j'(\mathbf{r}^M) \equiv \int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \left[\sum_{i=1}^N \delta[\mathbf{R}_i(\mathbf{r}^M) - \mathbf{R}] \right] \quad (2)$$

Uma vez definido $n_j'(\mathbf{r}^M)$, a densidade de probabilidades $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ pode ser formalmente escrita segundo:

$$\rho_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}} \int d\mathbf{r}^M \delta[n_1(\mathbf{r}^M) - n_1] \dots \delta[n_s(\mathbf{r}^M) - n_s] e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)} \quad (3)$$

Onde $\beta = (k_b T)^{-1}$, e k_b e T são a constante de Boltzmann e a temperatura, respectivamente. Além disso, na equação acima a função delta discreta, definida como

$$\delta[n_j(\mathbf{r}^M) - n_j] = \begin{cases} 1, & \text{se } n_j'(\mathbf{r}^M) = n_j \\ 0, & \text{se } n_j'(\mathbf{r}^M) \neq n_j \end{cases}, \quad (4)$$

mapeia o número de ligantes no sítio j associado a uma configuração específica \mathbf{r}^M e garante a integração unicamente das configurações acessíveis ao estado $O_X(n_1, \dots, n_s)$.

Entretanto, a integral na equação (3) percorre todos os graus de liberdade acessíveis ao sistema. Mesmo com grandes avanços metodológicos e aumento da capacidade de supercomputadores, o cômputo direto de $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ via simulações computacionais atomísticas é inviável e atualmente restrito a sistemas reduzidos ou casos específicos que fazem uso de máquinas especialmente desenhadas para esse fim. (Shaw et al., 2008)

Uma alternativa computacionalmente mais acessível é viabilizada pela condição estrita imposta pela função delta na equação (4). A simplificação consiste em reescrever as densidades de probabilidade restringindo a integral da equação (3) aos volumes discretos dos sítios e do volume do banho:

$$\rho_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!} \frac{1}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}} \int_{\delta V_1} d\mathbf{r}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{r}^{n_s} \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)} \quad (5)$$

O termo $\frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!}$ pretende levar em consideração as múltiplas formas de n ligantes idênticos se associarem ao receptor a fim de gerar o mesmo estado $O_X(n_1, \dots, n_s)$. Igualmente, para o estado vazio $O_X(0_1, \dots, 0_s)$:

$$\rho_X(0_1, \dots, 0_s) = \frac{1}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}} \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)} \quad (6)$$

Inserindo equações (5) e (6) na definição da constante de ligação (1), obtém-se:

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\mathbf{r}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{r}^{n_s} \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}}{\int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}} \quad (7)$$

A equação simplificada (7) para $K_X(n_1, \dots, n_s)$ pode ser calculada no contexto de simulações de dinâmica molecular e métodos perturbativos de cálculo de energia livre, como Free Energy Perturbation (FEP, cf. II.3.3.1), considerando o potencial de força média $W_X(\mathbf{R}^n)$ associado ao centro geométrico da configuração $\mathbf{R}^n \equiv \{\mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_n\}$ dos n ligantes, conforme mostrado nas equações (8) e (9) e (10).

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_X(\mathbf{R}^n)}}{\int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{R}^N e^{-\beta W_X(\mathbf{R}^n)}}, \quad (8)$$

onde a exponencial do trabalho reversível $W_X(\mathbf{R}^n)$ é

$$e^{-\beta W_X(\mathbf{R}^n)} = \frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*] \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X^0(\mathbf{r}^M)}}. \quad (9)$$

Aqui, $e^{-\beta W_X(\mathbf{R}^n)}$ é definido em relação a um sistema de referência $U_X^0(\mathbf{r}^M)$, no qual todas as interações dos n ligantes com o meio estão desligadas. Com isso, $W_X(\mathbf{R}^n)$ é análogo à variação de energia livre relativa à transferência dos ligantes da fase gasosa para seus respectivos sítios de ligação. Como as partículas não interagem com o ambiente na condição imposta por $U_X^0(\mathbf{r}^M)$, $\{\mathbf{R}_1^*, \dots, \mathbf{R}_n^*\}$ é estabelecido como um conjunto de posições *arbitrárias* de referência para os ligantes. Ainda, os centros geométricos são explicitamente calculados a partir das coordenadas cartesianas dos $N_i^{\text{átomos}}$ átomos do ligante i :

$$\mathbf{R}_i(\mathbf{r}_i) \equiv \frac{1}{N_i^{\text{átomos}}} \sum_{(x,y,z) \in \mathbf{r}_i} (x, y, z) \quad (10)$$

Para as moléculas de ligante que se encontram no banho, a transição gás \rightarrow banho pode ser interpretada como uma aumento do número de ligantes presentes em solução. A variação de energia livre em função da variação do número de moléculas de uma única espécie química, enquanto demais variáveis são mantidas constantes, representa uma quantidade conhecida, denominada potencial químico. Nota-se portanto que o potencial de força média $W_X(\mathbf{R}_i)$ de cada ligante

individual i está relacionado ao potencial químico $\bar{\mu}$ do ligante em qualquer posição \mathbf{R}_i do banho, segundo:

$$e^{-\beta W_x(\mathbf{R}_i)} = e^{-\beta \bar{\mu}} \quad (11)$$

O conceito apresentado na equação (11) implica que a integral no volume do banho na equação (8) pode ser substituída conforme abaixo:

$$\begin{aligned} \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{R}^n e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} &= \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{R}_1 \dots d\mathbf{R}_n e^{-\beta [W(\mathbf{R}_1) + \dots + W(\mathbf{R}_s)]} \\ &= V_{\text{banho}}^n e^{-\beta n \bar{\mu}} \end{aligned} \quad (12)$$

Em condições diluídas, como é assumido para este sistema, os ligantes do banho estão fracamente acoplados e a aproximação $W_x(\mathbf{R}^n) \approx W_x(\mathbf{R}_1) + \dots + W_x(\mathbf{R}_s)$ é possível. Na prática, $\bar{\mu}$ é calculado via FEP (cf. tópico II.3.3.1), desacoplando reversivelmente o ligante do solvente.

Diferentemente, a resolução da integral em sítios de ligação proteicos geralmente requer a aplicação de um potencial externo que restringe o volume efetivo amostrado pelo ligante, a fim de garantir uma melhor convergência da amostragem. Esse viés é particularmente importante nas fases finais do desacoplamento do ligante de forma a mantê-lo em um estado bem definido e impedir que este saia do sítio de ligação. (Pohorille et al., 2010) É portanto estabelecido um potencial harmônico aplicado apenas ao ligante i no sítio j durante o cálculo de FEP:

$$u^*(\mathbf{R}_i) = \frac{1}{2} k_j [\mathbf{R}_i - \mathbf{R}_i^*]^2 \quad (13)$$

onde k_j é a constante de força e \mathbf{R}_i^* uma coordenada de referência, definida como a posição de equilíbrio do ligante no sítio. Naturalmente, torna-se necessário desenvolver uma estratégia para garantir a convergência do cálculo de energia livre, sem no entanto enviesar o resultado pelo potencial harmônico aplicado. Com esse intuito, é proposto calcular $e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)}$ (não enviesado) em função do quantidade medida na presença do potencial harmônico (enviesado) fazendo a seguinte operação:

$$\begin{aligned}
& \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} = \\
& = \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*] \int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x^0(\mathbf{r}^M)}} \right. \\
& \quad \times \left. \frac{\int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_x^0(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}}{\int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_x^0(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \right] \quad (14)
\end{aligned}$$

Reorganizando e separando os termos da exponencial do numerador da fração à direita, obtém-se:

$$\begin{aligned}
& \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} = \\
& = \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x(\mathbf{r}^M)}}{\int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_x^0(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \right. \\
& \quad \times \left. \frac{\int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x^0(\mathbf{r}^M)} e^{-\beta \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*] \int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x^0(\mathbf{r}^M)}} \right]
\end{aligned}$$

que pode ser simplificado em:

$$\begin{aligned}
& \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} = \\
& = \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x(\mathbf{r}^M)}}{\int_{V_{banho}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_x^0(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \right. \\
& \quad \times \left. \frac{\int d\mathbf{r}_1 e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_1)} \dots \int d\mathbf{r}_n e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_n)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*]} \right] \quad (15)
\end{aligned}$$

Aplicando a transformação do sistema de coordenadas em (\mathbf{r}^n) para $(\mathbf{R}^n, \mathbf{\Omega}^n, \mathbf{I}^n)$, onde os centros

de massa são denotados por \mathbf{R}^n , orientações Ω^n e graus de liberdade internos I^n dos n ligantes, leva à equação (16), (Roux et al., 1996). É importante observar que, neste caso, o jacobiano da transformação não depende dos \mathbf{R}^n graus de liberdade e portanto permite que Ω^n e I^n sejam cancelados.

$$\int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} = \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \times \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_x(\mathbf{r}^M)}}{\int_{V_{\text{banho}}} d\mathbf{r}^n \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_x^0(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \right] \quad (16)$$

O produtório corresponde assim ao volume efetivo amostrado pelo ligante i , centrado na sua posição de equilíbrio \mathbf{R}_i^* no sítio, e $\mathcal{W}_X^*(n)$ ao potencial de força média, ambos calculados na presença do potencial harmônico:

$$\int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W_x(\mathbf{R}^n)} = \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta \mathcal{W}_X^*(n)} \quad (17)$$

Finalmente, substituindo as expressões (12) e (17) na equação (8), a constante de equilíbrio de ligação é escrita como mostrado na equação (18) abaixo. Considera-se ainda que, no limite

termodinâmico onde $N \gg n$, $\frac{N!}{(N-n)!} \approx N^n$.

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{N^n}{n_1! \dots n_s!} \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \frac{e^{-\beta \mathcal{W}_X^*(n)}}{V_{\text{banho}}^n e^{-\beta n \bar{u}}} \quad (18)$$

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1! \dots n_s!} \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[\mathcal{W}_X^*(n) - n \bar{u}]}$$

I.4.3. Densidade de probabilidade dos estados ligados

O formalismo apresentado permite que a probabilidade de um estado qualquer $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ (Equação 19), seja obtida pela combinação de simulações de dinâmica molecular e cálculos de energia livre ao tempo que supera as barreiras de amostragem e custo computacional impostas pelas equações (3) e (5).

$$\rho_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{\bar{\rho}^{(n_1 + \dots + n_s)} K_X(n_1, \dots, n_s)}{\sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1 + \dots + n'_s)} K_X(n'_1, \dots, n'_s)} \quad (19)$$

A condição de normalização da equação acima, (n'_1, \dots, n'_s) abrange desde o estado de ocupância zero $O_X(0_1, \dots, 0_s)$ até ocupância máxima acessível àquela conformação, $O_X(n_1^{max}, \dots, n_s^{max})$. O conhecimento de $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ permite o cálculo do valor esperado ou média termodinâmica de uma propriedade qualquer do sistema, mapeada ao estado $O_X(n'_1, \dots, n'_s)$. Nesse caso, a média de uma propriedade $A(n_1, \dots, n_s)$ passa a ser determinada por:

$$\langle A \rangle = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} A_{(n'_1, \dots, n'_s)} \rho(n'_1, \dots, n'_s) \quad (20)$$

Por exemplo, o número médio de ligantes, no equilíbrio, pode ser calculado como:

$$\langle n \rangle = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} n_{(n'_1, \dots, n'_s)} \rho(n'_1, \dots, n'_s) \quad (21)$$

É importante apontar ainda que a equação 19 para probabilidade dos estados depende da concentração do ligante no banho, tornando-a uma importante equação para o estudo de efeitos de concentração na interação ligante-receptor (cf. II.5.1.4).

I.4.4. Marginalização das probabilidades

Conhecer as densidades de probabilidade dos estados marginalizadas em termos da probabilidade de n_j moléculas estarem ligadas ao sítio j , $\rho_X(n_j)$, auxilia na compreensão do amplo espaço de dados gerado por $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$, bem como no exame da importância relativa de cada sítio. Com esse intuito, define-se $\rho_X(n_j)$ como:

$$\rho_X(n_j) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \delta_{n'_j, n_j} \rho(n'_1, \dots, n'_s) \quad (22)$$

Seguindo o mesmo raciocínio, é possível ainda integrar as densidades de probabilidade a fim de obter a probabilidade de n ligantes estarem associados ao canal, independentemente do sítio em que se encontrem:

$$\rho_X(n) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \delta_{n', n} \rho(n'_1, \dots, n'_s) \quad (23)$$

Em ambos casos, o somatório percorre todas as as configurações acessíveis O_X , e há incremento da probabilidade exclusivamente quando a condição imposta pela função delta de Kronecker ($\delta_{n', n}$) é satisfeita, definindo assim os macroestados $O_X(n_j)$ e $O_X(n)$.

I.4.5. Densidade de probabilidade posição-dependente

A probabilidade do estado $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ pode ser mapeada na densidade de probabilidade espacial $\rho_X(\mathbf{R})$ de um ligante qualquer i estar na coordenada \mathbf{R} , independente da posição dos demais $N-1$ ligantes. Assim, $\rho_X(\mathbf{R})$ é dada por:

$$\rho(\mathbf{R}) = \frac{N}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)}} \int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}] \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^M)} \quad (24)$$

onde $\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1)$ é a posição instantânea do centro geométrico do ligante $i=1$ e N no numerador reflete as configurações indistinguíveis, dado ligantes idênticos.

Em consequência da consideração inicial de que o banho é homogêneo com densidade constante, i.e. posição-independente, a probabilidade $\rho_X(\mathbf{R})$ pode ser simplificada, tal que:

$$\rho_X(\mathbf{R}) = \begin{cases} \rho_X^j(\mathbf{R}), & \forall \mathbf{R} \in \delta V_j \\ \bar{\rho}, & \forall \mathbf{R} \in \text{banho} \end{cases} \quad (25)$$

para cada sítio $j=1, \dots, s$ presente na conformação X da proteína. Assim, a determinação de $\rho_X(\mathbf{R})$ se reduz à determinação da densidade no sítio, $\rho_X^j(\mathbf{R})$:

$$\rho_X^j(\mathbf{R}) = \sum_{n_j=0}^{n_j^{\max}} \rho_X(n_j) \times \rho_X(\mathbf{R}|n_j) \quad (26)$$

onde, $\rho_X(\mathbf{R}|n_j)$ é a densidade local no sítio j na situação em que n_j moléculas estão ligadas, satisfazendo a condição $\int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \rho_X(\mathbf{R}|n_j) = n_j$. E $\rho_X(n_j)$ é a probabilidade de o sítio estar ocupado por exatamente n_j ligantes (cf. equação 22).

Dessa forma, a equação (26) estabelece uma relação formal entre as densidades de probabilidade estado e posição dependentes do sistema, uma vez que $\rho_X(n_j)$ está fundamentalmente relacionada às constantes de equilíbrio $K_X(n_1, \dots, n_s)$ que satisfazem a condição $\rho_X(n_j)$.

As densidades calculadas a partir da equação (26) também podem ser marginalizadas para obter uma projeção espacial ao longo da direção transmembrânica z , $\rho_X(z)$.

$$\rho_X(z) = \bar{\rho} \times A(z) + \sum_{j=1}^s \rho_X^j(z) \quad (27)$$

Tal que $A(z) = \Delta x \Delta y$ corresponde à área total da região do banho para uma posição específica do eixo z .

I.4.6. Variação de energia livre padrão

A variação de energia livre padrão ΔG° associada à formação do estado $O(n_1, \dots, n_s)$ (equação 28) pode ser compreendida como a energia de ligação de n moléculas ao receptor, a partir de um estado de referência na concentração padrão $C^\circ = 1 M = \frac{1}{1660 \text{ \AA}^3}$. Define-se assim ΔG° em função da constante de ligação $K(n_1, \dots, n_s)$ como mostrado a seguir:

$$\Delta G^\circ(n_1, \dots, n_s) = -\beta^{-1} \ln [K(n_1, \dots, n_s) \times (C^\circ)^n] \quad (28)$$

Substituindo a equação (18) pra $K(n_1, \dots, n_s)$, temos uma expressão para a variação de energia livre padrão:

$$\Delta G^\circ(n_1, \dots, n_s) = [\mathcal{W}^*(n) - n\bar{\mu}] - \beta^{-1} \ln \left[\prod_{i=1}^n C^\circ \times \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] - \beta^{-1} \ln \left[\frac{1}{n_1! \dots n_s!} \right] \quad (29)$$

que pode ser separada em três componentes.

i) $[\mathcal{W}^*(n) - n\bar{\mu}]$: potencial de força média associado à transferência dos ligantes da fase gasosa para os sítios de ligação (sob a influência de restrições de posição via potenciais harmônicos) menos o excesso de potencial químico – resultando no PMF da transferência banho \rightarrow sítio;

ii) $-\beta^{-1} \ln \left[\prod_{i=1}^n C^\circ \times \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right]$: a variação de energia quando os ligantes na fase gasosa, antes restritos, podem ocupar o volume $(C^\circ)^n$;

iii) $-\beta^{-1} \ln \left[\frac{1}{n_1! \dots n_s!} \right]$ a contribuição das possíveis maneiras que os N ligantes idênticos podem se combinar para formar o estado $O(n_1, \dots, n_s)$.

Sob a premissa de que os múltiplos sítios de ligação analisados são independentes, é possível ainda simplificar o potencial de força média associado ao estado $O(n_1, \dots, n_s)$ com n moléculas ligadas, $\mathcal{W}^*(n)$, de acordo com a aproximação:

$$\mathcal{W}^*(n) = \mathcal{W}^*(n_1, \dots, n_s) \approx \mathcal{W}^*(n_1) + \dots + \mathcal{W}^*(n_s) \quad (30)$$

A aproximação da equação 30 garante que a constante de ligação para o estado $O(n_1, \dots, n_s)$ possa ser calculada como o produto de constantes de ligação independentes, conforme equação (31).

$$K(n_1, \dots, n_s) = K(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times K(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) \quad (31)$$

Onde cada equação

$$\begin{aligned}
K(n_1, 0_2, \dots, 0_s) &= \frac{1}{n_1!} \left[\prod_{i=1}^{n_1} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[\mathcal{W}^*(n_1) - n_1 \bar{\mu}]} \\
&\quad (\dots) \\
K(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) &= \frac{1}{n_s!} \left[\prod_{i=1}^{n_s} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[\mathcal{W}^*(n_s) - n_s \bar{\mu}]}
\end{aligned} \tag{32}$$

representa a constante de ligação de n_j moléculas em cada um dos j sítios do receptor. Para cada constante de ligação na eq. (32), há exclusivamente n_j ligantes no sítio j , enquanto demais sítios mantêm-se vazios. Em termos práticos, a formulação das equações (29) e (31) é essencial, pois permite que essas quantidades sejam obtidas a partir de uma série de cálculos independentes das energias livres de ligação a cada sítio (cf. tópico II.5.1.2).

I.4.7. Constante de Equilíbrio dependente de Voltagem K(V)

A fim de investigar a dependência conformacional na interação de ligantes alostéricos a receptores proteicos, é preciso considerar a equação (19) no contexto do equilíbrio conformacional da proteína. Este capítulo trata do desenvolvimento teórico necessário à investigação de proteínas que mudam de conformação em função de diferenças de voltagem. Particularmente, este é aplicado a canais iônicos dependentes de voltagem (CIDV), objeto de estudo da parte II da tese. Assim, foi considerado aqui o equilíbrio entre duas conformações, $X \equiv \{F, A\}$, fechado e aberto, de um CIDV submetidos a diferenças de potencial transmembrânico TM (Figura 3).

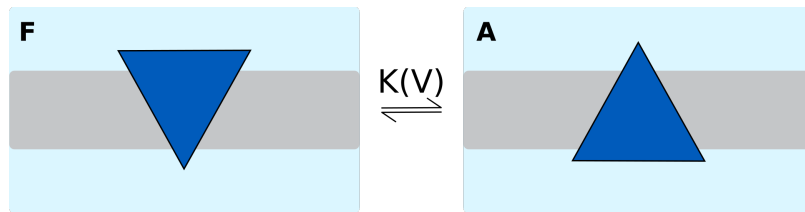


Figura 3. **Equilíbrio conformacional dependente de voltagem.** Ilustração de uma proteína que muda da conformação fechada (F) para a aberta (A) em função da voltagem transmembrânica, de acordo com a constante de equilíbrio $K(V)$.

Seja portanto um sistema semelhante ao apresentado anteriormente (cf. I.4.1. Considerações Iniciais e Pressupostos). Agora, no entanto, o receptor é um canal iônico dependente de voltagem, com imposição de voltagem V , induzida pela assimetria de eletrólitos entre as duas faces da membrana. Seja \mathbf{r}^P os graus de liberdade associados à proteína, e \mathbf{r}^{M-P} os demais graus de liberdade do sistema. A energia potencial total do sistema é dada por:

$$U_X(\mathbf{r}^M) = U_X(\mathbf{r}^P) + U_X(\mathbf{r}^{M-P}) + U_X(\mathbf{r}^P, \mathbf{r}^{M-P}) \tag{33}$$

onde $U_X(\mathbf{r}^P)$, $U_X(\mathbf{r}^{M-P})$ e $U_X(\mathbf{r}^P, \mathbf{r}^{M-P})$ são respectivamente a energia interna da proteína, do ambiente e a energia de interação de ambos. A energia livre associada à proteína $E_X(V)$ na conformação $X \equiv X(\mathbf{r}^P)$, em uma configuração fixa \mathbf{r}^P , representa a energia potencial microscópica do receptor proteico e seu acoplamento com o ambiente. Como o receptor está restrito a uma conformação específica, podemos estabelecer:

$$e^{-\beta E_X(V)} = \frac{1}{\int d\mathbf{r}^{M-P} e^{-\beta U_X(\mathbf{r}^{M-P})}} \int d\mathbf{r}^{M-P} e^{-\beta [U_X(\mathbf{r}^P) + U_X(\mathbf{r}^{M-P}) + U_X(\mathbf{r}^P, \mathbf{r}^{M-P})]} \quad (34)$$

A energia livre da proteína $E_X(V)$ em uma conformação específica, submetida a um potencial de membrana V é composta por dois termos: um termo químico, independente de voltagem, e um relacionado ao excesso de energia livre dado o potencial eletrostático TM (equação 35).

$$E_X(V) = E_X(V=0) + Q_X V \quad (35)$$

Aqui $E_X(V=0)$ é a energia química e Q_X é a carga efetiva da proteína, que pode ser entendida como a quantidade de *gating charges* (cf. II.1.3.1) associada à conformação X . Nesse contexto, a menos de uma constante arbitrária, a energia livre da proteína

$$e^{-\beta E_X(V)} \propto \int d\mathbf{r}^P \delta[X'(\mathbf{r}^P) - X] e^{-\beta [U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V]} \quad (36)$$

pode ser escrita em termos de uma energia potencial efetiva, $U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V$, quando esta é submetida a um potencial V e apresenta carga Q .

As equações (34) e (36) permitem escrever a probabilidade da conformação X a partir da função de partição de todas as conformações acessíveis à proteína:

$$\rho_X(V) = \frac{e^{-\beta E_X(V)}}{\int d\mathbf{r}^P e^{-\beta [U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V]} \quad (37)$$

Simplificando o sistema para um modelo de dois estados, como sugerido pelo conjunto de conformações $X \equiv \{F, A\}$, o equilíbrio entre conformações da proteína passa a ser ilustrado pela reação dependente de voltagem $F \xrightleftharpoons{\Delta V} A$ e a densidade de probabilidades do estado A é reduzida a:

$$\rho_A(V) = \frac{e^{-\beta E_A(V)}}{e^{-\beta E_F(V)} + e^{-\beta E_A(V)}} \quad (38)$$

Tal que $e^{-\beta E_X(V)}$ é definido pela equação (34).

Ao estabelecer o excesso de energia livre da proteína em decorrência da aplicação de voltagem (equação 39),

$$e^{-\beta \Delta E_x(V)} = \frac{1}{\int d\mathbf{r}^P e^{-\beta U(\mathbf{r}^P)}} \int d\mathbf{r}^P \delta[X'(\mathbf{r}^P) - X] e^{-\beta[U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V]}, \quad (39)$$

podemos reescrever a densidade de probabilidades do estado A em termos das energias químicas conformaçoão-dependentes, $E_F(V=0)$ e $E_A(V=0)$, e de seus respectivos excessos de energia livre $\Delta E_F(V)$ e $\Delta E_A(V)$:

$$\rho_A(V) = \frac{e^{-\beta[E_A(V=0) + \Delta E_A(V)]}}{e^{-\beta[E_F(V=0) + \Delta E_F(V)]} + e^{-\beta[E_A(V=0) + \Delta E_A(V)]}} \quad (40)$$

Aqui, os termos independentes de voltagem correspondem à energia potencial microscópica do receptor proteico, bem como suas energia de solvatação polar e apolar no ambiente. Em contrapartida, as contribuições voltagem-dependentes são proporcionais à voltagem e à carga líquida efetiva da proteína em cada estado conformacional.

Conhecidas algumas características de canais iônicos dependentes de voltagem, é desejável obter uma simplificação da equação (40). Para tanto, define-se a razão entre as probabilidades dos estados conformacionais F e A :

$$\frac{\rho_A(V)}{\rho_F(V)} = e^{-\beta[E_A(V=0) - E_F(V=0)]} \cdot e^{-\beta V[Q_F - Q_A]} \quad (41)$$

onde $Q_F - Q_A = \Delta Q$ é a diferença de *gating charges* que resulta da mudança de conformaçoão da proteína. Considere agora uma voltagem específica, na qual metade dos canais estão na conformaçoão F e metade estão na A . Essa diferença de potencial, característica da proteína, é denominada $V_{1/2}$. Segue que:

$$\frac{\rho_A(V_{1/2})}{\rho_F(V_{1/2})} = 1 \quad (42)$$

Resolvendo a equação 41 na condição em que $V = V_{1/2}$:

$$\Delta E(V=0) = E_F(V=0) - E_A(V=0) = -V_{1/2} \Delta Q \quad (43)$$

Assim, a constante de equilíbrio *independente* de voltagem é escrita na forma:

$$K(V=0) = e^{-\beta \Delta E(V=0)} = e^{\beta V_{1/2} \Delta Q} \quad (44)$$

Dado que

$$\begin{aligned} \Delta E_A(V) - \Delta E_F(V) &= V \langle Q_A \rangle - V \langle Q_F \rangle \\ &= V \Delta Q \end{aligned} \quad (45)$$

Substituindo as igualdades encontradas nas equações 43 e 45 na definição da probabilidade da conformaçoão aberta, A , dada pela equação 40, $\rho_A(V)$ é simplificada a:

$$\rho_A(V) = \frac{1}{1 + e^{+\beta \Delta Q [V_{1/2} - V]}} \quad (46)$$

que é a equação de Boltzmann de dois estados, comumente utilizada na descrição de curvas de condutância por voltagem de CIDVs. Segue portanto que a constante de equilíbrio entre as conformações, em função da voltagem, é dada por:

$$K(V) = \frac{\rho_A(V)}{\rho_F(V)} = e^{-\beta \Delta Q [V_{1/2} - V]} \quad (47)$$

I.4.8. Impacto Funcional: Efeito do Ligante em $K(V)$

Para avaliar o impacto da modulação alostérica no equilíbrio entre conformações A e F , descrito em I.4.7., propõe-se agora combinar as equações (19) e (46), que determinam respectivamente a probabilidade de um estado ligado dada uma conformação X do receptor, $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$, e probabilidade da conformação aberta de um canal iônico dependente de voltagem, $\rho_A(V)$. (Figura 4)

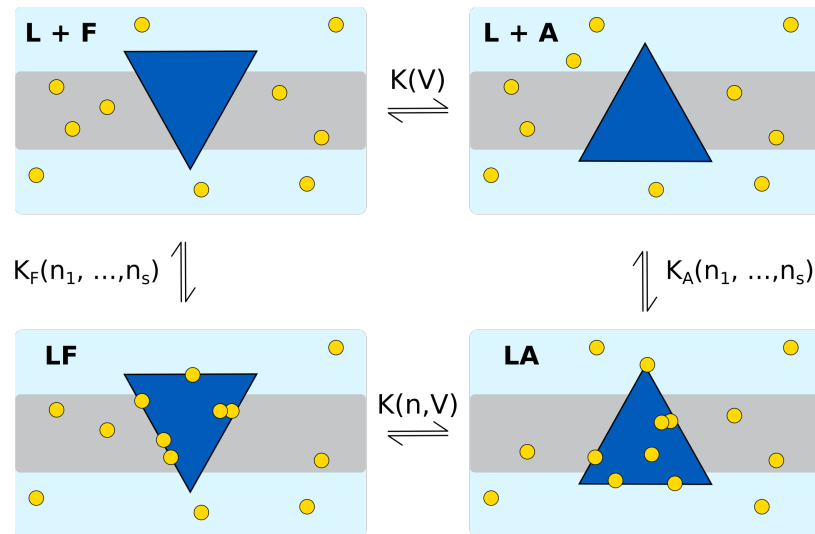


Figura 4. Desafio da modulação alostérica. A modulação pode ocorrer pela interação de ligantes em múltiplos sítios, com múltiplas ocupâncias, além de dependência conformacional. $L + F$: ligante (amarelo) e proteína (azul) na conformação fechada F , dissociados. LF : Ligante em sítios acessíveis à conformação F da proteína. Idem para conformação aberta A . Aqui, n ligantes interagem com afinidade diferencial com as conformações F e A para modular o equilíbrio $K(n, V)$.

Uma análise de ciclo termodinâmico considerando todos os estados conformacionais da proteína ligados e não ligados à molécula moduladora é empregada. Nessa situação, a densidade de probabilidades das conformações acessíveis à proteína passam a ser escritas como:

$$\rho_F(V) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \rho_F(n'_1, \dots, n'_s, V) \quad (48)$$

e

$$\rho_A(V) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \rho_A(n'_1, \dots, n'_s, V) \quad (49)$$

Relembrando a definição de $K_X(n_1, \dots, n_s)$ mostrada na equação 1, é possível reescrever as densidades de probabilidade em função do estado de referência desocupado, $\rho_F(0_1, \dots, 0_s, V)$, segundo:

$$\rho_F(n_1, \dots, n_s, V) = K_F(n_1, \dots, n_s, V) \cdot \bar{\rho}^n \cdot \rho_F(0_1, \dots, 0_s, V) \quad (50)$$

Dessa forma, a probabilidade da conformação **A** passa a ser:

$$\begin{aligned} \rho_A(V) &= \frac{\rho_A(V)}{\rho_F(V) + \rho_A(V)} \\ &= \frac{K(V) Z_A(n_1, \dots, n_s)}{Z_F(n_1, \dots, n_s) + K(V) Z_A(n_1, \dots, n_s)} \end{aligned} \quad (51)$$

Onde as funções de partição são definidas considerando o conjunto completo de possíveis estados ligados em cada conformação **F** e **A** do receptor, de acordo com:

$$\begin{aligned} Z_F(n_1, \dots, n_s) &= \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1 + \dots + n'_s)} K_F(n'_1, \dots, n'_s) \\ Z_A(n_1, \dots, n_s) &= \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1 + \dots + n'_s)} K_A(n'_1, \dots, n'_s) \end{aligned} \quad (52)$$

A probabilidade da conformação **A**, a uma dada concentração do ligante, é então escrita como uma equação de Boltzmann de dois estados repesada pela razão entre as funções de partição $Z_F(n_1, \dots, n_s)$ e $Z_A(n_1, \dots, n_s)$ das duas conformações:

$$\rho_A(V) = \frac{1}{1 + \frac{Z_F(n_1, \dots, n_s)}{Z_A(n_1, \dots, n_s)} e^{+\beta \Delta Q[V_{1/2} - V]}} \quad (53)$$

Consequentemente, a exponencial da variação de energia livre associada à mudança conformacional e à ligação de moléculas moduladoras é:

$$e^{+\beta \Delta \Delta G_{\text{ligação}}} = \frac{Z_F(n_1, \dots, n_s)}{Z_A(n_1, \dots, n_s)} \quad (54)$$

I.4.9. Considerações gerais e discussão

O arcabouço teórico aqui apresentado visa contribuir uma descrição atomística estrutural da ligação de pequenas moléculas a proteínas de membrana e foi recentemente comunicado nas referências (Stock et al., 2017, 2018) – também disponíveis nos Anexos I e II. Diferentemente de reações do tipo enzima-substrato, em que geralmente ligantes interage com um sítio ativo, a modulação de proteínas de membrana pode apresentar múltiplos sítios de ligação, e cada um desses pode ser ocupado por um ou mais ligantes. Outro aspecto pouco considerado em estudos computacionais, mas contemplado nas equações apresentadas, se refere aos efeitos da concentração do ligante no solvente.

Diante disso, as perspectivas da aplicação desse estudo são amplas. As equações desenhadas até o tópico I.4.6. são gerais e podem ser aplicadas a diferentes sistemas proteína-ligante. As distribuições locais dos ligantes podem ser obtidas no contexto de metodologias atualmente acessíveis como *docking* molecular e simulações de *flooding*. Ademais, espera-se futuramente expandir e generalizar as equações dependentes de voltagem para outros conjugados termodinâmicos (e.g.: área superficial e pressão).

Como exemplo, e com vistas à generalidade da teoria, é interessante expandir o arcabouço proposto para mais estados conformacionais. Particularmente no caso de canais iônicos, a inclusão de um estado inativado pode ajudar a compreender a complexa modulação dessas proteínas por anestésicos gerais (cf. II.1.4 e IV.3). Assim, expandimos o formalismo a fim de considerar três estados conformacionais, X , Y e I , ou fechado, aberto e inativo (aberto-não condutor), respectivamente. A figura 5 ilustra o novo ciclo termodinâmico tratado. Define-se agora $K_1(V)$ como a constante de equilíbrio dependente de voltagem entre os estados fechado e aberto, e K_2 a constante de equilíbrio que rege a entrada do canal no estado inativado. Apesar da representação simplificada da figura, as equações são gerais e capazes de considerar múltiplos sítios e múltiplas ocupâncias para os três estados (vide abaixo).

O sistema de referência, no qual não há ligantes interagindo com a proteína e todos os ligantes se encontram no banho, apresenta a seguinte densidade de probabilidades:

$$\begin{aligned} \rho_A(V) &= \frac{\rho_A(0)}{\rho_F(0) + \rho_A(0) + \rho_I(0)} \\ &= \frac{K_1(V)\rho_F(0)}{\rho_F(0) + K_1(V)\rho_F(0) + K_1(V)K_2\rho_F(0)} \end{aligned} \tag{55}$$

que simplifica em:

$$\rho_A(V) = \frac{K_1(V)}{1 + K_1(V) + K_1(V)K_2} \quad (56)$$

A densidade de probabilidades de determinada conformação, considerando-se inicialmente ocupância simples dos sítios é então dada por:

$$\rho_A(V) = \frac{\rho_A(0) + \rho_A(1)}{\rho_F(0) + \rho_F(1) + \rho_A(0) + \rho_A(1) + \rho_I(0) + \rho_I(1)} \quad (57)$$

$$= \frac{K_1(V)\rho_F(0) + \bar{\rho}K_1(V)K_A(1)\rho_F(0)}{\rho_F(0) + \bar{\rho}K_F(1)\rho_F(0) + K_1(V) + \bar{\rho}K_1(V)K_A(1)\rho_F(0) + K_1(V)K_2\rho_F(0) + \bar{\rho}K_I(1)K_2K_1(V)\rho_F(0)}$$

O mesmo procedimento pode ser empregado para n ligantes em s sítios, e é generalizado segundo a equação abaixo:

$$\rho_A(V) = \frac{K_1(V)Z_A(n_1, \dots, n_s)}{Z_F(n_1, \dots, n_s) + K_1(V)Z_A(n_1, \dots, n_s) + K_1(V)K_2Z_I(n_1, \dots, n_s)} \quad (58)$$

$$= \frac{1}{1 + e^{+\beta\Delta Q(V_{1/2}-V)} \frac{Z_F(n_1, \dots, n_s)}{Z_A(n_1, \dots, n_s)} + K_2 \frac{Z_I(n_1, \dots, n_s)}{Z_A(n_1, \dots, n_s)}}$$

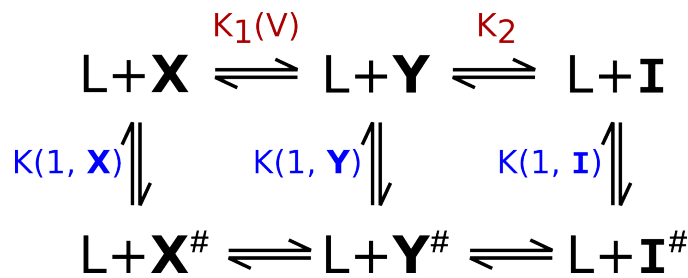


Figura 5. **Ciclo termodinâmico considerando três estados conformacionais.** O equilíbrio conformacional do canal iônico é ditado pelas constantes de equilíbrio $K_1(V)$ e K_2 . A ligação de sevoflurano em uma dada conformação, aqui indicada pelo símbolo #, é capaz de modular esse equilíbrio, favorecendo um ou outro estado do CI. Por simplicidade, a figura ilustra apenas as constantes de ligação referentes à ocupância simples de um sítio, para cada uma das conformações consideradas, i.e.: $K(1, X)$, $K(1, Y)$ e $K(1, I)$.

Deve ser notado no entanto que o estudo se utiliza da premissa de sítios de ligação independentes. Para muitos casos, incluindo o exemplo apresentado em seguida, a aproximação pode ser empregada, em vista da distância entre os sítios de ligação. Naturalmente porém, em situações sistema-específico (e.g. sítios muito próximos) essa pode ser uma aproximação severa e pouco representativa. Apesar disso, o arcabouço teórico pode ser interpretado ainda como uma primeira aproximação de constantes de ligação mais complexas.

Para além do avanço metodológico, o presente estudo aporta uma visão estrutural, posto que simplificada como discutido acima, para interpretação e desenho de experimentos, particularmente em investigações de dose-resposta. Tal contribuição se torna mais clara com a ilustração apresentada na parte II, a seguir, onde a teoria é aplicada ao estudo de canais iônicos e anestésicos gerais.

II PARTE 2: Modulação direta de canais iônicos neuronais por anestésicos gerais

II.1 INTRODUÇÃO

II.1.1 Potencial elétrico transmembrânico

Células são delimitadas por membranas lipídicas, que compõem uma barreira seletiva entre os compartimentos intra e extracelulares. Devido a sua natureza fundamentalmente apolar, partículas carregadas, como íons, são impedidas de atravessar livremente a membrana plasmática, mas sim têm seu transporte auxiliado por proteínas integrais de membrana (i.e. canais iônicos e proteínas transportadoras). (Cole, 1972) De fato, íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- estão distribuídos de forma assimétrica entre os volumes intra e extracelulares (conforme ilustrado na tabela 1), produzindo uma diferença de potencial eletroquímico através da membrana celular. Particularmente em células excitáveis, essa diferença de potencial é empregada na geração e propagação de informações eletroquímicas, na forma de inversões transientes da polaridade da membrana.

Tabela 1. Estimativa da concentração (em mM) de íons livres em células humanas musculares esqueléticas e neurônios. (Hille, 1992)

Íon	Célula Muscular		Neurônio	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
Na^+	145	12	145	5 - 15
K^+	4	155	5	140
Ca^{2+}	1,5	10^{-4}	1 - 2	10^{-4}
Cl^-	123	4,2	110	4 - 30

Em uma situação de equilíbrio, considerando apenas uma espécie iônica, define-se o potencial de Nernst, potencial de equilíbrio ou potencial reverso como o potencial elétrico transmembrânico no qual não há fluxo líquido de determinado íon entre compartimentos. Assim, a equação de Nernst relaciona a voltagem transmembrânica com a diferença de concentração de uma espécie iônica dentro e fora da célula conforme a equação 59:

$$V_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[ion]_{extra}}{[ion]_{intra}} \right) \quad (59)$$

Tal que R é a constante dos gases, T é a temperatura em Kelvin, z é a valência do íon, F a constante de Faraday, e $[ion]_{intra}$ e $[ion]_{extra}$ são as concentrações de um determinado íon dentro e fora da célula, respectivamente. Por exemplo, resolvendo a equação 59 para as concentrações

reportadas na tabela 1, o potencial de equilíbrio de K^+ , V_K , é da ordem de $-83mV$ em células neuronais, e $-91mV$ em células musculares esqueléticas.

Oportunamente, nota-se que o potencial de reverso de uma *célula*, ou potencial de repouso, (V_m) é determinado pela contribuição dos diversos íons presentes nos meios intra e extracelulares, em contraposição ao potencial reverso de um único íon. O potencial de repouso da célula depende ainda da permeabilidade da membrana a cada espécie iônica, P_{ion} . (Cole, 1972) A equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) é uma generalização da equação de Nernst (59), segundo a qual V_m é dado por:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_{Ci} [C_i]_{extra} + \sum_j^M P_{Ai} [A_i]_{intra}}{\sum_i^N P_{Ci} [C_i]_{intra} + \sum_j^M P_{Ai} [A_i]_{extra}} \right) \quad (60)$$

Onde P_{Ci} é a permeabilidade da membrana a cada uma das N espécies de cátions Ci no sistema e P_{Ai} , a permeabilidade aos ânions.

Para células neuronais, o potencial de repouso é de aproximadamente $-70mV$, valor próximo ao V_K nessas células. Diferentemente, o potencial reverso de V_{Na} é aproximadamente $+60mV$. Assim, quando a membrana se torna permeável a íons Na^+ (em função da abertura temporária de canais iônicos seletivos a sódio, cf. II.1.2), o potencial da célula tende ao valor de V_{Na} , se tornando mais positivo que o potencial de repouso – nessa situação, a membrana é dita despolarizada. De forma equivalente, quando íons K^+ podem transitar entre os compartimentos, o potencial da célula tende a valores mais negativos, e esta é denominada hiperpolarizada. Para além desses exemplos específicos, convencionou-se identificar membranas como hiper- ou despolarizadas quando seu potencial V satisfaz $V > V_m$, ou $V < V_m$, respectivamente.

II.1.2 Canais Iônicos

Canais iônicos (CIs) são proteínas transmembrânicas (TM) que delimitam poros hidratados, conectando meios intra e extracelulares. Esses poros estão amplamente distribuídos nas células e organismos e permitem a difusão de íons de um lado a outro da membrana celular, a favor de um gradiente eletroquímico. O transporte de íons através de compartimentos celulares é, por sua vez, fundamental a diversos processos biológicos como transdução de sinais, controle da pressão osmótica e contração muscular. Em células excitáveis, os CIs constituem a maquinaria molecular

responsável pela produção e propagação de impulsos nervosos, na forma de potenciais de ação. (Hille, 1992) Potenciais de ação são sinais elétricos capazes de transmitir informações, e são caracterizados pela despolarização passageira seguida pela repolarização da membrana celular. CIs são, em maioria, altamente seletivos a um íon específico. Essa característica é utilizada para classificá-los em canais de potássio, sódio, cálcio ou cloreto, de acordo com o íon selecionado. (Hodgkin and Huxley, 1952; Alberts et al., 2002)

O estudo de canais iônicos resultou em grandes avanços nas últimas décadas. Até os anos 1970, era desconhecida a existência de proteínas transmembrânicas que auxiliam a passagem de íons de um lado a outro de membranas celulares. (Katz and Miledi, 1970) Já em meados de 1980, o desenvolvimento de metodologias de biologia molecular permitiram a clonagem e sequenciamento dessas estruturas. (Noda et al., 1984; Tempel et al., 1987) Finalmente, aproximadamente uma década depois, foi possível cristalizar o primeiro canal iônico, um CI bacteriano de *Streptomyces lividans* seletivo a K^+ (KcsA). (Doyle et al., 1998) Desde então, diversas outras estruturas de CIs foram resolvidas. (Brohawn et al., 2012; Jiang et al., 2002, 2003; Kuo et al., 2003; Long et al., 2005a, 2007; McCusker et al., 2012; Miller and Long, 2012; Payandeh et al., 2011, 2012; Shaya et al., 2013; Zhang et al., 2012) A elucidação da estrutura tridimensional dessas proteínas é fundamental a uma melhor compreensão da relação entre sua estrutura e função, tanto em situações normais, quanto em patologias. (Delemotte et al., 2010)

Experimentos, juntamente com as estruturas tridimensionais de diferentes CIs disponíveis permitiram identificar que essas proteínas apresentam uma estrutura geral conservada (Figura 6). Como regra, CIs são compostos por quatro subunidades, homólogas ou não, que se arranjam de forma a delimitar um poro transmembrânico através do qual ocorre a permeação de íons. Variações a essa estrutura comum incluem canais formados por dímeros de dímeros (que simulam quatro unidades estruturais repetitivas ou protômeros, e.g.: canais de potássio da família K2P), e aqueles compostos por quatro repetições em uma única cadeia polipeptídica (e.g.: canais de sódio dependentes de voltagem de mamíferos). Assim, cada subunidade, ou repetição, é composta por duas alfa-hélices transmembrânicas, os segmentos externos (SE) e internos (SI). Unindo os segmentos, encontra-se uma hélice curta denominada hélice do poro e um segmento distendido, chamado filtro de seletividade (FS). O FS, como o nome sugere, é o responsável pela seletividade dos CIs. A cavidade central dos canais localiza-se abaixo do filtro de seletividade. Essa cavidade é a região mais ampla do caminho de permeação, delineada por resíduos de aminoácido essencialmente apolares. Próximo à face intracelular, há uma região especializada da cavidade central, chamada portão ou *gate* hidrofóbico. Essa região apresenta resíduos hidrofóbicos e sua abertura ou constrição compõe um importante mecanismo de controle da condução de CIs (cf.

II.1.3.1). Como discutido em maiores detalhes a seguir, o filtro de seletividade e o portão hidrofóbico constituem peças fundamentais na maquinaria de funcionamento e controle da atividade de canais iônicos.

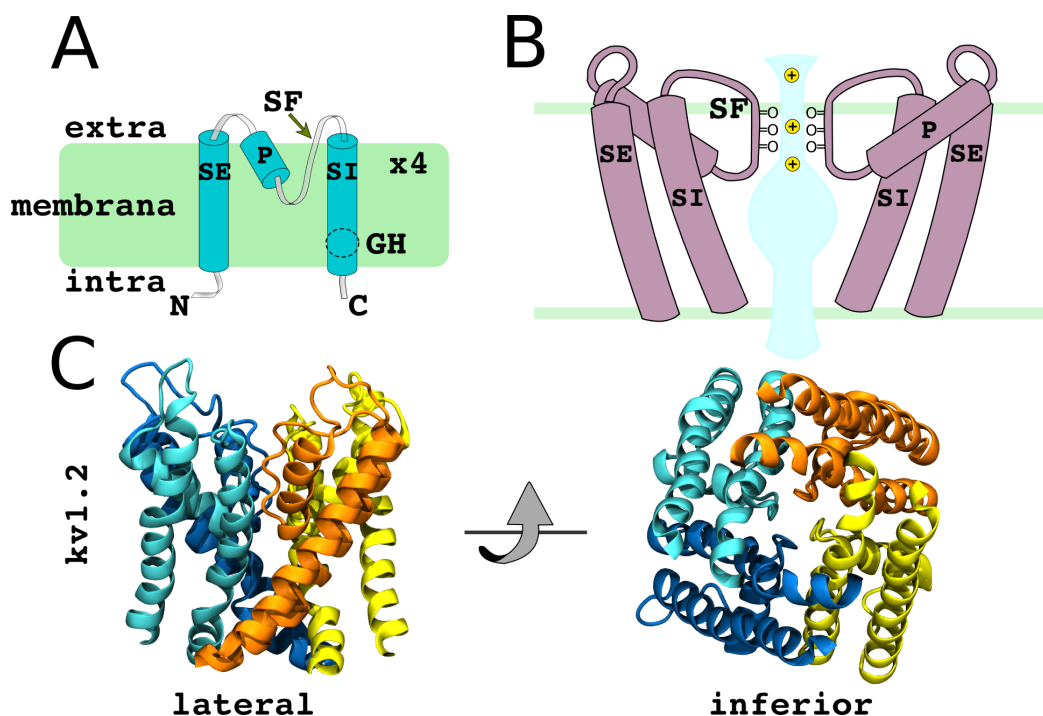


Figura 6. **Estrutura geral de canais iônicos.** (A) Desenho esquemático de uma subunidade de CI. SE: segmento externo, SI: segmento interno, P: hélice do poro, SF: filtro de seletividade, GH: gate hidrofóbico, C e N indicam as extremidades C e N-terminal da cadeia peptídica. (B) Ilustração do arranjo tridimensional de duas das quatro subunidades mostradas em A. Note os oxigênios coordenando o íon no interior do FS. (C) Estrutura cristalográfica de um canal de K⁺ (Kv1.2), mostrando a vista lateral e inferior (lado intracelular). Cada subunidade é colorida diferentemente. Figura adaptada da dissertação de Stock, L.(Stock, 2013)

II.1.3 Estados Funcionais e Mecanismos Intrínsecos de Modulação da Condução

Condizente com sua intrincada função nas células e organismos, CIs apresentam diversas estratégias para controlar a permeabilidade do poro, e conseqüentemente a passagem de íons. Esse controle é feito via mecanismos coletivamente denominados de comporta ou *gating*. Assim, canais iônicos podem ser classificados não só pelo íon que é seletivamente transportado, mas também de acordo o sinal que regula o processo de *gating*. Segundo este último critério, CIs podem ser denominados dependentes de ligantes, de estímulos mecânicos, de voltagem, de pH, de nucleotídeos cíclicos, etc.(Hille, 1992) Ainda, a depender do tipo de regulação, o canal pode

apresentar domínios proteicos especializados na captação do estímulo. Por exemplo, canais iônicos dependentes de voltagem possuem, associado a cada subunidade do poro, um domínio transmembrânico sensível à voltagem (DSV). Tradicionalmente, considera-se que canais iônicos podem apresentar dois *gates* que controlam a condução: um *gate* interno (*gate* hidrofóbico) e um *gate* localizado na porção mais extracelular do canal, no filtro de seletividade.

Dentre as famílias de canais iônicos, canais de K^+ são os mais bem estudados e caracterizados. Isso se dá principalmente pois CI seletivos a potássio foram os primeiros a serem cristalizados, enquanto a primeira estrutura cristalográfica de CI de Na^+ somente foi resolvida em 2011.(Payandeh et al., 2011) Consequentemente, boa parte dos avanços no conhecimento a respeito de canais iônicos, bem como avanços metodológicos foram desenvolvidos nesse modelo estrutural.

II.1.3.1 Gate Hidrofóbico

A presença de um *gate* hidrofóbico é reconhecida em diversos canais iônicos, sugerindo que essa seja uma característica comum a canais iônicos em geral.(Aryal et al., 2014, 2015; Barber et al., 2012a; Nury et al., 2010; Payandeh et al., 2012; Sotomayor and Schulten, 2004; Treptow and Klein, 2010) Apesar da variedade de sinais capazes de regular as diferentes classes de CIs, há evidências de que esses estímulos externos sejam comunicados através da estrutura, levando à abertura ou fechamento da região do *gate* hidrofóbico.(Amaral et al., 2012; Barber et al., 2012a; Blunck and Batulan, 2012a; Jensen et al., 2012; Liu et al., 2001; Lolicato et al., 2014; Lu et al., 2002; Perozo et al., 1999; Thompson et al., 2008)

Como mencionado, essa região é equipada com resíduos hidrofóbicos e constitui um mecanismo intrínseco de controle da condução. Na presença do estímulo que ativa o canal, o *gate* se abre e permite a passagem de íons a taxas próximas às apresentadas durante transporte difusivo de íons.(LeMasurier et al., 2001) Simulações computacionais, com duração da ordem de 30 μs , mostram ainda que, quando o estímulo que abre o canal está presente, o *gate* pode transitar entre conformações abertas e fechadas, em função da desidratação e re-hidratação transiente do poro. (Jensen et al., 2010) Esse resultado é corroborado por observações semelhantes feitas em estudos de eletrofisiologia, utilizando patch-clamp, onde se observa a abertura estocástica dos canais. (Hamill et al., 1981) Diferentemente, na ausência do estímulo que ativa a proteína, o poro se mantém principalmente fechado. Quando constrita, a região do *gate* hidrofóbico desidrata o caminho de permeação iônica e impõe uma barreira energética significativa à condução (Figura 7). (Beckstein et al., 2004; Treptow and Tarek, 2006a)

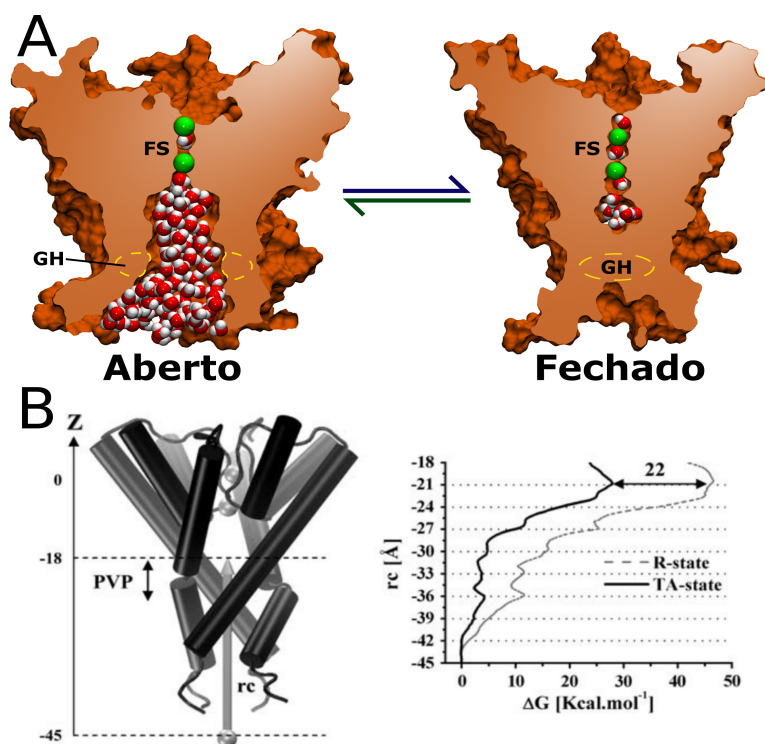


Figura 7. **Controle da condução via gate hidrofóbico.** (A) Ilustração do mecanismo de controle da passagem de íons (esfera verde) pela constrição e desidratação do caminho de permeação. FS: Filtro de seletividade; GH: Gate hidrofóbico; Moléculas de água são representadas por esferas brancas (H) e vermelhas (O). (B) Perfil de energia livre relativo à condução de um íon K^+ através do poro de um canal de potássio. Esquerda: representação do canal, ilustrando a coordenada de reação definida como a posição em Z (eixo axial da proteína) do íon, medida em relação ao centro do filtro de seletividade ($Z=0$). Direita: Perfil de energia livre referente à passagem do íon através do poro nas conformações fechada (R) e pré-ativada (TA, toward activation), indicando a barreira energética imposta pela constrição do gate hidrofóbico. Figura 2A adaptada da dissertação de Stock, L.(Stock, 2013); Figura 2B adaptada de Treptow, W. e Tarek, M., 2006(Treptow and Tarek, 2006a).

Canais iônicos dependentes de voltagem (CIDV) apresentam quatro subunidades acessórias, domínios sensíveis à voltagem, capazes de responder a diferenças de potencial eletrostático através da membrana. O domínio é composto de quatro hélices transmembrânicas denominadas S1 a S4 e, por consistência, as hélices SE e SI que compõem o poro passam a ser indicadas por S5 e S6. Cada domínio sensível à voltagem se conecta à hélice S5 do poro por intermédio de um pequeno segmento de hélice paralelo ao plano da membrana, o linker-S4S5. Esse conector é o responsável pelo acoplamento eletromecânico entre os dois domínios.(Blunck and Batulan, 2012b; Jensen et al., 2012; Long et al., 2005b; Lu et al., 2002) . A estrutura tridimensional do CIDV Kv1.2, na conformação aberta, pode ser observada na figura 8 abaixo:

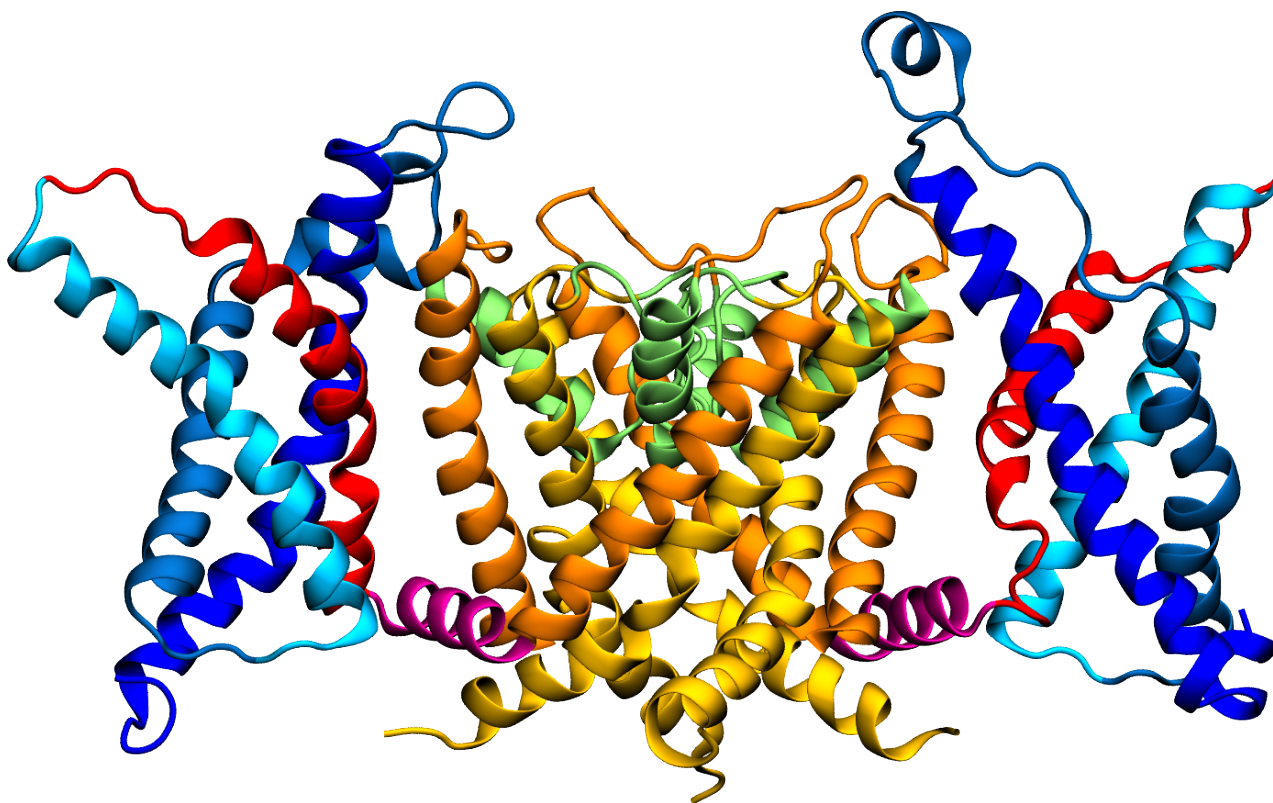


Figura 8. Estrutura do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2. O arranjo tridimensional de Kv1.2 resolvido por difração de raio X (Long et al., 2005a), na conformação aberta-condutora, é mostrado acima. Por clareza, apenas duas subunidades não-adjacentes foram representadas com seus respectivos domínios sensíveis a voltagem (DSV). Em azul marinho, petróleo e ciano estão respectivamente as hélices S, S2 e S3; vermelho: hélice S4; magenta: linker-S4S5; laranja: hélice S5; verde: hélice do poro e filtro de seletividade; amarelo: hélice S6.

Brevemente, a hélice S4 apresenta de quatro a seis resíduos de aminoácido carregados positivamente, majoritariamente argininas (Figura 9A). Quando na presença de um campo elétrico, esses resíduos carregados, denominados *gating charges*, sofrem transições conformacionais sequenciais, transferindo cargas através do dielétrico. Durante esse processo altamente dependente de voltagem, são transportadas aproximadamente 4 cargas elementares por subunidade. Em seguida, há uma transição final pouco dependente de voltagem em que as quatro hélices S4 movem de forma cooperativa e permitem a abertura do *gate* hidrofóbico, e portanto a condução (Figura 9B). (Stock et al., 2013; Vargas et al., 2012)

Experimentalmente, uma medida importante na caracterização da ativação de CIDVs é a condutância (G) em função da diferença de voltagem (V). A condutância por sua vez se relaciona à probabilidade de abertura dos canais segundo:

$$G(V) = N \cdot P_o(V) \cdot \gamma \quad (61)$$

Onde N é o número de canais funcionais expressos na membrana utilizada na medida, $P_o(V)$ é a probabilidade de abertura do canal dependente de voltagem e γ é a corrente unitária. A condutância máxima de um CIDV é uma quantidade independente de voltagem, correspondente à condutância do canal quando sua probabilidade de abertura é máxima $P_{O_{max}}$:

$$G_{max} = N \cdot P_{O_{max}} \cdot \gamma \quad (62)$$

Para a maioria dos CIDV, a despolarização da célula leva a um aumento da condutância, correspondente à ativação dos DSV e subsequente abertura dos canais (Figura 9C).

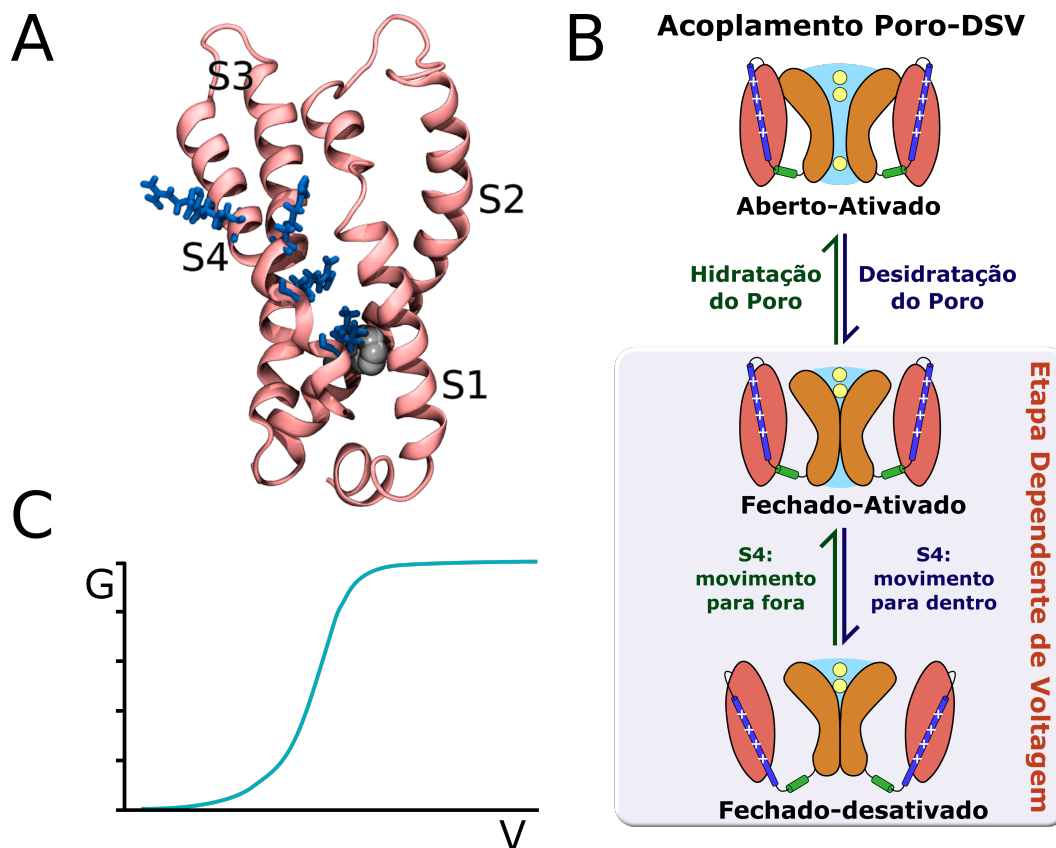


Figura 9. Funcionamento de Canais Iônicos Dependentes de Voltagem. (A) Estrutura de um domínio sensível à voltagem. Hélices S1 a S4 são indicadas na figura. Quatro resíduos de arginina carregados positivamente, responsáveis pela sensibilidade a diferenças de potencial, são representados em azul. (B) Esquema ilustrando o acoplamento entre a ativação do DSV e a abertura do poro. Abaixo (quadro) destaca-se a etapa dependente de voltagem; acima, a transição cooperativa entre as subunidades que leva à abertura do poro. (C) Curva idealizada de condutância pela voltagem, indicando o aumento do fluxo de íons em função da despolarização da membrana.

II.1.3.2 Filtro de Seletividade

Filtros de seletividade são estruturas centrais no funcionamento de CIs, pois têm a capacidade de distinguir entre espécies iônicas extremamente semelhantes, sem no entanto limitar o transporte do íon adequado. Estudos a respeito dos mecanismos de condução em diferentes canais iônicos mostram que, ao atravessar o filtro, os íons são ao menos parcialmente desidratados.(Doyle et al., 1998; Jensen et al., 2010; Köpfer et al., 2014; Stock et al., 2013) Nesse contexto, observa-se que o filtro de seletividade é uma estrutura cuidadosamente selecionada para permitir a condução eficiente de um tipo de íon e impedir a passagem dos demais. Em outras palavras, o custo energético relativo à desidratação de um íon específico deve ser contrabalanceada pelas características físico-químicas, estruturais e dinâmicas dos resíduos que compõem o FS, culminando em altas taxas de condução (da ordem de 1×10^6 íons por segundo, para canais de Na^+ e K^+). (LeMasurier et al., 2001) Como seria intuitivo supor, ao analisar as estruturas de CIs disponíveis, é possível observar que os FS de canais seletivos a uma mesma espécie iônica apresentam sequência de aminoácidos altamente conservada.(Doyle et al., 1998) Em contrapartida, filtros seletivos a íons diferentes divergem não somente em suas sequências, mas também em seus arranjos estruturais tridimensionais (Figura 10).

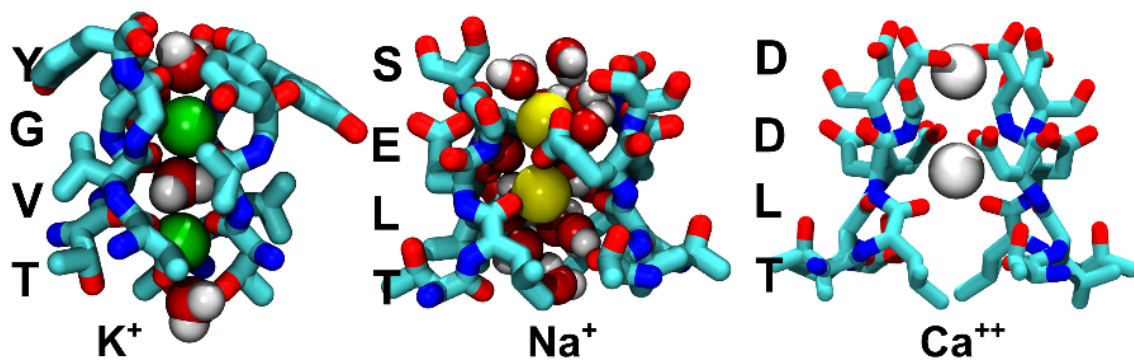


Figura 10. Filtros de seletividade de canais iônicos. Da esquerda para a direita: Filtros de seletividade de canais de potássio, sódio e cálcio. Observe o ambiente estreito que força o posicionamento alinhado dos íons no FS do canal de K^+ , em contraposição com o filtro mais amplo e hidratado do FS de Na^+ . Filtro do canal de Ca^{++} é mostrado como resolvido pela cristalização e difração de raio X.(Tang et al., 2013) A sequência de aminoácidos característica de cada um dos FS é mostrada à esquerda de cada estrutura.

É interessante observar ainda que mesmo CIs seletivos a uma mesma espécie iônica podem apresentar diferenças em suas taxas de condução e seletividade. Esse fato, apesar de surpreendente ao considerar que os canais apresentam uma sequência-assinatura no FS, é funcionalmente justificado dada a variedade de localizações e funções assumidas por essas proteínas. No intuito de esclarecer essa questão, estudos experimentais de mutagênese e simulações atômicas associadas

a cálculos de energia livre foram realizados e sugerem que pequenas alterações na estrutura do FS ou em regiões próximas podem ter consequências significativas nas taxas de condução e seletividade do CI.(Cordero-Morales et al., 2007; Heinemann et al., 1992; Treptow and Tarek, 2006b; Yue et al., 2002) Tais resultados evidenciam a complexidade dos mecanismos de modulação da condução e o fino ajuste do funcionamento de CIs às demandas do organismo.

Além de sua função seletiva, o FS é também responsável por outro mecanismo de controle da condução. Observa-se que, sob condições de prolongada despolarização, CI dependentes de voltagem param de conduzir íons por longos períodos (milissegundos a segundos), espontaneamente entrando no que é denominado estado inativado. Esse mecanismo de inativação é importante, pois regula a excitabilidade celular, propriedades de disparo bem como adaptação dos potenciais de ação a estímulos repetitivos.(Hille, 1992)

No início da década de 1990, experimentos com CIs dependentes de voltagem da família Shaker (homólogos dos canais da família Kv1, em drosófila) acumularam evidências a favor de um mecanismo de inativação envolvendo a região mais C-terminal do canal, acessível pela face extracelular da membrana.(Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; Liu et al., 1996) Adicionalmente, um estudo de espectroscopia de ressonância paramagnética mostrou que o poro de condução se encontrava na conformação aberta quando da inativação, sugerindo a existência de um segundo *gate*, em outro local diferente do *gate* hidrofóbico.(Perozo et al., 1999) Em função da localização desse novo *gate*, e porque a inativação descrita ocorre em escalas de tempo maiores que as de um outro mecanismo(Balser et al., 1996; Hoshi et al., 1990, 1991; Stühmer et al., 1989), esse evento recebeu o nome de inativação do tipo C ou lenta (IL). Ainda nessa época, diversos estudos ressaltaram a influência do filtro de seletividade no *gate* de canais de K⁺.(Chapman et al., 1997; Demo and Yellen, 1992; Kiss et al., 1999; Lu et al., 2001; Proks et al., 2001; Zheng and Sigworth, 1997) Apesar de o mecanismo molecular e detalhes estruturais atômicos por trás da inativação do tipo C não estarem completamente caracterizados, a hipótese vigente é de que o fenômeno corresponda a mudanças conformacionais que alteram a estrutura do filtro de seletividade e impedem a permeação dos íons.(Cordero-Morales et al., 2006; Devaraneni et al., 2013; Domene et al., 2008; Kiss et al., 1999; Starkus et al., 1997)

As transições moleculares responsáveis pelo mecanismo de inativação lenta foram mais bem exploradas no canal iônico bacteriano KcsA e são consideradas como modelo representativo da inativação para a família de canais de K⁺ em geral.(Chakrapani et al., 2007a, 2007b; Cordero-Morales et al., 2011; Cuello et al., 2010a) Para o KcsA, estão disponíveis estruturas cristalográficas nos quatro estados funcionais relevantes, nos quais o *gate* hidrofóbico está aberto ou fechado, e o filtro de seletividade condutor ou inativado.(Cuello et al., 2010c, 2010b; Liu et al., 2001; Zhou et

al., 2001) No estado condutor, as estruturas apresentam alta ocupância de íons, distribuídos nos quatro sítios de ligação a K^+ disponíveis no filtro de seletividade. Ambas estruturas cristalográficas do CI KcsA inativado (código PDB: 3F5W, poro aberto; e 1K4D, poro fechado) mostram o filtro de seletividade constrito na região do resíduo de glicina 77, equivalente à Gly345 de Kv1.2, e portanto tem menor número de íons ligados (Figura 11). Apesar das diferenças na região do *gate* hidrofóbico, as estruturas contendo o filtro não-condutor não apresentam variações estruturais expressivas na região extracelular.

Estudo realizados até hoje sugerem que pelo menos três características estão relacionadas à indução ao estado inativado em CIs, particularmente aqueles seletivos a K^+ :

i) Estado funcional do *gate* hidrofóbico. Há um acoplamento entre a abertura e fechamento do *gate* hidrofóbico e a inativação. A abertura do canal favorece o estado não-condutor do FS, possivelmente devido a modificação da rede de contatos de resíduos do filtro em função da abertura do poro e conseqüente torção do segmento interno. Outro argumento sugere que a abertura do *gate* favorece a depleção de íons no FS (vide abaixo).(Cuello et al., 2010c; Panyi and Deutsch, 2006)

ii) Concentração e íons permeantes. A cristalização da estrutura de KcsA em condições de baixa concentração de K^+ evidencia o filtro de seletividade constrito em uma conformação não-condutora (Figura 11). Além disso, entre outras evidências, experimentos utilizando íons de maior residência no FS, como por exemplo rubídio, diminuem as taxas de inativação de KcsA. (Baukrowitz and Yellen, 1995; Chakrapani et al., 2007a; Kiss et al., 1999; López-Barneo et al., 1993; Matulef et al., 2013; Ogielska and Aldrich, 1999)

iii) Resíduos próximos e realizando contatos com resíduos do FS. Inativação em KcsA é abolida pela mutação pontual E71A, localizada no ambiente imediatamente atrás do FS.(Bhate and McDermott, 2012; Bucher et al., 2007; Rotem et al., 2010)

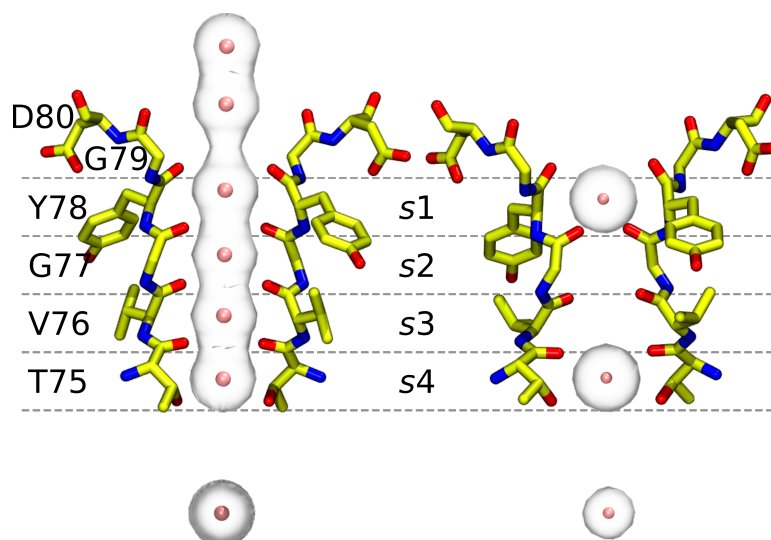


Figura 11. **Filtro de seletividade do canal iônico KcsA em dois estados.** Da esquerda para a direita, estrutura cristalográfica do FS condutor (pdb 1K4C) e não-condutor (pdb 1K4D). Densidade de íons resolvida nas estruturas são indicadas no centro do FS, e a identificação dos sítios de ligação de íons K^+ é mostrada à esquerda. Para melhor visualização, somente duas subunidades são representadas. Observe a constrição e menor quantidade de íons na estrutura não-condutora/inativada.

Canais de Na^+ e Ca^{++} também apresentam inativação lenta após um período de condução, provavelmente por mecanismos independentes do proposto para canais de K^+ , entretanto estudos com esses canais ainda são insipientes. Novas evidências sugerem a existência de um estado inativado, envolvendo o FS, em canais não-seletivos de *Bacillus cereus* (canais NaK). (Brettmann et al., 2015)

Assim, considerando-se as conformações e mecanismos até então identificados, é possível pontuar quatro estados funcionais de canais iônicos (Figura 12):

- 1) Aberto-condutor: dado um estímulo, o poro de condução se encontra aberto e o filtro de seletividade está na conformação condutora. Nessa situação, os íons selecionados podem atravessar livremente;
- 2) Aberto-não condutor ou aberto-inativado: poro de condução aberto e FS inativado. Não há condução;
- 3) Fechado-não condutor: poro fechado e FS não condutor;
- 4) Fechado-condutor: após o cessamento do estímulo que abre o canal, e subsequente fechamento do poro, é permitido ao FS a mudança conformacional que o torna condutor (i.e. volta para o início do ciclo em 1).

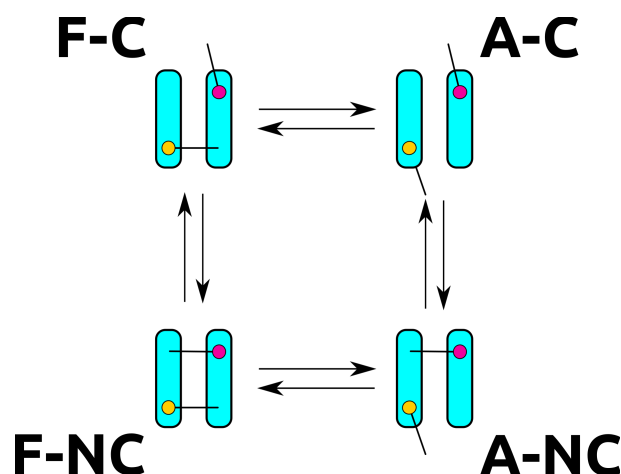


Figura 12. *Ilustração dos estados funcionais de canais iônicos dependentes de voltagem. F-C: fechado condutor; A-C: Aberto-condutor; A-NC: Aberto-não condutor; F-NC: fechado-não condutor. O poro é representado por bastões azuis e os mecanismos de controle da condução, gate hidrofóbico e filtro de seletividade são indicados em amarelo e rosa, respectivamente. Ambos estados contendo o filtro de seletividade não-condutor são categorizados como inativos. A condução de íons somente é permitida na conformação aberta-condutora.*

II.1.4 Modulação de Canais Iônicos por Ligantes

Além dos mecanismos intrínsecos de controle da função de canais iônicos, mecanismos de abertura e fechamento e condução de CIs podem ainda ser alostericamente modulados (cf. I.1.1.) por uma variedade de ligantes, como antidepressivos, anestésicos, neuroprotetores, entre outros. De fato, canais iônicos representam a segunda maior classe de proteínas mediadoras de efeitos de fármacos, ficando atrás apenas de receptores acoplados a proteína G. (Rask-Andersen et al., 2011; 2015)

II.1.4.1 Anestésicos Gerais

Uma questão particularmente interessante é a investigação da modulação de canais iônicos por anestésicos. Anestésicos gerais são compostos quimicamente diversos, classificados em haloalcanos (e.g.: halotano), alquilfenóis (propofol) e haloéteres (isoflurano e sevoflurano). Além disso, anestésicos gerais podem também ser classificados segundo sua forma de administração em injetáveis ou inalatórios. Apesar de diferenças físico-químicas, em geral anestésicos são moléculas apolares, ou com regiões apolares.

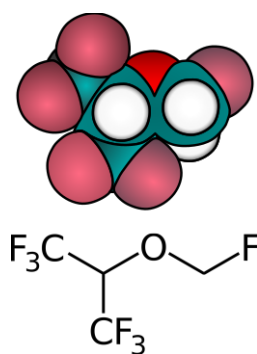


Figura 13. **Estrutura do sevoflurano.** Sevoflurano é um anestésico geral halogenado inalável amplamente utilizado e alvo de investigação do presente estudo. Flúor: rosa. Carbono: verde. Oxigênio: vermelho. Hidrogênio: branco.

O uso de anestésicos gerais em cirurgias visa a produção de um estado no paciente no qual há imobilização reversível, perda da consciência e incapacidade de responder a estímulos nociceptivos. Via de regra, este estado é alcançado por meio do uso combinado de diferentes anestésicos gerais com efeitos e vias de administração distintos. Nesse contexto, anestésicos gerais intravenosos estão majoritariamente associados à indução da anestesia, enquanto anestésicos gerais inalatórios mantêm a analgesia. Entre as diversas moléculas com propriedades anestésicas, salienta-se o haloéter sevoflurano (Figura 13). Sevoflurano é um anestésico geral volátil especialmente utilizado na pediatria, em vista de propriedades como: indução e recuperação rápidas, quando comparado com outros anestésicos gerais; alta estabilidade hemodinâmica; e baixa irritabilidade respiratória. Assim a indução inalatória com sevoflurano é por vezes preferida a procedimento de via intravenosa.(Lerman, 2007; Villani et al., 1998)

Entretanto, apesar do uso de anestésicos gerais ser amplamente difundido e imprescindível a diversas práticas médicas, pouco se conhece a respeito dos alvos e mecanismos moleculares que levam à anestesia. Em decorrência, nota-se o relato de efeitos colaterais adversos como disfunção hepática, hipercalemia e convulsão.(Bhananker et al., 2007) Além disso, estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem que a anestesia geral pode induzir morte celular neuronal por apoptose, alterações morfológicas celulares e perdas cognitivas importantes.(Jevtovic-Todorovic, 2016; Yang and Wei, 2017) Naturalmente, a identificação dos alvos moleculares e mecanismos subjacentes ao processo de anestesia devem ser úteis na proteção a tais efeitos colaterais, bem como no desenho de fármacos mais específicos aos alvos relevantes na promoção e manutenção do estado de anestesia.

II.1.4.2 Modulação de Canais Iônicos por Anestésicos Gerais

Inicialmente, em vista do papel fundamental de membranas na condução do impulso elétrico, propôs-se que anestésicos causam seus efeitos no organismo pela partição na membrana plasmática das células.(Seeman, 1972) Consequência direta dessa proposição seria que moléculas com propriedades físico-químicas semelhantes apresentariam efeitos anestésicos de mesma

natureza e intensidade. Além disso, seria esperado que os efeitos dos anestésicos fossem altamente promíscuos e pouco seletivos, uma vez que seu alvo seria a membrana plasmática. Entretanto, nenhum desses eventos foi satisfatoriamente comprovado. A variedade de estudos refutando a primeira hipótese (Alifimoff et al., 1989; Dickinson et al., 1993; Franks and Lieb, 1985, 1991; Herold et al., 2017) e sugerindo a existência de alvos moleculares proteicos (Franks and Lieb, 1984, 1985; Slater et al., 1993; Yang et al., 2018), acabaram por colocar essa ideia em segundo plano. Atualmente, uma hipótese bem aceita propõe que a anestesia seja uma propriedade emergente (i.e.: um fenômeno complexo que surge da combinação e inter-relação de múltiplos fatores mais simples), resultante da modulação seletiva direta e/ou indireta (Cantor, 1997) de múltiplos receptores proteicos por anestésicos.(Covarrubias et al., 2015; Eckenhoff and Johansson, 1997; Franks, 2008; Franks and Honoré, 2004; Heurteaux et al., 2004) Diante dessa nova hipótese, focada em proteínas como receptores, investigações mostram que diversas famílias de canais iônicos são sensíveis a diferentes classes de anestésicos, apresentando efeitos como inibição, potenciação (aumento da atividade) e ativação, tornando-os assim importantes alvos de anestésicos gerais.(Leeb-Lundberg et al., 1980; Franks and Honoré, 2004; Franks, 2006, 2008; Alkire et al., 2009; Lugli et al., 2009; Barber et al., 2012b; Herold and Hemmings Jr., 2012; Lioudyno et al., 2013; LeBard et al., 2012; Jayakar et al., 2013)

Enquanto investigações iniciais de eletrofisiologia em células focaram majoritariamente em canais iônicos presentes em sinapses(Franks and Lieb, 1994; Leeb-Lundberg et al., 1980; Richards, 1983), estudos *in vivo* se mostraram menos conclusivos a respeito do papel desses receptores em descrever completamente o mecanismo de ação dos anestésicos.(Jurd et al., 2003; Werner et al., 2011) Outros estudos sugerem agora que canais iônicos dependentes de voltagem (CIDV) são sensíveis à modulação por anestésicos gerais em concentrações clínicas e podem ser relevantes para uma melhor compreensão desse mecanismo.(Alkire et al., 2009; Barber et al., 2012b, 2014, Liang et al., 2013, 2015)

Em células excitáveis, canais de potássio dependentes de voltagem contribuem para a hiperpolarização e conseqüente retorno ao potencial de repouso da membrana, portanto atenuam a excitação celular (cf. II.1.1). Assim, um ligante (e.g. anestésico) que estimule a atividade e potencialize essa proteína, diminuiria a atividade neuronal. O mesmo poderia ser esperado para ligantes que inibem canais de sódio dependentes de voltagem, uma vez que estes são responsáveis pela gênese do potencial de ação.(Hille, 1992) Pondera-se no entanto limitações a respeito do quanto efeitos fisiológicos podem ser inferidos a partir de experimentos em sistemas reduzidos. Nota-se que, em um sistema fisiológico, há interações complexas entre diferentes CIs, de forma que a modulação de um canal específico pode impactar a função de outras classes dessa proteína de

formas não antecipadas.

Ainda assim, em 2009, pesquisadores observaram a interação de sevoflurano com o CIDV Kv1.2. Camundongos anestesiados com sevoflurano foram injetados com um anticorpo anti-Kv1.2, desenhado para bloquear o caminho de permeação do canal. Após a administração do inibidor do canal, 75% dos animais recuperaram temporariamente a consciência.(Alkire et al., 2009) Mais recentemente, um experimento semelhante, envolvendo um inibidor específico da família Kv1, foi realizado.(Lioudyno et al., 2013) Tais experimentos reforçam a ideia de que canais iônicos dependentes de voltagem são alvos funcionais de anestésicos gerais, em particular sevoflurano.

II.1.4.3 Sevoflurano e Canais de Potássio

Sevoflurano é um anestésico geral comumente utilizado em anestesia humana, e é um modulador alostérico positivo de diversos canais de potássio dependentes de voltagem. Em concentrações da ordem de mM, a molécula é capaz de aumentar a atividade do canal de potássio de drosófila K-shaw2 (homólogo a canais da família Kv3) e do CI humano Kv1.2 por dois efeitos: 1) aumento da condutância máxima (cf. II.1.3.1, equação 62); 2) aumento da probabilidade de abertura do canal a diferenças de potencial menores, observado como um deslocamento para a esquerda na curva de condutância por voltagem dos canais; Figura 14.(Barber et al., 2012c; Liang et al., 2015) A potenciação do canal de drosófila é aproximadamente três vezes maior que a do canal humano.(Barber et al., 2012c) Um estudo formulou a hipótese de que diferenças no *linker-S4S5* desses canais poderia explicar divergências na intensidade de modulação do anestésico. (Barber et al., 2011) De fato, mudanças nesse segmento da proteína alteram drasticamente a modulação de canais de K⁺ por sevoflurano, supostamente por modificar o acoplamento eletromecânico entre o domínio sensível à voltagem e o poro.(Barber et al., 2011; Liang et al., 2015) No canal Kv1.2, a mutação G329T, próxima ao *linker-S4S5*, aumenta ao efeito de potenciação por sevoflurano, convertendo o comportamento do canal na presença de sevoflurano a padrões semelhantes ao apresentado por K-shaw2.(Liang et al., 2015)

Análises de dose-resposta da potenciação de Kv1.2 por sevoflurano mostram a corrente em função da concentração do anestésico e sugerem que esse seja um fenômeno bifásico, i.e.: gradual a baixas concentrações, e rápido e cooperativo em concentrações maiores. Ainda, segundo os pesquisadores, pode-se explicar o resultado pela existência de dois conjuntos de sítios de ligação: um de alta afinidade aparente e sem cooperatividade; e outro de afinidade mais baixa e cooperativo.(Liang et al., 2015)

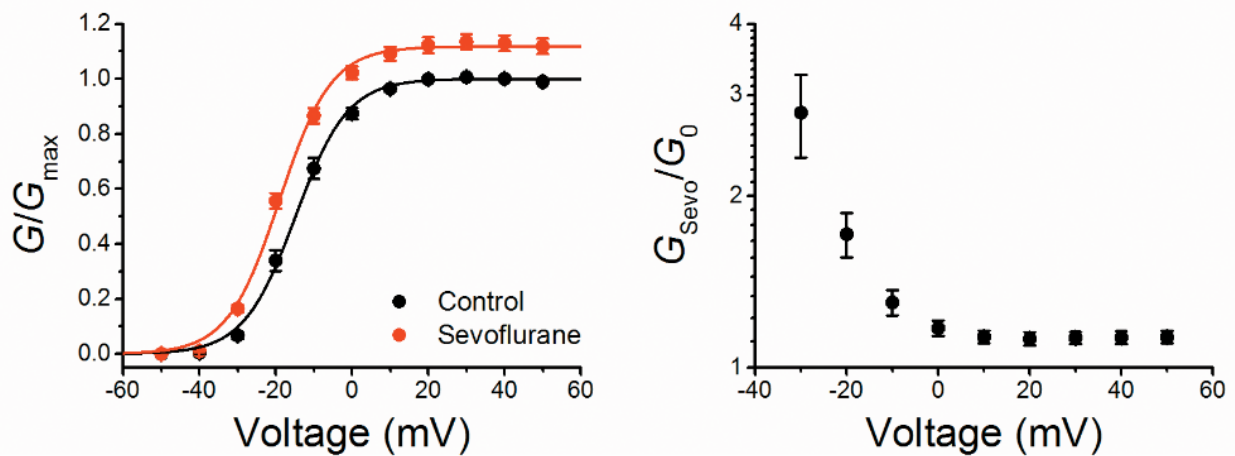


Figura 14. **Potenciação do canal Kv1.2 por 1mM de sevoflurano.** *Esquerda:* Curvas de condutância (G) por voltagem do canal iônico Kv1.2 livre de sevoflurano (preto) e na presença de 1mM do anestésico (vermelho). Ambas curvas são normalizadas pelo valor da condutância máxima (G_{max}) na ausência de sevoflurano. A interação com o ligante provoca um aumento da probabilidade de abertura do canal a voltagens menos despolarizadas (deslocamento para a esquerda), bem como o aumento da condutância máxima. *Direita:* Dependência de voltagem da razão entre as condutâncias mostradas à esquerda. Figura adaptada de Liang et al. (Liang et al., 2015)

Como mencionado acima, a mutação da glicina 329 presente no *linker-S4S5* de Kv1.2 para o resíduo correspondente de K-Shaw2, treonina 330, amplifica os efeitos do anestésico geral sevoflurano, via um efeito dependente de voltagem. Naturalmente, segue a questão de qual o efeito da mutação do mesmo resíduo do *linker* de K-Shaw2 para o equivalente em Kv1.2 selvagem. Interessantemente, a mutação T330G em K-Shaw2 elimina o efeito dependente de voltagem (deslocamento para a esquerda na curva G), porém o aumento da condutância máxima se mantém inalterado. (Liang et al., 2015) Esse fato sugere que a modulação positiva de sevoflurano nesses canais ocorre por pelo menos dois mecanismos separados.

Conjuntamente, os estudos concluem que a modulação de canais de potássio dependentes de voltagem por sevoflurano deve envolver processos independentes, nos quais a molécula se liga a múltiplos sítios em regiões distintas, de forma que outros sítios de interação com anestésico, diferentes do *linker-S4S5*, podem ser necessários a fim de explicar completamente o efeito do ligante nas medidas eletrofisiológicas.

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 Objetivo geral

Quantificar o impacto da ligação do anestésico geral sevoflurano no equilíbrio conformacional aberto-fechado de Kv1.2.

II.2.2 Objetivos específicos

- Gerar um conjunto de estruturas equilibradas do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2 nos estados conformacionais aberto e fechado, ambos com filtro de seletividade ativado/condutor;
- Identificar potenciais sítios de ligação do anestésico geral sevoflurano em Kv1.2 por *docking* molecular em estruturas equilibradas;
- Verificar a procedência dos resultados obtidos a partir do *docking* por meio de cálculos da energia de ligação de um e/ou dois anestésicos para cada sítio definido.
- Calcular constantes de ligação do sevoflurano aos sítios identificados;
- Calcular constantes de ligação generalizadas para os diferentes estados de ocupância do canal;
- Avaliar a dependência conformacional da ligação de sevoflurano a Kv1.2 a partir das quantidades obtidas acima;
- Quantificar o impacto da ligação do anestésico no equilíbrio entre as conformações aberta e fechada de Kv1.2.

II.3 TEORIA E MÉTODOS

II.3.1 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)

Dinâmica molecular (DM) é uma metodologia computacional cujo princípio consiste na produção de trajetórias para um número finito de partículas por meio da integração numérica das equações clássicas de movimento. Seu objetivo final é o cálculo de propriedades dinâmicas médias de um dado sistema microscópico. Assumindo a ergodicidade dos sistemas estudados em DM, é possível calcular médias termodinâmicas de propriedades de interesse na forma de médias temporais segundo:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}_t = \langle A \rangle , \quad (63)$$

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

Além do cômputo de grandezas medidas experimentalmente (e.g. temperatura, pressão, calor específico, etc.), avanços significativos na acurácia das descrições dos sistemas, bem como no poder computacional concederam às simulações de DM um importante papel como experimento computacional. Nesses experimentos, informações dinâmicas a nível molecular atômico presentemente inalcançáveis via técnicas experimentais, seja pelo poder de resolução, seja porque as condições experimentais são de difícil controle, tornam-se acessíveis. (Frenkel and Smit, 2002).

A descrição do sistema mencionada acima é condicionada a uma função de energia potencial $U(\mathbf{r}^N)$, onde \mathbf{r}^N corresponde às coordenadas de cada uma das N partículas. $U(\mathbf{r}^N)$ é a principal função dos cálculos de DM, uma vez que dela derivam as forças agindo em todas as partículas de um sistema. Associada a parâmetros moleculares, que definem constantes de equilíbrio e cargas parciais obtidas a partir de cálculos quânticos, esta compõe o campo de força. O campo de força é portanto um conjunto de descrições das interações intra e intermoleculares do sistema. (Feller and MacKerell, 2000) Diversos campos de força clássicos para simulações de dinâmica molecular estão atualmente disponíveis, e.g.: GROMOS (Schuler et al., 2001), CHARMM (Feller and MacKerell, 2000; MacKerell et al., 1998) e AMBER (Ponder and Case, 2003). Apesar das particularidades da implementação, de forma geral, os componentes de $U(\mathbf{r})$ podem ser divididos em termos de (i) interações ligadas: energias de ligação, angulares e diedrais; e (ii) interações não ligadas: energias de van der Waals e eletrostática. (cf. Equação (64))

$$\begin{aligned}
U(r) = & \sum_{\text{ligação}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diédro}} \sum_n \frac{U_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
& + \sum_{\substack{i < j \\ (i,j) > 1-4}} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{i < j \\ (i,j) > 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon r_{ij}}
\end{aligned} \tag{64}$$

Aqui, respectivamente, k_r e k_θ são constantes de força de ligação e angular; r_0 e θ_0 são distâncias e ângulos de equilíbrio; $U_n/2$, n e γ são barreira torsional, sua periodicidade e fase; ε é a constante dielétrica; q_i é a carga parcial do átomo i ; R_{ij}^* e ε_{ij} correspondem aos parâmetros e à força de van der Waals para o par ij .

Sistemas simulados em DM têm tamanho limitado, com número de átomos aproximadamente da ordem de 10^6 , portanto efeitos de borda devem ser tratados a fim de minimizar sua influência na dinâmica do sistema. Para tanto, condições periódicas de contorno (PBC, do inglês *periodic boundary conditions*) são comumente aplicadas. Brevemente, nesse esquema, o sistema completo de interesse é compartimentalizado em uma célula unitária mínima e réplicas dessa caixa mínima circundam a célula original em todas as direções tridimensionais cartesianas ($\pm x$, $\pm y$, $\pm z$). Cada partícula que atravessa os limites de uma célula é representada por uma partícula que se reinsere na célula pelo limite oposto. Porque todas as réplicas são idênticas, só precisam ser representadas uma única vez no código de dinâmica.

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

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

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \delta t^2 + O(\delta t^4) \tag{65}$$

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

$$v_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t+\delta t) - \mathbf{r}_i(t-\delta t)}{2\delta t} + O(\delta t^2) \quad (66)$$

A despeito do considerável aumento do tempo computacional, um passo de integração (δt) infinitesimal, da ordem de 2 femtosegundos (10^{-15} s), é requerido para assegurar a conservação de energia do sistema (Frenkel and Smit, 2002).

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

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

$$\mathbf{v}_i = w \dot{\mathbf{r}}_i = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i w} \quad (67)$$

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

$$U_w = k_B T (f+1) \ln w \quad (68)$$

$$\text{e } K_w = \frac{1}{2} Q \dot{w}^2 \quad (69)$$

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

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

II.3.1.1 Desvio Quadrático Médio (RMSD)

RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) é uma análise comumente utilizada na avaliação da estabilidade de estruturas moleculares ao longo das trajetórias de dinâmica molecular. Dado um conjunto de n átomos a serem comparados a uma estrutura de referência, uma medida de

distância os átomos das estruturas de referência e das estruturas instantâneas da trajetória é calculada a cada instante, segundo a equação abaixo.

$$RMSD(\mathbf{X}^{ref}, \mathbf{X}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|\mathbf{X}_i^{ref} - \mathbf{X}_i\|^2} \quad (70)$$

Aqui, \mathbf{X}^{ref} e \mathbf{X} são o conjunto de coordenadas cartesianas dos n átomos da estrutura de referência e as coordenadas instantâneas ao longo da trajetória, respectivamente.

II.3.1.2 Steered Molecular Dynamics (SMD)

Steered Molecular Dynamics é uma metodologia que permite o estudo de mudanças conformacionais de biomoléculas em escalas de tempo acessíveis a simulações de dinâmica molecular. Isso é feito pela adição dependente do tempo de forças ao longo de uma coordenada de reação previamente definida. O centro de massa do conjunto de átomos selecionados sofre a ação de uma restrição harmônica com constante de força k , que faz com que os átomos se movam com velocidade v na direção \mathbf{n} . Assim, durante simulações empregando SMD, a seguinte energia potencial é aplicada ao sistema:

$$U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, t) = \frac{1}{2} k [vt - (\mathbf{R}(t) - \mathbf{R}_0) \cdot \mathbf{n}]^2 \quad (71)$$

tal que
 $t \equiv N_{ts} dt$

\mathbf{r}_i são as coordenadas tridimensionais de cada átomo i ; $\mathbf{R}(t)$ é o centro de massa do conjunto de átomos sendo movidos, no tempo t e \mathbf{R}_0 seu valor de referência, no início da simulação. N_{ts} é o número de passos de integração e dt o tamanho do passo de integração em femtosegundos.

II.3.2 Docking Molecular

Fundamental ao estudo da modulação de proteínas por ligantes é a identificação dos sítios de ligação onde tais moléculas são complexadas. Nesse sentido, a metodologia de ancoragem ou *docking* molecular tem por objetivo encontrar sítios de ligação não covalente principalmente de pequenos ligantes a receptores macromoleculares, bem como estimar a afinidade de tais ligações. No método, algoritmos de amostragem geram diferentes poses para o ligante, em diferentes locais da proteína. As soluções geradas são subsequentemente classificadas em mais ou menos favoráveis, segundo uma função, denominada *scoring function*. Tanto algoritmos de busca, quando *scoring functions* variam de acordo com o software de *docking* empregado.

O programa de *docking* utilizado no presente trabalho é o AutoDock Vina (Trott and Olson,

2010). Vina se destaca por ser paralelizável e portanto mais eficiente do que programas de *docking* anteriores. Sua *scoring function* é fundamentada principalmente em aprendizado de máquina. O funcional conformação-dependente de sua *scoring function* é definido por:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (72)$$

Tal que a soma é feita entre os pares de átomos i e j capazes de mover um em relação ao outro. f função dependente da posição entre os átomos i e j e de seus tipos t_i e t_j .

Critérios não físicos como os empregados pelo *AutoDock Vina* não são adequados para inferir energias de ligação. Assim, a interação do ligante com os sítios identificados pelos cálculos de *docking* foram novamente avaliados, dessa vez por métodos acurados de cálculo de energia livre, particularmente FEP.

II.3.3 Cálculos de energia livre

Transições moleculares envolvendo modificações estruturais de domínios proteicos como aquelas que ocorrem no *gating* e condução de CIs, e como estes eventos são afetados pela presença de ligantes, podem ser descritos na forma de equilíbrios químicos entre dois ou mais estados, na forma de um ciclo termodinâmico. Particularmente útil na descrição quantitativa de equilíbrios químicos, é a energia livre associada ao processo ou a uma coordenada de reação conectando dois estados.

Especificamente, a variação de energia livre padrão $\Delta G^\circ = G_1^\circ - G_2^\circ$ entre dois estados relaciona-se à constante de equilíbrio k_{eq} segundo:

$$\Delta G^\circ = -k_B T \ln k_{eq} \quad (73)$$

Apesar de fundamental na determinação do comportamento de sistemas próximos ou no equilíbrio, caracterizar o perfil de energia livre associado a determinadas transições moleculares ainda é tarefa desafiadora. O cômputo da energia livre requer, a princípio, o cálculo da função de partição e portanto uma amostragem completa dos graus de liberdade do sistema. Para os casos em que as barreiras de energia conectando dois estados são de ordem maior do que a energia térmica ($k_B T$), tal amostragem torna-se inviável para os métodos atualmente disponíveis. Essa limitação se traduz em transições moleculares que ocorrem em escalas de tempo muito grandes, comparadas às escalas de tempo amostradas em simulações de dinâmica molecular. Assim, a fim de estimar perfis de energia livre para a maioria dos processos biológicos de interesse, deve-se realizar simulações inviavelmente longas, uma vez que a função de energia potencial é de lenta convergência. Nesse

sentido, técnicas que melhoram a amostragem do espaço de fase do sistema são utilizadas para otimizar a investigação desses fenômenos. De forma geral, estratégias para o cálculo de energia livre podem ser divididas em duas grandes classes, cada uma mais adequada a um tipo de problema: i) métodos capazes de calcular um perfil de energia livre ao longo de uma coordenada de reação; ii) aqueles que calculam a diferença de energia livre entre dois estados (inicial e final) bem definidos. A seguir, é fornecida uma breve descrição das técnicas de amostragem empregadas neste trabalho, a saber: Umbrella Sampling (US) e Free Energy Perturbation (FEP), que se inserem respectivamente nas categorias i e ii acima.

II.3.3.1 Free energy perturbation (FEP)

O Método de *Free Energy Perturbation* é uma das mais utilizadas e bem estabelecidas estratégias para cálculo de energia livre. Fundamentado na teoria da perturbação, cálculos de FEP são geralmente descritos em função de um sistema referência (não perturbado) e de um sistema alvo (perturbado). A perturbação pode ser interpretada como uma mudança conformacional, mutação pontual ou a ligação de um modulador, por exemplo. O efeito da perturbação é expresso em termos de uma série de pequenas quantidades chamadas de *parâmetro perturbativo*. Assim, aplicando o parâmetro perturbativo, o sistema de referência é transformado no sistema alvo através de estados intermediários não obrigatoriamente físicos. Especificamente no problema da energia de ligação, o cálculo consiste em desacoplar o ligante do ambiente (ou desligar suas interações com o ambiente) de forma reversível.

VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE

Suponha um sistema referência com N partículas, descrito pelo Hamiltoniano $H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})$, onde \mathbf{x} e \mathbf{p} são coordenadas tridimensionais cartesianas e de momentos de cada átomo. Tem-se por objetivo calcular a diferença de energia livre entre o sistema referência e o sistema alvo caracterizado pelo hamiltoniano $H_1(\mathbf{x}, \mathbf{p})$, tal que:

$$H_1(\mathbf{x}, \mathbf{p}) = H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p}) + \Delta H(\mathbf{x}, \mathbf{p}) \quad (74)$$

Assim, o hamiltoniano perturbado é dado pela soma do hamiltoniano não perturbado e da perturbação $\Delta H(\mathbf{x}, \mathbf{p})$. A diferença de energia livre entre o sistema alvo e o sistema referência é portanto:

$$\Delta A = -\frac{1}{\beta} \ln \frac{Q_1}{Q_0} \quad (75)$$

onde Q_0 e Q_1 são respectivamente funções de partição dos estados referência e alvo, definidas segundo:

$$Q_0 = \frac{1}{h^{3N} N!} \int \int e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p} \quad (76)$$

O termo $\frac{1}{h^{3N}}$, onde h é a constante de Plank, é uma constante de proporcionalidade; e $N!$ considera configurações idênticas a menos da permuta de partículas. Substituindo a equação (76) em (75):

$$\begin{aligned} \Delta A &= -\frac{1}{\beta} \ln \frac{\int \int e^{-\beta H_1(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p}}{\int \int e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p}} \\ &= -\frac{1}{\beta} \ln \frac{\int \int e^{-\beta \Delta H(\mathbf{x}, \mathbf{p})} e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p}}{\int \int e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p}} \end{aligned} \quad (77)$$

Definindo a probabilidade de se encontrar o sistema em um estado específico definido por \mathbf{x} e \mathbf{p} :

$$P_0(\mathbf{x}, \mathbf{p}) = \frac{e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})}}{\int \int e^{-\beta H_0(\mathbf{x}, \mathbf{p})} d\mathbf{x} d\mathbf{p}} \quad (78)$$

Substitui-se a equação (78) na definição de variação de energia livre da equação (77) e obtemos:

$$\begin{aligned} \Delta A &= -\frac{1}{\beta} \ln \int \int e^{-\beta \Delta H(\mathbf{x}, \mathbf{p})} P_0(\mathbf{x}, \mathbf{p}) d\mathbf{x} d\mathbf{p} \\ &= -\frac{1}{\beta} \ln \langle e^{-\beta \Delta H(\mathbf{x}, \mathbf{p})} \rangle_0 \end{aligned} \quad (79)$$

A equação (79) define a equação fundamental dos cálculos de FEP, para transformações no sentido referência (0) \rightarrow alvo (1).

Na prática, em estudos de sistemas moleculares, interessa-se somente pela contribuição das configurações para a descrição das funções de partição. Uma vez que os componentes cinéticos podem ser calculados analiticamente, não há necessidade de avaliá-los via simulações computacionais. Além disso, para qualquer par de sistemas referência-alvo em que a massa das partículas permaneça inalterada, o termo cinético é cancelado, e a variação de energia livre pode ser escrita em função da variação de energia potencial ΔU :

$$\Delta A = -\frac{1}{\beta} \ln \int e^{-\beta \Delta U} P_0(\Delta U) d\Delta U \quad (80)$$

$$\Delta A = -\frac{1}{\beta} \ln \langle e^{-\beta \Delta U} \rangle_0$$

A menos que $P_0(\Delta U)$ seja uma função estreita de ΔU , aplicação direta da teoria acima é inviável, e apresenta erros muito grandes. Para solucionar o problema, uma estratégia de estratificação é utilizada (equação (81)). Ou seja, diversos estados intermediários (ou janelas) entre o estado referência e o alvo são gerados, de forma que parte da distribuição de probabilidades $P_0(\Delta U_{i,i+1})$ dos estados i e $i+1$ adjacentes se sobreponham. Nesse contexto, a variação de energia livre total entre os estados inicial e final, com $I-2$ estados intermediários, é escrita como a soma das variações em cada janela:

$$\Delta A = \sum_{i=1}^{I-1} \Delta A_{i,i+1} = -\frac{1}{\beta} \sum_{i=1}^{I-1} \ln \langle e^{-\beta \Delta U_{i,i+1}} \rangle_i \quad (81)$$

Aplicado aos cálculos de energia de ligação do anestésico ao canal iônico definimos: i) o sistema de referência como o sistema molecular contendo o CI e o anestésico no sítio de ligação; ii) o sistema perturbado como a situação em que o anestésico está ausente; iii) parâmetro perturbativo como todos os termos do funcional de energia que descrevem a interação do anestésico com o meio.

CÁLCULO DO ERRO – *SIMPLE OVERLAP SAMPLING* (SOS) (Lu et al., 2004)

A fim de obter uma melhor amostragem, cálculos de FEP independentes para o mesmo sistema podem ser combinados. Cada uma das R repetições da trajetória de FEP é denominada uma réplica r . Os estados intermediários, juntamente com os estados de referência e alvo compõem um total de I janelas ou estratos (cf. equação (81)).

Para cada janela i , de uma réplica r pode-se definir:

$$X_{ir} = \langle e^{-\beta \Delta U_i} \rangle_{ir} , \quad (82)$$

$$\Delta U_i = U_{i+1} - U_i$$

A média entre as réplicas é portanto :

$$\bar{X}_i = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R X_{ir} = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R \langle e^{-\beta \Delta U_i} \rangle_{ir} = \langle e^{-\beta \Delta U_i} \rangle_i \quad (83)$$

com erros associados à média:

$$\varepsilon^2(X_i) = \left[\frac{1}{R^2} \sum_{r=1}^R X_{ir}^2 \right] - \frac{1}{R} \bar{X}_i^2 \quad (84)$$

Diante dessas definições, podemos escrever a variação de energia livre em cada estrato i

$$\Delta A_i = -\frac{1}{\beta} \ln \bar{X}_i = -\frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{1}{R} \sum_{r=1}^R X_{ir} \right), \quad (85)$$

e conseqüentemente a variação de energia livre total da transformação como:

$$\Delta A = \sum_{i=1}^I \Delta A_i \quad (86)$$

Finalmente, o erro associado é dado por:

$$\varepsilon(\Delta A) = \left(\sum_{r=1}^R \varepsilon^2(X_i) \right)^{\frac{1}{2}} \quad (87)$$

II.3.3.2 Umbrella Sampling (US)

O método de *umbrella sampling* (US) foi desenvolvido em 1977 como uma estratégia para melhorar a amostragem do espaço de fase e permitir o cálculo da energia livre ao longo de um parâmetro de ordem, também conhecido como potencial de força média (PMF). (Torrie and Valleau, 1977) O método de US consiste na divisão da coordenada de reação (CR) em uma série de pequenas janelas, ou intervalos ao longo da coordenada de reação. A amostragem em cada uma dessas divisões é então imposta pela aplicação de potenciais harmônicos que forçam a coordenada de reação a ficar próxima ao centro da janela. Dada a condição que as janelas se sobreponham parcialmente, é possível utilizar o formalismo do “*weighted histogram analysis method*” (WHAM) (Grossfield) para retirar o viés adicionado pelo potencial harmônico e combinar as janelas, obtendo assim o PMF final.

DISTRIBUIÇÃO DE PROBABILIDADES

Suponha uma coordenada de reação ζ ao longo da qual se quer avaliar o PMF. Seja a probabilidade de encontrar o sistema não-enviesado em qualquer região dessa coordenada (equação (88)), e sua energia livre associada (equação (89)):

$$P_0(\zeta) = \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U_0(\mathbf{x})}}{\int d\mathbf{x} e^{-\beta U_0(\mathbf{x})}} \quad (88)$$

$$A(\zeta) = -\frac{1}{\beta} \ln P_0(\zeta) \quad (89)$$

Aqui, $\zeta(\mathbf{x})$ é função das coordenadas das partículas do sistema; δ é a função delta de Dirac; $U_0(\mathbf{x})$ é a energia potencial não perturbada associada à configuração.

Como mencionado anteriormente, a depender do formato da superfície de energia livre ao longo dessa coordenada, determinadas configurações de maior energia podem não ser suficientemente amostradas. Essa questão pode ser abordada via: i) divisão da CR em R janelas que serão tratadas como simulações independentes; ii) adição de um potencial harmônico em cada simulação. Assim, define-se a perturbação $h_i(\zeta)$ em cada janela i como:

$$h_i(\zeta) = \frac{1}{2} K_i (\zeta - \zeta_i^{ref})^2 \quad (90)$$

onde K_i é a constante de força aplicada, e ζ_i^{ref} é a coordenada de referência, no centro da janela i .

A energia potencial enviesada de cada janela $U_i(\mathbf{x}, \zeta)$ é escrita segundo:

$$U_i(\mathbf{x}, \zeta) = U_0(\mathbf{x}) + h_i(\zeta) \quad (91)$$

Logo, a distribuição de probabilidades enviesada, oriunda de simulações considerando a energia potencial da equação (91):

$$\begin{aligned} P_i(\zeta) &= \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U_i(\mathbf{x}, \zeta)}}{\int d\mathbf{x} e^{-\beta U_i(\mathbf{x}, \zeta)}} \\ &= \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta [U_0(\mathbf{x}) - h_i(\zeta)]}}{\int d\mathbf{x} e^{-\beta [U_0(\mathbf{x}) - h_i(\zeta)]}} \\ &= \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] w_i(\zeta) e^{-\beta U_0(\mathbf{x})}}{\int d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] w_i(\zeta) e^{-\beta U_0(\mathbf{x})}} \end{aligned} \quad (92)$$

Tal que

$$w_i(\zeta) = e^{-\beta h_i(\zeta)} \quad (93)$$

Para obter o PMF real ao longo da coordenada de reação, torna-se necessário escrever a distribuição de probabilidades não enviesada, a partir das distribuições de probabilidades do ensemble perturbado fornecidas pelo método de US. Reescrevemos a equação (88):

$$P_0(\zeta) = \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U_0(\mathbf{x})} e^{-\beta h(\zeta)} e^{\beta h(\zeta)}}{\int d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U_0(\mathbf{x})} e^{-\beta h(\zeta)} e^{\beta h(\zeta)}}$$

Pela definição de $U(\mathbf{x}, \zeta)$,

$$P_0(\zeta) = \frac{\int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{\beta h(\zeta)} e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}}{\int d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{\beta h(\zeta)} e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}} \quad (94)$$

$$P_0(\zeta) = \frac{e^{\beta h(\zeta)} \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}}{\int e^{\beta h(\zeta)} d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}}$$

$$P_0(\zeta) = \frac{e^{\beta h(\zeta)} \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}}{\int e^{\beta h(\zeta)} d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}} \times \frac{\int d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}}{\int d\zeta \int d\mathbf{x} \delta[\zeta'(\mathbf{x}) - \zeta] e^{-\beta U(\mathbf{x}, \zeta)}} \quad (95)$$

$$P_0(\zeta) = \frac{e^{\beta h(\zeta)} P(\zeta)}{\langle e^{\beta h(\zeta)} \rangle_{vies}}$$

WHAM: WEIGHTED HISTOGRAM ANALYSIS METHOD

WHAM é uma estratégia desenvolvida para estimar o quanto a energia livre é alterada, quando se altera algum parâmetro da simulação, como por exemplo o viés aplicado. Assim, é possível combinar as diversas simulações independentes, e recuperar o PMF. O método se baseia em duas equações principais, (96) e (97) abaixo, que são resolvidas iterativamente até que sejam autoconsistentes, a menos de um erro pré estabelecido. (Kästner, 2009; Kumar et al., 1992)

$$P_0(\zeta) = \frac{\sum_{i=1}^R n_i(\zeta) P_i(\zeta)}{\sum_{j=1}^R n_j e^{-\beta[h_j(\zeta) - F_j]}} \quad (96)$$

e

$$e^{-\beta F_i} = \int d\zeta e^{-\beta h_i(\zeta)} P_0(\zeta) \quad (97)$$

Tal que n_i é o número de vezes que a coordenada correspondente à janela i foi amostrada, $P_i(\zeta)$ é a probabilidade como definida na equação (92) e F_i é a energia do viés utilizado para acelerar a

amostragem.

II.3.4 Sobreposição sítio-específica da amostragem de FEP nas conformações F e A

Cálculos de FEP foram realizados nos sítios, definidos via análise de *docking*, nas conformações abertas e fechadas de Kv1.2. Quis-se assegurar que as diferenças de energia de ligação entre sítios equivalentes em diferentes conformações do receptor são devidas a diferenças de afinidade conformação-dependente e não a falhas na amostragem ou amostragens divergentes. Para tanto, realizou-se uma análise sítio a sítio da sobreposição da distribuição das moléculas de sevoflurano durante as trajetórias de FEP nas conformações **F** e **A** do canal. A trajetória de FEP, e não a distribuição de soluções de *docking*, foi utilizada pois é nessa simulação que efetivamente as energias livres de ligação são calculadas.

Assim, a sobreposição entre a distribuição A e B dos centros de massa do sevoflurano ao longo das trajetórias na conformação fechada e aberta foi calculada segundo proposto em Hess, 2002, como um menos a diferença entre as matrizes de covariância A e B dividido pela raiz quadrada da soma de seus traços (Hess, 2002):

$$o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j) = 1 - \frac{\sqrt{\text{tr}((\mathbf{A}_j^{1/2} - \mathbf{B}_j^{1/2})^2)}}{\sqrt{\text{tr} \mathbf{A}_j + \text{tr} \mathbf{B}_j}} \quad (98)$$

tal que \mathbf{A}_j e \mathbf{B}_j são as matrizes de covariância relativas ao sítio j nas conformações fechada e aberta, respectivamente. Cada uma é determinada como uma matriz 3x3 (x, y e z) da covariância do centro de massa \mathbf{R}_j do sevoflurano durante a trajetória de FEP, segundo equação 99.

$$\mathbf{X}_j = \langle (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle) \cdot (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle)^T \rangle \quad (99)$$

A fim de comparar a distribuição do ligante em duas conformações proteicas distintas, a posição média de referência $\langle \mathbf{R}_j \rangle$ foi escolhida como a média entre os centros geométricos dos resíduos que compõem o sítio em ambas conformações, após a eliminação da rotação e translação entre as estruturas por meio da sobreposição dos segmentos majoritariamente estáticos S1, S2, S3 e hélice P.

II.4 PROTOCOLOS

II.4.1 Protocolo Geral de Simulação

Todas as simulações realizadas foram conduzidas no programa de dinâmica molecular NAMD2.9.(Phillips et al., 2005) Algoritmos adequados foram empregados para manter constantes a temperatura e a pressão a 27°C e 1 atm, respectivamente. Condições periódicas de contorno (PBC) foram aplicadas a fim de evitar efeitos de borda nos limites do sistema. Integração das equações de movimento foi feita por um algoritmo de Verlet modificado. A fim de utilizar um passo de integração de 2 fs, as ligações e ângulos entre hidrogênios e demais átomos do sistema foram mantidas rígidas, assumindo os valores de equilíbrio determinados pelo arquivo de parâmetros, pelo algoritmo ShakeH. Interações de curto e longo alcance foram computadas a cada 1 e 2 passos de integração, respectivamente. Interações eletrostáticas foram tratadas pelo algoritmo PME (do inglês, *Particle mesh Ewald*).(Darden et al., 1993) Em todas as situações, o campo de força empregado foi CHARMM36 para proteínas, água e lipídios.(Huang and MacKerell, 2013) O campo de força do anestésico geral sevoflurano foi desenvolvido e publicado por Barber et al. (Barber et al., 2012b) As proteínas transmembrânicas são inseridas em uma bicamada do fosfolipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e moléculas de água são descritas pelo modelo TIP3P.(Jorgensen et al., 1983)

As estruturas do canal iônico Kv1.2 em suas conformações aberta e fechada foram adquiridas de Delemotte et. al.(Delemotte et al., 2011) Esse modelo é proveniente de uma longa estabilização da estrutura cristalográfica do canal.(Long et al., 2005a; Treptow and Tarek, 2006b) As figuras de sistemas moleculares foram feitas com o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD).(Humphrey et al., 1996)

II.4.2 *Docking* Molecular

Tanto na conformação aberta quanto na fechada de Kv1.2, 120 estruturas foram aleatoriamente selecionadas dos últimos 6 ns de trajetória de equilíbrio. Estas foram usadas como receptor nas buscas de *docking*. A prática tem o objetivo de considerar as modificações e flutuações conformacionais da estrutura do receptor, especialmente cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, de forma eficiente. As estruturas geradas foram utilizadas na busca de sítios de

ligação com o programa de *docking* molecular AutoDock Vina. Para cada estrutura do canal, o espaço de busca por soluções compreendeu toda a proteína. Definiu-se o parâmetro de *exhaustiveness* igual a 400, e as ligações covalentes do sevoflurano foram consideradas flexíveis.

As diferentes poses dos ligantes associados à proteína, ou soluções, são classificadas segundo o critério de *scoring function* do programa AutoDock Vina. As 50 melhores soluções segundo o algoritmo foram analisadas, somando 6000 soluções de *docking* para o estado aberto e 6000 para o estado fechado de Kv1.2. As poses encontradas são agrupadas em um mesmo sítio de ligação se distam de até 4Å umas das outras e apresentam pelo menos 80% de similaridade nos contatos com resíduos da proteína.

A fim de verificar se dois ligantes poderiam ser acomodados em um mesmo sítio, o conjunto de complexos proteína-ligante gerado pelo primeiro ciclo de *docking* é utilizado como estrutura inicial para uma nova rodada de buscas, com os mesmos parâmetros da primeira. Considera-se que há dupla ocupância se o sítio, de volume fixo definido na primeira rodada, é capaz de acomodar duas moléculas concomitantemente.

II.4.3 Free Energy Perturbation (FEP)

A fim de melhorar a amostragem, bem como para verificar a convergência dos cálculos, foram realizadas duas réplicas de pelo menos duas simulações independentes em cada sítio. As energias obtidas por esses cálculos independentes foram combinadas e os erros calculados via SOS (cf. II.3.3.1).

Cada cálculo foi estratificado em 100 janelas. Em cada janela são amostrados 1.000 passos de integração que são descartados como equilíbrio e 30.000 passos de coleta efetiva. Um total de 6,4 ns é amostrado por cálculo de FEP, por sítio. Demais parâmetros relevantes para reprodução dos cálculos são indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros computacionais dos cálculos de FEP.

alchVdwLambdaEnd	alchElecLambdaStart	alchVdWShiftCoeff	alchDecouple
1,0	0,5	7,0	on

Para assegurar que as transformações fossem realizadas em estados bem definidos, um potencial harmônico foi aplicado ao centro de massa do ligante, com constante de força k_i

variável, de acordo com a flutuação da molécula em cada sítio. Para cada sítio encontrado, as energias de ligação são calculadas com base no ciclo termodinâmico mostrado na Figura 15. Os cálculos de energia do desacoplamento do ligante em água foram realizados independentemente em sistema ortorrômbico de lado 30Å, 50Å e 60Å. Em todos os casos, as energias foram semelhantes.

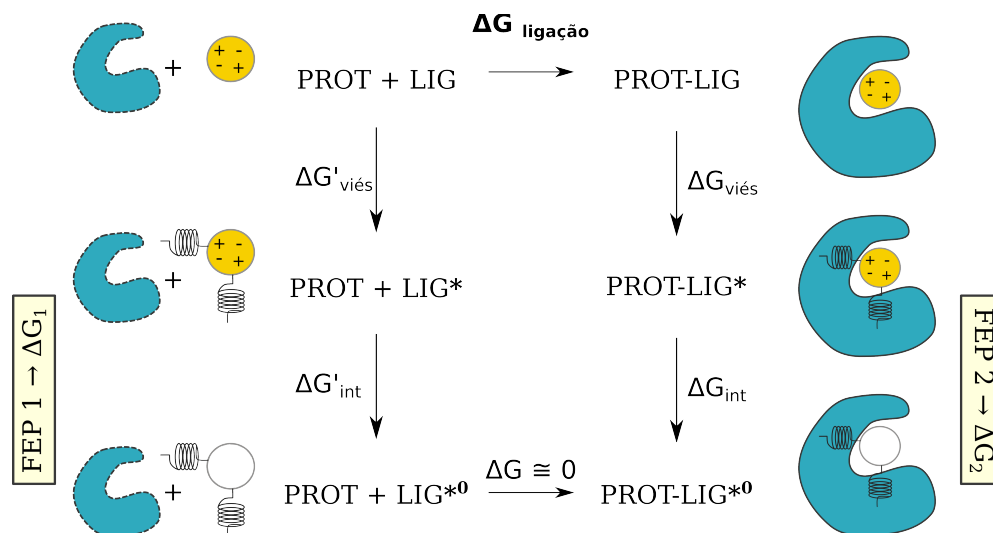


Figura 15. **Ciclo termodinâmico empregado nos cálculos de FEP para obtenção da energia livre de ligação ($\Delta G_{\text{ligação}}$).** No lado esquerdo do ciclo: ligante (amarelo) livre em solução com todas suas interações ligadas. Interação de van der Waals é representada pela cor da esfera, e eletrostática pelas cargas desenhadas na molécula. A molécula é restrita a uma posição bem definida do espaço pela adição de um viés (lig*). Na sequência, suas interações com o meio são desligadas (esfera branca, lig*⁰). Essa quantidade está relacionada ao potencial químico da molécula. **À direita**, os mesmos passos são seguidos, porém para a molécula ligada à proteína. A energia referente à adição do viés é calculada analiticamente, e demais diferenças de energia computadas via FEP. A variação de energia livre de ligação $\Delta G_{\text{ligação}}$, referente à transição solvente \rightarrow sítio de ligação é, portanto, calculada pela soma das contribuições:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = (\Delta G'_{\text{viés}} + \Delta G'_{\text{int}}) - (\Delta G_{\text{viés}} + \Delta G_{\text{int}})$$

II.4.4 Umbrella Sampling

Simulações de dinâmica molecular associadas ao método de *umbrella sampling* foram empregadas para investigar e propor um modelo do estado não condutor de Kv1.2, com base na estrutura cristalográfica de KcsA resolvida a baixas concentrações de K⁺ (PDB: 1K4D, cf. II.1.3.2). Para tanto, definiu-se uma coordenada de reação tridimensional, a saber: a distância entre os C α do resíduo de glicina 345 das subunidades 1 e 3; a distância entre os C α do resíduo de glicina 345 das subunidades 2 e 4; e a posição axial transmembrânica (z) de um íon K⁺, em relação ao centro geométrico dos resíduos de glicina 345 (Figura 26). Essa escolha se justifica, pois na estrutura de KcsA com filtro de seletividade não-condutor, há uma aproximação das glicinas correspondentes

(Gly 77), que impede a passagem de íons através da estrutura.

A fim de amostrar a coordenada, foram geradas 14 janelas para cada coordenada radial, e 9 janelas para a posição axial do íon. Em ambos casos, as janelas foram definidas em intervalos de 0,5 Å, totalizando 126 janelas ou simulações independentes. Cada trajetória foi simulada por 15 ns, sendo os primeiros 5 descartados como equilíbrio. Ao todo, 1260 ns de coleta foram amostrados. Para as análises, considerou-se a média entre as distâncias entre os pares de C α do resíduo Gly345.

II.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme discutido no capítulo II.1.4.3, o haloéter sevoflurano é capaz de modular o canal iônico dependente de voltagem Kv1.2. De forma geral, a ligação de sevoflurano potencializa a condução de Kv1.2. Seus efeitos nas medidas de eletrofisiologia do canal incluem deslocamento da curva de condutância por voltagem para a esquerda, bem como o aumento da condutância máxima.

Dentro do contexto da teoria alostérica, pode-se entender a potenciação ou inibição observada experimentalmente em canais iônicos, dada a interação com pequenos ligantes, como a estabilização de conformações específicas pela ligação da molécula.(Liang et al., 2015) Assim, para que o anestésico altere o comportamento do canal, preconiza-se que, em cada uma das conformações acessíveis à proteína, o ligante interaja com afinidades distintas a determinados sítios.

Particularmente no caso da potenciação de Kv1.2 por sevoflurano, é esperado que o ligante interaja com maior afinidade e estabilize a conformação aberta, em detrimento da conformação fechada. Em um esforço para compreender os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados em estudos de neuro e eletrofisiologia (cf. II.1.4.3), propõe-se aqui elucidar se há ou não dependência conformacional na interação de sevoflurano com o conjunto de conformações de Kv1.2 bem caracterizadas(Stock et al., 2013) $X \equiv \{F, A\}$, fechada e aberta respectivamente, e quantificar o efeito dessa ligação diferencial no equilíbrio entre as conformações. Alternativamente colocado, quer-se avaliar quanto do efeito medido experimentalmente pode ser recuperado por um modelo mínimo de dois estados, no contexto do desenvolvimento teórico apresentado na parte I. Na prática, resolver o problema da modulação envolve:

1. Demonstrar a ligação do anestésico às diferentes conformações do CI;
2. Predizer, a partir de primeiros princípios, qual o efeito da ligação no equilíbrio $F \leftrightarrow A$;
3. Quantificar o impacto funcional da ligação do modulador de forma comparável às medidas experimentais conhecidas.

Para tanto, o formalismo apresentado no capítulo I.4. foi empregado. Particularmente aqui, o sistema é composto de um canal iônico (receptor, R) fixo no centro do sistema de coordenadas, inserido em uma bicamada lipídica hidratada. Imersos nesse sistema também estão N moléculas idênticas de sevoflurano (ligante). Considera-se ainda que o sistema é diluído e está em equilíbrio

termodinâmico.

II.5.1 Sevoflurano se liga a múltiplos sítios em Kv1.2

II.5.1.1 Sítios de ligação a sevoflurano

O primeiro passo necessário ao tratamento desse problema hierárquico consiste em conhecer os sítios de ligação de sevoflurano a Kv1.2, bem como sua distribuição local em cada sítio. Para tanto, desenvolveu-se um procedimento a fim de definir sítios para condições de saturação até $n_j^{\max}=2$. A estratégia baseou-se na combinação de buscas de *docking* molecular, seguidas pela caracterização da energia de ligação por cálculos de energia livre, particularmente Free Energy Perturbation (FEP). Enquanto as buscas de *docking* são realizadas apenas com a proteína despida de sua membrana e solvente, os cálculos de FEP são realizados com o sistema molecular completo.

A identificação de potenciais sítios de interação de sevoflurano a Kv1.2 e suas distribuições locais foi feita com auxílio do programa de ancoragem molecular AutoDock Vina (cf. capítulo II.3.2). Para cada uma das conformações consideradas (i.e. aberta e fechada), 120 estruturas retiradas aleatoriamente de trajetórias após equilíbrio foram utilizadas para buscas de *docking*, a fim de levar em consideração a flutuação das cadeias laterais dos aminoácidos do receptor. De cada resultado independente, selecionou-se as 50 melhores poses classificadas pelo algoritmo do programa, totalizando 6000 poses por estado do CI. Em seguida, as poses selecionadas foram agrupadas em possíveis sítios de ligação segundo critérios definidos a seguir. Um resíduo de aminoácido é dito em contato com sevoflurano se eles estão distantes em até 4Å. Assim, a partir da análise dos resíduos de aminoácido interagindo com cada solução de *docking*, poses com pelo menos 80% de similaridade nos contatos com resíduos proteicos, e que se encontrem a 4Å de distância uma da outra foram classificadas como pertencentes ao mesmo sítio de ligação. Segundo esse critério, foram definidos 21 potenciais sítios j com volume definido δV_j , quais sejam: no interior do domínio sensor de voltagem (VSD); nas proximidades da hélice S4S5-linker que conecta o domínio sensor de voltagem ao poro (S4S5linker); na interface entre a hélice S4 e o poro (S4Poro); na interface entre hélice S6 e hélice do poro (S6P-helix); na face extracelular, próxima ao filtro de seletividade (Ext face); e na cavidade central (CC); Figura 16. Por se tratar de uma proteína homotetramérica, há quatro repetições de cada sítio, exceto para o da cavidade central. Conforme pode ser observado na figura 16, alguns sítios estão presentes em uma conformação do canal, mas não na outra, e.g. sítio da face extracelular presente nas quatro subunidades da conformação aberta e somente em duas da fechada.

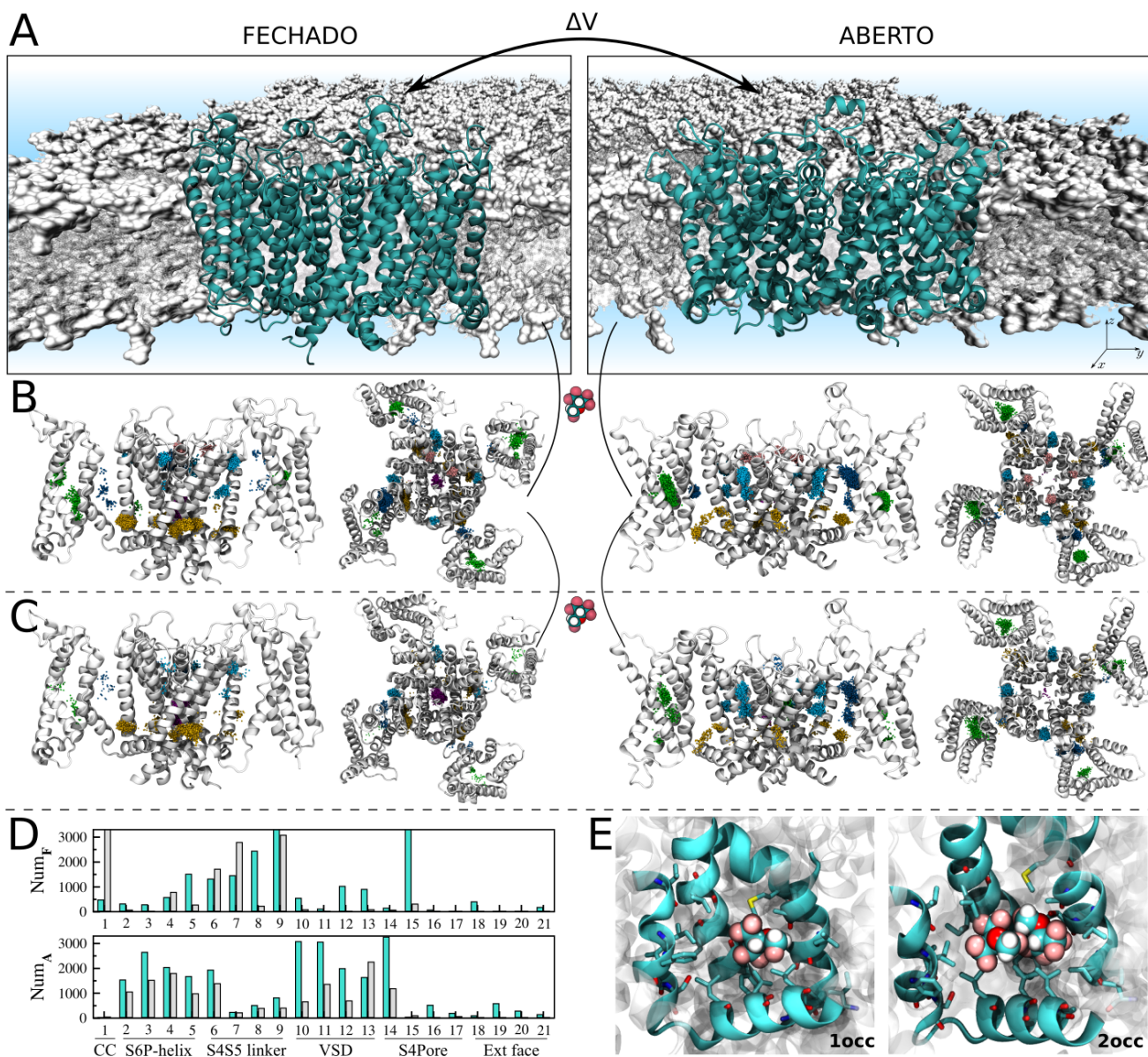


Figura 16. Identificação de sítios de ligação via Docking Molecular de sevoflurano nas conformações aberta e fechada de Kv1.2. (A) Representação do sistema molecular com Kv1.2 equilibrado e inserido em bicamada fosfolipídica de POPC hidratada. F e A: conformações fechada e aberta, respectivamente. (B) Poses de docking encontradas para busca de ocupância simples. A estrutura média de cada umas das conformações F e A é mostrada em branco. Para melhor visualização, apenas duas subunidades de VSD são mostradas. Os centros geométricos de sevoflurano são mostrados como pontos agrupados e coloridos por sítios: domínio sensor de voltagem ou VSD (verde), S4S5linker (amarelo), interface S4Poro (azul escuro), interface S6P-helix (azul claro), face extracelular (rosa) e cavidade central, CC (roxo). (C) Poses de docking após a segunda rodada de buscas. Cada um dos sítios anteriores é dito como tendo dupla ocupância se o volume do sítio δV_i é capaz de acomodar duas moléculas de sevoflurano. (D) Número de poses de docking para ocupância simples (1occ) e dupla (2occ), em ciano e cinza, respectivamente. (E) Imagem representativa de interação molecular encontrada pelo algoritmo de docking.

A possibilidade de dupla ocupância foi tratada submetendo o conjunto de complexos proteína-ligante, gerado pelo primeiro ciclo de *docking*, a uma nova rodada de buscas. Um sítio j apresenta dupla ocupância se seu volume δV_j , definido na primeira rodada, é capaz de acomodar duas moléculas de sevoflurano concomitantemente. Somou-se um total de 13.000 poses de segunda ocupância por conformação.

II.5.1.2 Energia livre de ligação e constantes de equilíbrio

A partir dos sítios e ocupância máxima identificados pela análise de *docking*, há um limite superior de 2×3^{21} estados da proteína ligada, $O_X(n_1, \dots, n_s)$, potencialmente capazes de contribuir para os efeitos mensurados de sevoflurano em Kv1.2. Com o objetivo de avaliar quantitativamente a afinidade do ligante por cada um dos sítios e conseqüentemente a sua relevância no mecanismo de modulação direta do canal, a energia livre de ligação do anestésico aos sítios foi calculada via FEP (cf. método: II.3.3.1 ; protocolo: II.4.3) utilizando os parâmetros (CHARMM) para sevoflurano desenvolvidos por Barber *et al.* (Barber *et al.*, 2014).

Os cálculos de FEP foram realizados considerando sítios iguais em subunidades diferentes como distintos. Todas as simulações de FEP partiram de configurações iniciais aleatórias dentro o subconjunto de poses de *docking* pertencentes a um sítio, porém levando em consideração o sistema molecular composto por canal iônico equilibrado na membrana, ligante, solvente e íons. No intuito de aprimorar a estatística e avaliar a convergência dos cálculos de energia livre, no mínimo duas réplicas de cada configuração inicial foram simuladas. Além disso, para a maioria dos sítios, duas ou mais configurações independentes foram simuladas. As energias das réplicas foram combinadas e seu erro associado determinado utilizando respectivamente as equações 86 e 87 do algoritmo de Simple Overlap Sampling (SOS, cf. tópico II.3.3.1). O tempo total de simulação, considerando as trajetórias de FEP para ocupância simples e dupla, em ambas conformações (**F** e **A**), somou aproximadamente 2 μ s.

Em detalhes, para o cálculo de FEP da variação de energia livre $\mathcal{W}_X^*(1_j)$ referente à ligação de um sevoflurano no sítio j do canal na conformação $X \equiv \{\mathbf{F}, \mathbf{A}\}$, é realizada uma simulação na qual o ligante é acoplado reversivelmente a um sítio vazio (cf. II.3.3.1). Já para o caso da dupla ocupância, $\mathcal{W}_X^*(2_j)$ é computado em duas etapas: primeiramente pelo cálculo de $\mathcal{W}_X^*(1_j)$, seguido da ligação do segundo anestésico em um sítio já ocupado pelo ligante, i.e. $\mathcal{W}_X^*(2_j|1_j)$. Por

se tratar de uma função de estado, é possível estimar $\mathcal{W}_X^*(2_j)$ de maneira que $\mathcal{W}_X^*(2_j) = \mathcal{W}_X^*(1_j) + \mathcal{W}_X^*(2_j|1_j)$.

Aqui, $\mathcal{W}_X^*(1_j)$ e $\mathcal{W}_X^*(2_j)$ indicam a variação de energia livre de ligação de um e dois anestésicos na presença de um viés (*) que restringe o volume disponível para o ligante conforme suas interações não-ligadas são desacopladas. Esse recurso assegura que o sistema permaneça em um estado bem definido durante a trajetória. Naturalmente, a restrição aplicada influencia o volume efetivo amostrado na simulação de FEP e, conseqüentemente, a variação de energia livre de ligação calculada para determinado sítio j . Conforme mencionado no tópico I.4.2., e explorado com detalhes no artigo de Roux *et al.*, (Roux *et al.*, 1996) a escolha do viés, na forma de um potencial harmônico, que menos interfere no cálculo da variação de energia livre, utiliza como parâmetros a posição média de equilíbrio dos n_j ligantes no sítio j , $\langle \mathbf{R}_X(n'_j) \rangle$, e suas respectivas flutuações quadráticas médias, $\langle [\delta \mathbf{R}_X(n'_j)]^2 \rangle$, tal que as constantes de força aplicadas $k_X(n'_j)$ sejam:

$$k_X(1_j) = \frac{3\beta^{-1}}{\langle [\delta \mathbf{R}_X(1_j)]^2 \rangle}, \dots, k_X(n_j) = \frac{3\beta^{-1}}{\langle [\delta \mathbf{R}_X(n_j)]^2 \rangle}$$

Tais parâmetros foram aqui estimados a partir do espaço de poses de *docking*. As constantes de força resultantes variam entre 0,03 e 1,4 kcal.mol⁻¹.Å⁻² e estão indicadas nas tabelas 3 e 4.

Os cálculos de FEP realizados fornecem a variação de energia livre associada à transferência do ligante da fase gasosa para o sítio de ligação. Para conhecer esse valor relativo à transferência do anestésico do banho para o sítio em questão, utiliza-se o ciclo termodinâmico ilustrado na Figura 15. Segundo essa estratégia, a variação de energia livre gás → banho, quando se acoplam as interações do ligante em água, é somada à variação de energia gás → sítio, de acoplamento do ligante no sítio. A variação de energia livre relativa à transferência gás → água, calculada conforme descrito no tópico II.4.3, somou 0,1 kcal.mol⁻¹. Essa quantidade se traduz como o excesso de potencial químico do ligante na equação (18).

O conjunto de energias livre e constantes de ligação derivadas das simulações de FEP podem ser analisadas nas tabelas 3 e 4 abaixo:

Tabela 3: Energias e constantes de ligação de uma e duas moléculas de sevoflurano ao sítio j na conformação **fechada** de Kv1.2.[#]

	Sítio	$k_F(1_j)$	$\mathcal{W}_F^*(1_j) \pm \epsilon$	$K_F(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$	$\Delta G_F^o(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$	$k_F(2_j)$	$\mathcal{W}_F^*(2_j 1_j) \pm \epsilon$	$\mathcal{W}_F^*(2_j) \pm \epsilon$	$K_F(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$	$\Delta G_F^o(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$
CC	1	0,238	-5.4 ± 0.2	2,84E-01	-3,3	0,238	-5.0 ± 0.3	-10.4 ± 0.5	2,06E-02	-5,9
	2	0,069	-6.1 ± 0.3	5,93E+00	-5,2	0,080	-4.5 ± 0.2	-10.6 ± 0.5	1,01E+00	-8,2
S6P-helix	3	0,093	-5.3 ± 0.2	9,89E-01	-4,1	-	-	-	-	-
	4	0,171	-6.0 ± 0.2	1,29E+00	-4,2	0,144	-4.8 ± 0.2	-10.8 ± 0.4	1,49E-01	-7,1
	5	0,044	-4.4 ± 0.3	6,54E-01	-3,8	0,107	-4.4 ± 0.2	-8.8 ± 0.5	6,19E-02	-6,5
	6	0,052	-3.9 ± 0.3	2,25E-01	-3,2	0,063	-6.3 ± 0.2	-10.2 ± 0.5	1,00E+00	-8,2
S4S5linker	7	0,069	-6.1 ± 0.2	5,89E+00	-5,1	0,239	-7.1 ± 0.3	-13.2 ± 0.5	1,34E+01	-9,7
	8	0,244	-8.0 ± 0.2	2,20E+01	-5,9	0,103	-6.0 ± 0.2	-14 ± 0.4	2,97E+01	-10,2
	9	0,058	-6.4 ± 0.2	1,26E+01	-5,6	0,059	-6.7 ± 0.2	-13.1 ± 0.4	1,19E+02	-11,0
VSD	10	0,047	-1.6 ± 0.4	5,41E-03	-1,0	0,055	-3.7 ± 0.3	-5.3 ± 0.7	3,81E-04	-3,5
	11	0,049	-4.4 ± 0.2	5,57E-01	-3,7	0,147	-2.6 ± 0.3	-7.0 ± 0.5	1,34E-03	-4,3
	12	0,703	-5.5 ± 0.3	6,63E-02	-2,5	-	-	-	-	-
	13	0,034	-3.0 ± 0.3	9,35E-02	-2,7	0,025	-3.9 ± 0.3	-6.9 ± 0.6	3,44E-02	-6,2
S4Pore	14	0,106	-7.6 ± 0.2	3,92E+01	-6,3	0,098	-7.3 ± 0.2	-14.9 ± 0.4	5,03E+02	-11,9
	15	0,293	-5.4 ± 0.2	2,08E-01	-3,2	0,150	-5.4 ± 0.3	-10.8 ± 0.5	5,52E-02	-6,5
	16	0,047	-3.5 ± 0.4	1,30E-01	-2,9	-	-	-	-	-
	17	0,047	-0.8 ± 0.3	1,37E-03	-0,2	-	-	-	-	-
Ext face	18	1,356	3.2 ± 0.7	1,05E-08	6,8	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	1,272	1.3 ± 0.5	2,85E-07	4,8	-	-	-	-	-

[#]Unidades de constante de força $k_F(1_j)$, $\mathcal{W}_F^*(1_j) \pm \epsilon$, $K_F(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$ e $\Delta G_F^o(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$ são respectivamente kcal/mol/Å², kcal/mol, mM⁻¹ e kcal/mol. Para dupla ocupância, as unidades de $k_F(2_j)$, $\mathcal{W}_F^*(2_j) \pm \epsilon$, $K_F(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$ e $\Delta G_F^o(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$ são kcal/mol/Å², kcal/mol, mM⁻² e kcal/mol.

Tabela 4: Energias e constantes de ligação de uma e duas moléculas de sevoflurano ao sítio j na conformação **aberta** de Kv1.2. As mesmas nomenclaturas e unidades da Tabela 3 são empregadas.

	Sítio	$k_A(1_j)$	$\mathcal{W}_A^*(1_j) \pm \epsilon$	$K_A(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$	$\Delta G_A^o(0_1 \dots 1_j \dots 0_n)$	$k_A(2_j)$	$\mathcal{W}_A^*(2_j 1_j) \pm \epsilon$	$\mathcal{W}_A^*(2_j) \pm \epsilon$	$K_A(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$	$\Delta G_A^o(0_1 \dots 2_j \dots 0_n)$
CC	1	0,238	-4.1 ± 0.2	3,17E-02	-2,0	0,238	-5.6 ± 0.2	-9.7 ± 0.2	6,31E-03	-5,2
	2	0,243	-4.5 ± 0.2	6,02E-02	-2,4	0,155	-6.7 ± 0.2	-11.2 ± 0.4	1,46E-01	-7,1
S6P-helix	3	0,283	-4.7 ± 0.2	6,74E-02	-2,5	0,144	-4.8 ± 0.2	-9.5 ± 0.4	7,41E-03	-5,3
	4	0,253	-5.7 ± 0.2	4,29E-01	-3,6	0,142	-6.3 ± 0.2	-12 ± 0.4	6,01E-01	-7,9
	5	0,108	-3.8 ± 0.3	6,27E-02	-2,5	0,140	-5.1 ± 0.3	-8.9 ± 0.6	1,19E-02	-5,6
	6	0,045	-6.4 ± 0.2	1,84E+01	-5,8	0,105	-8.1 ± 0.2	-14.5 ± 0.4	8,49E+02	-12,2
S4S5linker	7	0,127	-7.8 ± 0.3	4,17E+01	-6,3	0,158	-7.3 ± 0.2	-15.1 ± 0.5	2,69E+02	-11,5
	8	0,050	-6.9 ± 0.2	3,70E+01	-6,2	0,109	-6.1 ± 0.2	-13 ± 0.4	5,55E+01	-10,6
	9	0,033	-6.7 ± 0.3	4,86E+01	-6,4	0,072	-5.2 ± 0.2	-11.9 ± 0.5	2,94E+01	-10,2
VSD	10	0,070	-3.5 ± 0.3	7,28E-02	-2,5	0,371	-2.7 ± 0.2	-6.2 ± 0.5	5,59E-05	-2,4
	11	0,112	-1.4 ± 0.4	1,04E-03	0,0	0,117	-1.3 ± 0.4	-2.7 ± 0.8	4,25E-07	0,5
	12	0,139	-3.3 ± 0.3	1,85E-02	-1,7	0,076	-4.7 ± 0.4	-8 ± 0.7	4,50E-03	-5,0
	13	0,111	-4.8 ± 0.3	3,25E-01	-3,4	0,098	-4.0 ± 0.4	-8.8 ± 0.7	1,65E-02	-5,8
S4Pore	14	0,137	-6.1 ± 0.2	2,11E+00	-4,5	0,074	-9.8 ± 0.3	-15.9 ± 0.5	2,92E+03	-12,9
	15	0,118	-2.2 ± 0.3	3,68E-03	-0,8	0,711	-0.5 ± 0.4	-2.7 ± 0.7	2,61E-08	2,2
	16	0,143	-7.9 ± 0.2	4,15E+01	-6,3	-	-	-	-	-
	17	0,113	-5.2 ± 0.2	6,22E-01	-3,8	0,303	-5.2 ± 0.3	-10.4 ± 0.5	4,39E-02	-6,3
Ext face	18	0,530	1.5 ± 0.4	7,57E-07	4,3	-	-	-	-	-
	19	0,453	-0.8 ± 0.4	4,63E-05	1,8	-	-	-	-	-
	20	0,283	-0.8 ± 0.4	9,36E-05	1,4	-	-	-	-	-
	21	0,332	-4.2 ± 0.5	2,28E-02	-1,9	-	-	-	-	-

Como pode ser observado nas tabelas, as constantes de ligação variam de sítio para sítio e entre conformações, estando distribuídas entre 10^{-8} mM^{-1} e 10^3 mM^{-2} . Apesar dessa heterogeneidade, para o estado fechado (**F**) é possível perceber uma tendência de afinidades decrescentes na sequência: interface S4-poro (S4Pore) > S4S5-linker > interface hélice S6 e hélice-P (S6P-helix) > domínio sensor de voltagem (VSD) ~ cavidade central (CC) > face extracelular (Ext face). Diferentemente, para o estado aberto (**A**), a sequência decrescente de afinidades que se destaca é S4S5-linker > S4Pore > S6P-helix > VSD ~ CC > Ext Face. Nota-se que, em casos como no sítio S4S5linker e S4Pore, a constante de ligação para dois anestésicos é ainda maior que aquela da ocupância simples. Tal fato sugere efeitos de saturação mesmo com ocupâncias truncadas em $n_j^{max}=2$. Em contrapartida, para ambas conformações, o sítio da face extracelular próximo ao filtro de seletividade apresenta energias positivas, além de não ser capaz de acomodar dois ligantes. Conclui-se portanto tratar-se de um falso positivo fornecido pelo algoritmo de *docking* molecular.

Ainda a respeito da distinção da interação do ligante com os estados aberto e fechado da proteína, é interessante tentar compreender a afinidade diferencial do sevoflurano por determinados sítios em termos das características físico-químicas de cada deles. Para tanto, analisou-se o final da trajetória de equilíbrio que antecede o cálculo de FEP. Nessa condição, o sistema compreende proteína, ligante, água, íons e lipídios. Ao fim de 6000 passos de minimização e simulação de equilíbrio, observou-se a polaridade de resíduos de aminoácidos próximos ao sevoflurano, bem como a presença de moléculas de água distantes até 5Å do centro geométrico do sítio (Figura 17). Como há mudanças conformacionais na proteína entre os estados **F** e **A**, é possível que essas características sofram alterações. Com a análise, percebe-se que os sítios de maior afinidade (a saber, S4S5linker, S4Pore e S6P-helix) são sítios em geral anfifílicos, desidratados e acessíveis a lipídios. Enquanto os sítios CC, VSD e Ext face são principalmente cavidades polares e/ou amplamente hidratadas.

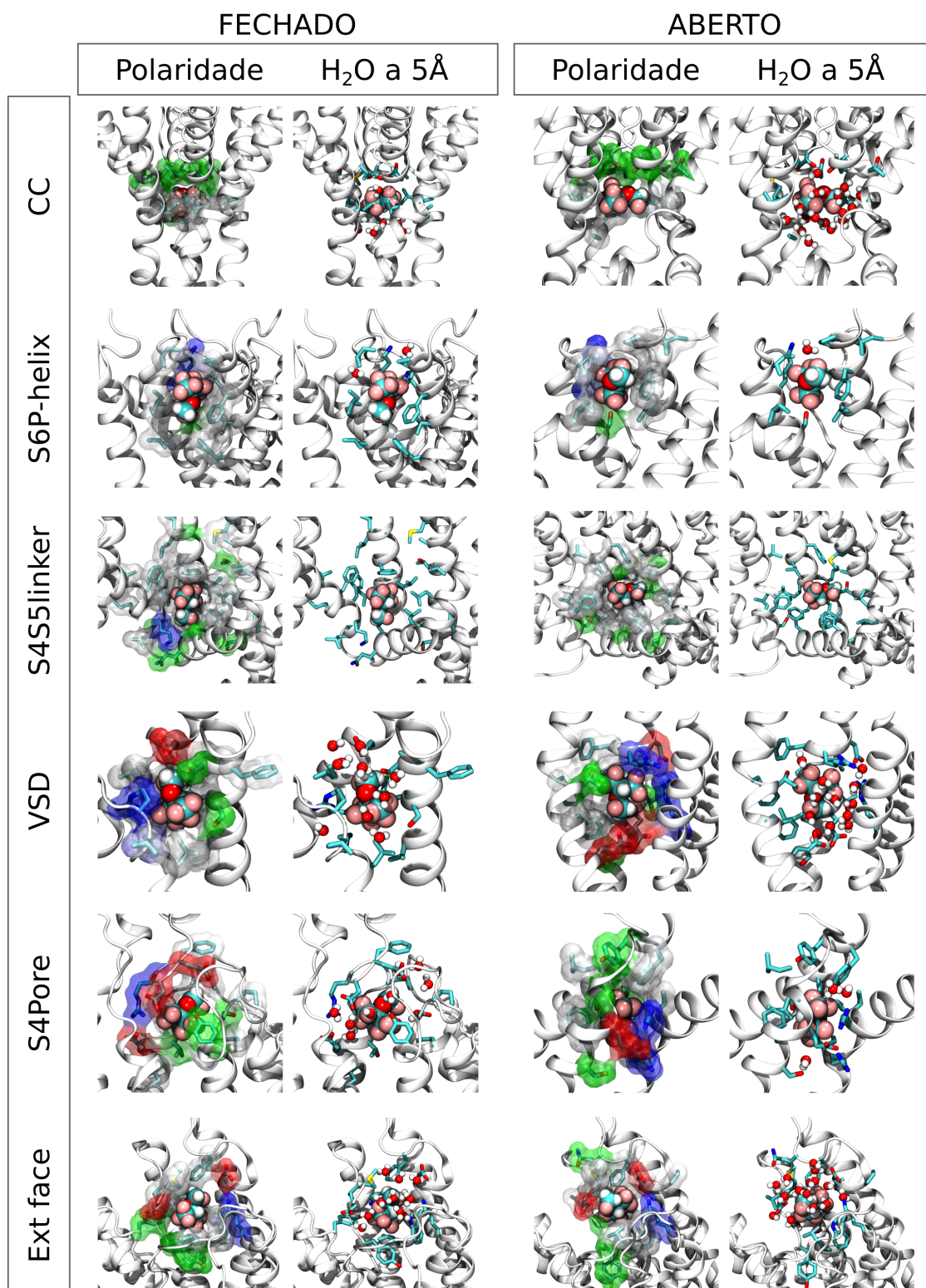


Figura 17. Detalhe das interações moleculares entre sevoflurano e seus sítios de ligação em Kv1.2 nas conformações F (esquerda) e A (direita). De um lado a superfície molecular de cada sítio é colorida por característica físico-química: cinza para resíduos hidrofóbicos, verde para polares não carregados, azul e vermelho para resíduos carregados positivos e negativos, respectivamente. Ao lado de cada superfície, o mesmo sítio é representado, ilustrando todas as moléculas de água em um raio de 5Å do centro do sítio. Imagens dos sistemas moleculares cedidas por Leonardo Cirqueira.

II.5.1.3 Distribuição espacial do ligante nos estados aberto e fechado de Kv1.2

Uma breve análise da distribuição e número de poses de *docking*, bem como das afinidades do ligante pelos sítios, sugere a existência de dependência conformacional na interação de sevoflurano por Kv1.2. Entretanto, em princípio, é difícil garantir que as diferenças sejam oriundas exclusivamente da mudança de conformação $F \leftrightarrow A$. O emprego de *docking* molecular como ferramenta para encontrar sítios de ligação e distribuições locais do ligante nestes, apesar de rápido, não é sem suas limitações (cf. tópico IV.1). Embora a maioria das deficiências do algoritmo tenham sido tratadas, falsos negativos (i.e. falhas do algoritmo de *docking* em encontrar poses em sítios *de facto*) ainda precisam ser melhor explorados. Ainda, as distribuições locais geradas pelo *docking* impactam diretamente o volume efetivo amostrado durante as simulações de FEP ao definirem as constantes de força que agem no ligante em cada sítio. Conquanto soluções alternativas sejam propostas no capítulo IV.1, almeja-se aqui quantificar a dependência conformacional da ligação de sevoflurano em sítios cujas distribuições espaciais amostradas nas trajetórias de FEP sejam comparáveis, embotando a crítica a respeito da qualidade da amostragem. Dessa forma, a presente análise parte de espaços igualmente bem amostrados e define um limite inferior para a possível dependência conformacional da ligação do anestésico. A quantificação da sobreposição (*overlap*) do espaço de coordenadas do ligante foi feita segundo descrito no capítulo II.3.4 e pode ser analisado na Figura 18 abaixo.

Todos os sítios do estado fechado que têm sua contrapartida no estado aberto apresentaram valores de *overlap* próximos ou maiores que 0,5, à exceção do sítio S4Pore nas subunidades 2 e 3 do canal. Nesses dois sítios, a sobreposição entre as distribuições espaciais ficou abaixo de um limiar arbitrário de 0,4 – metade do valor máximo de *overlap* para esse conjunto de dados. Considera-se portanto que, para esses dois sítios, a dependência (ou não-dependência) conformacional nas energias de ligação tem maiores chances de serem frutos de falhas na amostragem do espaço. Para todos os outros sítios porém, a cobertura das trajetórias se sobrepõe em grande parte, servindo como suporte procedente para a hipótese da dependência conformacional.

Além da compatibilidade entre amostragens nos cálculos de energia livre, regiões da proteína que apresentam grandes flutuações estruturais entre os estados F e A são candidatas promissoras, embora não obrigatórias, a sítios com afinidade diferencial por sevoflurano. Assim, o desvio quadrático médio entre as conformações estudadas foi medido, após eliminar translações e rotações entre os sistemas por meio da otimização da sobreposição de segmentos essencialmente estáticos, i.e. hélices S1, S2, S3 e hélice-P. Nessas condições, nota-se que os sítios avaliados se

encontram próximos de regiões que flutuam acima de 4Å entre as conformações aberta e fechada, excetuando-se S6P-helix e Ext face. A distribuição do ligante nas simulações de FEP nas estruturas coloridas segundo a mudança conformacional é mostrada na Figura 18A.

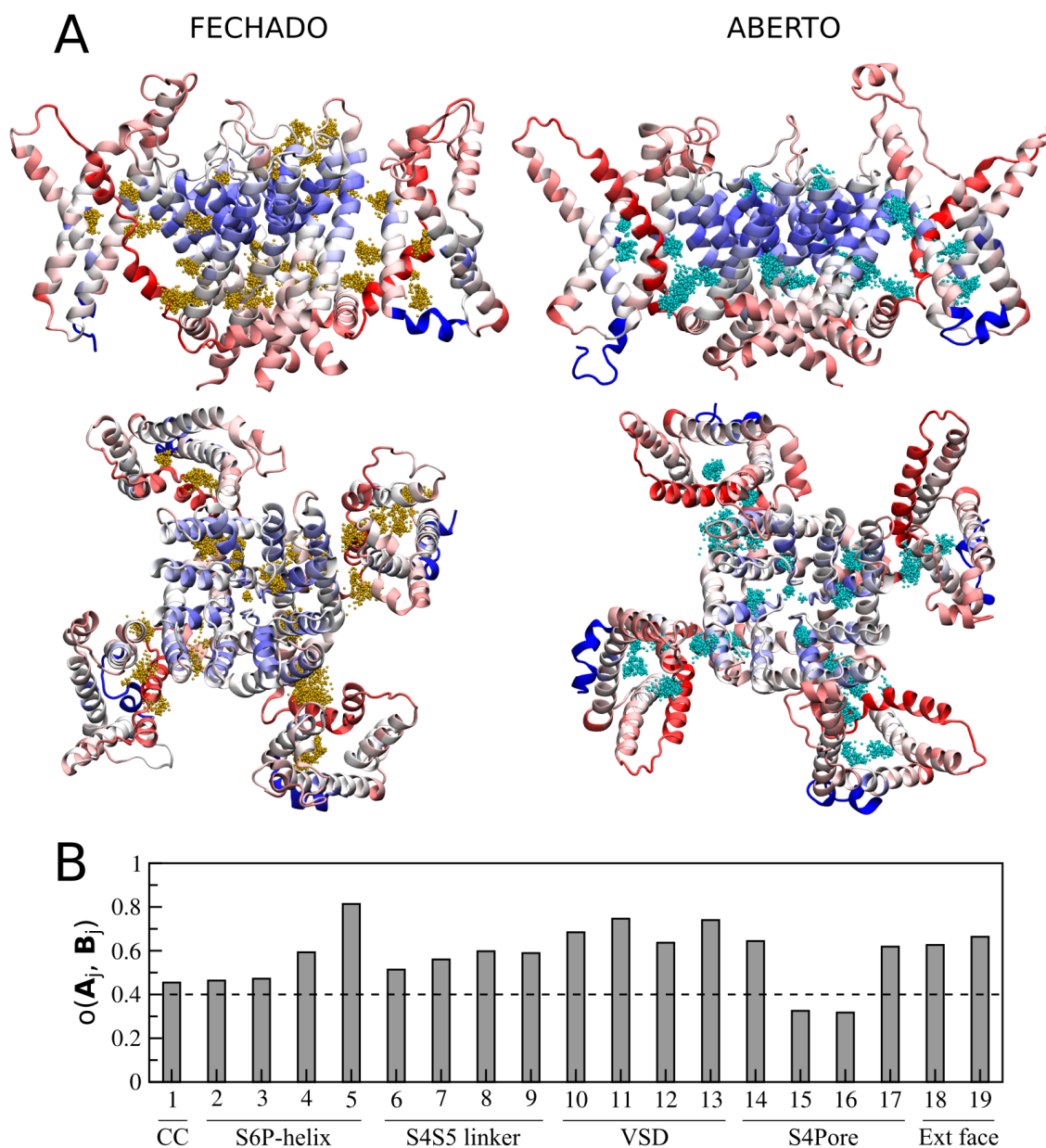


Figura 18. Análise da sobreposição sítio-específica da distribuição dos centros geométricos do ligante. (A) Distribuição das posições amostradas durante simulações de FEP de cada sítio, para 1 e 2 sevofluranos interagindo com estados fechado (pontos laranjas) e aberto (azul claro) de Kv1.2. Apenas os centróides do ligante, representados por pontos, são mostrados. As estruturas de Kv1.2 estão coloridas de acordo com o RMSF entre os estados F e A a fim de indicar regiões flexíveis da proteína. A escala azul-branca-vermelha indica desde regiões virtualmente estáticas (azul) a regiões de flutuação superior a agitação térmica, cujo RMSF >4Å (vermelho). Nota-se que a maioria dos sítios encontrados, à exceção dos sítios S6P-helix e Ext face, se encontram em regiões flexíveis da proteína. (B) Sobreposição sítio-específica da amostragem de FEP nas conformações F e A. A linha tracejada indica o limiar de 0,4 para os valores de sobreposição.

II.5.1.4 Probabilidades de ligação concentração-dependente de sevoflurano a Kv1.2 e efeitos de saturação

De posse das afinidades e constantes de ligação a cada sítio, quis se verificar se sevoflurano é capaz de se ligar ao receptor em concentrações de 1mM, 10mM e 100mM. Para tanto, retoma-se a equação 19, onde a probabilidade de um determinado estado $O_X(n_1, \dots, n_s)$, $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$, é escrita como função das constantes de ligação $K_X(n_1, \dots, n_s)$ e da concentração do ligante no banho $\bar{\rho}^{(n_1 + \dots + n_s)}$. Assim, as constantes de ligação para todos os estados possíveis foram reconstruídas a partir das constantes de ligação de cada sítio individualmente ocupado por 1 ou 2 ligantes. Isso se torna possível ao empregar uma aproximação de sítios independentes, de forma que o cômputo da constante de ligação de cada um dos 3^{21} estados acessíveis é feito a partir do produto de cada constante individual, $K_X(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times K_X(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s)$ (equações 31 e 32). A enumeração e classificação em ordem decrescente dos 10 estados mais prováveis, em função da concentração, em cada uma das conformações de Kv1.2 podem ser analisadas na figura 19.

Mesmo com *overlap* comparável aos demais, para as duas subunidades com poses em ambos estados, o sítio da face extracelular foi desconsiderado nas análises subsequentes em vista da sua baixa afinidade por sevoflurano, como demonstrado por valores de energia positivos e constantes de ligação da ordem de 10^{-7} mM^{-1} .

A 1mM, as probabilidades são amplamente dominadas pelo estado vazio do canal. Apenas uma pequena fração dos estados possíveis apresentam probabilidade não negligenciável, particularmente os sítios S4Pore na conformação fechada, e sítios S4S5liker na conformação aberta. Em contrapartida, a 10 e 100mM há uma maior distribuição das probabilidades entre sítios ocupados por diferentes números de ligantes.

A importância relativa de cada sítio na ligação a sevoflurano é evidenciada pela probabilidade do sítio j estar ligado a n_j moléculas de anestésico, $\rho_X(n_j)$, em cada uma das concentrações analisadas, Figura 20. Essa quantidade é obtida pelo somatório das probabilidades de estado $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ que satisfazem a condição de apresentar n_j ligantes no sítio j (cf. equação (22), tópico I.4.4.)

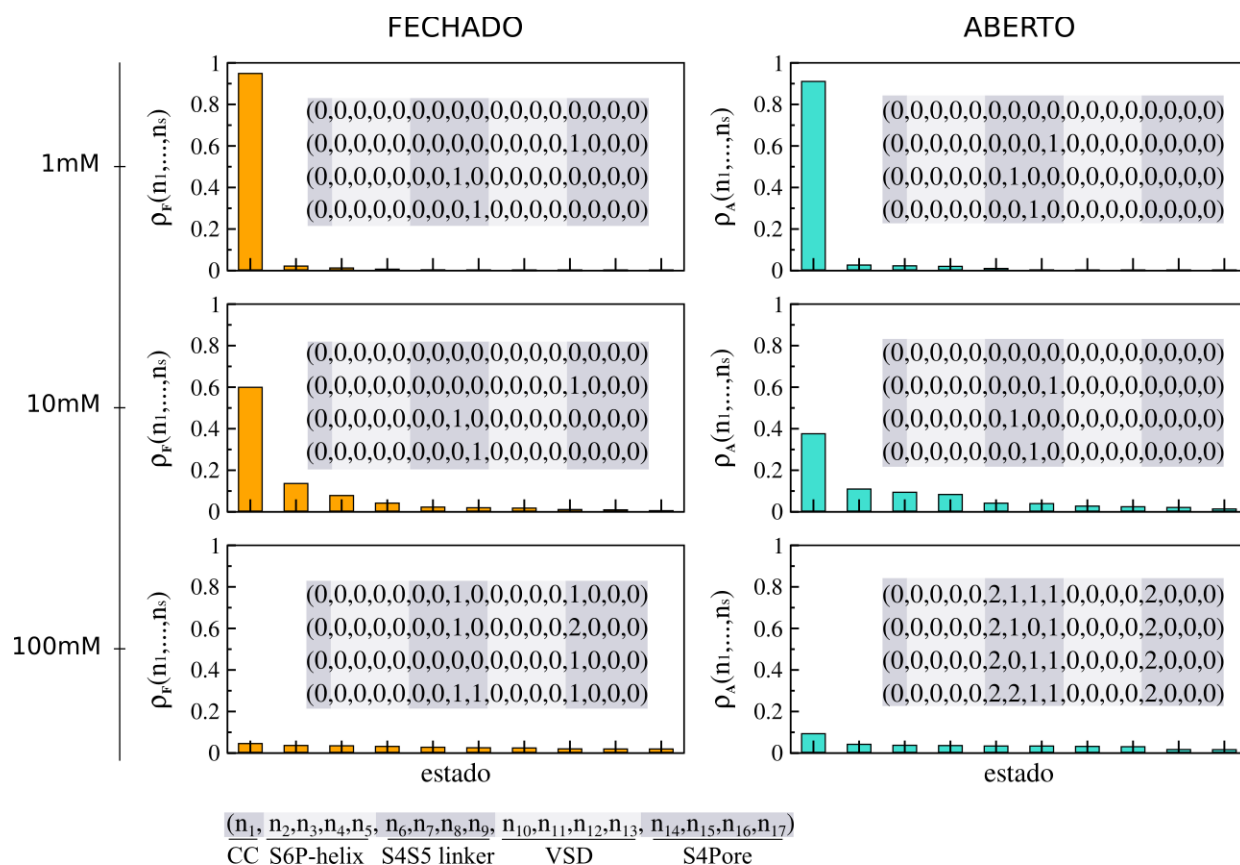


Figura 19. Probabilidade dos estados ligados a sevoflurano $\rho_x(n_1, \dots, n_s)$ em diferentes concentrações do ligante no banho. Valores das probabilidades foram ordenados de forma decrescente. Os 4 estados mais prováveis, dentre os 3^{17} possíveis, são mostrados no interior de cada gráfico, tal que a primeira linha corresponde à configuração mais provável (primeira barra no eixo x) e a última ao quarto estado mais provável (quarta barra). A correspondência entre os índices que compõem um estado e seus respectivos sítios é indicada abaixo dos gráficos, separado também por alternância de cores.

Inspeção da figura 20 reitera a percepção de que a 1mM a probabilidade é dominada pelo estado vazio em ambas conformações, enquanto a concentrações mais altas, a contribuição dos sítios se torna mais evidente. É também patente a probabilidade diferencial dos sítios nas conformações fechada e aberta. Na primeira, predomina a ligação de sevoflurano aos sítios S4Pore, S4S5linker e em menor extensão S6P-helix. Na segunda, há uma clara prevalência do sítio S4S5linker, seguida pelo sítio S4Pore. Observa-se ainda que, para uma mesma concentração de sevoflurano, os sítios da conformação aberta apresentam probabilidades de ocupância dupla comparativamente maiores que as do estado fechado.

Apesar da complexidade das probabilidades sítio-específicas, pode-se perceber que há maior

afinidade pelo estado aberto em detrimento do fechado ao analisar a probabilidade de n ligantes em todo o canal, $\rho_x(n)$ (Figura 20, B). A distribuição de $\rho_A(n)$ é notadamente deslocada para a direita quando comparada com $\rho_F(n)$, observação que se reflete também no número médio de ligantes em **A** aproximadamente duas vezes maior que em **F** em todas as concentrações analisadas.

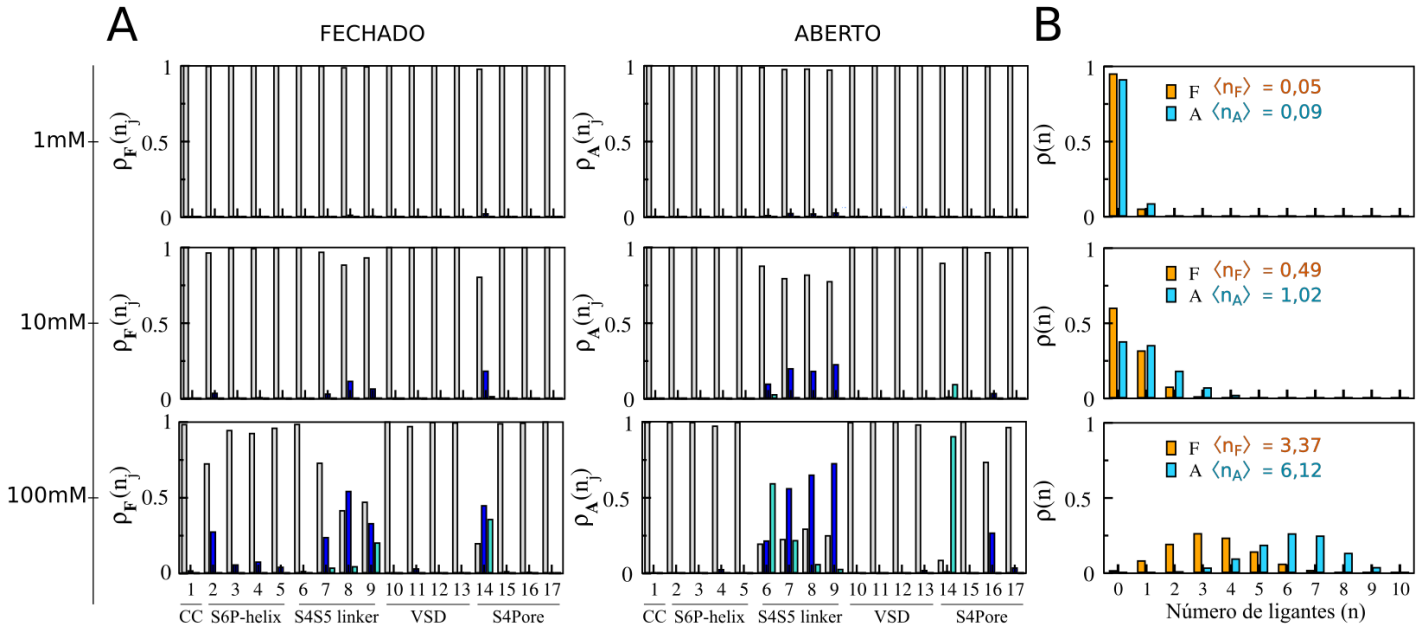


Figura 20. Probabilidades marginais de ligação de sevoflurano nos estados F e A em concentrações crescentes de sevoflurano no banho. (A) Probabilidades marginais $\rho_x(n_j)$ de se ter $n_j=0$ (cinza), $n_j=1$ (azul escuro) e $n_j=2$ (azul claro) em cada sítio j , independentemente da ocupância dos demais sítios. (B) Probabilidade $\rho_x(n)$ de se ter n ligantes interagindo com o receptor, independentemente da distribuição específica desses n ligantes pelos sítios. O número médio de ligantes $\langle n_x \rangle$ nas conformações **F** e **A** estão destacados nos gráficos de (B).

A intrincada interação de sevoflurano com Kv1.2 foi também representada tridimensionalmente pelo mapeamento de $\rho_x(n_1, \dots, n_s)$ na densidade espacial do ligante $\rho_x^j(\mathbf{R})$ para cada sítio j , como descrito nas equações (25) e (26) (Figura 21 A). Na prática, $\rho_x^j(\mathbf{R})$ é estimada repesando, para cada sítio, a densidade de equilíbrio $\rho_x(\mathbf{R}|n_j)$ aproximada como a distribuição de poses de *docking*, pela probabilidade $\rho_x(n_j)$ de n_j ligantes no sítio j . Ainda na figura 21 B, são mostradas as projeções das densidades no eixo transmembrânico z (cf. equação 27). As projeções tornam claras a maior densidade de sevoflurano na conformação aberta em comparação com a fechada, e a distinção entre os padrões de interação do ligante com as diferentes

conformações da proteína.

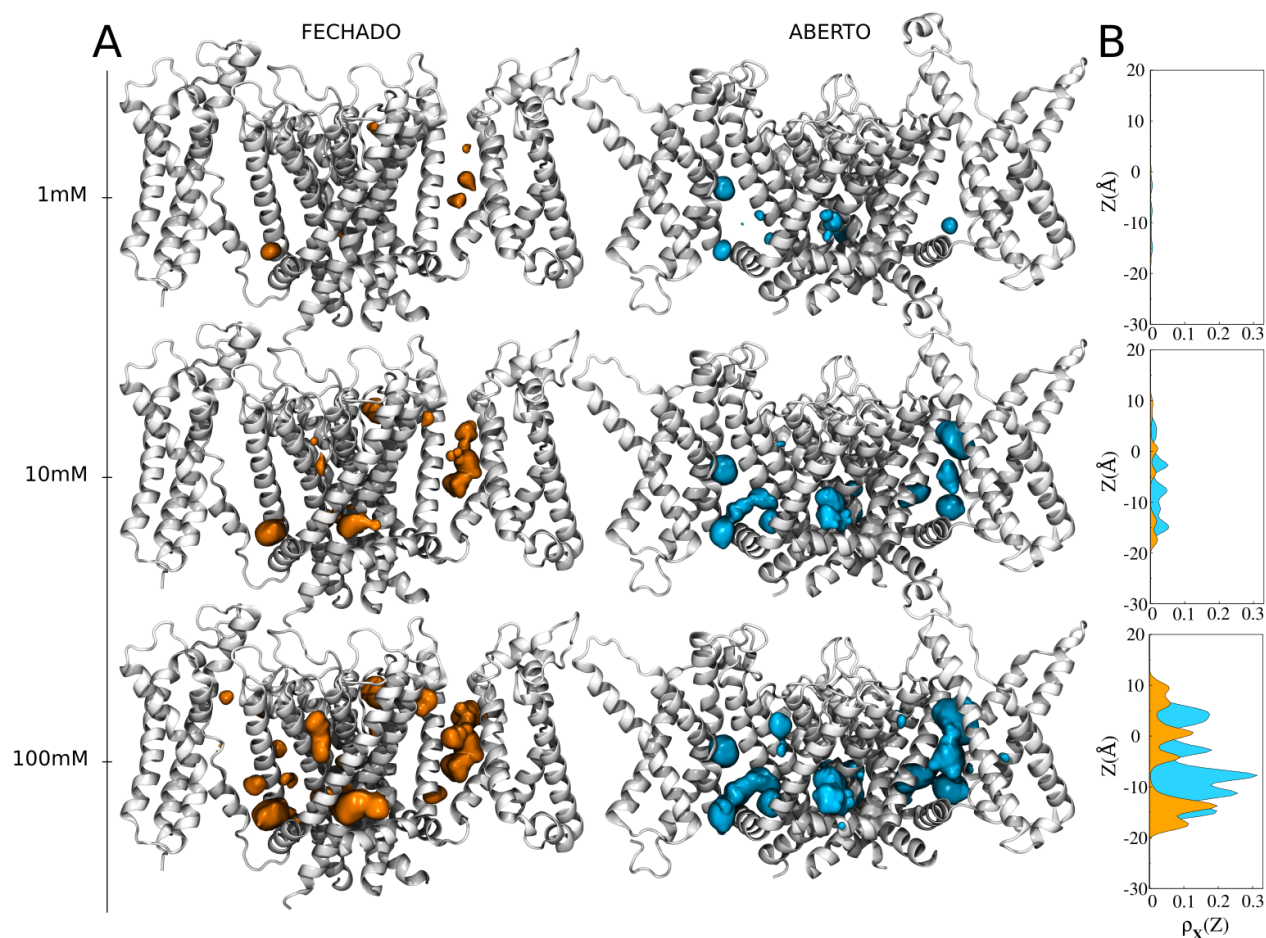


Figura 21. **Representação da probabilidade espacial de ligação de sevoflurano nos estados fechado e aberto em diferentes concentrações do ligante.** (A) A estrutura média de cada conformação do canal, estimada a partir de trajetórias de equilíbrio, está representada em branco. Em laranja e azul na mesma imagem, são representados $\rho_X^j(\mathbf{R})$, ou a densidade de equilíbrio de sevoflurano em cada sítio ($\rho_X(\mathbf{R}|n_j)$), repesada pelas probabilidades marginais $\rho_X(n_j)$ (B) *Projeção das densidades apresentadas em (A) ao longo do eixo transmembrânico z, $\rho_X^j(z)$.*

II.5.2 Sevoflurano impacta a energética do canal em baixas concentrações.

Os resultados obtidos a partir de $\rho_X(n_j)$ e $\rho_X^i(\mathbf{R})$ mostram uma dependência conformacional da interação de Kv1.2 com sevoflurano. As implicações dessa interação podem ser melhor apreciadas examinando sua influência no equilíbrio das duas conformações, **F** e **A**. Nesse contexto, quantificou-se o efeito do anestésico na probabilidade de abertura $\rho_o(V)$ de Kv1.2 na presença de 1mM, 10mM e 100mM de sevoflurano. Particularmente para Kv1.2, resolveu-se a equação 53 para $V_{1/2} = -15,1 \text{ mV}$ (Liang et al., 2015) e funções de partição $Z_F(n_1, \dots, n_s)$ e $Z_A(n_1, \dots, n_s)$, tal que $Z_X(n_1, \dots, n_s) = \sum_{n_1, \dots, n_s} \bar{\rho}^{(n_1 + \dots + n_s)} K_X(n_1, \dots, n_s)$ contempla todos os estados ligados (Figura 22).

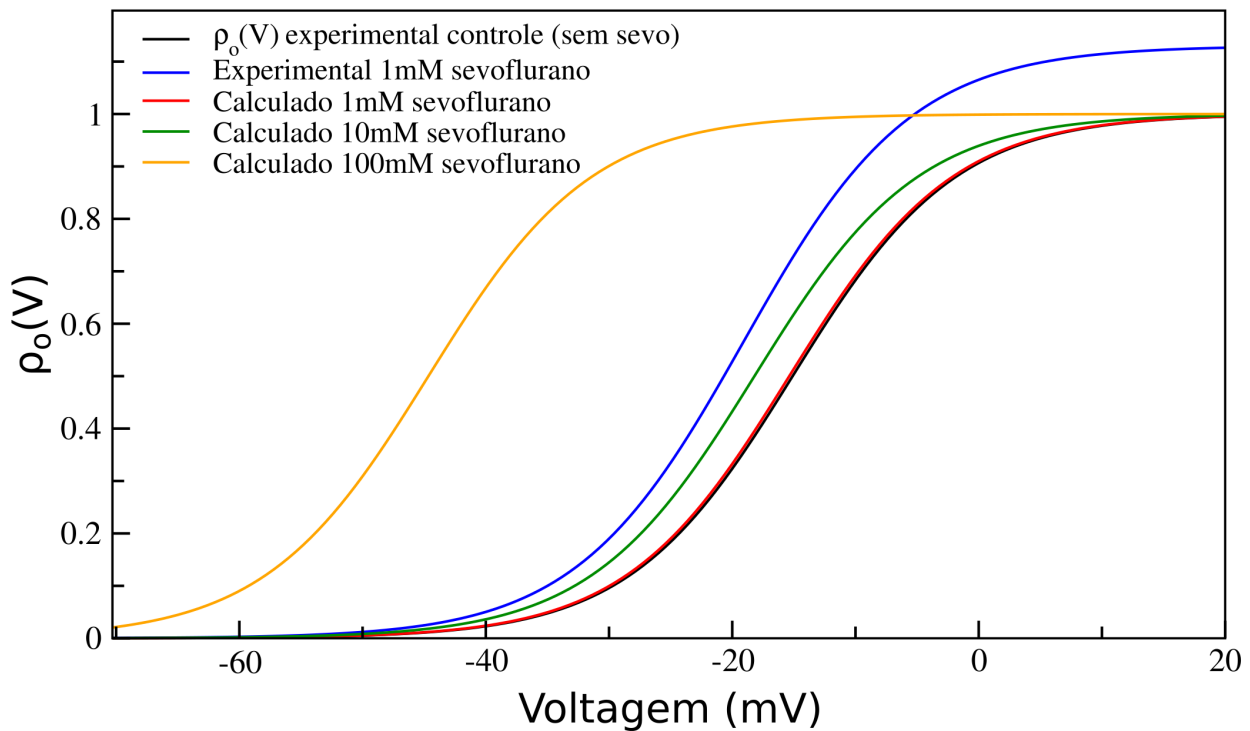


Figura 22. **Probabilidade de abertura do canal iônico dependente de voltagem Kv1.2 na presença de sevoflurano em diversas concentrações.** As curvas em preto e azul são provenientes de dados de eletrofisiologia e fornecem os parâmetros experimentais $V_{1/2} = -15,1 \text{ mV}$ (preto) e $V_{1/2} = -21,9 \text{ mV}$ (azul), e $\Delta Q = 3,85 e_o$, que melhor ajustam a curva de Boltzmann de dois estados (equação 46) aos dados, segundo Liang e colaboradores (Liang et al., 2015). Em vermelho, verde e amarelo, estão respectivamente as probabilidades de abertura calculadas pelo formalismo apresentado (equação 53) para sevoflurano a 1mM, 10mM e 100mM. Os parâmetros $V_{1/2}$ e ΔQ para as curvas calculadas são os mesmos da curva experimental para o canal na ausência de sevoflurano.

Solução das equações 46 e 53 mostra que a ligação de sevoflurano ao canal Kv1.2 produz um deslocamento da curva de probabilidade de abertura, $\rho_o(V)$, para a esquerda de forma concentração-dependente. A 1mM, 10mM e 100mM, $\rho_o(V)$ foi desviada aproximadamente -1mV, -5mV e -30 mV do valor experimental controle (sem sevoflurano). Tal deslocamento indica que a voltagens mais hiperpolarizadas um maior número de canais iônicos dependentes de voltagem Kv1.2 estariam abertos. Mais do que isso, empregando o formalismo desenvolvido para um modelo simples (embora não trivial) de dois estados é possível recuperar o resultado experimental entre 10mM e 20mM de sevoflurano, apenas uma ordem de grandeza acima da concentração utilizada nos experimentos de eletrofisiologia.

Para uma concentração fixa de 100mM de sevoflurano no banho, decidiu-se analisar as contribuições de cada um dos sítios na energética do canal (Figura 23). Assim como, no limite da aproximação de sítios independentes, as constantes de ligação para estados multiplamente ocupados podem ser fatoradas como o produto de constantes de ligação individuais (cf. equação 31). Também as funções de partição associadas podem ser decompostas tal que:

$$Z_X(n_1, \dots, n_s) = Z_X(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times Z_X(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) \quad (100)$$

Dessa forma, a razão entre as funções de partição calculadas para um mesmo sítio nas conformações aberta e fechada $\frac{Z_F(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s)}{Z_A(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s)}$, mostradas na figura 23A podem assumir valores $0 \leq x < 1$ quando estabilizam a conformação aberta; $x=1$ quando não há dependência conformacional; e $x > 1$ quando há estabilização no estado fechado.

Segundo essa análise, os sítios de menor afinidade, i.e. cavidade central (CC), domínio sensível à voltagem (VSD) e face extracelular (ext face), não apresentam dependência conformacional e se concentram em torno do valor 1 da abscissa. Diferentemente, os sítios S4S5linker e S4Pore são os principais componentes estabilizadores da conformação aberta, contrastando com a ligeira estabilização da conformação fechada pela ligação ao sítio S6P-helix. Tal padrão de estabilização é refletido nas curvas de $\rho_o(V)$ sob efeito da ligação em cada sítio, mostradas na figura 23 (B e C). Nota-se ainda que sevoflurano tem maior afinidade por uma das subunidades do sítio S4Pore no canal fechado. Entretanto, como pode ser observado na figura 23 (A), esse também é um dos sítios de menor *overlap* entre amostragens de FEP (cf. Figura 18). Não obstante, o efeito global do sítio S4Pore (Figura 23, C) favorece a estabilização da conformação aberta quando o efeito do anestésico ligado às quatro subunidades é agrupado. A análise da decomposição dos efeitos sítio-específicos torna ainda mais evidente a não trivialidade da

modulação de proteínas de membrana por pequenos ligantes, aqui ilustrada pela interação de sevoflurano com Kv1.2.

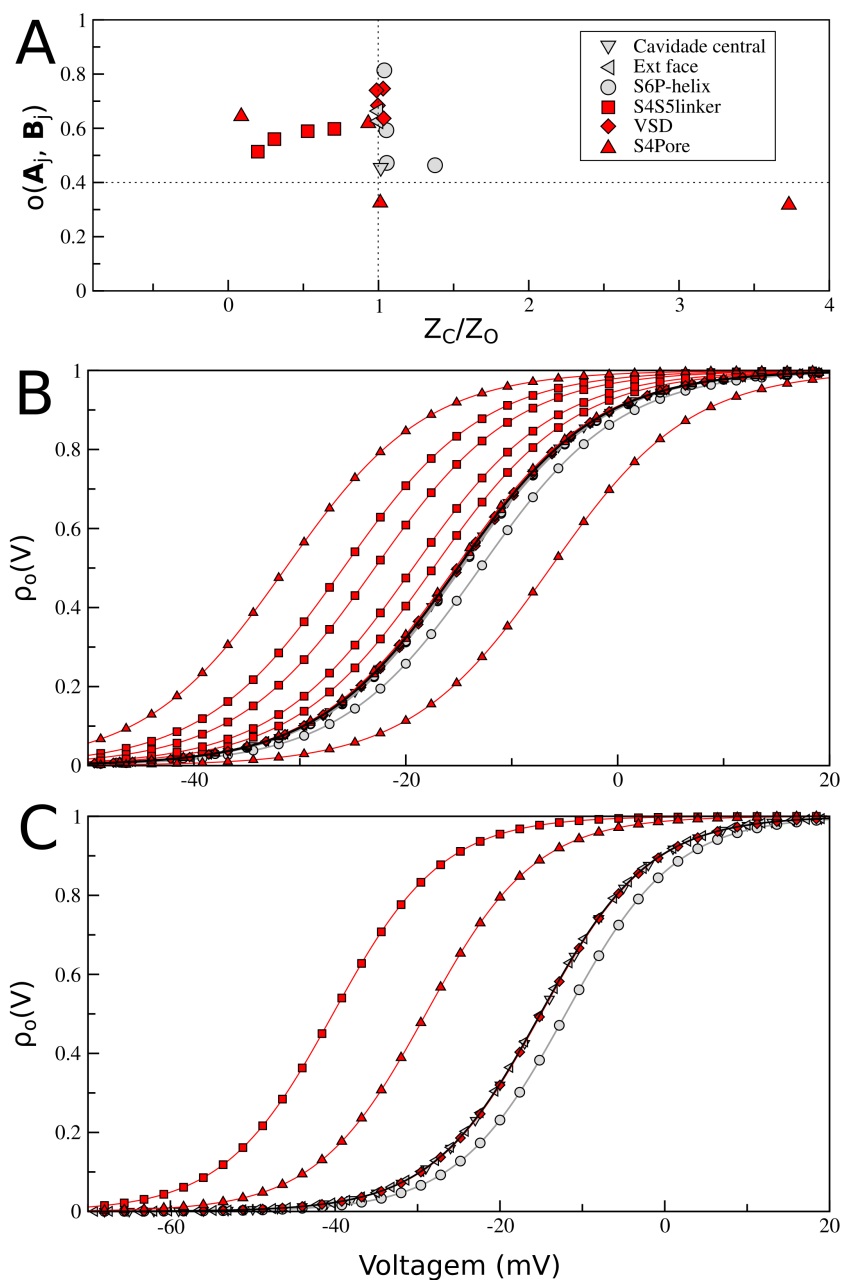


Figura 23. **Decomposição do efeito de sevoflurano no equilíbrio $F \leftrightarrow A$.** (A) Decomposição da contribuição de cada sítio na energética do canal Kv1.2, medido pela razão das funções de partição individuais (cf. equação 100). Valores entre 0 e 1 indicam estabilização do estado A; valores iguais a 1 são indiferentes; e valores maiores que 1 indicam estabilização do estado F. (B) Probabilidade de abertura de Kv1.2 calculadas a partir das razões em (A). Em preto está a curva experimental controle (sem sevoflurano) para referência. (C) Mesma análise de (B) agregando os efeitos de sítios iguais em subunidades diferentes. Em todas as figuras, a concentração de sevoflurano no banho foi de 100mM, a fim de facilitar a visualização dos dados. Sítios próximos de regiões flexíveis da proteína são destacados em vermelho, enquanto sítios em regiões mais estáveis são mostrados em cinza.

II.5.3 Sítios e Afinidades Recapitulam Dados Experimentais Independentes

Os resultados aqui apresentados mostram que sevoflurano se liga ao canal Kv1.2 em diversas concentrações, preferencialmente nos sítios S4S5Linker, S4Pore e S6P-helix. Análise desses resultados a luz de dados experimentais revelam que estes são consistentes com experimentos recentes de mutagênese e de marcação de Kv1.2 com moléculas anestésicas fotoativas.

Em um desses estudos, Woll *et al.* desenvolveram um análogo fotoativo de sevoflurano capaz de modular Kv1.2 de forma semelhante à molécula original.(Woll et al., 2017) Essa nova molécula, azisevoflurano, se liga covalentemente a um resíduo de aminoácido próximo quando irradiada com luz ultravioleta. Entre outras estratégias, a confirmação de que a região marcada pela molécula fotoativa é a mesma do anestésico parental é feita via experimentos de competição, de forma que se sevoflurano *protege* contra a ligação do análogo marcador, sugere-se que aquele é de fato um sítio de ligação. A identidade dos aminoácidos marcados pode ser subsequentemente identificada por espectrometria de massa.(Woll et al., 2016)

Nesse experimento com azisevoflurano e Kv1.2, foi sugerido que o anestésico se liga ao linker-S4S5 e à hélice S6, particularmente aos resíduos de aminoácido Leu317 e Thr384. Corroborando os achados, a mutação Leu317Ala abole a potenciação dependente de voltagem de Kv1.2 por sevoflurano. Ambos resíduos são próximos dos sítios S4S5linker e S6P-helix, definidos nesta tese (Figura 24).

Destaca-se também o estudo com a mutação pontual do linker-S4S5, Gly329Thr (discutida no tópico II.1.4.3).(Barber et al., 2012c) Essa mutação converte a curva de probabilidade de abertura de Kv1.2 na curva registrada para um canal relacionado, K-shaw2. Tanto K-shaw2, quanto Kv1.2-Gly329Thr tem valores de $V_{1/2}$ maiores que o de Kv1.2 selvagem, porém o efeito dependente de voltagem do anestésico é amplificado consideravelmente. Os efeitos medidos no mutante sugerem uma região relevante na modulação de Kv1.2 por sevoflurano. Como pode ser observado na figura 24, o resíduo Gly329 encontra-se próximo ao sítio S4S5linker, um dos sítios de maior afinidade apontado neste trabalho.

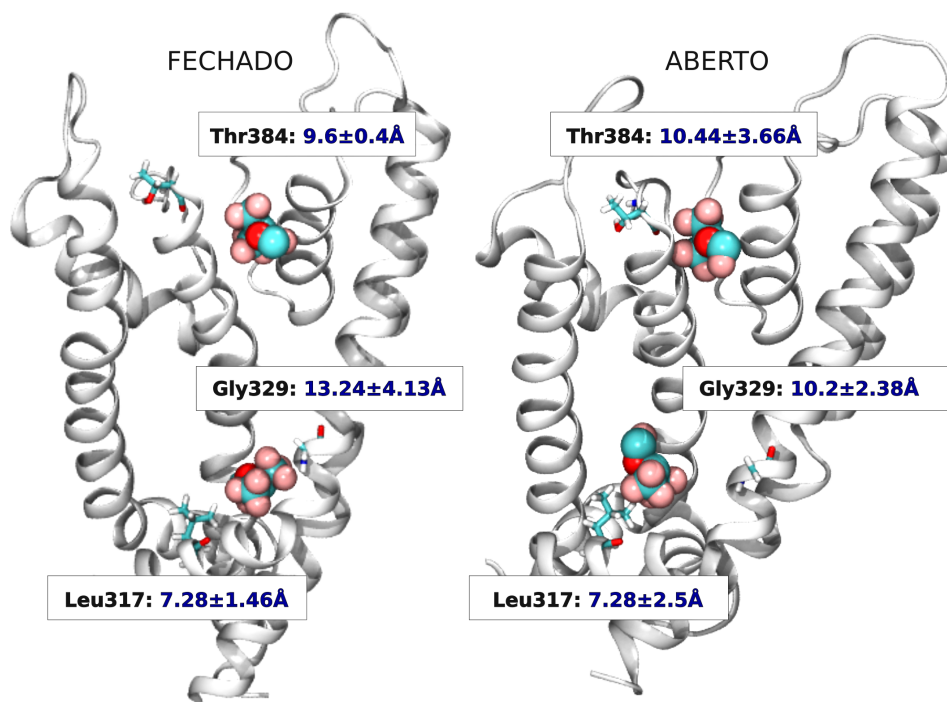


Figura 24. Distâncias médias entre sevoflurano e resíduos de aminoácido sugeridos por experimentos, nas conformações F e A de Kv1.2. São mostradas na imagem as distâncias médias entre sevoflurano ligado ao sítio S6P-helix e o resíduo de Thr384; e as distâncias médias entre sevoflurano quando ligado ao sítio S4S5linker e os resíduos Gly329 e Leu317. A média das distâncias foi calculada a partir do conjunto de poses de docking pertencentes a cada sítio.

III. CONCLUSÕES

Aplicou-se aqui a teoria desenvolvida no capítulo I a estudos estruturais da ligação do anestésico geral sevoflurano às conformações fechada (**F**) e aberta (**A**) do canal iônico dependente de voltagem humano Kv1.2. A interação do anestésico com Kv1.2 foi analisada para concentrações do ligante de 1mM, 10mM e 100mM, para sítios de ligação ocupados por no máximo $n_j^{max}=2$. A identificação dos sítios é empreendida por uma abordagem que combina buscas massivas de *docking* molecular com cálculos de energia livre. Este último tem por objetivo obter estimativas mais acuradas das energias de ligação do anestésico aos sítios de interação. (Deng et al., 2015) Não obstante as limitações do método de busca de sítios (IV.1), a análise foi realizada em regiões igualmente amostradas e comparáveis nas conformações **F** e **A** (cf II.5.1.3).

Os resultados apresentados sugerem que o anestésico se liga com afinidade diferencial às duas conformações. Apesar de um padrão de interação comparável, análise da influência de cada sítio evidencia a complexidade do padrão de ligação de sevoflurano, contribuindo componentes que estabilizam o estado fechado e outras que estabilizam o estado aberto. Ainda, o efeito global das contribuições acabam por estabilizar mais fortemente a conformação aberta do canal, aumentando a probabilidade de abertura, traduzida na forma da curva de probabilidade de abertura deslocada para a esquerda, a voltagens menos despolarizadas (II.5.2). É interessante ressaltar que, porquanto mecanismos de modulação indireta ou efeitos mais complexos possam contribuir para a modulação desses alvos por anestésicos, o presente modelo simples (posto que não trivial) de dois estados é capaz de recuperar os efeitos dependentes de voltagem em concentrações um ordem de grandeza acima da usada experimentalmente (Figura 22).

Para além deste sistema específico, o trabalho oferece uma nova abordagem para se considerar e analisar quantitativamente a modulação alostérica não só de canais iônicos, mas de proteínas em geral, visto que a metodologia pode ser transposta para outros sistemas. Estratégias tradicionais apresentam limitações quando se trata de sistemas com múltiplos sítios de ligação não idênticos, como os descritos. Em geral, tais métodos fornecem afinidades globais obtidas a partir de medidas indiretas, como por exemplo curvas de dose-resposta, e modificações na corrente iônica de canais iônicos medidas na presença do ligante (parte da motivação deste estudo). Diferentemente, a metodologia apresentada possibilita obter a afinidade e impacto funcional de sítios individuais, cujas contribuições podem ser combinadas a fim de descrever os macroestados acessíveis aos experimentos. Assim, em função da descrição estrutural com resolução atômica do estudo, espera-se que este possa ajudar a racionalizar e propor novos experimentos.

IV. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

IV.1. Limitações da amostragem por *docking* molecular

O estudo parte da premissa que buscas de *docking* molecular são capazes de descrever acuradamente a distribuição local dos ligantes nos sítios. Entretanto, três limitações bem documentadas do método devem ser mencionadas: (i) o tratamento rígido dos ângulos e ligações da proteína; (ii) falsos resultados positivos (poses de *docking* em regiões de baixa/não afinidade) e (iii) falsos resultados negativos (falha em registrar sítios que existem). (Deng et al., 2015) A questão (i) é tratada pela busca extensiva de poses de *docking* em várias estruturas de equilíbrio do receptor. Essa estratégia fornece uma alternativa eficiente para inclusão da flexibilidade das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido da proteína. Apesar dos esforços para incorporar flutuações estruturais da proteína e do ligante, é possível que nem todos os sítios tenham sido amostrados corretamente. Questões (ii) e (iii) são ambas resultantes de deficiências da *scoring function* na estimativa da energias de solvatação do ligante. Porém, enquanto falsos positivos são identificados pela estimativa da afinidade da molécula pelo sítios via cálculos de FEP (e.g. sítio Ext face), falsos negativos não são tratados.

Possíveis soluções para (iii) incluem combinar resultados de diferentes algoritmos de *docking*, com algoritmos de busca e *scoring functions* diversos. Outras formas de amostragem, como simulações de *flooding* também podem ser empregadas. Nesse tipo de estudo, longas simulações do receptor com concentração explícita do ligante são realizadas, até que as moléculas de ligante se particionem pelo sistema. Tais simulações implicam um custo computacional grande para que se alcance o equilíbrio. Em contrapartida, o método de *flooding* é interessante pois permite a amostragem do espaço por importância, livre de hipóteses prévias a respeito da localização e ocupância dos sítios. Nota-se que para que essa outra forma de amostragem seja incorporada, faz-se necessário adaptar a teoria apresentada em I.4. (em andamento).

IV.2. Modelo simplificado de dois estados

Os resultados mostram claramente a existência de dependência conformacional na ligação de sevoflurano aos estados aberto e fechado do canal. Conquanto a diferença de afinidade de sevoflurano pelos estados **F** e **A** seja capaz de explicar grande parte do efeito voltagem-dependente

na probabilidade de abertura de Kv1.2, esta não recapitula o aumento na condutância máxima. Para tanto é necessária a inclusão de outros estados conformacionais (equações 56 e 58, capítulo I.4.9.).

Em sistemas experimentais, a condutância máxima de um canal iônico dependente de voltagem é função do número de canais funcionais presentes na membrana, da probabilidade máxima de abertura do canal (independente de voltagem) e da condutância unitária (equações 61 e 62). Assim, em princípio, alteração em qualquer um desses fatores, separadamente ou combinados, poderia contribuir para o aumento de G_{max} . Dada a escala de tempo, da ordem de segundos, da ação do anestésico no organismo, é improvável que o aumento da expressão de canais de potássio seja responsável pelo efeito na condutância máxima. Complementarmente, experimentos de *patch-clamp*, realizados em canais individuais (*single channel*) na presença de sevoflurano também exibem aumento em G_{max} e igualmente excluem a hipótese do aumento do número de canais expressos na membrana. Esse mesmo estudo indica que a ligação do anestésico não acarreta aumento da condutância unitária do canal de K^+ . (Liang et al., 2015) É sugerido portanto que o aumento de condutância máxima evidenciado pelo dado experimental (Figura 22, curva vermelha) se deve principalmente a um aumento na probabilidade máxima de abertura, voltagem-independente, de Kv1.2.

Conhecendo os mecanismos intrínsecos de controle da condução de CIs, i.e. abertura ou fechamento do *gate* hidrofóbico e ativação ou inativação do FS, e lembrando que a abertura do *gate* hidrofóbico tem um componente fortemente dependente de voltagem, é razoável propor que a probabilidade de abertura máxima seja alterada pela modulação da entrada em estados inativos, ou em estados intermediários. Uma hipótese seria que a ligação do anestésico geral sevoflurano estabilizaria o estado condutor, diminuindo a frequência da ocorrência de conformações não condutoras, conseqüentemente aumentando a probabilidade de abertura máxima do CI. Tais estados no entanto não estão completamente caracterizados. Um panorama para estudos futuros inclui a caracterização estrutural dessas conformações, seguida de investigações a respeito da influência do anestésico no equilíbrio entre estados aberto, fechado e não condutores.

IV.2.1. Estado não-condutor: DSV ativado, poro fechado

Conforme mencionado em II.1.3.1, transições independentes em direção à ativação dos quatro domínios sensíveis a voltagem (DSV), seguida por uma pequena transição cooperativa das quatro subunidades precedem a abertura do poro de condução. Tal fato sugere que todas as subunidades de DSV devem estar na conformação ativada, *antes* que o poro se abra indicando

independência entre os domínios do poro e DSV.(Blunck and Batulan, 2012b; Pathak et al., 2005; Zagotta et al., 1994)

Simulações computacionais extremamente longas de Kv1.2 mostram ainda que o poro pode transitar rapidamente entre conformações abertas e fechadas, mesmo quando o estímulo que abre o canal está presente (i.e. em voltagens despolarizadas). Segundo os autores, isso se dá em função da desidratação e re-hidratação transiente do poro.(Jensen et al., 2012)

Nesse contexto, Kv1.2 em um estado intermediário com domínios sensíveis à voltagem ativados e poro fechado poderia constituir um alvo para interação com sevoflurano. Da mesma forma, a desestabilização desse estado não condutor poderia contribuir para o aumento observado na condutância máxima do canal.

IV.2.2. Estado não-condutor: Inativação do filtro de seletividade

Estruturas cristalográficas disponíveis para o canal de K⁺ bacteriano KcsA demonstram um filtro de seletividade (FS) constrito na região da glicina 77 (Figura 11), caracterizando um potencial estado de inativação lenta do canal. Nessa estrutura, as carbonilas do resíduo encontram-se voltadas para fora do caminho de permeação, impedindo a coordenação dos íons no FS.(Zhou et al., 2001) Tal conformação foi obtida a partir da cristalização do CI submetido a baixas concentrações de K⁺. Ainda, estudos recentes sugerem que o estado inativado do FS do canal é estabilizado pela presença de moléculas de água atrás do segmento do filtro de seletividade.(Ostmeyer et al., 2013) Segundo os autores, as moléculas de água formam pontes de hidrogênio com os grupos carbonila de alguns resíduos do FS, tornando-as indisponíveis para coordenar os íons no interior do filtro. A estabilização do estado pelas moléculas de água justificaria as longas escalas de tempo necessárias para a recuperação da condução. Corroborando essa proposta, experimentos mostram que a recuperação do estado condutor do CI é acelerada quando este é exposto a condições de alto estresse osmótico (2 molar de sacarose). Tal resultado se dá pois altas concentrações de soluto no banho favorecem a saída das moléculas de água ligadas ao FS.(Ostmeyer et al., 2013)

A Gly77 constricta de KcsA é equivalente à Gly345 em Kv1.2. Entretanto, estruturas inativadas do filtro de seletividade de Kv1.2 ainda não foram obtidas por métodos estruturais de alta resolução, como cristalografia de raio X. Ainda assim, é interessante investigar esse estado conformacional em Kv1.2, dadas as semelhanças entre os domínios do poro de KcsA e Kv1.2, e evidências experimentais da ocorrência de inativação lenta nesse canal.(Baukowitz and Yellen, 1995; Cuello et al., 2010b; Domene et al., 2008; Hoshi and Armstrong, 2013; Hoshi et al., 1991;

Liu et al., 1996; Thomson et al., 2014) Assim como para conformações intermediários, análise da influência de sevoflurano na transição para esse potencial estado pode fornecer esclarecimentos acerca dos mecanismos de anestesia.

IV.3. Investigação do Estado Inativado do FS de Kv1.2

Dada a hipótese de que sevoflurano estaria inibindo estados associadas à inativação lenta no filtro de seletividade, faz-se necessário conhecer esses estados importantes no gate e na modulação de Kv1.2. Apesar de haver uma estrutura cristalográfica potencialmente inativada para o canal KcsA, o mesmo não é verdade para descrições estruturais desse estado para o canal Kv1.2. Aqui, simulações de dinâmica molecular, juntamente com métodos avançados de amostragem, foram empregados para propor uma conformação característica do estado inativado no CIDV de interesse.

A fim de gerar um modelo estrutural do estado inativado de Kv1.2, cujo conhecimento auxiliaria a esclarecer o papel de estados não condutores na modulação do Kv1.2 por sevoflurano, utilizou-se a estrutura cristalográfica de KcsA contendo FS inativado (PDB: 3F5W) como molde. Em vista de similaridades de sequência e de estrutura tridimensional, espera-se que o estado inativado do CI Kv1.2 seja semelhante ao de KcsA. As coordenadas dos resíduos do FS condutor de Kv1.2 foram levadas às coordenadas do filtro constrito de KcsA via Steered Molecular Dynamics (cf. tópico II.3.1.2) durante 3 nanosegundos (Figura 25A). Na estrutura final gerada, os carbonos α de glicinas 345 opostas (não adjacentes) estão separados por uma distância de 5,1Å (Figura 25A e C). A estrutura final gerada pela simulação de SMD foi então simulada em bicamada lipídica hidratada durante 40 ns e a estabilidade do filtro constrito e do restante da proteína avaliada via análise de RMSD (Figura 25B). Os baixos valores de RMSD da estrutura com filtro constrito durante o período de equilíbrio sugere que a estrutura gerada é estável. Nota-se porém que o tempo de simulação avaliado ainda é muito limitado

Ainda a fim de avaliar a viabilidade do estado não-condutor, o método de *umbrella sampling* foi empregado para estimar o potencial de força média (PMF) associado a duas coordenadas de reação: i) distância entre os $C\alpha$ de glicinas 345 opostas, denominado R; ii) a posição axial de um íon K^+ atravessando o FS, em relação ao centro geométrico das glicinas, ou Z. As conformações iniciais ao longo da coordenada de reação da inativação, necessárias aos cálculos de US, foram retiradas da trajetória de SMD mencionada acima. A partir desta, foram filtradas estruturas condizentes com cada uma das janelas pré-definidas (cf. II.4.4).

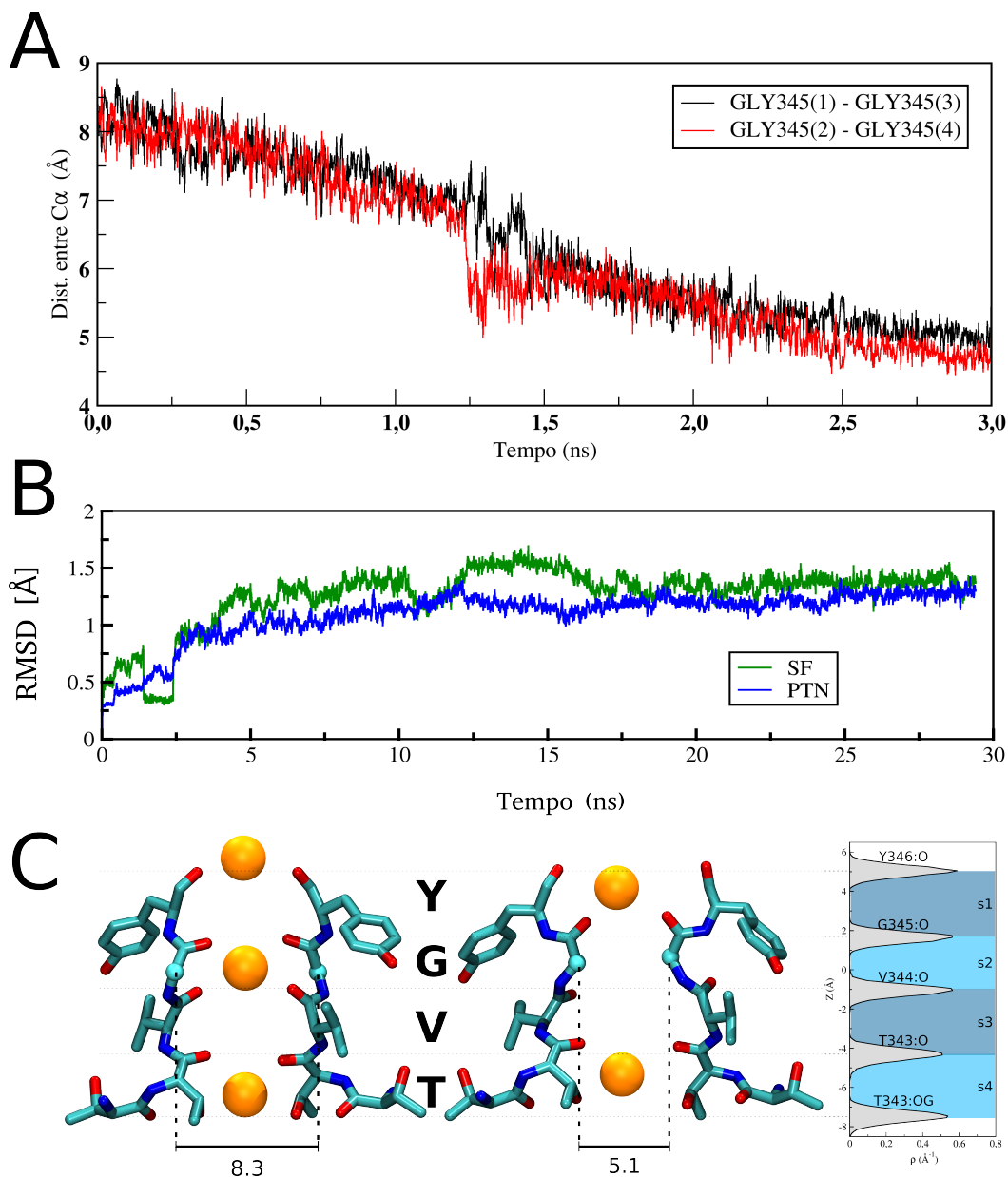


Figura 25. Produção do potencial estado não-condutor. **A)** Coordenada de reação durante simulação de SMD definida como a distância entre os carbonos- α das glicinas 345 de duas subunidades não adjacentes do canal. O gráfico mostra a aproximação dos resíduos em função do tempo. **B)** RMSD da proteína completa (azul) e somente do segmento correspondente ao filtro de seletividade inativo (SF, em verde) durante a simulação de equilíbrio. Magnitude do RMSD mostra a estrutura estável ao longo de pelo menos 30 ns. **C)** Estrutura condutora (esquerda) e não condutora (direita) do filtro de seletividade. Observa-se a distância entre C α (esferas azuis). Íons K $^{+}$ são representados por esferas amarelas. À direita, são mostradas as densidades dos oxigênios (cinza) do grupo carbonila (O) ou da cadeia lateral (OG1, ligado ao carbono gama) dos resíduos do FS, calculadas para a conformação condutora. A posição dos oxigênios define os sítios de ligação a íons K $^{+}$ cujas delimitações são destacadas como áreas coloridas entre as densidades dos oxigênios. Note que o eixo vertical é posicionado no centro geométrico dos carbonos- α da Gly345, assim como a coordenada de reação do íon.

A superfície de energia livre resultante é mostrada na figura 26. Deve-se notar que esse PMF corresponde à aproximação simétrica das quatro subunidades, de forma que o eixo horizontal do gráfico corresponde à média entre a distância do C α da Gly 345 das subunidades 1 e 3, e das subunidades 2 e 4. É possível observar um mínimo de energia em R próximo a 8,5 Å, dado que o íon esteja no sítio s2 (0 a 2 Å no eixo Z). Consistentemente, essa é a separação média entre os átomos observada em trajetórias de equilíbrio, de sorte que essa coordenada corresponde ao estado condutor do FS. Apesar de a superfície ainda não estar completamente convergida, é possível notar um mínimo local em aproximadamente R=5,0 e Z=4,0 (sítio s1). Aqui, não é permitida a presença do íon no sítio s2 pois o FS se encontra constricto na região.

Os dados apresentados ainda são incipientes e simulações mais longas, juntamente com análises adicionais se fazem necessárias para garantir a convergência dos dados. Após a validação da estrutura não condutora, pretende-se investigar sua interação com sevoflurano.

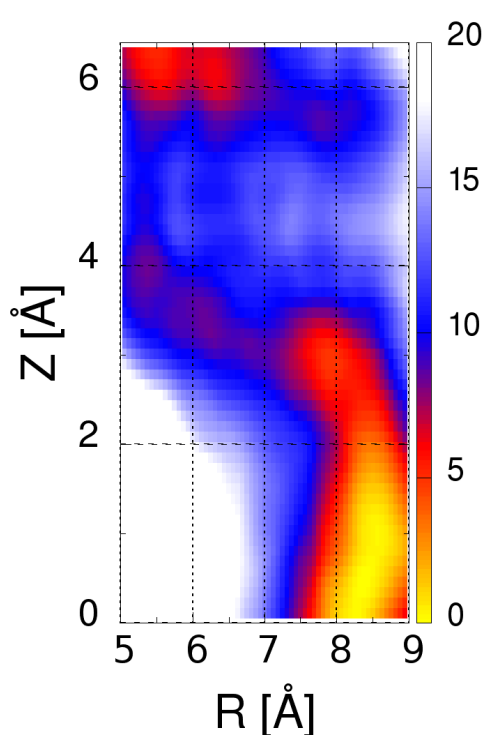


Figura 26. *Superfície de energia livre bidimensional (R e Z) associada à permeação de íons K⁺ em diferentes conformações do filtro de seletividade. PMF obtido via simulações de dinâmica molecular em associação com cálculos de umbrella sampling, utilizando as estruturas geradas durante a simulação de SMD. Coordenada R indica a separação média entre C α do resíduo Gly345 do FS de subunidades não adjacentes. Z é a posição axial de um íon K⁺. Valores de energia são indicados no gradiente à direita e estão em unidades de kcal.mol⁻¹. Observa-se que de fato na estrutura proposta como não condutora, as barreiras de energia requeridas para condução do íon são proibitivas. O mesmo não é observado em conformações com separação média das glicinas maiores do que 8Å.*

IV.4. Conexão entre resultados microscópicos e efeitos fisiológicos

Os resultados apresentados são promissores e oferecem uma perspectiva otimista no sentido que um fenômeno relativamente simples como a modulação alostérica do equilíbrio de dois estados é capaz de reproduzir medidas eletrofisiológicas. Entretanto não é possível delinear uma conexão

direta entre os resultados apresentados e o fenômeno macroscópico conhecido como anestesia. Sabe-se medidas realizadas em sistemas reducionistas de eletrofisiologia e realizadas *in vivo* não estão forçosamente correlacionadas e podem apresentar divergências significativas.(Lugli et al., 2009; Jurd et al., 2003; Werner et al., 2011; Eckenhoff and Johansson, 1999) Assim, é necessário estabelecer uma relação direta entre a modulação de Kv1.2 por sevoflurano e o fenômeno de anestesia, em sistemas realistas. Face a essas limitações, e no escopo de um projeto já aprovado, pretende-se desenhar experimentos *in vitro* com células neuronais e *in vivo* a fim de desafiar os resultados aqui apresentados e averiguar os impactos da modulação de Kv1.2 por sevoflurano.

V. REFERÊNCIAS

- Abdel-Magid, A.F. (2015). Allosteric Modulators: An Emerging Concept in Drug Discovery. *ACS Med Chem Lett* 6, 104–107.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Alifimoff, J.K., Firestone, L.L., and Miller, K.W. (1989). Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *Br J Pharmacol* 96, 9–16.
- Alkire, M.T., Asher, C.D., Franciscus, A.M., and Hahn, E.L. (2009). Thalamic microinfusion of antibody to a voltage-gated potassium channel restores consciousness during anesthesia. *Anesthesiology* 110, 766–773.
- Almén, M.S., Nordström, K.J.V., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2009). Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol.* 7, 50.
- Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M.L., and Treptow, W. (2012). Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 21336–21341.
- Andersen, H.C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of Chemical Physics* 72, 2384–2393.
- Aryal, P., Abd-Wahab, F., Bucci, G., Sansom, M.S.P., and Tucker, S.J. (2014). A hydrophobic barrier deep within the inner pore of the TWIK-1 K2P potassium channel. *Nat Commun* 5.
- Aryal, P., Sansom, M.S.P., and Tucker, S.J. (2015). Hydrophobic Gating in Ion Channels. *Journal of Molecular Biology* 427, 121–130.
- Ballesteros, J., and Ransom, J. (2006). In-Target versus Off-Target allosteric modulators of GPCRs. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3, 445–450.
- Balser, J.R., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M.T., Marban, E., and Tomaselli, G.F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol. (Lond.)* 494 (Pt 2), 431–442.
- Barber, A.F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W., and Covarrubias, M. (2011). Molecular Mapping of General Anesthetic Sites in a Voltage-Gated Ion Channel. *Biophys J* 101, 1613–1622.
- Barber, A.F., Carnevale, V., Raju, S.G., Amaral, C., Treptow, W., and Klein, M.L. (2012a). Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 2120–2125.
- Barber, A.F., Liang, Q., and Covarrubias, M. (2012b). Novel activation of voltage-gated K(+) channels by sevoflurane. *J. Biol. Chem.* 287, 40425–40432.
- Barber, A.F., Liang, Q., and Covarrubias, M. (2012c). Novel Activation of Voltage-gated K+ Channels by Sevoflurane. *J. Biol. Chem.* 287, 40425–40432.
- Barber, A.F., Carnevale, V., Klein, M.L., Eckenhoff, R.G., and Covarrubias, M. (2014). Modulation of a voltage-gated Na+ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *PNAS* 201405768.

- Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951–960.
- Beckstein, O., Tai, K., and Sansom, M.S.P. (2004). Not Ions Alone: Barriers to Ion Permeation in Nanopores and Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14694–14695.
- Bhananker, S.M., Ramamoorthy, C., Geiduschek, J.M., Posner, K.L., Domino, K.B., Haberkern, C.M., Campos, J.S., and Morray, J.P. (2007). Anesthesia-related cardiac arrest in children: update from the Pediatric Perioperative Cardiac Arrest Registry. *Anesth. Analg.* 105, 344–350.
- Bhandarkar, M., Brunner, R., Chipot, C., Dalke, A., Dixit, S., Grayson, P., Gullinsrud, J., Gursoy, A., Humphrey, W., Hurwitz, D., et al. (2002). NAMD version 2.4. <http://www.ks.uiuc.edu/research/namd>.
- Bhate, M.P., and McDermott, A.E. (2012). Protonation state of E71 in KcsA and its role for channel collapse and inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 15265–15270.
- Blunck, R., and Batulan, Z. (2012a). Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* 3, 166.
- Blunck, R., and Batulan, Z. (2012b). Mechanism of Electromechanical Coupling in Voltage-Gated Potassium Channels. *Front Pharmacol* 3.
- Brettmann, J.B., Urusova, D., Tonelli, M., Silva, J.R., and Henzler-Wildman, K.A. (2015). Role of protein dynamics in ion selectivity and allosteric coupling in the NaK channel. *PNAS* 112, 15366–15371.
- Brohawn, S.G., del Mármol, J., and MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 335, 436–441.
- Brooks, B.R., Brooks, C.L., Mackerell, A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., et al. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry* 30, 1545–1614.
- Bucher, D., Guidoni, L., and Rothlisberger, U. (2007). The protonation state of the Glu-71/Asp-80 residues in the KcsA potassium channel: a first-principles QM/MM molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93, 2315–2324.
- Cantor, R.S. (1997). The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36, 2339–2344.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007a). A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents. *J Gen Physiol* 130, 465–478.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007b). A Quantitative Description of KcsA Gating II: Single-Channel Currents. *J Gen Physiol* 130, 479–496.
- Chapman, M.L., VanDongen, H.M.A., and VanDongen, A.M.J. (1997). Activation-Dependent Subconductance Levels in the drk1 K Channel Suggest a Subunit Basis for Ion Permeation and Gating. *Biophys J* 72, 708–719.
- Choi, K.L., Aldrich, R.W., and Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5092–5095.
- Cole, K.S. (1972). *Membranes, Ions and Impulses: A Chapter of Classical Biophysics* (University of California Press).
- Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol* 13, 311–

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

Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Chakrapani, S., and Perozo, E. (2011). A Multipoint Hydrogen-Bond Network Underlying KcsA C-Type Inactivation. *Biophysical Journal* *100*, 2387–2393.

Covarrubias, M., Barber, A.F., Carnevale, V., Treptow, W., and Eckenhoff, R.G. (2015). Mechanistic Insights into the Modulation of Voltage-Gated Ion Channels by Inhalational Anesthetics. *Biophysical Journal* *109*, 2003–2011.

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

Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., Pan, A.C., Gagnon, D.G., Dalmas, O., Cordero-Morales, J.F., Chakrapani, S., Roux, B., and Perozo, E. (2010c). Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K⁺ channels. *Nature* *466*, 272–275.

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

Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* *98*, 10089–10092.

Delemotte, L., Treptow, W., Klein, M.L., and Tarek, M. (2010). Effect of Sensor Domain Mutations on the Properties of Voltage-Gated Ion Channels: Molecular Dynamics Studies of the Potassium Channel Kv1.2. *Biophysical Journal* *99*, L72–L74.

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

Demo, S.D., and Yellen, G. (1992). Ion effects on gating of the Ca(2⁺)-activated K⁺ channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys J* *61*, 639–648.

Deng, N., Forli, S., He, P., Perryman, A., Wickstrom, L., Vijayan, R.S.K., Tiefenbrunn, T., Stout, D., Gallicchio, E., Olson, A.J., et al. (2015). Distinguishing binders from false positives by free energy calculations: fragment screening against the flap site of HIV protease. *J Phys Chem B* *119*, 976–988.

Devaraneni, P.K., Komarov, A.G., Costantino, C.A., Devereaux, J.J., Matulef, K., and Valiyaveetil, F.I. (2013). Semisynthetic K⁺ channels show that the constricted conformation of the selectivity filter is not the C-type inactivated state. *PNAS* *110*, 15698–15703.

Dickinson, R., Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1993). Thermodynamics of anesthetic/protein interactions. Temperature studies on firefly luciferase. *Biophys J* *64*, 1264–1271.

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

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

Eckenhoff, R.G., and Johansson, J.S. (1997). Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins. *Pharmacol. Rev.* *49*, 343–367.

- Eckenhoff, R.G., and Johansson, J.S. (1999). On the Relevance of “Clinically Relevant Concentrations” of Inhaled Anesthetics in In Vitro Experiments. *Anesthesiology* 91, 856–856.
- Feller, S.E., and MacKerell, A.D. (2000). An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. *J. Phys. Chem. B* 104, 7510–7515.
- Franks, N.P. (2006). Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology* 147, S72–S81.
- Franks, N.P. (2008). General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 370–386.
- Franks, N.P., and Honoré, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 601–608.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1984). Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310, 599–601.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1985). Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature* 316, 349–351.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1991). Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* 254, 427–430.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367, 607–614.
- Frenkel, D., and Smit, B. (2002). *Understanding molecular simulation from algorithms to applications* (San Diego: Academic Press).
- Grossfield, A. WHAM: The Weighted Histogram Analysis Method.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85–100.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441–443.
- Herold, K.F., and Hemmings Jr., H.C. (2012). Sodium Channels as Targets for Volatile Anesthetics. *Front Pharmacol* 3.
- Herold, K.F., Sanford, R.L., Lee, W., Andersen, O.S., and Hemmings, H.C. (2017). Clinical concentrations of chemically diverse general anesthetics minimally affect lipid bilayer properties. *PNAS* 201611717.
- Hess, B. (2002). Convergence of sampling in protein simulations. *Phys. Rev. E* 65, 031910.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684–2695.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer Associates Inc).
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500–544.
- Hoover, W.G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31, 1695–

1697.

Hoshi, T., and Armstrong, C.M. (2013). C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: Pore constriction or dilation? *J Gen Physiol* *141*, 151–160.

Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* *250*, 533–538.

Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* *7*, 547–556.

Huang, J., and MacKerell, A.D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* *34*, 2135–2145.

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

Jayakar, S.S., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., and Cohen, J.B. (2013). Identification of Propofol Binding Sites in a Nicotinic Acetylcholine Receptor with a Photoreactive Propofol Analog. *J Biol Chem* *288*, 6178–6189.

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

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

Jevtovic-Todorovic, V. (2016). General Anesthetics and Neurotoxicity: How much do we know? *Anesthesiol Clin* *34*, 439–451.

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

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

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

Jurd, R., Arras, M., Lambert, S., Drexler, B., Siegwart, R., Crestani, F., Zaugg, M., Vogt, K.E., Ledermann, B., Antkowiak, B., et al. (2003). General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J.* *17*, 250–252.

Kästner, J. (2009). Umbrella integration in two or more reaction coordinates. *J Chem Phys* *131*, 034109.

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

Kiss, L., LoTurco, J., and Korn, S.J. (1999). Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J* *76*, 253–263.

Köpfer, D.A., Song, C., Gruene, T., Sheldrick, G.M., Zachariae, U., and Groot, B.L. de (2014). Ion permeation in K⁺ channels occurs by direct Coulomb knock-on. *Science* *346*, 352–355.

Kumar, S., Rosenberg, J.M., Bouzida, D., Swendsen, R.H., and Kollman, P.A. (1992). THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* *13*, 1011–1021.

- Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T., and Doyle, D.A. (2003). Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science* 300, 1922–1926.
- LeBard, D.N., Hénin, J., Eckenhoff, R.G., Klein, M.L., and Brannigan, G. (2012). General Anesthetics Predicted to Block the GLIC Pore with Micromolar Affinity. *PLOS Computational Biology* 8, e1002532.
- Leeb-Lundberg, F., Snowman, A., and Olsen, R.W. (1980). Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7468–7472.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001). Kcsa: It's a potassium channel. *J Gen Physiol* 118, 303–314.
- Lerman, J. (2007). Inhalation agents in pediatric anaesthesia – an update. *Current Opinion in Anesthesiology* 20, 221.
- Liang, Q., Barber, A.F., Souza, C.S., Treptow, W., and Covarrubias, M. (2013). Novel Modulation of a Kv1.2 Chimera by Volatile Anesthetics. *Biophysical Journal* 104, 126a.
- Liang, Q., Anderson, W.D., Jones, S.T., Souza, C.S., Hosoume, J.M., Treptow, W., and Covarrubias, M. (2015). Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLoS ONE* 10, e0143363.
- Lindahl, E., Hess, B., and Spoel, D. van der (2001). GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 7, 306–317.
- Lioudyno, M.I., Birch, A.M., Tanaka, B.S., Sokolov, Y., Goldin, A.L., Chandy, K.G., Hall, J.E., and Alkire, M.T. (2013). 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.* 33, 16310–16322.
- Liu, Y., Jurman, M.E., and Yellen, G. (1996). Dynamic Rearrangement of the Outer Mouth of a K⁺ Channel during Gating. *Neuron* 16, 859–867.
- Liu, Y.-S., Sompornpisut, P., and Perozo, E. (2001). Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Mol Biol* 8, 883–887.
- Lolicato, M., Riegelhaupt, P.M., Arrigoni, C., Clark, K.A., and Minor Jr., D.L. (2014). Transmembrane Helix Straightening and Buckling Underlies Activation of Mechanosensitive and Thermosensitive K2P Channels. *Neuron* 84, 1198–1212.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005a). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* 309, 897–903.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005b). Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* 309, 903–908.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H., and Aldrich, R.W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Recept. Channels* 1, 61–71.
- Lu, N., Kofke, D.A., and Woolf, T.B. (2004). Improving the efficiency and reliability of free energy perturbation calculations using overlap sampling methods. *J. Comput. Chem.* 25, 28–40.
- Lu, T., Ting, A.Y., Mainland, J., Jan, L.Y., Schultz, P.G., and Yang, J. (2001). Probing ion permeation and

- gating in a K⁺ channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci* 4, 239–246.
- Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K⁺ Channels. *J Gen Physiol* 120, 663–676.
- Lugli, A.K., Yost, C.S., and Kindler, C.H. (2009). Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol* 26, 807–820.
- MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., et al. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. *J. Phys. Chem. B* 102, 3586–3616.
- Matulef, K., Komarov, A.G., Costantino, C.A., and Valiyaveetil, F.I. (2013). Using protein backbone mutagenesis to dissect the link between ion occupancy and C-type inactivation in K⁺ channels. *PNAS* 110, 17886–17891.
- McCusker, E.C., Bagn eris, C., Naylor, C.E., Cole, A.R., D’Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* 3, 1102.
- Miller, A.N., and Long, S.B. (2012). Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1. *Science* 335, 432–436.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., et al. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.
- Nos e, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics* 52, 255–268.
- Nury, H., Poitevin, F., Renterghem, C.V., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010). One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *PNAS* 107, 6275–6280.
- Ogielska, E.M., and Aldrich, R.W. (1999). Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J. Gen. Physiol.* 113, 347–358.
- Ostmeyer, J., Chakrapani, S., Pan, A.C., Perozo, E., and Roux, B. (2013). Recovery from slow inactivation in K⁺ channels is controlled by water molecules. *Nature advance online publication*.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993–996.
- Panyi, G., and Deutsch, C. (2006). Cross Talk between Activation and Slow Inactivation Gates of Shaker Potassium Channels. *J Gen Physiol* 128, 547–559.
- Pathak, M., Kurtz, L., Tombola, F., and Isacoff, E. (2005). The Cooperative Voltage Sensor Motion that Gates a Potassium Channel. *J Gen Physiol* 125, 57–69.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Payandeh, J., El-Din, T.M.G., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135–139.
- Perozo, E., Cortes, D.M., and Cuello, L.G. (1999). Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* 285, 73–78.

- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1781–1802.
- Pohorille, A., Jarzynski, C., and Chipot, C. (2010). Good Practices in Free-Energy Calculations. *J. Phys. Chem. B* 114, 10235–10253.
- Ponder, J.W., and Case, D.A. (2003). Force Fields for Protein Simulations. In *Advances in Protein Chemistry*, Valerie Daggett, ed. (Academic Press), pp. 27–85.
- Proks, P., Capener, C.E., Jones, P., and Ashcroft, F.M. (2001). Mutations within the P-Loop of Kir6.2 Modulate the Intraburst Kinetics of the Atp-Sensitive Potassium Channel. *J Gen Physiol* 118, 341–353.
- Rask-Andersen, M., Almén, M.S., and Schiöth, H.B. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 579–590.
- Richards, C.D. (1983). Actions of general anaesthetics on synaptic transmission in the CNS. *Br J Anaesth* 55, 201–207.
- Rotem, D., Mason, A., and Bayley, H. (2010). Inactivation of the KcsA potassium channel explored with heterotetramers. *J Gen Physiol* 135, 29–42.
- Roux, B., Nina, M., Pomès, R., and Smith, J.C. (1996). Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys J* 71, 670–681.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16, 19–34.
- Schuler, L.D., Daura, X., and van Gunsteren, W.F. (2001). An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* 22, 1205–1218.
- Seeman, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* 24, 583–655.
- Shaw, D.E., Deneroff, M.M., Dror, R.O., Kuskin, J.S., Larson, R.H., Salmon, J.K., Young, C., Batson, B., Bowers, K.J., Chao, J.C., et al. (2008). Anton, a Special-purpose Machine for Molecular Dynamics Simulation. *Commun. ACM* 51, 91–97.
- Shaya, D., Findeisen, F., Abderemane-Ali, F., Arrigoni, C., Wong, S., Nurva, S.R., Loussouarn, G., and Minor Jr., D.L. (2013). Structure of a Prokaryotic Sodium Channel Pore Reveals Essential Gating Elements and an Outer Ion Binding Site Common to Eukaryotic Channels. *Journal of Molecular Biology*.
- Slater, S.J., Cox, K.J., Lombardi, J.V., Ho, C., Kelly, M.B., Rubin, E., and Stubbs, C.D. (1993). Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364, 82–84.
- Sotomayor, M., and Schulten, K. (2004). Molecular Dynamics Study of Gating in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance MscS. *Biophysical Journal* 87, 3050–3065.
- Starkus, J.G., Kuschel, L., Rayner, M.D., and Heinemann, S.H. (1997). Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 539–550.
- Stock, L. (2013). Mecanismos de condução iônica em canais de sódio. *Dissertação / Dissertation*. Universidade de Brasília.
- Stock, L., Souza, C., and Treptow, W. (2013). Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels. *Biochemistry* 52, 1501–1513.

- Stock, L., Hosoume, J., and Treptow, W. (2017). Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. *Scientific Reports* 7, 5734.
- Stock, L., Hosoume, J., Cirqueira, L., and Treptow, W. (2018). Binding of general anesthetics to ion channels. *BioRxiv* 266809.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. , Published Online: 22 June 1989; | Doi:10.1038/339597a0 339, 597–603.
- Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Payandeh, J., Martinez, G.Q., Heard, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2013). Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature advance online publication*.
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.
- Thompson, A.N., Posson, D.J., Parsa, P.V., and Nimigean, C.M. (2008). Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6900–6905.
- Thomson, A.S., Heer, F.T., Smith, F.J., Hendron, E., Bernèche, S., and Rothberg, B.S. (2014). Initial steps of inactivation at the K⁺ channel selectivity filter. *PNAS* 111, E1713–E1722.
- Torrie, G.M., and Valleau, J.P. (1977). Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics* 23, 187–199.
- Treptow, W., and Klein, M.L. (2010). The Membrane-Bound State of K2P Potassium Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8145–8151.
- Treptow, W., and Tarek, M. (2006a). Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels. *Biophys J* 91, L26–L28.
- Treptow, W., and Tarek, M. (2006b). Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* 90, L64–L66.
- Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455–461.
- Vargas, E., Yarov-Yarovoy, V., Khalili-Araghi, F., Catterall, W.A., Klein, M.L., Tarek, M., Lindahl, E., Schulten, K., Perozo, E., Bezanilla, F., et al. (2012). An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* 140, 587–594.
- Verlet, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* 159, 98–103.
- Villani, A., Zuccoli, P., Rovella, C., Laviani, R., Gulli, E., Guddo, A.M., Scoyni, G., and Casati, A. (1998). A prospective, randomized clinical comparison of sevoflurane and halothane in children. *Minerva Anestesiol* 64, 3–10.
- Werner, D.F., Swihart, A., Rau, V., Jia, F., Borghese, C.M., McCracken, M.L., Iyer, S., Fanselow, M.S., Oh, I., Sonner, J.M., et al. (2011). Inhaled Anesthetic Responses of Recombinant Receptors and Knockin Mice Harboring α 2(S270H/L277A) GABAA Receptor Subunits That Are Resistant to Isoflurane. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 134–144.
- Westen, G.J.P. van, Gaulton, A., and Overington, J.P. (2014). Chemical, Target, and Bioactive Properties of Allosteric Modulation. *PLOS Computational Biology* 10, e1003559.

- Woll, K.A., Dailey, W.P., Brannigan, G., and Eckenhoff, R.G. (2016). Shedding Light on Anesthetic Mechanisms: Application of Photoaffinity Ligands. *Anesth Analg* *123*, 1253–1262.
- Woll, K.A., Peng, W., Liang, Q., Zhi, L., Jacobs, J.A., Maciunas, L., Bhanu, N., Garcia, B.A., Covarrubias, M., Loll, P.J., et al. (2017). Photoaffinity Ligand for the Inhalational Anesthetic Sevoflurane Allows Mechanistic Insight into Potassium Channel Modulation. *ACS Chem. Biol.* *12*, 1353–1362.
- Yang, M., and Wei, H. (2017). Anesthetic neurotoxicity: Apoptosis and autophagic cell death mediated by calcium dysregulation. *Neurotoxicol Teratol* *60*, 59–62.
- Yang, Y., Cui, Y., Sang, K., Dong, Y., Ni, Z., Ma, S., and Hu, H. (2018). Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* *554*, 317–322.
- Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A., and Clapham, D.E. (2002). The Cation Selectivity Filter of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac. *J Gen Physiol* *120*, 845–853.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1994). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *The Journal of General Physiology* *103*, 321–362.
- Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., et al. (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* *486*, 130–134.
- Zheng, J., and Sigworth, F.J. (1997). Selectivity Changes during Activation of Mutant Shaker Potassium Channels. *J Gen Physiol* *110*, 101–117.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel–Fab complex at 2.0 [angst] resolution. *Nature* *414*, 43–48.
- (2015). *Handbook of Ion Channels* (Boca Raton: CRC Press).

ANEXOS

Anexo 1: Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. Stock, L., Hosoume, J. & Treptow, W. *Scientific Reports* 7, 5734 (2017). doi:10.1038/s41598-017-05896-8

Anexo 2: Binding of general anesthetics to ion channels. Stock, L., Hosoume, J., Cirqueira, L., and Treptow, W. *BioRxiv* 266809 (2018). doi:10.1101/266809

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins

Letícia Stock, Juliana Hosoume & Werner Treptow

Membrane proteins are primary targets for most therapeutic indications in cancer and neurological diseases, binding over 50% of all known small molecule drugs. Understanding how such ligands impact membrane proteins requires knowledge on the molecular structure of ligand binding, a reasoning that has driven relentless efforts in drug discovery and translational research. Binding of small ligands appears however highly complex involving interaction to multiple transmembrane protein sites featuring single or multiple occupancy states. Within this scenario, looking for new developments in the field, we investigate the concentration-dependent binding of ligands to multiple saturable sites in membrane proteins. The study relying on docking and free-energy perturbation provides us with an extensive description of the probability density of protein-ligand states that allows for computation of thermodynamic properties of interest. It also provides one- and three-dimensional spatial descriptions for the ligand density across the protein-membrane system which can be of interest for structural purposes. Illustration and discussion of the results are shown for binding of the general anesthetic sevoflurane against Kv1.2, a mammalian ion channel for which experimental data are available.

Membrane proteins are critical for diverse processes in cells. Given their relevance, membrane proteins are targets for a large family of ligands, including small drug molecules featuring a wide spectrum of pharmaceutical properties. How such ligands modulate the function of membrane proteins must at some point build on understanding ligand binding, a reasoning that has driven growing efforts in the field¹. Currently, though not refuting a membrane-mediated mechanism in which ligands may impact proteins indirectly through modification of bilayer properties², high-resolution measurements and manifold studies involving molecular dynamics (MD) support that small ligands bind membrane proteins at low concentrations^{3–14}. Specifically, partitioning of such molecules across the water-membrane phases allows accessibility-to and binding-to multiple transmembrane (TM) protein sites featuring single or multiple occupancy states. In contrast to typical one-to-one substrate interactions against enzymes, binding of small ligands to membrane receptors appears highly complex and might depend further on chemotypes, protein-types and conformations as recently evidenced in structural studies of ion channels^{5, 11}. Within this scenario, solution of the problem implies demonstrating ligand binding and determining from first principles how that affects protein equilibrium to modulate function. Although some progress has been made in one or more of these aspects, a detailed description of the problem still misses.

Here, as a pre-requisite to solve this hierarchical problem, we investigate ligand binding to a specific protein conformation that features multiple sites occupied by one or more ligands in a concentration-dependent manner. For that purpose, we present a rigorous theoretical framework to tackle the problem via a combined docking and free-energy perturbation (FEP) approach. In part, the framework represents an extension of previous treatment dealing with binding of water molecules to a single receptor site of the bacteriorhodopsin proton channel¹⁵. Specifically, the theory provides us with a complete description of the probability density of the protein-ligand bound states allowing for computation of any thermodynamic properties of interest. Besides that, a three-dimensional description of the binding problem is readily derived by mapping state-dependent into space-dependent probability densities of the ligand which can be of special interest for structural measurements.

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional (LBTC), Universidade de Brasília DF, Brasília, DF, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to W.T. (email: treptow@unb.br)

Illustration and discussion of the approach is presented for binding of the general anesthetic sevoflurane against Kv1.2, a mammalian voltage-gated potassium channel for which experimental data are available.

Theory and Methods

Consider a microscopic system constituted by M molecular species in thermodynamic equilibrium. The potential energy of the system is $U(\mathbf{r}^M)$ with $\mathbf{r}^M \equiv \{\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{r}_{N+1}, \dots, \mathbf{r}_M\}$ denoting the degrees of freedom of the M molecular constituents; \mathbf{r}_i is a shorthand for the entire set of Cartesian coordinates of molecule i . The system comprises of a single protein receptor fixed at the origin of the coordinate system and embedded in a *large* membrane-aqueous volume that contains N identical ligands under dilute conditions. The protein is assumed to remain in a well-defined conformational state providing with s distinct binding sites for ligands. For simplicity, we consider that ligands dissolve uniformly across the membrane-aqueous region of the system from where they can partition into the protein binding sites. The lipid and aqueous phases thus provide with a reservoir volume V occupied by ligands at constant density $\bar{\rho}$ and *excess* chemical potential $\bar{\mu}$. We consider further that every site $j = 1, \dots, s$ corresponds to a discrete volume δV_j that can be populated by $0 \leq n_j \leq n_j^{\max}$ ligands. Then, there is a maximum number of bound O states accessible to the protein receptor in the system, $\max(O) = \prod_{j=1}^s (n_j^{\max} + 1)$. We denote by $O(n_1, \dots, n_s)$ the specific state featuring exactly n_j bound ligands at corresponding sites and by $n = n_1 + \dots + n_s$ the total number of bound ligands in this state.

Equilibrium binding constant. Under these considerations, solution of ligand binding to multiple receptor sites relies fundamentally on determining the equilibrium constant $K(n_1, \dots, n_s)$ for the process $O(0_1, \dots, 0_s) + nL \rightleftharpoons O(n_1, \dots, n_s)$ where, $O(0_1, \dots, 0_s)$ is the empty receptor state with all ligands occupying the system reservoir^{16–19}. Because the system is dilute, $K(n_1, \dots, n_s)$ relates to the microscopic probability densities of each of the reaction species at equilibrium

$$K(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{\rho(n_1, \dots, n_s)}{\rho(0_1, \dots, 0_s)} \quad (1)$$

in which, $\rho(n_1, \dots, n_s)$ denotes the probability of finding the protein receptor at the ligand-bound state $O(n_1, \dots, n_s)$. Note that for dilute solutions, equation (1) is equivalent to its classical definition in terms of the concentration of each of the species in the process.

For a fixed temperature $\beta = (k_B T)^{-1}$, $\rho(n_1, \dots, n_s)$ is formally expressed as the canonical probability density of the system²⁰ which allows restatement of equation (1)

$$K(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\mathbf{r}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{r}^{n_s} \int_V d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int_V d\mathbf{r}^N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \quad (2)$$

in terms of configuration integrals over the ligand-bound $O(n_1, \dots, n_s)$ and ligand-free $O(0_1, \dots, 0_s)$ states of the protein. Here, the volume integral over the reservoir and site specific regions of the system are restricted to microscopic configurations \mathbf{r}^M accessible to $O(n_1, \dots, n_s)$ and $\frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!}$ corrects for the degeneracy of the state given the indistinguishable nature of the ligands.

In the present form, equation (2) can be evaluated in the context of MD simulations and free-energy perturbation (FEP) calculations²¹ by taking into consideration the reversible work $W(\mathbf{R}^n)$ associated with the centroid configuration $\mathbf{R}^n \equiv \{\mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_n\}$ of n ligands

$$K(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{\bar{\rho}^n} \times \frac{N!}{n_1! \dots n_s! (N-n)!} \frac{\int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)}}{\int_V d\mathbf{R}^N e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)}} \quad (3)$$

where,

$$e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)} = \frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*] \int d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U_o(\mathbf{r}^M)}}$$

is defined relative to a reference system $U_o(\mathbf{r}^M)$ in which all the interactions of the n ligands with the remaining particles of the system are switched off. Here, $\mathbf{R}_i(\mathbf{r}_i)$ is explicitly given

$$\mathbf{R}_i(\mathbf{r}_i) \equiv \frac{1}{N_i^{\text{atom}}} \sum_{(x,y,z) \in \mathbf{r}_i} (x, y, z)$$

from the Cartesian coordinates of the N_i^{atom} atoms of ligand i and $\{\mathbf{R}_1^*, \dots, \mathbf{R}_n^*\}$ is any arbitrary set of reference positions of the ligands in the system. Within this definition, $W(\mathbf{R}^n)$ corresponds to the free energy variation associated with transfer of ligands from gas phase to their molecular environments. Note that by construction, the single-molecule reversible work $W(\mathbf{R}_i)$ has a simple connection with the *excess* chemical potential $\bar{\mu}$ (or identically, the solvation free energy) for any position \mathbf{R}_i of the ligand in the reservoir that is, $e^{-\beta W(\mathbf{R}_i)} = e^{-\beta \bar{\mu}}$. The implications for the reservoir integral of n ligands in equation (3) are then clear

$$\int_V d\mathbf{R}^n e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)} = V^n e^{-\beta n\bar{\mu}} \quad (4)$$

given their weak couplings in the reservoir volume under dilute conditions that is, $W(\mathbf{R}^n) \approx W(\mathbf{R}_1) + \dots + W(\mathbf{R}_n)$. As presented in Computational Methods, $e^{-\beta\bar{\mu}}$ can be evaluated from one single FEP calculation handling the reversible decoupling of the ligand from the reservoir. On the other hand, estimation of the site specific integral in equation (3) by means of FEP requires the use of an auxiliary external potential to ensure an accurate sampling of the ligand in the binding site volume. This is critical to ensure that the ligand has a well defined chemical potential at the last stages of decoupling from the protein cavity^{15,16}. By defining a harmonic potential coupled to ligand i

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

in terms of a reference position \mathbf{R}_i^* of the ligand at the binding site then

$$\int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_s} d\mathbf{R}^{n_s} e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)} = \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta W_n^*} \quad (5)$$

in which W_n^* corresponds to the free-energy of n site-specific bound ligands relative to a gas phase state given that the same ligands $i = 1, \dots, n$ are restrained to occupy an *effective* volume $\left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right]$ centered at the equilibrium positions \mathbf{R}_i^* at the protein sites (*cf.* Supplementary Information text for details). Equations (3), (4) and (5) thus establish that

$$K(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1! \dots n_s!} \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[W_n^* - n\bar{\mu}]} \quad (6)$$

for the thermodynamic limit $N \gg n$, $\frac{N!}{(N-n)!} \approx N^n$. Here, $\frac{1}{n_1! \dots n_s!}$ corrects the equilibrium constant for the equivalent configurations of n_j indistinguishable ligands within the site volumes δV_j .

By describing the equilibrium constant in terms of ligand binding over multiple protein sites, equations (1) to (6) are generalizations of the formulation in reference¹⁵ dealing with water occupancy of the bacteriorhodopsin proton channel. Within this formulation, knowledge of $K(n_1, \dots, n_s)$ ensures the probability of any occupancy state

$$\rho(n_1, \dots, n_s) = \frac{\bar{\rho}^{(n_1+\dots+n_s)} K(n_1, \dots, n_s)}{\sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1+\dots+n'_s)} K(n'_1, \dots, n'_s)} \quad (7)$$

to be known in principle from free-energy calculations. Here, the normalization condition appearing on the denominator of equation (7) runs from the occupancy state $O(0_1, \dots, 0_s)$ up to $O(n_1^{max}, \dots, n_s^{max})$. The relevance of the result is clear

$$\langle A \rangle = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \langle A \rangle_{(n'_1, \dots, n'_s)} \rho(n'_1, \dots, n'_s) \quad (8)$$

as the ensemble average of any thermodynamic property of the system $A(n'_1, \dots, n'_s)$ for state $O(n'_1, \dots, n'_s)$ can be known from equation (8). Note, in equation (7), $\rho(n_1, \dots, n_s)$ depends on the density or concentration of the ligand in the reservoir thus providing us with a useful equation for investigation of concentration effects on binding.

From equation (6), an absolute binding free-energy $\Delta G^\circ(n_1, \dots, n_s)$ ¹⁶ associated with state $O(n_1, \dots, n_s)$ can be also defined as

$$\Delta G^\circ(n_1, \dots, n_s) = -\beta^{-1} \ln [K(n_1, \dots, n_s) \times (C^\circ)^n] \quad (9)$$

where it is understood that this refers to the free energy of binding n ligands to the protein receptor from a reference standard reservoir concentration $C^\circ = 1M$ or in units of number density $C^\circ = (1,660A^3)^{-1}$. The standard free energy

$$\Delta G^\circ(n_1, \dots, n_s) = [W_n^* - n\bar{\mu}] - \beta^{-1} \ln \left[\prod_{i=1}^n C^\circ \times \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] - \beta^{-1} \ln \left[\frac{1}{n_1! \dots n_s!} \right]$$

then rewrites in terms of three contributions: *i*) the free-energy variation of binding from the gas phase under restrained potentials minus the *excess* potential, *ii*) the free-energy change when the restrained, gas-phase ligands are allowed to expand to occupy a volume $(C^\circ)^{-n}$ and *iii*) the free-energy correction for n indistinguishable

ligands into the binding sites. Note that for the case of $n = 1$, this equation reduces to the familiar formulation considered in FEP studies, $\Delta G^\circ(n = 1) = [W_1^* - \bar{\mu}] - \beta^{-1} \ln \left[\frac{V_{\text{effective}}}{V_0} \right]$.

Independent binding sites. Although rigorously correct and insightful, equation (6) cannot be applied to solve in practice multiple correlated binding events. The complexity in estimating W_n^* from FEP increases significantly with the number of inter-correlated sites along the receptor structure. In contrast, equation (6) can be simplified under the condition of ligand interactions to multiple independent sites; a condition that we expect to be fulfilled in large membrane proteins featuring sparse binding sites for ligands. Within this scenario, the PMF $W(R^n)$ for the bound state of n ligands can be approximated

$$W(R^n) = W(R^{n_1}, \dots, R^{n_s}) \approx W(R^{n_1}) + \dots + W(R^{n_s}) \quad (10)$$

thus ensuring the binding constant $K(n_1, \dots, n_s)$ to be factorized, as the product of independent equilibrium constants

$$K(n_1, \dots, n_s) = K(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times K(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) \quad (11)$$

where,

$$K(n_1, 0_2, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1!} \left[\prod_{i=1}^{n_1} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta [W_{n_1}^* - n_1 \bar{\mu}]} \\ \dots \\ K(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) = \frac{1}{n_s!} \left[\prod_{i=1}^{n_s} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta [W_{n_s}^* - n_s \bar{\mu}]} \quad (12)$$

denote respectively the binding constant of n_j ligands to each of the j sites on the receptor structure. Description of equation (11) is of practical relevance by allowing computation of $K(n_1, \dots, n_s)$ from a series of independent and parallel free-energy calculations aimed at determining binding affinities individually.

Position-dependent probability densities. So far, the treatment describes the probability density of states $\rho(n_1, \dots, n_s)$. For further progress, we explore mapping $\rho(n_1, \dots, n_s)$ into the probability density $\rho(\mathbf{R})$ of any given ligand i to occupy position \mathbf{R} in the system (regardless the position of the remaining $N - 1$ ligands). The probability density $\rho(\mathbf{R})$ is given by

$$\rho(\mathbf{R}) = \frac{N}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}_1'(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}] \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}$$

where, $\mathbf{R}_1'(\mathbf{r}_1)$ is the instantaneous centroid position of ligand $i = 1$ in the system. The factor N accounts for equivalent configurations of the indistinguishable ligands. Given our original consideration that the reservoir is a homogeneous volume occupied by ligands with position-independent density $\bar{\rho}$, the probability $\rho(\mathbf{R})$ simplifies to

$$\rho(\mathbf{R}) = \begin{cases} \rho_j(\mathbf{R}), & \forall \mathbf{R} \in \delta V_j \\ \bar{\rho}, & \text{reservoir} \end{cases} \quad (13)$$

for every protein site $j = 1, \dots, s$. The determination of $\rho(\mathbf{R})$ thus reduces in practice to knowledge of $\rho_j(\mathbf{R})$ within each site.

By defining the configuration-dependent number of bound ligands $n'_j(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$ as a function of their centroid positions $\mathbf{R}_i(\mathbf{r}_i)$ in the system

$$n'_j(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \equiv \sum_{i=1}^N \left[\int d\mathbf{R} \delta[\mathbf{R}_i(\mathbf{r}_i) - \mathbf{R}] \right]$$

the probability density $\rho_j(\mathbf{R})$

$$\rho_j(\mathbf{R}) = \frac{N}{\int d\mathbf{r}^M e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}_1'(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}] \dots \\ \times \int d\mathbf{r}_N \overbrace{\left[\sum_{n_j=0}^{n_j} \delta[n'_j(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) - n_j] \right]}^{=1} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}$$

can be restated in terms of discrete occupancy states of the binding site,

$$\begin{aligned}
\rho_j(\mathbf{R}) &= \sum_{n_j=0}^{n_j^{\max}} \frac{\int_{n_j'(r_1, \dots, r_N)=n_j} d\mathbf{r}_1 \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}_1 \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \\
&\quad \times \frac{N \int_{n_j'(r_1, \dots, r_N)=n_j} d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}_1(r_1) - \mathbf{R}] \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int_{n_j'(r_1, \dots, r_N)=n_j} d\mathbf{r}_1 \dots \int d\mathbf{r}_N \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \\
&= \sum_{n_j=0}^{n_j^{\max}} \rho(n_j) \times \rho(\mathbf{R}|n_j)
\end{aligned} \tag{14}$$

in which, $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ is the local density at site j when occupied exactly by n_j molecules and $\rho(n_j)$ is the probability for this occupancy state. In the definition of $n_j'(r_1, \dots, r_N)$, the Dirac delta functions $\delta[\mathbf{R}_i(r_i) - \mathbf{R}]$ ensures counting of bound ligands within the site volume only. This definition is identical to that considered by Roux and coworkers¹⁵. In equation (14), $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ describes the local equilibrium density of the ligand, conditional to a specific number of bound molecules that satisfies $\int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \rho(\mathbf{R}|n_j) = n_j$. In contrast,

$$\rho(n_j) = \sum_{n_1', \dots, n_s'} \delta_{n_j', n_j} \rho(n_1', \dots, n_s') \tag{15}$$

denotes the marginal probability of site j to be occupied by n_j ligands regardless of the occupancy of the other sites.

Equations (13) and (14) establish a formal relation between space-dependent and state-dependent densities of the system. At a fine level, this relation involves the set of equilibrium constants $K(n_1, \dots, n_s)$ satisfying $\rho(n_j)$. The result can be of interest by embodying the probability densities of multiple occupancy states of the protein receptor into $\rho(\mathbf{R})$. Besides that, equations (13) and (14) can be useful for analysis of spatial projections of $\rho(\mathbf{R})$. For instance, the density profile along the z direction of the system can be achieved as

$$\rho(z) = \bar{\rho} \times A(z) + \sum_{j=1}^s \rho_j(z) \tag{16}$$

where, $A(z) = \Delta x \Delta y$ is the total area of the membrane-aqueous region along the Cartesian x and y directions (cf. Supplementary Information for details).

Symmetry of membrane proteins. For completeness, note that we have considered $j = 1, \dots, s$ distinguishable sites for ligand binding on the protein receptor with volume δV_j and site-specific affinity $K(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s)$. Typically, membrane proteins are in average f -fold symmetric structures given their oligomeric nature. Therefore, there might be effectively $k = 1, \dots, s' \leq s$ distinguishable sites for ligand binding across the protein subunits such that

$$\begin{cases} \delta V_j = \delta V_k \\ K(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s) = K(0_1, \dots, n_k, \dots, 0_{s'}) \end{cases}$$

for every $j \in \{j\}_k$. This implies that $K(n_1, \dots, n_s)$ for any occupancy state of the protein involving s independent sites can be reconstructed in average

$$K(n_1, \dots, n_s) = \prod_{k=1}^{s'} K(0_1, \dots, n_k, \dots, 0_{s'})^{\chi(n_k)} \tag{17}$$

from the individual affinities of k distinguishable sites allowing all previous results to be derived accordingly. Here, $\chi(n_k)$ is the symmetry number for the site occupancy n_k appearing in state $O(n_1, \dots, n_s)$ - the symmetry number satisfies $s = \sum_{k=1}^{s'} \chi(n_k)$.

The f -fold symmetry ensures $K(0_1, \dots, n_k, \dots, 0_i)$ and derived results to be estimated from the average estimator

$$\bar{A}_k = \frac{1}{f} \sum_{j \in \{j\}_k} A_j \tag{18}$$

over the set of indistinguishable independent sites $j \in \{j\}_k$, with associated statistical errors $\sigma_{\bar{A}}^2 = \bar{A}_k^2 - \bar{A}_k^2$. Note that, \bar{A}_k only converges $\sigma_{\bar{A}}^2 \rightarrow 0$ in the limit of a complete ensemble for the protein conformation under consideration.

Computational methods. A procedure was designed to solve the molecular binding of the haloether sevoflurane to the Kv1.2 channel under assumption of independent binding sites and saturation conditions up to $n_j^{\max} = 2$. The procedure consisted of (i) an extensive production of docking solutions for the ligand-receptor interaction, (ii) clustering of docking solutions into binding sites along the receptor structure and (iii) estimation of binding affinities using the free-energy perturbation (FEP) method. First completion of steps (i) through (iii)

solved the ligand channel interaction for singly-occupied binding sites. Double occupancy of receptor sites were investigated by inputting the first generated ensemble of docked structures into another round of (i) through (iii) calculations. In detail, step (i) was accomplished by docking sevoflurane as a flexible ligand molecule against an MD-generated ensemble of membrane-equilibrated structures of the channel to properly handle the molecular flexibility of the protein receptor. Docking calculations were restricted to the pore domain region of the channel, free from the membrane surroundings. Step (ii) provided the location of δV_j volumes lodging docking solutions for the ligand along the channel structure. Each of these volumes were treated as binding site regions in step (iii) calculations.

Following this procedure, binding constants were solved by inputting the FEP estimates into equations (11) and (12), allowing for direct solution of $\rho(n_1, \dots, n_s)$ via equation (7). Determination of $\rho(\mathbf{R})$ followed equations (13) and (14) with $\rho(n_j)$ calculated according to equation (15) and $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ estimated from the ensemble of docking solutions. Both estimates $\rho(n_1, \dots, n_s)$ and $\rho(\mathbf{R})$ were solved for sevoflurane concentrations in the range of 1–1000 mM. A detailed description of the calculations is provided as Supplementary Text.

Results

Here, the main goal is to contribute a theoretical structure-based study of concentration-dependent binding of ligands against multiple saturable sites in membrane proteins. The work is illustrated in the context of binding of the general anesthetic sevoflurane to the well-understood open structure of the Kv1.2 channel^{22,23}. Our choice is justified as previous findings support that sevoflurane binds Kv1.2 through multiple sites²⁴ to induce potentiation in a dose-dependent manner²⁵.

Ligand reservoir. In Theory and Methods, the equilibrium binding constant (see equation (6)) and following results are derived in the limit of a *homogeneous* diluted reservoir occupied by ligands at constant density $\bar{\rho}$ and *excess* chemical potential $\bar{\mu}$. Given that, we treated the system reservoir as a homogeneous aqueous solution despite its intrinsic inhomogeneity provided by the solvated lipid bilayer. An in-water *excess* potential of -0.1 kcal/mol (*cf.* Supplementary Information for details) was then estimated as the reservoir potential of sevoflurane and concentration effects were investigated for in-water densities $\bar{\rho}$ in the range of $6.02 \times 10^{-7} \text{ \AA}^{-3}$ – $6.02 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-3}$ (1 mM – 1000 mM in concentration units).

Resolution of ligand sites on the protein receptor. From a total of $\sim 15,000$ docking solutions, clustering analysis returned 12 interaction sites for sevoflurane on Kv1.2 (Fig. 1). The interaction sites spread over the TM region of the channel at the S4S5 linker, at the S6P-helix interface of adjacent subunits and at the extracellular face. A minimum site-to-site distance of $\sim 15 \text{ \AA}$ demonstrates their non-overlap distributions along the channel structure. Re-docking of sevoflurane generated in turn a total of $\sim 5,000$ solutions, solving the interaction of two ligands for all sites but the extracellular face.

Ligand binding at low 1 mM concentration. From the docking ensemble, there are up to 3^{12} occupancy states of the channel that might contribute to sevoflurane binding. To evaluate this quantitatively, we performed a series of FEP calculations to estimate the per site binding affinity for one and two bound ligands via equation (12) (Table 1, Supplementary Fig. S1). As shown in Table 1, binding constants (or absolute binding free-energies) for the individual sites are heterogeneous and take place under a diverse range *ie.*, 10^{-7} – 10^{+7} mM^{-1} . There is however a clear decreasing trend of affinities involving sites respectively at the S4S5 linker, S6P-helix interface and extracellular face.

Under the assumption of independent sites, equilibrium constants $K(n_1, \dots, n_s)$ for every occupancy state of the channel were then reconstructed from the per-site affinities (equation (11)) to determine the state probability $\rho(n_1, \dots, n_s)$ for a fixed ligand concentration in the reservoir (equation (7)). At low 1 mM concentration (Fig. 2), $\rho(n_1, \dots, n_s)$ is largely dominated by the probability of the empty state $\rho(0_1, \dots, 0_s)$ implying only a small fraction of channel occupied states with non-negligible occurrences. Within this fraction, the most likely states involve single and double sevoflurane occupancy of the S4S5 linker as expected from the affinities reported in Table 1. Consistent with $\rho(n_1, \dots, n_s)$, the average number of bound ligands computed from equation (8) is 0.08 molecules.

The complex distribution of the multiple occupied states of the channel was readily visualized in three dimensions by mapping $\rho(n_1, \dots, n_s)$ into the position-dependent density $\rho_j(\mathbf{R})$ of sevoflurane in each of the binding sites. As prescribed in equation (14), this involved reweighing the marginal probability $\rho(n_j)$ of site j by the local equilibrium density of the ligand $\rho(\mathbf{R}|n_j)$. Here, $\rho(n_j)$ was computed from equation (15) by coarse-graining over state probabilities in Fig. 2a whereas, $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ was calculated from the centroid distributions of docking solutions shown in Fig. 1b,c. As shown in Fig. 2, non-zero marginal probabilities for $n_j = 1$ and $n_j = 2$ take place only for sites at the S4S5 linker. The consequence for the distribution $\rho_j(\mathbf{R})$ at 1 mM is then clear, there is one dominant interaction spot for sevoflurane at the S4S5 linker that contrasts with vanishing densities at the other docking sites (Fig. 3). From equation (16), projection of $\rho_j(\mathbf{R})$ along the transmembrane direction z of the system, $\rho_j(z)$, stresses further the result.

Concentration dependence of ligand binding and saturation effects. So far, our study supports that in average 0.08 sevoflurane molecules bind Kv1.2 at 1 mM, preferentially at the S4S5 linker. It is informative to clarify further the dependence of the results on concentration changes of the ligand in the reservoir. Figures 2 and 3 show $\rho(n_1, \dots, n_s)$, $\rho_j(\mathbf{R})$ and related quantities for reservoir concentrations of 10 mM, 100 mM and 1 M. Here, estimates at 1 M must be seen with caution as the presented formulation is designed to describe dilute conditions only. Expectedly, there is a clear shift of $\rho(n_1, \dots, n_s)$ towards states of the channel that enhances signifi-

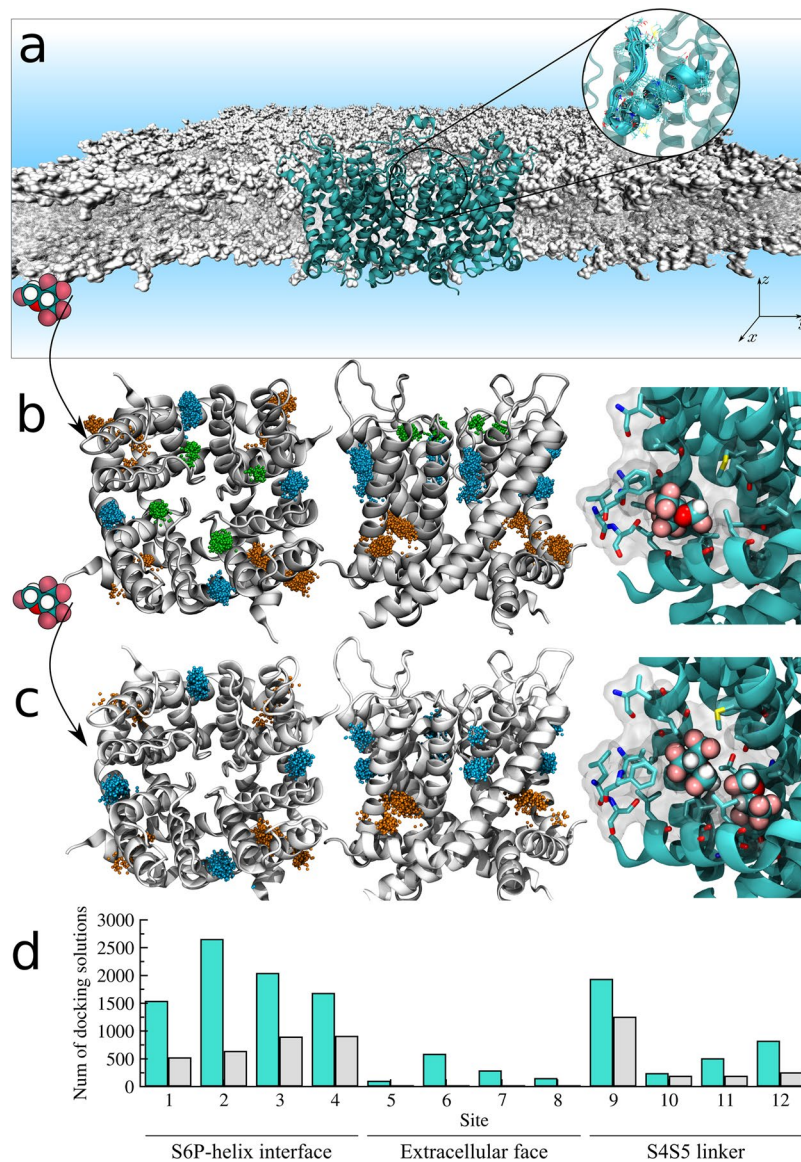


Figure 1. Resolution of sevoflurane sites on Kv1.2. **(a)** Molecular Dynamics simulation system containing the Kv1.2 channel (cyan) embedded in a fully-hydrated lipid bilayer (gray). Inset illustrates the MD-generated ensemble of channel structures considered for docking calculations. **(b)** Docking solutions for singly-occupied sites. Shown is the ensemble average structure of the channel along with the set of centroid configurations of sevoflurane (points) determined from docking. Centroid configurations of sevoflurane were clustered as a function of their location on the channel structure, that is at the S4S5 linker (orange), at the S6P-helix interface (blue) and at the extracellular face (green) next the selectivity filter. Each of these clusters was treated as an interaction site j for sevoflurane with volume δV_j . Inset shows a representative molecular structure resolved from docking. **(c)** Following another round of docking calculations started from structures in **(b)**, solutions for doubly-occupied sites were resolved by determining if volumes δV_j could accommodate the centroid positions of two docked ligands at once (inset). **(d)** Per site number of docking solutions for single (cyan) and double (gray) ligand occupancy. Voltage-sensor domains of the channel are not shown for clarity in **(b,c)**.

cantly the average number of bound ligands with concentration increase *ie.*, ~ 1.63 , 5.74 and 8.54 molecules. Careful inspection of $\rho(n_1, \dots, n_k)$ (or in a simpler way of $\rho(n_j)$) confirms the major relevance of sites at the S4S5 linker over the entire concentration range, accompanied by an increasing importance of binding regions at the S6P-helix interface. In contrast, the probability density for sites at the selectivity filter remains negligible for all concentrations. The density of sevoflurane $\rho_j(\mathbf{R})$ and its TM projection $\rho_j(z)$ make sense of the results by showing the concentration dependent population of bound ligands.

As shown in Table 1, note for completeness that equilibrium constants for doubly-occupied sites are comparable to or even higher than estimates for one-bound ligand thus revealing important saturation effects in which one or two ligands can stably bind the channel at individual sites. The result is especially true for spots at the S4S5 linker.

	Site	k_j	$W_1^* \pm \epsilon$	$K(0 \dots 1_j \dots 0)$	$\Delta G^\circ(0 \dots 1_j \dots 0)$	k_j	$W_{21}^* \pm \epsilon$	W_2^*	$K(0 \dots 2_j \dots 0)$	$\Delta G^\circ(0 \dots 2_j \dots 0)$
S6P-helix	1	0.053	-4.5 ± 0.2	$5.93E-01$	-3.8	0.196	-3.6 ± 0.2	$-8.1 + -0.4$	$5.41E+00$	-5.1
	2	0.141	-4.7 ± 0.2	$1.92E-01$	-3.1	0.137	-4.3 ± 0.2	$-9.0 + -0.4$	$9.71E+00$	-5.4
	3	0.084	-5.0 ± 0.2	$6.86E-01$	-3.9	0.084	-3.8 ± 0.3	$-8.8 + -0.5$	$3.14E+01$	-6.1
	4	0.036	-3.8 ± 0.3	$3.26E-01$	-3.4	0.174	-3.3 ± 0.4	$-7.1 + -0.7$	$2.14E+00$	-4.5
Ext. Face	5	0.530	1.5 ± 0.4	$7.57E-07$	4.3	—	—	—	—	—
	6	0.453	-0.8 ± 0.4	$4.63E-05$	1.8	—	—	—	—	—
	7	0.283	-0.8 ± 0.4	$9.36E-05$	1.4	—	—	—	—	—
	8	0.332	-4.2 ± 0.5	$2.28E-02$	-1.9	—	—	—	—	—
S4S5 linker	9	0.061	-6.4 ± 0.2	$1.18E+01$	-5.6	0.004	-4.0 ± 0.3	$-10.4 + -0.5$	$7.45E+04$	-10.7
	10	0.127	-7.5 ± 0.0	$2.51E+01$	-6.0	0.004	-5.2 ± 0.2	$-12.7 + -0.2$	$1.18E+06$	-12.4
	11	0.037	-6.7 ± 0.3	$4.19E+01$	-6.3	0.003	-7.0 ± 0.3	$-13.7 + -0.6$	$4.97E+07$	-14.6
	12	0.058	-5.6 ± 0.3	$3.30E+00$	-4.8	0.003	-6.1 ± 0.3	$-11.7 + -0.6$	$1.00E+06$	-12.3

Table 1. FEP calculations and equilibrium binding constants for singly- and doubly-occupied sites[#]. [#]Units for force constants k_j , $W_1^* \pm \epsilon$, $K(0 \dots 1_j \dots 0)$ and $\Delta G^\circ(0 \dots 1_j \dots 0)$ are kcal/mol/Å², kcal/mol, mM⁻ⁿ and kcal/mol, respectively. Idem for doubly occupied sites. W_2^* was computed as a two-step process $W_2^* = W_1^* + W_{21}^*$ involving ligand coupling to a vacant site W_1^* followed by binding of a second ligand at the preoccupied site W_{21}^* . FEP estimates and statistical errors (ϵ) were determined based on at least two independent FEP runs (*cf.* Supplementary Information for details).

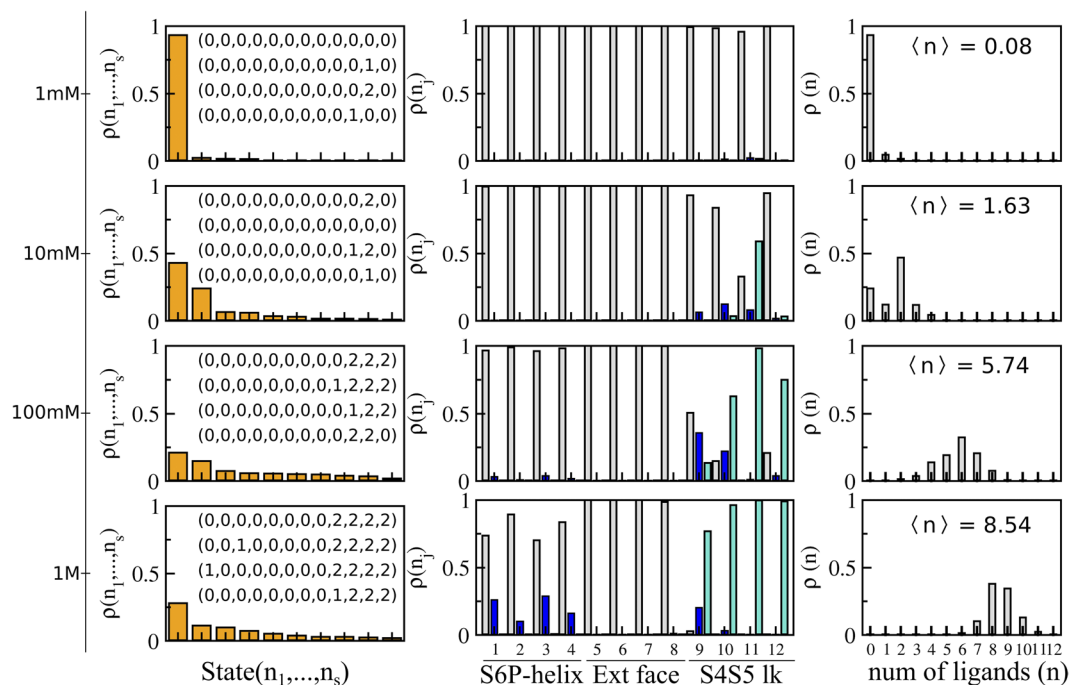


Figure 2. State-dependent binding probabilities for different concentrations of sevoflurane at the reservoir. (a) Sorted values of $\rho(n_1, \dots, n_s)$ over the channel occupancy states. Strings for the four most likely states are highlighted. (b) Marginal probabilities $\rho(n_j)$ of site j , for $n_j = 0$ (gray), $n_j = 1$ (blue) and $n_j = 2$ (cyan). (c) Probabilities $\rho(n)$ for macrostates $O(n)$. Here, $\rho(n_j)$ and $\rho(n)$ were computed by coarse-graining over state probabilities in (a) according to equation (15) and Supplementary equation S1, respectively. Average number $\langle n \rangle$ of bound ligands as a function of the reservoir concentration are indicated in (c).

4-fold symmetry. Kv1.2 is a homotetramer. Sevoflurane sites identified from docking are therefore indistinguishable across the channel subunits implying that there might effectively be 3 distinguishable regions for ligand binding on the channel structure that is, S4S5 linker, S6P-helix interface and selectivity filter. Table 2 shows average estimates and associated errors for sevoflurane affinities against each of these distinguishable regions. According to equation (18), statistical errors reflect the structural heterogeneity across the channel subunits implicit in the calculations as a result of finite MD-sampling of the Kv1.2 open conformation. Given that, Table 2 must provide us with statistically improved estimates when describing sevoflurane affinities to each of the distinguishable sites on Kv1.2. Following equation (17), we made symmetric all previous results for 1 M concentration

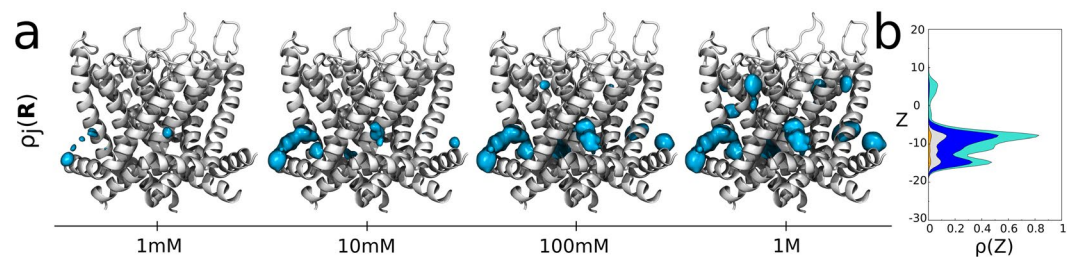


Figure 3. Position-dependent binding probabilities for different concentrations of sevoflurane at the reservoir. (a) Shown is the ensemble average structure of the channel along with the density $\rho_j(\mathbf{R})$ of sevoflurane (cyan) in each of the binding sites (isovalues of $9 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-3}$). Voltage-sensor domains are not shown for clarity. (b) Projection of $\rho_j(\mathbf{R})$ along the transmembrane direction z of the system, $\rho_j(z)$. Note that the TM projection of $\rho(\mathbf{R})$ across the entire channel-membrane system can be approximated by combining, into equation (16), the individual site projections $\rho_j(z)$ with projections elsewhere $\bar{\rho}(z) = \bar{\rho} \times A(z)$, where $\bar{\rho}$ is the ligand reservoir density and $A(z)$ is the membrane area.

	$K(0 \dots, 1_k \dots 0)$	$\Delta G^\circ(0 \dots, 1_k \dots 0)$	$K(0 \dots, 2_k \dots 0)$	$\Delta G^\circ(0 \dots, 2_k \dots 0)$
S6P-helix	$4.49\text{E}-01 \pm 1.99\text{E}-01$	-3.6	$1.22\text{E}+01 \pm 1.14\text{E}+01$	-5.6
Ext. face	$5.73\text{E}-03 \pm 9.84\text{E}-03$	-1.0		—
S4S5 linker	$2.06\text{E}+01 \pm 1.46\text{E}+01$	-5.9	$1.30\text{E}+07 \pm 2.12\text{E}+07$	-13.8

Table 2. Averaged-out estimates for singly- and doubly-occupied distinguishable sites[#]. [#]Units for binding constants $K(0 \dots 1_k \dots 0)$ and absolute binding free-energies $\Delta G^\circ(0 \dots 1_k \dots 0)$ considered for singly-occupied sites k are mM^{-n} and kcal/mol, respectively. Idem for doubly occupied sites.

of sevoflurane in the reservoir (Fig. 4). Reduction to symmetry causes redistribution of ligand-channel probabilities without modifying its average properties.

Discussion

Membrane proteins are primary targets for a large fraction of small molecule drugs that likely bind the protein receptor through complex concentration and saturation effects. Understanding the molecular structure of ligand binding thus prompts new advances in experimental and theoretical fronts, justifying the work herein. We presented a theoretical approach based on docking and FEP to study concentration-dependent interactions of ligands to multiple saturable sites in membrane receptors. Here, our study relies on two underlying assumptions that (i) docking can faithfully describe ligand interactions at protein sites and that (ii) binding events are independent over multiple sites. Specifically related to assumption (i), we have considered the generated ensemble of docking solutions to estimate the location of binding sites δV_j and the local distribution of the ligand $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ in each of the identified sites. The generation of false positive hits is however a well documented drawback of docking algorithms as a result of limitations of the scoring function in describing ligand solvation energies and protein flexibility²⁶. In this regard, the combination of extensive docking calculations against an ensemble of equilibrium receptor structures to handle protein flexibility and FEP calculations based on fine force-fields to accurately estimate solvation energies are critical aspects of the presented strategy to minimize such drawbacks²⁶. Given the same limitations of the scoring function, it is also not guaranteed that all binding hits nor that $\rho(\mathbf{R}|n_j)$ can be accurately known from docking. In this regard, although not considered here, it might be important to integrate docking results from different algorithms involving different scoring functions in order to characterize the bound ensemble. Still, thanks to the generality of the presented formulation, extension of the current approach to sampling techniques other than docking, including all-atom flooding-MD simulations^{3,6,7,11}, might also be an important refinement in that direction (*manuscript in preparation*). When compared to docking, flooding-MD applied to membrane protein has however the disadvantage of handling with full partition of the ligand into protein sites for which slow kinetics may reflect into high computational costs for sampling convergence. In relation with assumption (ii), it is true that for case specific systems, the additive PMF in equation (10) may be a severe approximation that will likely fail as soon as nearby sites are simultaneously occupied. Given that, elaboration of a proper treatment of site dependence in multiple binding events and evaluation of its usefulness will be highly welcome in future studies. Before that and for certain systems, the formulated work based on equation (10) must therefore be seen as an 0-level approximation of more elaborate and still more complex descriptions of the binding constant.

The approach is illustrated here in the context of sevoflurane binding to Kv1.2 over [1 mM – 1 M] and saturation conditions up to $n_j^{\text{max}} = 2$. A detailed description of sevoflurane binding and its implications for Kv1.2 function exceeds the main scope of this contribution and will be published elsewhere. Still, we find it pertinent to discuss key results of the study. The model system was chosen as previous findings support that sevoflurane binds Kv1.2 through multiple sites²⁴ to induce potentiation in a dose-dependent manner²⁵. Specifically, sevoflurane shifts leftward the voltage-dependence of channel and increases its maximum conductance. Overall, our calculations demonstrate that sevoflurane binds Kv1.2 in a concentration dependent manner, binding preferentially the

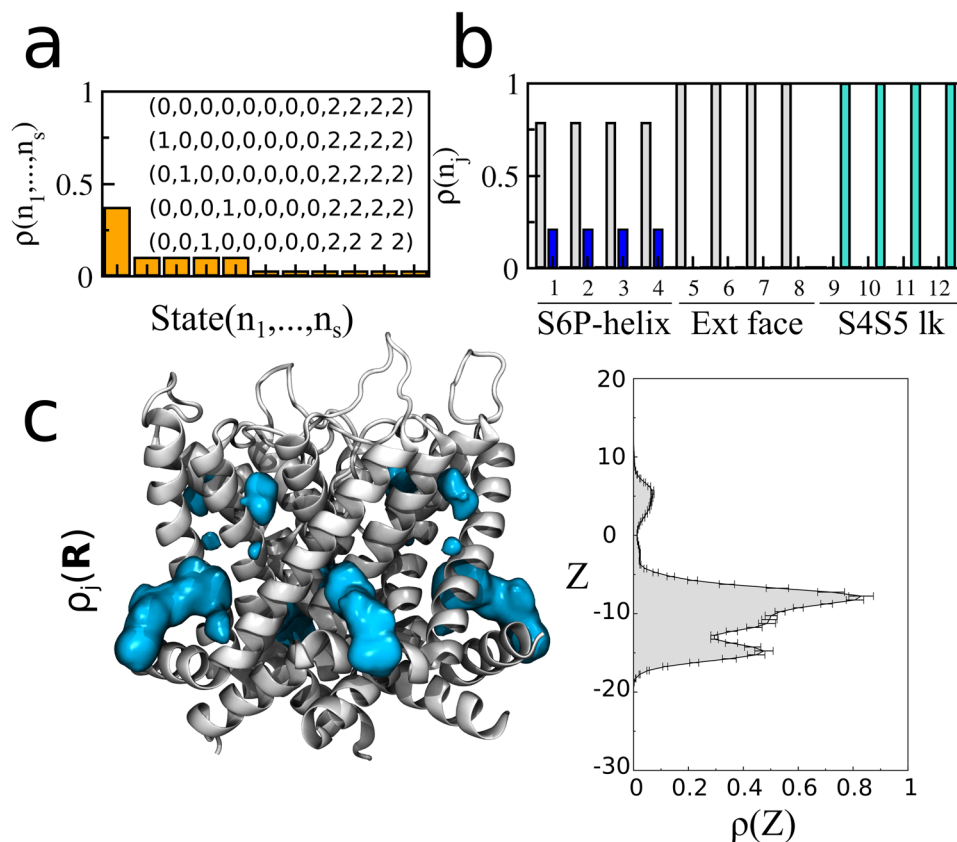


Figure 4. Symmetric state-dependent and position-dependent probabilities for sevoflurane at 1 M. **(a)** Sorted values of $\rho(n_1, \dots, n_s)$ over the channel occupancy states. Strings for the five most likely states are highlighted. **(b)** Marginal probabilities $\rho(n_j)$ of site j , for $n_j=0$ (gray), $n_j=1$ (blue) and $n_j=2$ (cyan). **(c)** Shown is the ensemble average structure of the channel along with the density $\rho_j(\mathbf{R})$ of sevoflurane (cyan) in each of the binding sites (isovalues of $9 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-3}$). Projection of $\rho_j(\mathbf{R})$ along the transmembrane direction z of the system $\rho_j(z)$ are also shown with error bars.

S4S5 linker and the S6P-helix interface over a range of concentrations. From a physical-chemical point of view, spots at these channel regions are primarily hydrophobic pockets (Supplementary Fig. S2) providing with favorable interaction sites for the uncharged sevoflurane molecule. In contrast to the aforesaid spots, sites nearby the selectivity filter of Kv1.2 are primarily hydrated amphiphilic pockets (Supplementary Fig. S2) that disfavors sevoflurane interaction as reflected in the free-energies shown in Table 1. The unfavorable binding free-energies for the singly-occupied site thus support that the non-negligible fraction of poses determined from docking (Fig. 1d) corresponds to low affinity or false positives.

Its is particularly worth of mention that our findings recapitulate independently very recent photolabeling experiments demonstrating that photoactive analogs of sevoflurane and propofol do interact at the S4S5 linker and the S6P-helix interface of Kv1.2 at the open-activated state^{27,28}. In detail, Leu317 and Thr384 were found to be protected from photoactive analogs, with the former being more protected than the latter. As highlighted in Supplementary Fig. S3, atomic distances of these amino-acid to bound sevoflurane molecules at the S4S5 linker and S6P-helix interface are found here to be respectively $5.5 \pm 1.1 \text{ \AA}$ and $10.6 \pm 1.1 \text{ \AA}$, in average more or less standard deviation. Such intermolecular distances imply their direct interactions with bound sevoflurane in agreement with the measured protective reactions. Besides that, our calculations also recapitulate the stronger protection of Leu317 in the sense that, relative to sites at the S6P-helix interface, the affinity of sevoflurane is found here to be higher at S4S5 linker given its stable occupancy by one or two ligands. The result is also consistent with previous Ala/Val-scanning mutagenesis showing a significant impact of S4S5 mutations on the effect of general anesthetics on family members of K^+ channels⁵. In special, a single residue (Gly329) at a critical pivot point between the S4S5 linker and the S5 segment underlines potentiation of Kv1.2 by sevoflurane²⁴. When bound at the S4S5, sevoflurane is found here to be in proximity to that amino acid (Supplementary Fig. S3).

The stable interaction of sevoflurane at the S4S5 linker of Kv1.2 is also consistent with independent structure-based calculations showing binding of one or two sevoflurane molecules at the linker of the homologous bacterial sodium channel NaChBac¹¹. On the other hand, the unfavorable or absent interactions at the central cavity and next the selectivity filter of Kv1.2 contrasts with sevoflurane binding at analogous regions of NaChBac¹¹ due major structural differences between Na^+ and K^+ channels. Specifically, the central cavity of potassium channels misses open-fenestrations of the sodium relatives²⁹ and K^+ -selective filters are sharply distinct from Na^+ -selective ones³⁰. Because sevoflurane induces potentiation rather than blocking of Kv1.2, we read

the negligible or absent density of the ligand at the central-cavity of the pore in Fig. 3 as a self-consistent result of the study.

Kv1.2 potentiation by sevoflurane has been attributed to stabilization of the open-conductive state of the channel²⁴. Given the critical role of the S4S5 linker for the gating mechanism of the channel²², it is likely that sevoflurane-S4S5 interactions as found here are at the origins of the experimentally measured voltage-dependent component of anesthetic action. Besides that, it is also likely that binding of sevoflurane at the S6P-helix interface might interfere allosterically with the selectivity filter operation thus affecting channel's conductance. Such hypotheses have been raised also in the context of anesthetic action on bacterial sodium channels^{7,11}. Corroboration of such hypotheses from a molecular perspective is however not trivial and will necessarily involve further structural studies to demonstrate how ligand binding affects protein equilibrium to modulate function.

As we advance in the early stages of the membrane structural biology field, our study treats and reveals a new layer of complexity in ligand binding that brings us novel paradigms to think the problem and to delineate research accordingly. Traditional methods have limited applicability to systems with multiple non-identical sites as such methods can only yield global- rather than relative-affinities for individual sites. Besides that, most of these methods provide us with apparent affinities derived from dose-response experiments which essentially are indirect measurements of the binding event. Ligand-induced modifications of the recorded ionic current of an ion channel is an example of such indirect measures. By gathering information at the level of individual sites that can be combined into the description of macrostates as well (see Supplementary equations S1 to S3), the approach here brings direct structural-level information that may therefore help to design and interpret experiments. For instance, affinity constants for individual sites can help rationalizing recordings from photoaffinity⁸ and NMR¹⁴ labeling measurements when probing ligand interactions to specific protein sites. Another important possibility may rely on the combination of our approach with measurements from high-resolution mass spectrometry¹³ and time-resolved x-ray/neutron interferometry³¹. Recent advances allow determining high-resolution spectra and electron-density profiles for membrane proteins in their native environment with concrete perspectives to determine such records for ligand-bound proteins as well. The link here between $\rho(n_1, \dots, n_s)$ and $\rho_f(\mathbf{R})$ can be therefore useful to resolve unique three-dimensional maps matching experiments. In this case, an auxiliary model distribution for the ligand heavy atoms would be required to describe the ligand electron density from the point distribution encoded in $\rho_f(\mathbf{R})$.

We believe the study is of broad interest by providing a common framework for investigation of ligands and membrane proteins, useful in producing new results in the field. To the best of our knowledge, Fig. 3 represents a deeper and first revealed structural view on the intricate mode of interactions that might take place between small ligands and membrane proteins. In particular, it becomes clear that from a molecular recognition standpoint, small ligands can be very promiscuous implying that not all binding events might elicit functional effects. Besides complex concentration and saturation effects, that promiscuous nature is also an important take home message that should guide new developments to properly account for ligand binding and its interplay with protein equilibrium and function.

References

- Mobley, D. L. & Dill, K. A. Binding of Small-Molecule Ligands to Proteins: "What You See" Is Not Always "What You Get". *Structure* **17**, 489–498 (2009).
- Cantor, R. S. Lateral Pressures in Cell Membranes: A Mechanism for Modulation of Protein Function. *J. Phys. Chem. B* **101**, 1723–1725 (1997).
- Brannigan, G., LeBard, D. N., Hénin, J., Eckenhoff, R. G. & Klein, M. L. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14122–14127 (2010).
- Kraszewski, S., Tarek, M., Treptow, W. & Ramseyer, C. Affinity of C60 Neat Fullerenes with Membrane Proteins: A Computational Study on Potassium Channels. *ACS Nano* **4**, 4158–4164 (2010).
- Barber, A. F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W. & Covarrubias, M. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys. J.* **101**, 1613–1622 (2011).
- LeBard, D. N., Hénin, J., Eckenhoff, R. G., Klein, M. L. & Brannigan, G. General Anesthetics Predicted to Block the GLIC Pore with Micromolar Affinity. *PLoS Comput. Biol.* **8** (2012).
- Raju, S. G., Barber, A. F., LeBard, D. N., Klein, M. L. & Carnevale, V. Exploring Volatile General Anesthetic Binding to a Closed Membrane-Bound Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel via Computation. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003090 (2013).
- Jayakar, S. S., Dailey, W. P., Eckenhoff, R. G. & Cohen, J. B. Identification of Propofol Binding Sites in a Nicotinic Acetylcholine Receptor with a Photoreactive Propofol Analog. *J. Biol. Chem.* **288**, 6178–6189 (2013).
- Bagn eris, C. *et al.* Prokaryotic NavMs channel as a structural and functional model for eukaryotic sodium channel antagonism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201406855, doi:10.1073/pnas.1406855111 (2014).
- Boiteux, C. *et al.* Local anesthetic and antiepileptic drug access and binding to a bacterial voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13057–13062 (2014).
- Barber, A. F., Carnevale, V., Klein, M. L., Eckenhoff, R. G. & Covarrubias, M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6726–6731 (2014).
- Dong, Y. Y. *et al.* K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* **347**, 1256–1259 (2015).
- Gault, J. *et al.* High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins. *Nat. Methods* **13**, 333–336 (2016).
- Kinde, M. N. *et al.* Fluorine-19 NMR and computational quantification of isoflurane binding to the voltage-gated sodium channel NaChBac. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 13762–13767 (2016).
- Roux, B., Nina, M., Pom es, R. & Smith, J. C. Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.* **71**, 670–681 (1996).
- Gilson, M. K., Given, J. A., Bush, B. L. & McCammon, J. A. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophys. J.* **72**, 1047–1069 (1997).
- Luo, H. & Sharp, K. On the calculation of absolute macromolecular binding free energies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10399–10404 (2002).
- Swanson, J. M. J., Henchman, R. H. & McCammon, J. A. Revisiting Free Energy Calculations: A Theoretical Connection to MM/PBSA and Direct Calculation of the Association Free Energy. *Biophys. J.* **86**, 67–74 (2004).

19. Woo, H.-J. & Roux, B. Calculation of absolute protein–ligand binding free energy from computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 6825–6830 (2005).
20. McQuarrie, D. A. *Statistical Mechanics* (University Science Books, 2000).
21. *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology* (Springer, 2007).
22. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
23. Souza, C. S., Amaral, C. & Treptow, W. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 17510–17515 (2014).
24. Liang, Q. *et al.* Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLoS One* **10**, e0143363 (2015).
25. Barber, A. F., Liang, Q. & Covarrubias, M. Novel activation of voltage-gated K⁺ channels by sevoflurane. *J. Biol. Chem.*, doi:[10.1074/jbc.M112.405787](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405787) (2012).
26. Deng, N. *et al.* Distinguishing Binders from False Positives by Free Energy Calculations: Fragment Screening Against the Flap Site of HIV Protease. *J. Phys. Chem. B* **119**, 976–988 (2015).
27. Bu, W. *et al.* Sites and Functional Consequence of Alkylphenol Anesthetic Binding to Kv1.2 Channels. *Mol. Neurobiol.* 1–11, doi:[10.1007/s12035-017-0437-2](https://doi.org/10.1007/s12035-017-0437-2) (2017).
28. Woll, K. A. *et al.* Photoaffinity Ligand for the Inhalational Anesthetic Sevoflurane Allows Mechanistic Insight into Potassium Channel Modulation. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1353–1362 (2017).
29. Barber, A. F. *et al.* Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2120–2125 (2012).
30. Treptow, W. & Klein, M. L. Computer Simulations of Voltage-Gated Cation Channels. *J Phys Chem Lett* **3**, 1017–1023 (2012).
31. Tronin, A. Y. *et al.* Direct Evidence of Conformational Changes Associated with Voltage Gating in a Voltage Sensor Protein by Time-Resolved X-ray/Neutron Interferometry. *Langmuir* **30**, 4784–4796 (2014).

Acknowledgements

The research was supported in part by the Brazilian Agencies CNPq and CAPES, under Grants 483968/2013-7, 305008/2015-3 and 23038.010052/2013-95. WT thanks CNPq for doctoral fellowship to LS (140845/2014-3).

Author Contributions

W.T. designed research; L.S. and J.H. performed research; L.S., J.H. and W.T. analyzed data; W.T. wrote the paper; L.S. and J.H. contributed equally to this work.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-05896-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05896-8)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary Information

Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins

Letícia Stock, Juliana Hosoume and Werner Treptow*

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional (LBTC), Universidade de Brasília DF, Brasil

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Membrane Equilibrated Channel Structures. The Kv1.2 structure in the open state was obtained from Treptow and Tarek.¹ The construct was previously acquired via molecular dynamics (MD) simulations of the published x-ray crystal structure.² Modeling details and validation can be found in the original paper.

The channel structure was embedded in the lipid bilayer for MD relaxation and subsequent molecular docking of sevoflurane. Specifically, the structure was inserted in a fully hydrated and neutral (zwitterionic) all atom palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) phospholipid bilayer. After assembled, the macromolecular system was simulated over an MD simulation spanning ~ 20 ns, at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm), neutral pH, and with no applied TM electrostatic potential. The channel structure remained stable in its starting open conformation throughout the simulations. In the Kv1.2 simulation, the root mean-square deviation (rmsd) values for the whole TM domain, as well as for segments S5S6 (pore) and the S4S5 linker, range from 1.0 to 3.5 Å, which agrees with the structural drift quantified in previous simulations of the channel.

Molecular Docking. Using *AutoDock Vina*,³ sevoflurane was docked against a MD-generated ensemble of 1200 structures of the channel. Docking solutions were resolved with an exhaustiveness parameter of 200, by searching a box volume of 50.0 x 50.0 x 100 Å³ containing the pore domain region of the protein receptor (voltage sensors were excluded from docking). Sevoflurane was allowed to have flexible bonds for all calculations. Clustering of docking solutions was carried out following a maximum neighborhood approach.

Molecular Dynamics. All MD simulations were carried out using the program NAMD 2.9.⁴ Langevin dynamics and Langevin piston methods were applied to keep the temperature (300 K) and the pressure (1 atm) of the system fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm.⁵ Short- and long-range forces were calculated every 1 and 2 time-steps respectively, with a time step of 2.0 fs. Also, periodic-boundary conditions were employed. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into account using the Particle Mesh Ewald (PME) approach.⁶ The CHARMM36 force field⁷ were applied and water molecules were described by the TIP3P model.⁸ All the protein charged amino acids were simulated in their full-ionized state (pH=7.0). All MD simulations including FEP calculations (see next) were performed on local HPC facility at LBTC.

Free-Energy Perturbation (FEP). The *excess* chemical potential $\bar{\mu}$ associated with coupling of the ligand from gas phase to bulk water and $W_{n_j}^*$ associated with coupling of n_j ligands from gas phase to site j under restraints were quantified via FEP. Because computation of $\bar{\mu}$ does not depend upon the choice of concentration, so long as the same thermodynamic state is used for the solution and gas phases, we estimated the *excess* potential by considering one sevoflurane molecule embedded into a water box of 60 x 60 x 60 Å³. $W_{n_j}^*$ was computed here by taking into considering the whole ligand-channel-membrane system.

All FEP calculations were performed in NAMD 2.9⁴ by considering the Charmm-based parameters for sevoflurane as devised by Barber *et al.*⁹ Starting from channel-membrane equilibrated systems containing bound sevoflurane as resolved from docking, forward transformation were carried out by varying the coupling parameter in steps of 0.05 (or for convergence purposes, in steps of 0.025 at final stages of the process). Each transformation then involved a total of 80 windows, each spanning over 32512 steps of simulation. For the purpose of improving statistics, free-energy estimates and associated statistical errors were determined using the simple overlap sampling (SOS) formula¹⁰ based on at least two independent FEP runs.

Specifically for ligand-protein calculations, the free-energy change W_1^* for singly-occupied sites was computed as a FEP process that involves ligand coupling to a vacant site. Differently, for doubly-occupied sites, W_2^* was computed as a two-step FEP process involving ligand coupling to a vacant site W_1^* followed by binding of a second ligand at the preoccupied site $W_{2|1}^*$. Because W_2^* is a state function, the stepwise approach is equivalent to a single-step process involving simultaneous coupling of two ligands to the protein site that is, $W_2^* = W_1^* + W_{2|1}^*$. The colvars module¹¹ in NAMD 2.9 was used to apply the harmonic restraint potentials when computing these quantities. As described in the main text, the value of $W_{n_j}^*$ depends on the parameters of the restraint potential adopted in the FEP calculation *ie.*, the reference positions of the ligands in the bound state $\{R_1^*, \dots, R_{n_j}^*\}$ and the magnitude of force constants $\{k_1, \dots, k_{n_j}\}$. By minimizing the contribution of the restraint potential to the binding free-energy $W_{n_j}^*$, Roux and coworkers¹² devised optimum choices for the parameters

$$\{\mathbf{R}_1^* = \langle \mathbf{R}_1 \rangle, \dots, \mathbf{R}_n^* = \langle \mathbf{R}_n \rangle\}$$

and

$$\{k_1 = \frac{3\beta^{-1}}{\langle \delta \mathbf{R}_1^2 \rangle}, \dots, k_n = \frac{3\beta^{-1}}{\langle \delta \mathbf{R}_n^2 \rangle}\}$$

in which, $\langle \mathbf{R}_1 \rangle, \dots, \langle \mathbf{R}_n \rangle$ and $\langle \delta \mathbf{R}_1^2 \rangle, \dots, \langle \delta \mathbf{R}_n^2 \rangle$ are respectively the equilibrium average positions for each of the n_j bound ligands at site j and their corresponding mean-square fluctuations. Here, these parameters were estimated from the docking configuration space and the resulting force constants, in the range of 1.0 to 10.0 kcal/mol/Å², were considered for computations of the bound state.

Convergence of sampling. Here, a per-site measure for the ensemble of docking solutions effectively sampled in FEP was determined by quantifying the overlap $o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j)$ between the configuration space in both calculations¹³

$$o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j) = 1 - \frac{\sqrt{\text{tr}((\mathbf{A}_j^{1/2} - \mathbf{B}_j^{1/2})^2)}}{\sqrt{\text{tr} \mathbf{A}_j + \text{tr} \mathbf{B}_j}},$$

for \mathbf{A}_j and \mathbf{B}_j denoting covariance matrices associated respectively to FEP and docking samples at site j and, $\mathbf{A}_j^{1/2}$ and $\mathbf{B}_j^{1/2}$ their square roots. Specifically, \mathbf{A}_j and \mathbf{B}_j were determined as symmetric 3×3 covariance matrices for centroid positions \mathbf{R}_j of the ligand at site j

$$\mathbf{X}_j = \langle (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle) \cdot (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle)^T \rangle$$

and their square roots

$$\mathbf{X}^{1/2} = \mathbf{R} \text{diag}(\lambda_1^{1/2}, \lambda_2^{1/2}, \lambda_3^{1/2}) \mathbf{R}^T$$

were solved from the column major eigenvectors $\{\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \mathbf{R}_3\}$ of the rotation matrix \mathbf{R} and the associated eigenvalues $\{\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3\}$. Note that the overlap equation $o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j)$ is expectedly 1 for identical samplings and 0 for orthogonal spaces.

Derivation of main text equation (5). Derivation of equation (5) is standard and follows from the coordinate transform $(\mathbf{r}^n) \rightarrow (\mathbf{R}^n, \mathbf{\Omega}^n, \mathbf{I}^n)$ involving the centroid positions \mathbf{R}^n , orientations $\mathbf{\Omega}^n$ and internal \mathbf{I}^n degrees of freedom of the n ligands.

$$\begin{aligned} & \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_n} d\mathbf{R}^{n_n} e^{-\beta W(\mathbf{R}^n)} = \\ & \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_n} d\mathbf{R}^{n_n} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}^n \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_o(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \times \right. \\ & \left. \frac{\int d\mathbf{r}^n \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_o(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*] \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}} \right] = \\ & \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_n} d\mathbf{R}^{n_n} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}^n \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_o(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \times \right. \\ & \left. \frac{\int d\mathbf{r}_1 e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_1)} \dots \int d\mathbf{r}_n e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_n)}}{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1^*] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n^*]} \right] = \\ & \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_n} d\mathbf{R}^{n_n} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}^n \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_o(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \times \right. \\ & \left. \int d\mathbf{R}_1 e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_1)} \dots \int d\mathbf{R}_n e^{-\beta u^*(\mathbf{R}_n)} \right] = \\ & \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \times \int_{\delta V_1} d\mathbf{R}^{n_1} \dots \int_{\delta V_n} d\mathbf{R}^{n_n} \left[\frac{\int d\mathbf{r}_1 \delta[\mathbf{R}'_1(\mathbf{r}_1) - \mathbf{R}_1] \dots \int d\mathbf{r}_n \delta[\mathbf{R}'_n(\mathbf{r}_n) - \mathbf{R}_n] \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta U(\mathbf{r}^M)}}{\int d\mathbf{r}^n \int_{V_{\text{bulk}}} d\mathbf{r}^{N-n} \int d\mathbf{r}^{M-N} e^{-\beta[U_o(\mathbf{r}^M) + \sum_{j=1}^n u^*(\mathbf{R}_j)]}} \right] = \\ & \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta W^*} \end{aligned}$$

In this case, the Jacobian of the transformation does not depend on the \mathbf{R}^n degrees of freedom allowing for cancellation of $(\mathbf{\Omega}^n, \mathbf{I}^n)$ contributions. The effective volume $\left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right]$ thus results from the $3n$ -dimensional Gaussian integral appearing in line 4.

Derivation of main text equation (16). The spatial projection along the z direction of the system shown in equation (16) derives as

$$\begin{aligned}
\rho(z) &= \int_{bulk} d\mathbf{R} \delta[z'(\mathbf{R})-z] \rho(\mathbf{R}) + \sum_{j=1}^s \left[\int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \delta[z'(\mathbf{R})-z] \rho_j(\mathbf{R}) \right] \\
&= \bar{\rho} \times A(z) + \sum_{j=1}^s \sum_{n_j=0}^{n_j^{max}} \rho(n_j) \int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \delta[z'(\mathbf{R})-z] \rho_{n_j}(\mathbf{R}) \\
&= \bar{\rho} \times A(z) + \sum_{j=1}^s \rho_j(z)
\end{aligned}$$

where, $A(z) = \Delta x \Delta y$ is the total area of the water-membrane region along the Cartesian x and y directions.

Coarse-graining over states $O(n_1, \dots, n_s)$. Description of the binding problem in terms of macrostates $O(n)$ can be of interest for macroscopic measurements. Consider any macrostate $O(n)$ of the system mapping an ensemble of accessible states $O(n_1, \dots, n_s)$ in which n ligands bind the receptor regardless their specific distributions over the binding sites. Because $O(n)$ is degenerate, the probability density of the macrostate

$$\rho(n) = \sum_{n_1, \dots, n_s} \delta_{n, n} \rho(n_1, \dots, n_s) \quad (S1)$$

can be determined by coarse-graining over the receptor states $O(n_1, \dots, n_s)$ featuring exactly $n = n_1 + \dots + n_s$ bound ligands. Here, the Kronecker delta function $\delta_{n, n}$ ensures summation over states accessible to $O(n)$ only. The consequence is that the equilibrium constant $K(n)$ for the process $O(0) + nL \rightleftharpoons O(n)$,

$$K(n) = \sum_{n_1, \dots, n_s} \delta_{n, n} K(n_1, \dots, n_s) \quad (S2)$$

can be fully reconstructed from $K(n_1, \dots, n_s)$ constants. Supplementary equations (S1) and (S2) ensure the extension of the previous results to macrostate $O(n)$, where

$$\rho(n) = \frac{\bar{\rho}^n K(n)}{\sum_n \bar{\rho}^n K(n)} \quad (S3)$$

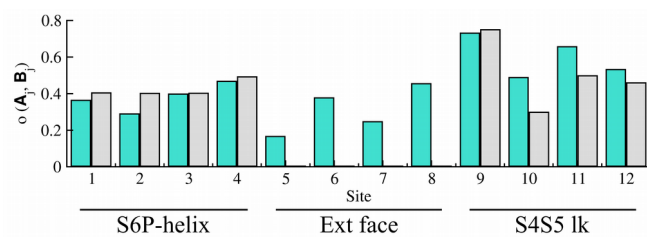
gives the probability density and

$$\Delta G^o(n) = -\beta^{-1} \ln [K(n) \times (C^o)^n]$$

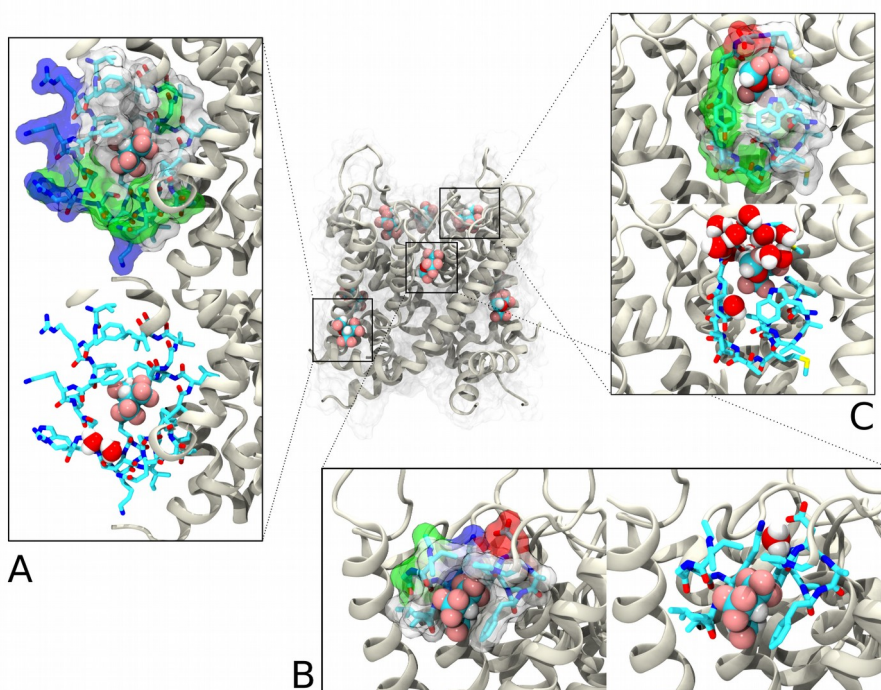
establishes the link between $K(n)$ and the standard binding free-energy $\Delta G^o(n)$ associated to each of the states satisfying supplementary equation (S1).

1. Treptow, W. & Tarek, M. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* **90**, L64-66 (2006).
2. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903 (2005).
3. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461 (2010).
4. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781-1802 (2005).
5. Izaguirre, J. A., Reich, S. & Skeel, R. D. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **110**, 9853-9864 (1999).
6. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089-10092 (1993).
7. Huang, J. & MacKerell, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135-2145 (2013).
8. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935 (1983).
9. Barber, A. F., Carnevale, V., Klein, M. L., Eckenhoff, R. G. & Covarrubias, M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6726-6731 (2014).
10. Lu, N., Kofke, D. A. & Woolf, T. B. Improving the efficiency and reliability of free energy perturbation calculations using overlap sampling methods. *J. Comput. Chem.* **25**, 28-40 (2004).
11. Fiorin, G., Klein, M. L. & Hémin, J. Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Mol. Phys.* **111**, 3345-3362 (2013).
12. Roux, B., Nina, M., Pomès, R. & Smith, J. C. Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.* **71**, 670-681 (1996).
13. Hess, B. Convergence of sampling in protein simulations. *Phys. Rev. E* **65**, 031910 (2002).

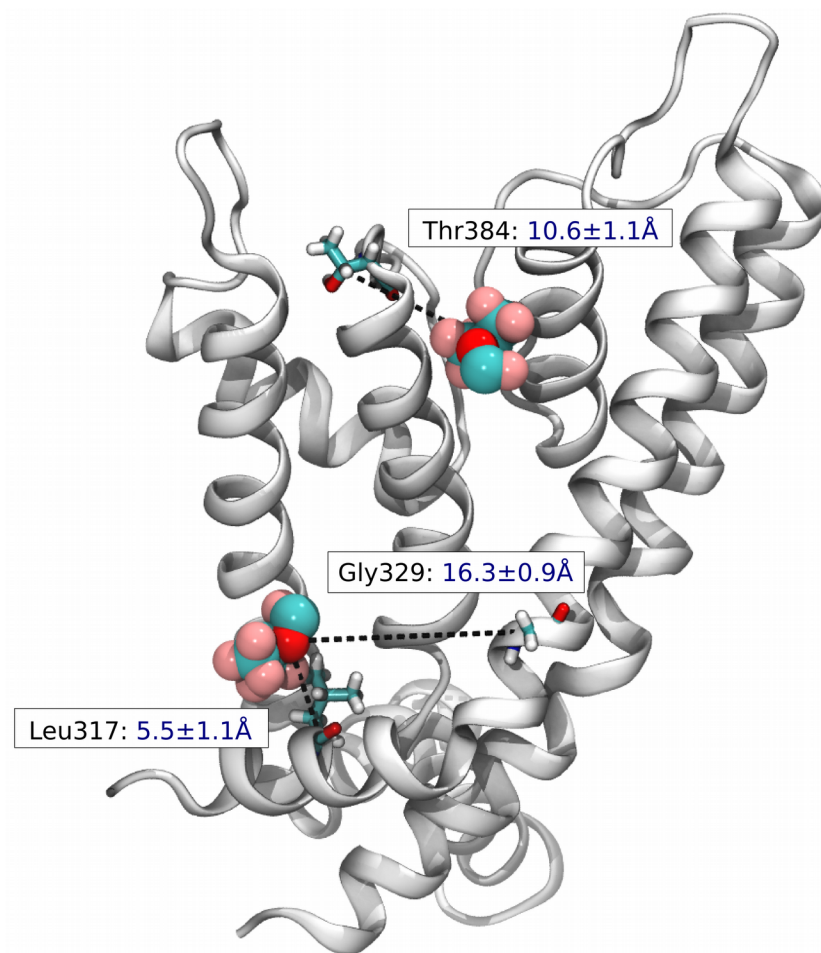
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure S1. Configuration space overlap $o(A_j, B_j)$ between FEP and docking calculations (*cf.* Supplementary Materials and Methods). Note that overlap is larger than 0.25 for the majority of singly- (cyan) and doubly-occupied (gray) sites supporting that FEP samples successfully the volumes δV_j determined from docking.



Supplementary Figure S2. Close view of sevoflurane interaction sites at Kv1.2 at the S4S5 linker (A), S6P-helix interface (B) and nearby the selectivity filter (C). The molecular surface in each of the binding sites is colored by physical-chemical properties of the constituting amino acids: hydrophobic (white), polar (green) and charged (blue or red). Note that sites (A) and (B) are primarily dehydrated hydrophobic pockets whereas the site nearby the selectivity filter is amphiphilic and largely hydrated.



Supplementary Figure S3. Average atomic distances between the centroids of sevoflurane and photolabeled Kv1.2 residues. Distances were measured considering ensembles of both equilibrium protein structures input into docking searches, and sevoflurane docking poses pertaining to a given binding site. As highlighted in the image, average distance between sevoflurane geometric center when bound to S6P-helix site and Thr384 is $10.6 \pm 1.1 \text{ \AA}$; average distance of the ligand when bound to S4S5-linker site to residues Leu317 and G329 are respectively $5.5 \pm 1.1 \text{ \AA}$ and $16.3 \pm 0.9 \text{ \AA}$.

Binding of General Anesthetics to Ion Channels

Letícia Stock, Juliana Hosoume, Leonardo Cirqueira and Werner Treptow[#]

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional (LBTC), Universidade de Brasília DF, Brasil

Author contributions: WT designed research; LS, JH and LC performed research; LS, JH, LC and WT analyzed data; WT wrote the paper.

#Corresponding author: E-mail treptow@unb.br

ABSTRACT: The direct-site hypothesis assumes general anesthetics bind ion channels to impact protein equilibrium and function, inducing anesthesia. Despite advancements in the field, a first-principle all-atom demonstration of this structure-function premise misses. We focus on the clinically used sevoflurane interaction to anesthetic-sensitive Kv1.2 mammalian channel to resolve if sevoflurane binds protein's well-characterized open and closed structures in a conformation-dependent manner to shift channel equilibrium. We employ an innovative approach relying on extensive docking calculations and free-energy perturbation and find sevoflurane binds open and closed structures at multiple sites under complex saturation and concentration effects. Results point to a non-trivial interplay of conformation-dependent modes of action involving distinct binding sites that increase channel open-probability at diluted ligand concentrations. Given the challenge in exploring more complex processes potentially impacting channel-anesthetic interaction, the result is reassuring as demonstrates the process of multiple binding events alone may account for open-probability shifts recorded in measurements.

KEYWORDS: general anesthetics | ion channels | binding free energy | protein equilibrium

Introduction

Volatile and injected general anesthetics encompass a diverse array of small and uncharged chemotypes including haloalkanes, haloethers and alkylphenols. Despite efforts reaching back over a century, clarification of their microscopic mechanism in general anesthesia has proven difficult and wanting. A favored hypothesis proposes that ion channels in the brain are implicated, among which members of ionotropic neurotransmitter receptors, voltage-gated and non-gated ion channels are best-known players (Covarrubias et al., 2015; Franks, 2008; Franks and Honoré, 2004). Primary exemplars are the Cys-loop nicotinic acetylcholine and γ -aminobutyric acid class A receptors, the voltage-gated sodium and potassium channels, and the tandem pore potassium channels. An extensive series of electrophysiological studies corroborate the hypothesis by demonstrating inhibition to potentiation effects of general anesthetics on the various receptor targets. Beyond these electrophysiological studies of reductionist systems, the current view has gained additional support from gene knockout experiments demonstrating for some of these channels the *in vivo* role on a clinically-relevant anesthetic outcome. For instance, the knockout of the non-gated tandem pore potassium channel *trek-1* produces an animal model (*Trek1^{-/-}*) resistant to anesthesia by inhalational anesthetics (Heurteaux et al., 2004).

How general anesthetics modulate ion channels to account for endpoints of anesthesia must at some point build on understanding electrophysiological data in the context of ligand binding, a reasoning that has driven mounting efforts in the field. Currently, though not refuting other molecular processes likely contributing for anesthetic action (Cantor, 1997; Finol-Urdaneta et al., 2010; Roth et al., 2008), crystallography and manifold studies involving molecular dynamics support that anesthetics bind ion channels at clinical concentrations (Arcario et al., 2017; Barber et al., 2011, 2014a; Brannigan et al., 2010; Jayakar et al., 2013; Kinde et al., 2016; LeBard et al., 2012; Nury et al., 2011; Raju et al., 2013). Binding interactions have been evidenced in anesthetic containing systems of *mammalian* voltage- and ligand-gated channels, and *bacterial* channel analogs as well. Specifically, partitioning of anesthetics in the membrane core allows accessibility-to and binding-to multiple transmembrane (TM) protein sites featuring single or multiple occupancy states - a process that might depend further on chemotypes, channel-types and conformations. Although some progress has been made in one or more aspects of the current view, a first-principle demonstration that anesthetics bind ion channels to affect protein equilibrium and function as recorded in experiments still misses.

Here, we focus our efforts on the haloether sevoflurane and its molecular interaction to Kv1.2, a mammalian voltage-gated potassium channel. Experimental work supports that sevoflurane potentiates the channel in a dose-dependent manner (Annika F. Barber et al., 2012; Liang et al., 2015). Effects on current tracings include a leftward shift in the conductance-voltage relationship of the channel and an increased maximum conductance. Among all other aspects that might impact channel-anesthetic interactions in general, we are specifically interested in determining if sevoflurane binds the well-characterized open-conductive (**O**) and resting-closed (**C**) structures of Kv1.2 (Long et al., 2005; Stock et al., 2013) in a conformation-dependent manner to impact protein equilibrium. Very recently, we went through an innovative structure-based study (Stock et al., 2017) of concentration-dependent binding of small ligands to multiple saturable sites in proteins to show that sevoflurane binds the open-pore structure of Kv1.2 at the S4S5 linker and the S6P-helix interface - a result largely supported by independent photolabeling experiments (Bu et al., 2017; Woll et al., 2017). Here, we aim at extending these previous calculations to investigate sevoflurane interactions with the entire TM-domain of the channel and more importantly, to resolve any conformational dependence for its binding process to channel structures. Accordingly, in the following sections, we first provide the theoretical framework to study binding of sevoflurane to a fixed conformation of the channel under equilibrium conditions. A state-dependent strategy is put forward to describe anesthetic binding in terms of occupancy states of the channel that embodies multiple saturable sites and concentration effects. The strategy is then generalized to account for ligand effects on the **C-O** equilibrium, allowing for reconstruction of voltage-dependent open probabilities of the channel at various ligand concentrations. Anticipating our results, we find that sevoflurane binds Kv1.2 structures at multiple sites under saturation and concentration effects. Despite a similar pattern of molecular interactions, binding of sevoflurane is primarily driven towards the

64 open-conductive state shifting leftward the open probability of the channel at diluted ligand concentrations.

65

66 Theory

67 **Anesthetic Binding and Channel Energetics.** Consider the voltage-gated channel embedded in a *large* membrane-aqueous volume
68 that contains N ligand molecules under dilution. The protein is assumed to remain in a well-defined conformational state X
69 providing with s distinct binding sites for ligands. For simplicity, we consider that ligands dissolve uniformly across the membrane-
70 aqueous region of the system from where they can partition into the protein sites. The lipid and aqueous phases thus provide with a
71 bulk volume V occupied by ligands at constant density $\bar{\rho}$ and *excess* chemical potential $\bar{\mu}$. We consider further that every site
72 $j=1, \dots, s$ corresponds to a discrete volume δV_j that can be populated by $0 \leq n_j \leq n_j^{\max}$ ligands. We denote by $O_X^*(n_1, \dots, n_s)$ the
73 specific occupancy state featuring n_j bound ligands at corresponding sites and by $n=n_1+\dots+n_s$ the total number of bound ligands
74 in this state.

75 Under these considerations, solution of ligand binding to multiple receptor sites relies fundamentally in determining the equilibrium
76 constant $K_X(n_1, \dots, n_s)$ for the process $O_X^*(0_1, \dots, 0_s) + nL \rightleftharpoons O_X^*(n_1, \dots, n_s)$ where, $O_X^*(0_1, \dots, 0_s)$ is the empty receptor state with all
77 ligands occupying the bulk. As shown in previous work (Stock et al., 2017), $K_X(n_1, \dots, n_s)$ can be evaluated from MD-based free-
78 energy perturbation (FEP) calculations

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{1}{n_1! \dots n_s!} \left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta[W_X^*(n) - n\bar{\mu}]} \quad (1)$$

79 in which $\bar{\mu}$ is the solvation free energy of the ligand in the bulk and $W_X^*(n)$ corresponds to the free-energy of n site-specific
80 bound ligands relative to a gas phase state given that ligands $i=1, \dots, n$ are restrained to occupy an *effective* site volume

81 $\left[\prod_{i=1}^n \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right]$ at structure X . Eq. [1] is solved for the thermodynamic limit $N \gg n$ and $\frac{1}{n_1! \dots n_s!}$ corrects the binding constant for
82 equivalent configurations of n_j indistinguishable ligands within the site volumes δV_j . Within this formulation, knowledge of
83 $K_X(n_1, \dots, n_s)$ ensures the probability of any occupancy state

$$\rho_X(n_1, \dots, n_s) = \frac{\bar{\rho}^{(n_1+\dots+n_s)} K_X(n_1, \dots, n_s)}{\sum_{n_1, \dots, n_s} \bar{\rho}^{(n_1+\dots+n_s)} K_X(n_1, \dots, n_s)} \quad (2)$$

84 to be known in practice from free-energy calculations (Chipot and Pohorille, 2007). Note in eq. [2], $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ depends on the
85 number density or concentration of the ligand at the reservoir thus providing us with a useful equation for investigation of
86 concentration effects.

87 To investigate any conformational dependence on ligand binding, we consider eq. [2] in the context of conformational equilibrium of
88 the channel over a range of TM voltages. Specifically, we consider the very same microscopic system submitted to a Nernst potential
89 induced by non-symmetrical electrolytes between membrane faces. The capacitive nature of the channel-membrane system ensures
90 the Nernst potential to account for a voltage difference V across the lipid bilayer. Accordingly, by denoting as \mathbf{r}^P the entire set of
91 Cartesian coordinates of the channel, the free energy of the protein $F_X(V)$ in the particular conformation $X \equiv \mathbf{X}(\mathbf{r}^P)$

$$e^{-\beta F_X(V)} \propto \int d\mathbf{r}^P \delta[\mathbf{X}'(\mathbf{r}^P) - \mathbf{X}] e^{-\beta[U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V]} \quad (3)$$

92 can be written within an arbitrary constant, in terms of an effective potential energy of the protein $U(\mathbf{r}^P) + Q(\mathbf{r}^P)V$ when coupled to
93 the external voltage V with charge $Q(\mathbf{r}^P)$ (Roux, 2008). From eq. [3], the open probability of the channel then reduces to

$$\rho_O(V) = \frac{e^{-\beta F_O(V)}}{e^{-\beta F_C(V)} + e^{-\beta F_O(V)}} \quad (4)$$

94 for the case of a voltage-gated channel with two conformational states $X \equiv \{C, O\}$ connected by the reaction process $C \xrightleftharpoons{V} O$. In
95 terms of *chemical* free-energies of the receptor $F_C(V=0)$ and $F_O(V=0)$ and the corresponding *excess* free-energies $\Delta F_C(V)$
96 and $\Delta F_O(V)$, eq. [4] simplifies into the familiar two-state Boltzmann equation

$$\rho_O(V) = [1 + e^{+\beta \Delta Q[V_m - V]}]^{-1} \quad (5)$$

97 in which,

$$\Delta Q = -\frac{\Delta F_O(V) - \Delta F_C(V)}{V} \quad (6)$$

98 is the gating charge $\Delta Q = Q_O - Q_C$ resulting from differences in the effective protein charge in each conformational state and

$$V_m = \frac{[F_O(V=0) - F_C(V=0)]}{\Delta Q} \quad (7)$$

99 is the midpoint voltage in which $\rho_C(V) = \rho_O(V)$ (Roux, 2008). From eq. [5], the equilibrium constant between protein states C
100 and O then writes as

$$K(V) = e^{-\beta \Delta Q[V_m - V]}$$

101 with $K(0) = e^{-\beta V_m \Delta Q}$ determining their equilibrium at 0 mV. In eq. [6 and 7], the voltage-independent free energies account for the
102 microscopic potential energy of the channel and its solvation energy in each state whereas the corresponding voltage-dependent
103 *excess* free energies are proportional to the applied voltage and associated protein charges.

104 By combining eq. [2 and 5] through a generalized thermodynamic-cycle analysis dealing with all possible states of the ligand-free

105 and ligand-bound receptor, binding effects on the channel energetics can be then explicitly expressed over a range of membrane
106 voltages

$$\rho_o(V) = \frac{K(V)Z_o(n_1, \dots, n_s)}{Z_c(n_1, \dots, n_s) + K(V)Z_o(n_1, \dots, n_s)} \quad (8)$$

107 in terms of the partition functions

$$\begin{cases} Z_c(n_1, \dots, n_s) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1 + \dots + n'_s)} K_c(n'_1, \dots, n'_s) \\ Z_o(n_1, \dots, n_s) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \bar{\rho}^{(n'_1 + \dots + n'_s)} K_o(n'_1, \dots, n'_s) \end{cases}$$

108 for the ensemble of occupancy states in each of the protein conformations. Eq. [8] simplifies into

$$\rho_o(V) = \left[1 + \frac{Z_c(n_1, \dots, n_s)}{Z_o(n_1, \dots, n_s)} e^{+\beta \Delta Q[V_m - V]} \right]^{-1} \quad (9)$$

109 the two-state Boltzmann equation embodying now the free-energy contributions arising from ligand binding. Note that eq. [8] is
110 achieved by rewriting the state probability densities

$$\begin{cases} \rho_c(V) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \rho_c(n'_1, \dots, n'_s, V) \\ \rho_o(V) = \sum_{n'_1, \dots, n'_s} \rho_o(n'_1, \dots, n'_s, V) \end{cases}$$

111 in terms of the reference state $\rho_c(0_1, \dots, 0_s, V)$.

112 In the following, we consider eq. [1, 5 and 9] to investigate the molecular binding of sevoflurane to open and closed structures of
113 Kv1.2, and its functional impact on the channel energetics.

114

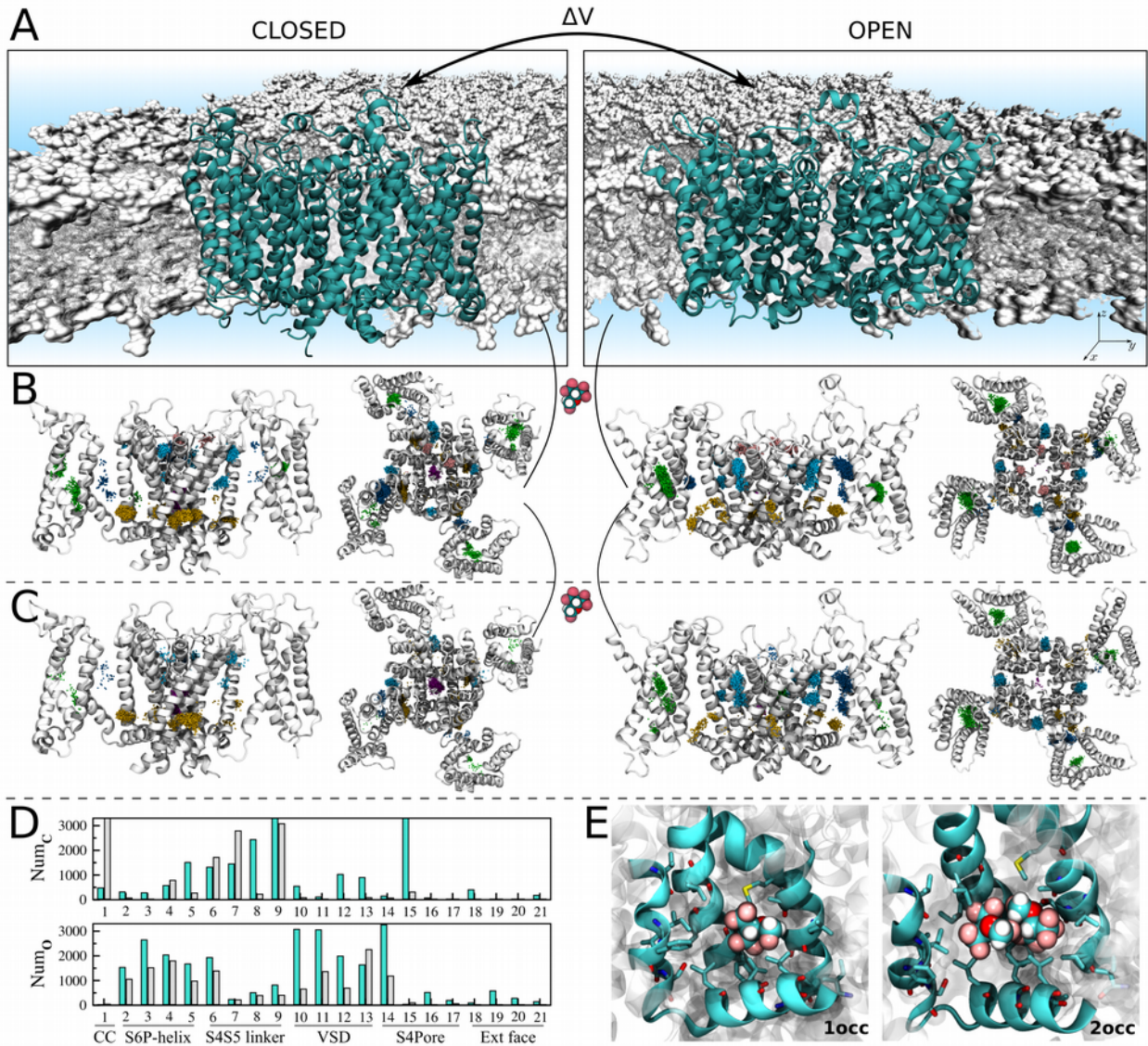
115 Results and Discussion

116 **Binding of Anesthetics to Multiple Channel Sites.** We applied large-scale and flexible docking calculations to solve sevoflurane
117 interactions to Kv1.2 structures $X \equiv \{C, O\}$ (Fig. 1). A total of ~ 6,000 docking solutions was generated per channel conformation
118 and clustered into 21 ligand interaction sites. The interaction sites spread over the transmembrane region of the channel at the S4S5
119 linker, S6P-helix interface and at the extracellular face, next to the selectivity filter. Further docking sites were resolved within the
120 voltage-sensor, at the S4Pore interface and at the central-cavity of the channel. Re-docking of sevoflurane generated in turn a total of
121 ~ 13,000 solutions per channel conformation, solving the interaction of two ligands for all sites but the extracellular face.

122 From the docking ensembles, there is up to 2×3^{21} occupancy states of the channel structures that might contribute for sevoflurane
123 binding and functional effects. To evaluate this quantitatively, we performed an extensive series of FEP calculations to estimate the
124 per-site binding affinity for one- and two-bound ligands against the channel structures (Fig. S1, Table-S1 and S2). Binding constants
125 for the individual sites are heterogeneous and take place under a diverse range, *i.e.* 10^{-8} (mM⁻¹) - 10^{+2} (mM⁻²). There is however a
126 decreasing trend of affinities involving sites respectively at the S4S5 linker, S4Pore and S6P-helix interfaces, voltage sensor, central
127 cavity and extracellular face.

128 To determine if sevoflurane binds channel structures $X \equiv \{C, O\}$ at clinically relevant concentrations, we computed binding
129 probabilities $\rho_x(n_1, \dots, n_s)$ for dilute concentrations of the ligand in solution, *i.e.* 1mM, 10mM and 100mM. Equilibrium constants
130 $K_x(n_1, \dots, n_s)$ for every occupancy state of the channel were then reconstructed from the per-site affinities to determine state
131 probabilities via eq. [2]. Here, estimates of $K_x(n_1, \dots, n_s)$ were determined for the condition of independent binding sites as
132 minimum site-to-site distances of ~15 Å demonstrated their non-overlap distributions in each of the channel structures. At low 1mM
133 concentration, $\rho_x(n_1, \dots, n_s)$ are largely dominated by the probability of the empty state $\rho_x(0_1, \dots, 0_s)$ implying only a small
134 fraction of bound states with non-negligible occurrences (Fig. S2). Within this fraction, the most likely states involve single
135 occupancy of the S4S5 linker or the S4Pore interface as shown by the marginal probabilities $\rho_x(n_j)$ at the individual sites (Fig. 2).
136 At higher concentrations, there is a clear shift of $\rho_x(n_1, \dots, n_s)$ towards states of the channel that enhances significantly the average
137 number of bound ligands. Careful inspection of $\rho_x(n_j)$ confirms the major relevance of sites at the S4S5 linker and S4Pore interface
138 over the entire concentration range, accompanied by an increasing importance of binding regions at the S6P-helix interface. In
139 contrast, $\rho_x(n_j)$ for sites within the voltage-sensor, at the central cavity and nearby the extracellular face of the channel remains
140 negligible over all concentrations. For completeness, note in Table-S1 that equilibrium constants for doubly-occupied sites are
141 comparable to or even higher than estimates for one-bound molecule thus revealing important saturation effects in which one or two
142 sevoflurane molecules can stably bind the channel structures at individual sites. The result is especially true for spots at the S4S5
143 linker and S4Pore interface.

144

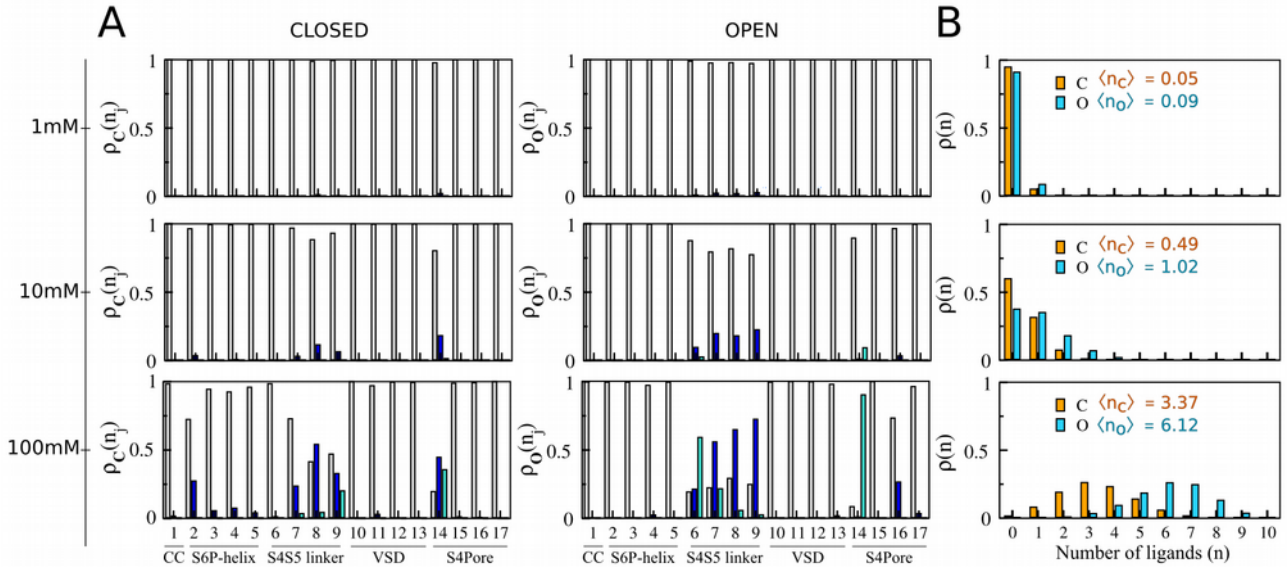


145 **Fig. 1.** Resolution of sevoflurane sites at the homotetrameric Kv1.2 structures **C** and **O**. (A) Atomistic systems containing Kv1.2 structures
 146 (cyan) embedded in a fully-hydrated lipid bilayer (gray) were MD simulated to produce molecular ensembles considered for flexible docking
 147 calculations. (B) Docking solutions for singly-occupied sites. Shown is the ensemble-average channel structures **C** and **O**, along with the set
 148 of centroid configurations of sevoflurane (points) determined from docking. Centroid configurations of sevoflurane were clustered as a
 149 function of their location on the channel structures that is, within the voltage-sensor (green), at the S4S5 linker (yellow), at the S4Pore (dark
 150 blue) and S6P-helix (light blue) interfaces, at the central cavity (violet) and extracellular face (pink). Each of these clusters was treated as an
 151 interaction site j for sevoflurane with volume δV_j . (C) Following another round of docking calculations started from structures in (B),
 152 solutions for doubly-occupied sites were resolved by determining if volumes δV_j accommodate the centroid positions of two docked
 153 ligands at once. (D) Per site number of docking solutions for single (cyan) and double (gray) ligand occupancy. (E) Representative molecular
 154 structure resolved from docking. Voltage-sensor domains in two opposing channel subunits are not shown for clarity in (B) and (C) lateral
 155 views.

156 The complex distributions of the multiple occupied states of structures $X \equiv \{C, O\}$ were described in three dimensions by mapping
 157 $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ into the position-dependent density $\rho_X^j(\mathbf{R})$ of sevoflurane in each binding site j (cf. eq. 18 And 20). As shown in
 158 Fig. 3 and supplementary Movies S1 and S2, the density of sevoflurane makes sense of the results by showing the concentration
 159 dependent population of bound ligands. Projection of $\rho_X^j(\mathbf{R})$ along the transmembrane direction z of the system, $\rho_X^j(z)$, stresses
 160 further the results (cf. eq. 20). Note from $\rho_X^j(\mathbf{R})$ that sevoflurane binds channel structures in a concentration dependent manner,
 161 binding preferentially the S4S5 linker and the interfaces S4Pore and S6P-helix over a range of concentrations.

162 So far, our calculations demonstrate that sevoflurane binds Kv1.2 structures over a range of concentrations, preferentially at the
 163 linker S4S5 and at the segment interfaces S4Pore and S6P-helix. From a physical-chemical point of view, spots at these channel
 164 regions are primarily dehydrated lipid-accessible amphiphilic pockets providing with favorable interaction sites for the polar
 165 lipophilic sevoflurane molecule (Fig. S3). It is worth mentioning that these findings recapitulate recent photolabeling experiments
 166 demonstrating that photoactive analogs of sevoflurane do interact at the S4S5 linker and at the S6P-helix interface of the open-
 167 conductive Kv1.2 channel (Bu et al., 2017; Woll et al., 2017). In detail, Leu317 and Thr384 were found to be protected from
 168 photoactive analogs, with the former being more protected though. As shown in Fig. S4, atomic distances of bound sevoflurane to
 169 these amino-acid side chains are found here to be respectively $7.28 \pm 2.5 \text{ \AA}$ and $10.44 \pm 3.66 \text{ \AA}$, in average more or less standard

170 deviation. Such intermolecular distances are consistent with direct molecular interactions and therefore consistent with the measured
 171 protective reactions - similar conclusions hold for the closed channel as well. Besides that, our calculations also recapitulate the
 172 stronger protection of Leu317 in the sense that relative to sites at S6P-helix, the affinity of sevoflurane is found to be higher at the
 173 S4S5 linker given its stable occupancy by one or two ligands. The stable occupancy of the linker by one or two ligands as computed
 174 here, is consistent with recent flooding-MD simulations of the homologous sodium channel NaChBac (Annika F Barber et al., 2012;
 175 Barber et al., 2014a) and more importantly, with previous Ala/Val-scanning mutagenesis showing a significant impact of S4S5
 176 mutations on the effect of general anesthetics on family members of K^+ channels (Barber et al., 2011). In special, a single residue
 177 (Gly329) at a critical pivot point between the S4S5 linker and the S5 segment underlines potentiation of Kv1.2 by sevoflurane (Liang
 178 et al., 2015). Sevoflurane is close to that amino acid when bound at the S4S5 linker.



179 **Fig. 2. C and O state-dependent binding probabilities for different concentrations of sevoflurane at the reservoir.** (A) Marginal probabilities
 180 $\rho_x(n_j)$ of site j , for $n_j=0$ (gray), $n_j=1$ (blue) and $n_j=2$ (cyan). Marginals at the extracellular face of the channel are negligible for
 181 every structure/concentration and are not shown for clarity. (B) Probabilities $\rho_x(n)$ for macrostates $O_x^*(n)$ mapping an ensemble of
 182 accessible states $O_x^*(n_1, \dots, n_s)$ in which n ligands bind the receptor regardless their specific distributions over the binding sites. Here,
 183 $\rho_x(n_j)$ and $\rho_x(n)$ were computed by coarse-graining over state probabilities in Fig. S2 according to eq. [19 and 21], respectively. Average
 184 number $\langle n_x \rangle$ of bound ligands as a function of the reservoir concentration is indicated in (B).

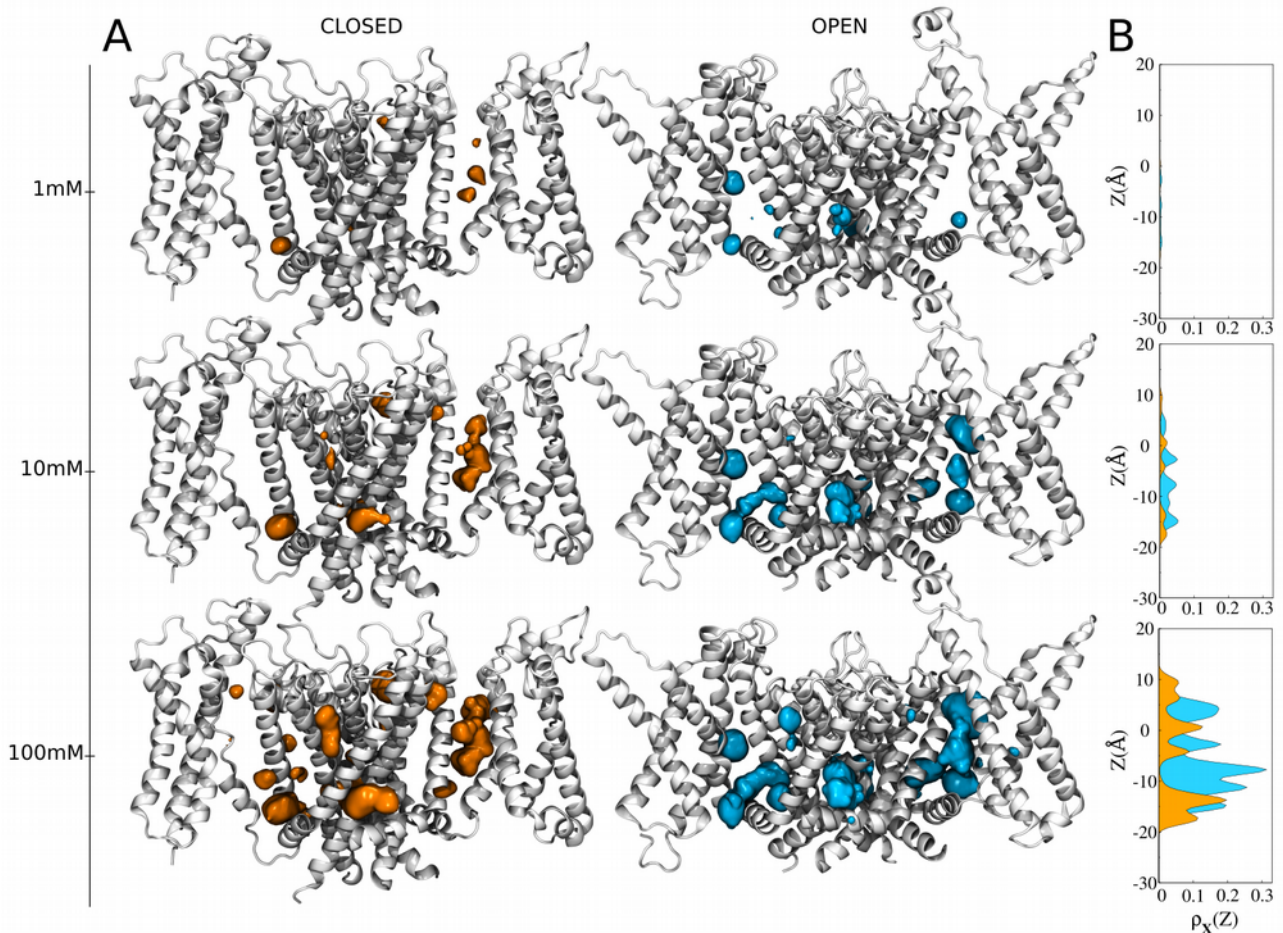
185 In contrast to the aforesaid spots, sites within the voltage-sensor, at the main pore and nearby the extracellular face of the Kv1.2
 186 structures are primarily hydrated lipid-inaccessible amphiphilic pockets that weaken sevoflurane interaction as reflected in the state-
 187 and space-dependent densities shown in Fig. 2 and 3. The binding probabilities at these sites thus support that the non-negligible
 188 fraction of poses determined from docking (Fig. 1D) corresponds to low affinity or false positives. In particular, because sevoflurane
 189 induces potentiation rather than blocking of Kv1.2 (Annika F. Barber et al., 2012; Liang et al., 2015), we read the negligible or
 190 absent density of the ligand at the central-cavity of the channel as a self-consistent result of the study - especially for the open-
 191 conductive state. Supporting that conclusion, note that binding constants as computed here are upper bounds for the affinity of
 192 sevoflurane under the ionic flux conditions in which potentiation takes place. Accordingly, as shown in Fig. S5, the binding affinity
 193 of a potassium ion at the central cavity overcomes that of sevoflurane due its binding and excess free-energies under applied
 194 voltages. Once bound, the ion destabilizes sevoflurane interactions and the molecule is not expected to bind the channel cavity at low
 195 concentration. As also shown in Fig. S5 supplementary Movie S3, even under the occurrence of rare binding events, sevoflurane
 196 appears unable to block the instantaneous conduction of potassium which is also consistent with its potentiating action.

197 Weak interactions at the main pore and nearby the selectivity filter of Kv1.2 contrasts with sevoflurane binding at analogous regions
 198 of NaChBac (Annika F Barber et al., 2012; Barber et al., 2014a) due major structural differences between Na^+ and K^+ channels.
 199 Specifically, the pore of potassium channels lacks lipid-accessible open-fenestrations of the sodium relatives and K^+ -selective filters
 200 are sharply distinct from Na^+ -selective ones.

201 **Anesthetic Binding Impacts Channel Energetics.** Despite a comparable pattern of molecular interactions, careful inspection of
 202 $\rho_x(n_j)$ or $\rho_x^j(\mathbf{R})$ reveals for most sites, an obvious differential affinity of sevoflurane across Kv1.2 structures (Fig. 2 and 3). The
 203 overall consequence for sevoflurane binding is then clear: the average number of bound ligands to the open-conductive channel
 204 exceeds systematically that number for the resting-closed channel over the entire concentration range. There is therefore a
 205 remarkable conformational dependence for the anesthetic interaction, with sevoflurane binding preferentially the open-conductive
 206 structure.

207 Implications for Kv1.2 energetics were then investigated by quantifying modifications of the open probability $\rho_o(V)$ of the channel
 208 induced by sevoflurane at concentrations of 1mM – 100mM (Fig. 4). Specifically, from the partition functions $Z_C(n_1, \dots, n_s)$ and
 209 $Z_O(n_1, \dots, n_s)$ across the entire ensemble of occupancy states of the channel, solution of eq. [5 and 9] shows that sevoflurane shifts
 210 leftward the open probability of Kv1.2 in a concentration-dependent manner - voltage shifts amount from -1.0 mV to -30.0 mV with
 211 concentration increase of the ligand in solution. For a fixed ligand concentration (100 mM), decomposition analysis reveals further
 212 that ratio values for the partition functions at individual sites j can be smaller, equal or larger than unity, implying a non-trivial
 213 interplay of conformation-dependent modes of action involving distinct sites (*cf.* eq. [23 and 24]). In detail, binding of sevoflurane at

214 the low affinity sites within the voltage-sensor, central cavity and next the extracellular face of the channel are mostly conformation
 215 independent and do not impact open probability (ratio ≈ 1). On the other hand, conformation-dependent binding of sevoflurane to
 216 sites at the S4S5 linker and the S4Pore interface accounts for the overall stabilization of the open channel (ratio < 1). That effect
 217 contrasts with the mild stabilization of the closed conformation of Kv1.2 induced by binding of sevoflurane at S6P-helix and
 218 reflected in rightward shifts of $\rho_o(V)$ (ratio > 1). The overall conformation-dependent binding process is therefore encoded
 219 differentially across distinct channel regions.



220 **Fig. 3. C and O** position-dependent binding probabilities for diluted concentrations of sevoflurane in the bulk. (A) Shown is the ensemble
 221 average structure of the channel (white) along with the density $\rho_x^j(\mathbf{R})$ of sevoflurane (orange and cyan) in each of the binding sites
 222 (isovalues of $9 \times 10^{-5} \text{ \AA}^{-3}$). As presented in eq. [18], this involved reweighing the marginal probability $\rho_x(n_j)$ at the binding site j by the
 223 local equilibrium density of sevoflurane $\rho_x(\mathbf{R}|n_j)$. The marginal $\rho_x(n_j)$ was computed from eq. [19] by coarse-graining over state
 224 probabilities in Fig. S2 whereas, $\rho_x(\mathbf{R}|n_j)$ was calculated from the centroid distributions of docking solutions shown in Fig. 1B and 1C. (B)
 225 Projection of $\rho_x^j(\mathbf{R})$ along the transmembrane direction z of the system, $\rho_x^j(z)$. Projections were determined as prescribed in eq. [20].

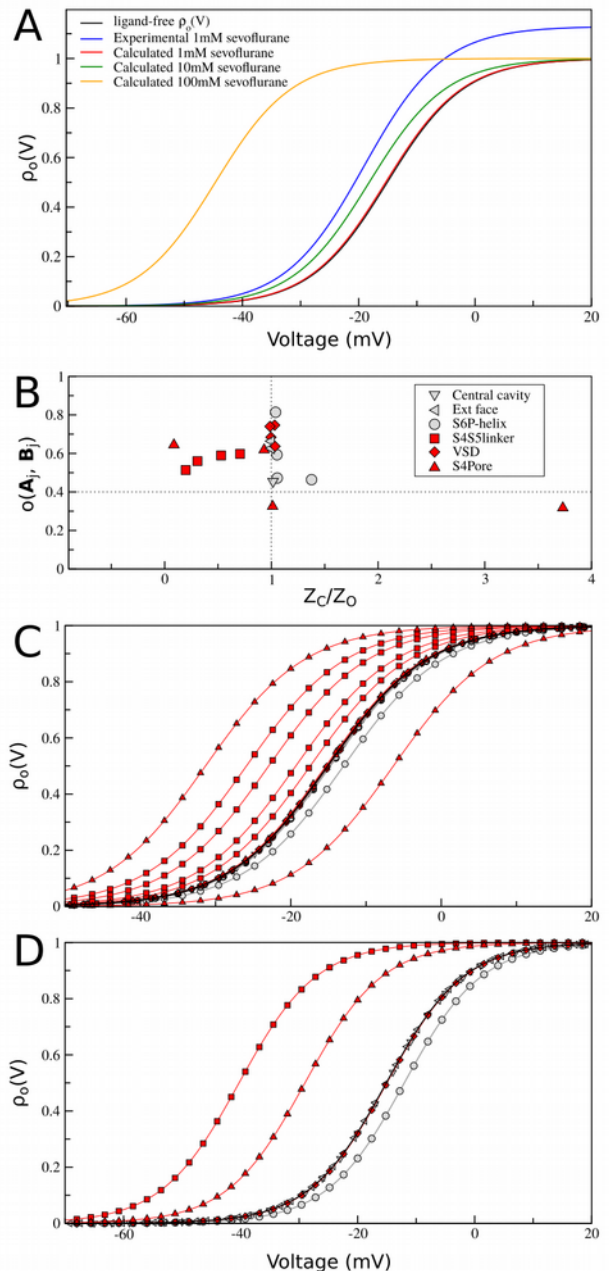
226 Potentiation of Kv1.2 by sevoflurane has been attributed to stabilization of the open-conductive state of the channel (Liang et al.,
 227 2015). Given the critical role of S4 and S4S5 linker on the gating mechanism of the channel (Long et al., 2005), it is likely that
 228 sevoflurane interactions with these segments as found here are at the origins of the experimentally measured voltage-dependent
 229 component of anesthetic action. While restricted to sevoflurane interactions with the resting-closed and open-conductive structures,
 230 the presented two-state binding model only embodies left- or rightward shifts in the open probability of the channel and therefore, it
 231 cannot clarify any molecular process accounting for maximum conductance increase as experimentally recorded and shown in Fig.
 232 4A. As supported by a recent kinetic modeling study (Annika F. Barber et al., 2012), generalization of eq. [9] to include a third non-
 233 conducting open state yet structurally unknown is needed to account for such conductance effects. We then speculate that binding of
 234 sevoflurane at the S4Pore and S6P-helix interfaces might interfere allosterically with the pore domain operation thus affecting
 235 channel's maximum conductance. A working hypothesis also raised in the context of anesthetic action on bacterial sodium channels
 236 (Barber et al., 2014a; Raju et al., 2013), assume indeed that non-conducting states of the selectivity filter are implicated.
 237 Corroboration of a such assumption from a molecular perspective is however not trivial and will necessarily involve further structural
 238 studies to demonstrate how ligand binding might impact non-conducting open states of the channel to affect maximum conductance.

239 **Fig. 4.** Sevoflurane binding effects on C-O equilibrium. (A) Open
 240 probabilities of Kv1.2 for different concentrations of sevoflurane in
 241 solution. Ligand-free and ligand-bound $\rho_o(V)$ curves were respectively
 242 computed from eq. [5 and 9] by taking into consideration parameters,
 243 $V_m = -21.9mV$ and $\Delta Q = 3.85e_s$, for best two-state Boltzmann fit of
 244 measured data (Liang et al., 2015). A reference experimental curve (red)
 245 is show for sevoflurane at 1 mM concentration. (B) Decomposition analysis
 246 at 100mM ligand concentration. Shown is the FEP sampling overlap
 247 ratio values for C-O partition functions at the individual binding sites j .
 248 Per-site ratio values can be equal, smaller or larger than unity meaning
 249 respectively that sevoflurane binding is not conformational dependent,
 250 stabilizes the open structure or stabilizes the closed structure. Binding sites
 251 located nearby flexible protein regions for which the root-mean-square
 252 deviation (RMSD) between channel structures is larger than 4.0 Å are
 253 highlighted in red (*cf.* eq. [14, 23 and 24] and Fig. S1 for details). (C)
 254 Decomposition analysis of $\rho_o(V)$ curves in terms of partition ratio values
 255 showing in (B). (D) Same decomposition analysis in terms of an aggregate
 256 per-site contribution across channels subunits. At 100mM, binding of
 257 sevoflurane at the S4S5 linker and S4Pore interface significantly stabilizes
 258 the open structure of the channel which contrasts the mild stabilization of
 259 the closed structure due to ligand binding at the S6P-helix interface.

260 Concluding Remarks

261 Here, we carried out extensive structure-based calculations to study
 262 conformation-dependent binding of sevoflurane to multiple saturable
 263 sites of Kv1.2 structures $X \equiv \{C, O\}$ - the total MD simulation time
 264 was $\sim 2.0 \mu s$. Binding of sevoflurane was studied for ligand
 265 concentrations in the range of 1mM - 100mM and saturation
 266 conditions up to $n_j^{max} = 2$. Our study relied on the assumption that
 267 molecular docking can faithfully describe ligand interactions at protein
 268 sites. Specifically related to that assumption, we have considered the
 269 generated ensemble of docking solutions to estimate the location of
 270 binding sites δV_j and the local distribution of the ligand $\rho_x(\mathbf{R}|n_j)$.
 271 The generation of false positive hits is however a well documented
 272 drawback of docking algorithms as a result of limitations of the scoring
 273 function in describing ligand solvation energies and protein flexibility
 274 (Deng et al., 2015). In this regard, the combination of extensive
 275 docking calculations against an ensemble of equilibrium receptor
 276 structures to handle protein flexibility and FEP calculations based on
 277 fine force-fields to accurately estimate solvation energies are critical
 278 technical aspects of the applied methodology to minimize such
 279 drawbacks (Deng et al., 2015). Given the same limitations of the
 280 scoring function, it is also not guaranteed that all binding hits nor that
 281 $\rho_x(\mathbf{R}|n_j)$ can be accurately known from docking. In this regard,
 282 although not considered here, it might be important to integrate
 283 docking results from different algorithms involving different scoring
 284 functions in order to characterize the bound ensemble. Still, thanks to
 285 the generality of the presented formulation, extension of the current investigation to sampling techniques other than docking,
 286 including all-atom flooding-MD simulations (Arcario et al., 2017; Barber et al., 2014a; Brannigan et al., 2010; LeBard et al., 2012;
 287 Raju et al., 2013), might also be an important refinement in that direction (*manuscript in preparation*). Despite these sampling
 288 improvements that may eventually be obtained, it is worth mentioning that the configuration space in FEP calculations overlap
 289 between channel structures at individual sites, meaning that sampling and binding affinities were evenly resolved between states (Fig.
 290 S1 and 4B). Besides that, most of the identified binding sites are located nearby flexible protein regions for which the root-mean-
 291 square deviation between channel structures is larger than 4.0 Å. Then for the purpose of quantifying any direct ligand effect on
 292 channel energetics, the determined conformational dependence of binding sevoflurane at these gating-implicated protein regions
 293 appears robust and likely to impact function.

294 Structural knowledge allied to solid electrophysiological data available for Kv1.2 make this channel an interesting model system
 295 for molecular-level studies of anesthetic action thereby justifying our choice. In detail, the atomistic structures complain most of the
 296 available experimental data characterizing closed and open conformations of the channel in the native membrane environment
 297 (Stock et al., 2013). Previous findings support further that sevoflurane binds Kv1.2 to shift leftward its voltage-dependence and to
 298 increase its maximum conductance in a dose-dependent manner (Liang et al., 2015). Despite a similar pattern of interactions, we
 299 found here a clear conformational dependence for sevoflurane binding at multiple channel sites. The ligand binds preferentially the
 300 open-conductive structure to impact the C-O energetics in a dose-dependent manner as dictated by the classical equilibrium theory
 301 for chemical reactions embodied in eq. [9]. Front of the difficulty in conceiving and characterizing other, still more complex
 302 molecular processes that might impact channel energetics under applied anesthetics (Cantor, 1997; Finol-Urdaneta et al., 2010; Roth
 303 et al., 2008), the result is reassuring by showing that in principle the isolated process of sevoflurane binding to Kv1.2 accounts for
 304 open-probability shifts as recorded in experiments. Within this scenario, the calculations reveal unexpectedly, contrasting per-site
 305 contributions to the overall open probability of the channel. For instance, at 100mM concentration, binding of sevoflurane at the



306 S4S5 linker and S4Pore interface significantly stabilizes the open structure of the channel overcoming the mild stabilization of the
 307 closed structure by ligand binding at the S6P-helix interface. By showing this non-trivial interplay of conformation-dependent modes
 308 of action involving distinct binding sites, the result is particularly insightful and should guide us to design novel site-specific
 309 mutagenesis and photolabeling experiments for further molecular characterization of anesthetic action.
 310 Although not addressing the paucity of *in vivo* experimental evidences that a binding process to a specific molecular target as
 311 presented here is related to any clinically-relevant anesthetic outcome, our study adds support to the direct-site hypothesis by linking
 312 binding free-energy and protein energetics. As such, our study treats and reveals a new layer of complexity in the anesthetic problem
 313 that brings us novel paradigms to think their molecular action and to design/interpret research accordingly. To the best of our
 314 knowledge, the main-text Fig. 3 and 4 represent in the context of structural studies, a deeper and first revealed view on the intricate
 315 mode of interactions that might take place between general anesthetics and ion channels to impact function.

316

317 Computational Methods

318 A procedure was designed to solve the molecular binding of sevoflurane to the open-conductive (**O**) and resting-closed (**C**) structures
 319 of Kv1.2 for saturation conditions up to $n_j^{max}=2$. For both channel structures, the procedure consisted of (i) an extensive production
 320 of docking solutions for the ligand-receptor interaction, (ii) clustering of docking solutions into binding sites along the receptor
 321 structure and (iii) estimation of binding affinities using the free-energy perturbation (FEP) method. First completion of steps (i)
 322 through (iii) solved the ligand channel interaction for singly-occupied binding sites. Double occupancy of the receptor sites was
 323 investigated by inputting the first generated ensemble of docked structures into another round of (i) through (iii) calculations. In
 324 detail, step (i) was accomplished by docking sevoflurane as a flexible ligand molecule against an MD-generated ensemble of
 325 membrane-equilibrated structures of the protein receptor. Docking calculations included the transmembrane domain of the channel,
 326 free from the membrane surroundings. Step (ii) provided the location of δV_j volumes lodging docking solutions for the ligand
 327 along the channel structures. Each of these volumes were treated as binding site regions in step (iii) calculations. FEP calculations
 328 were carried out by taking into consideration the whole ligand-channel-membrane system.

329 Following this procedure, binding constants $K_X(n_1, \dots, n_s)$ for channel structures $X \equiv \{C, O\}$ were solved by inputting FEP
 330 estimates into eq. [1], allowing for direct solution of state-dependent probability distributions via eq. [2]. Here, affinity constants
 331 were solved for the condition of independent binding sites. Ligand-free and ligand-bound open probability curves were respectively
 332 computed from eq. [5 and 9] by taking into consideration previously determined experimental values of $V_m = -15.1 mV$ and
 333 $\Delta Q = 3.9 e_0$ for Kv1.2 (Liang et al., 2015). Estimates were determined for sevoflurane concentrations in the range of 1mM - 100mM
 334 (or in density units, $6.02 \times 10^{-7} \text{\AA}^{-3} - 6.02 \times 10^{-5} \text{\AA}^{-3}$). A detailed description of the calculations is provided bellow.

335 **Membrane Equilibrated Channel Structures.** The Kv1.2 structure in the open-conductive (**O**) state was obtained from Treptow
 336 and Tarek (Treptow and Tarek, 2006). The construct was previously acquired via molecular dynamics (MD) simulations of the
 337 published x-ray crystal structure (Long et al., 2005). The resting-closed (**C**) structure of Kv1.2 was obtained from Delemotte *et al.*
 338 (Delemotte et al., 2011). Modeling details and validation can be found in the original papers.

339 Structures **C** and **O** were embedded in the lipid bilayer for Molecular Dynamics (MD) relaxation and subsequent molecular docking
 340 of sevoflurane. Specifically, each structure featuring three K^+ ions (s4s2s0) at the selectivity filter was inserted in a fully hydrated
 341 and zwitterionic all atom palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) phospholipid bilayer. After assembled, each macromolecular
 342 system was simulated over an MD simulation spanning ~ 20 ns, at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm), neutral pH,
 343 and with no applied TM electrostatic potential. The channel structures remained stable in their starting conformations throughout the
 344 simulations. The root mean-square deviation (rmsd) values for the channel structures range from 1.5 to 3.5 \AA , which agrees with the
 345 structural drift quantified in previous simulation studies (Delemotte et al., 2011; Treptow and Tarek, 2006).

346 **Molecular Docking.** We used *AutoDock Vina* (Trott and Olson, 2010) to dock sevoflurane against the MD-generated ensemble of
 347 channel structures **C** and **O**. Each ensemble included 120 independent channel configurations at least. Docking solutions were
 348 resolved with an exhaustiveness parameter of 200, by searching a box volume of $100 \times 100 \times 100 \text{\AA}^3$ containing the transmembrane
 349 domain of the protein receptor. Sevoflurane was allowed to have flexible bonds for all calculations. Clustering of docking solutions
 350 was carried out following a maximum neighborhood approach.

351 **Molecular Dynamics.** All MD simulations were carried out using the program NAMD 2.9 (Phillips et al., 2005) under Periodic
 352 Boundary Conditions. Langevin dynamics and Langevin piston methods were applied to keep the temperature (300 K) and the
 353 pressure (1 atm) of the system fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm (Izaguirre et al.,
 354 1999). Short- and long-range forces were calculated every 1 and 2 time-steps respectively, with a time step of 2.0 fs. Chemical bonds
 355 between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into
 356 account using the Particle Mesh Ewald (PME) approach (Darden et al., 1993). The CHARMM36 force field (Huang and MacKerell,
 357 2013) was applied and water molecules were described by the TIP3P model (Jorgensen et al., 1983). All the protein charged amino
 358 acids were simulated in their full-ionized state (pH=7.0). All MD simulations, including FEP and voltage-driven simulations (see
 359 next), were performed on local HPC facility at LBTC amounting to a total run time of $\sim 2.0 \mu s$.

360 **Free-Energy Perturbation (FEP).** Eq. [1] was simplified here for the condition of ligand interactions to multiple independent sites -
 361 a condition that appears to be fulfilled at the channel structures featuring sparse binding sites for sevoflurane. Within this scenario,
 362 binding constants for structures $X \equiv \{C, O\}$ were factorized as the product of independent equilibrium constants

$$K_X(n_1, \dots, n_s) = K_X(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times K_X(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) \quad (10)$$

363 where,

$$K_X(n_1, 0_2, \dots, 0_s) = \frac{1}{n_1!} \left[\prod_{i=1}^{n_1} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta [W_X^*(n_1) - n_1 \bar{\mu}]} \quad (11)$$

$$\dots$$

$$K_X(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) = \frac{1}{n_s!} \left[\prod_{i=1}^{n_s} \left(\frac{2\pi}{\beta k_i} \right)^{\frac{3}{2}} \right] e^{-\beta [W_X^*(n_s) - n_s \bar{\mu}]}$$

364 denote respectively the binding constant of n_j ligands to each of the j sites at structure X .

365 Accordingly, the *excess* chemical potential $\bar{\mu}$ associated with coupling of the ligand from gas phase to bulk water and $W_X^*(n_j)$
 366 associated with coupling of n_j ligands from gas phase to site j under restraints were quantified via FEP. Because computation of
 367 $\bar{\mu}$ does not depend upon the choice of concentration, so long as the same thermodynamic state is used for the solution and gas
 368 phases, we estimated the *excess* potential by considering one sevoflurane molecule embedded into a water box of $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}^3$.
 369 $W_X^*(n_j)$ was computed by taking into considering the whole ligand-channel-membrane system.

370 All FEP calculations were performed in NAMD 2.9 (Phillips et al., 2005) by considering the Charmm-based parameters for
 371 sevoflurane as devised by Barber *et al.* (Barber et al., 2014b). Starting from channel-membrane equilibrated systems containing
 372 bound sevoflurane as resolved from docking, forward transformation were carried out by varying the coupling parameter in steps of
 373 0.01. Each transformation then involved a total of 100 windows, each spanning over 31800 steps of simulation. For the purpose of
 374 improving statistics, free-energy estimates and associated statistical errors were determined using the simple overlap sampling (SOS)
 375 formula (Lu et al., 2004) based on at least two independent FEP runs.

376 Specifically for ligand-protein calculations, the free-energy change $W_X^*(1_j)$ for singly-occupied sites j was computed as a FEP
 377 process that involves ligand coupling to a vacant site. Differently, for doubly-occupied sites, $W_X^*(2_j)$ was computed as a two-step
 378 FEP process involving ligand coupling to a vacant site $W_X^*(1_j)$ followed by binding of a second ligand at the preoccupied site
 379 $W_X^*(2_j|1_j)$. Because $W_X^*(2_j)$ is a state function, the stepwise approach is equivalent to a single-step process involving simultaneous
 380 coupling of two ligands to the protein site that is, $W_X^*(2_j) = W_X^*(1_j) + W_X^*(2_j|1_j)$. The colvars module (Fiorin et al., 2013) in NAMD
 381 2.9 was used to apply the harmonic restraint potentials when computing these quantities.

382 The value of $W_X^*(n_j)$ depends on the parameters of the restraint potential adopted in the FEP calculation *ie.*, the reference positions
 383 of the ligands in the bound state $\{\mathbf{R}_X^*(1_j), \dots, \mathbf{R}_X^*(n_j)\}$ and the magnitude of force constants $\{k_X(1_j), \dots, k_X(n_j)\}$. By minimizing
 384 the contribution of the restraint potential to the binding free-energy $W_X^*(n_j)$, Roux and coworkers (Roux et al., 1996) devised
 385 optimum choices for the parameters

$$\{\mathbf{R}_X^*(1_j) = \langle \mathbf{R}_X(1_j) \rangle, \dots, \mathbf{R}_X^*(n_j) = \langle \mathbf{R}_X(n_j) \rangle\} \quad (12)$$

386 and

$$\{k_X(1_j) = \frac{3\beta^{-1}}{\langle [\delta \mathbf{R}_X(1_j)]^2 \rangle}, \dots, k_X(n_j) = \frac{3\beta^{-1}}{\langle [\delta \mathbf{R}_X(n_j)]^2 \rangle}\} \quad (13)$$

387 in which, $\langle \mathbf{R}_X(1_j) \rangle, \dots, \langle \mathbf{R}_X(n_j) \rangle$ and $\langle [\delta \mathbf{R}_X(1_j)]^2 \rangle, \dots, \langle [\delta \mathbf{R}_X(n_j)]^2 \rangle$ are respectively the equilibrium average positions for each of
 388 the n_j bound ligands at site j and their corresponding mean-square fluctuations when interacting to structure X . Here, these
 389 parameters were estimated from the space of docking solutions and the resulting force constants, in the range of 0.03 to 1.35
 390 kcal/mol/ \AA^2 , were considered for computations of the bound state.

391 The equilibrium binding constant (eq. [10 and 11]) and following results are derived in the limit of a homogeneous diluted reservoir
 392 occupied by ligands at constant density $\bar{\rho}$ and excess chemical potential $\bar{\mu}$. Given that, we treated the system reservoir as a
 393 homogeneous aqueous solution despite its intrinsic inhomogeneity provided by the solvated lipid bilayer. An excess chemical
 394 potential of $-0.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ was estimated here as the reservoir potential for sevoflurane in bulk water.

395 **Sampling Overlap.** Here, a per-site measure of sampling overlap $o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j)$ between FEP configurations in structures \mathbf{C} and \mathbf{O}

$$o(\mathbf{A}_j, \mathbf{B}_j) = 1 - \frac{\sqrt{\text{tr}((\mathbf{A}_j^{1/2} - \mathbf{B}_j^{1/2})^2)}}{\sqrt{\text{tr} \mathbf{A}_j + \text{tr} \mathbf{B}_j}}, \quad (14)$$

396 was determined (Hess, 2002) from the square root of the covariance matrices \mathbf{A}_j and \mathbf{B}_j associated respectively to \mathbf{C} and \mathbf{O}
 397 samples at site j . Specifically, \mathbf{A}_j and \mathbf{B}_j were computed as symmetric 3×3 covariance matrices for centroid positions \mathbf{R}_j of
 398 the ligand at site j

$$\mathbf{X}_j = \langle (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle) \cdot (\mathbf{R}_j - \langle \mathbf{R}_j \rangle)^T \rangle$$

399 and their square roots

$$\mathbf{X}_j^{1/2} = \mathbf{R} \text{diag}(\lambda_1^{1/2}, \lambda_2^{1/2}, \lambda_3^{1/2}) \mathbf{R}^T$$

400 were solved from the column major eigenvectors $\{\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \mathbf{R}_3\}$ of the rotation matrix \mathbf{R} and the associated eigenvalues
 401 $\{\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3\}$. Note that overlap is expectedly 1 for identical samplings and 0 for orthogonal configuration spaces.

402 **Absolute Binding Free Energy and Ensemble Averages.** An absolute binding free-energy $\Delta G_X^o(n_1, \dots, n_s)$ (Gilson et al., 1997)
 403 associated with state $O_X^*(n_1, \dots, n_s)$ can be defined as

$$\Delta G_X^o(n_1, \dots, n_s) = -\beta^{-1} \ln [K_X(n_1, \dots, n_s) \times (C^o)^n] \quad (15)$$

404 where it is understood that this refers to the free energy of binding n ligands to the protein structure $X \equiv \{\mathbf{C}, \mathbf{O}\}$ from a reference
 405 standard reservoir concentration $C^o = 1M$ or in units of number density $C^o = (1,660 \text{ \AA}^3)^{-1}$. Still, the relevance of eq. [2] is clear

$$\langle A_X \rangle = \sum_{n_1, \dots, n_s} \langle A_X \rangle_{(n_1, \dots, n_s)} \rho_X(n_1', \dots, n_s') \quad (16)$$

406 as the ensemble average of any thermodynamic property of the system $A_X(n_1', \dots, n_s')$ for state $O_X^*(n_1', \dots, n_s')$ can be known from
407 eq. [16].

408 **Position-Dependent Probability Densities.** As demonstrated in reference (Stock et al., 2017), state-dependent probabilities
409 $\rho_X(n_1, \dots, n_s)$ for channel structures $X \equiv \{C, O\}$ can be mapped into the probability density $\rho_X(\mathbf{R})$ of any given ligand i to
410 occupy position \mathbf{R} in the system (regardless the position of the remaining $N-1$ ligands). Given our original consideration that the
411 reservoir is a homogeneous volume occupied by ligands with position-independent density $\bar{\rho}$, the probability $\rho_X(\mathbf{R})$ simplifies to

$$\rho_X(\mathbf{R}) = \begin{cases} \rho_X^j(\mathbf{R}), & \forall \mathbf{R} \in \delta V_j \\ \bar{\rho}, & \text{reservoir} \end{cases} \quad (17)$$

412 for every protein site $j=1, \dots, s$. The determination of $\rho_X(\mathbf{R})$ thus reduces in practice to knowledge of the per-site density $\rho_X^j(\mathbf{R})$

$$\rho_X^j(\mathbf{R}) = \sum_{n_j=0}^{n_j^{\max}} \rho_X(n_j) \times \rho_X(\mathbf{R}|n_j) \quad (18)$$

413 where, $\rho_X(\mathbf{R}|n_j)$ is the local density at site j when occupied exactly by n_j molecules and $\rho_X(n_j)$ is the probability for this
414 occupancy state. In eq. [18], $\rho_X(\mathbf{R}|n_j)$ describes the local equilibrium density of the ligand, conditional to a specific number of
415 bound molecules that satisfies $\int_{\delta V_j} d\mathbf{R} \rho_X(\mathbf{R}|n_j) = n_j$. In contrast,

$$\rho_X(n_j) = \sum_{n_1, \dots, n_s} \delta_{n_j, n_j} \rho_X(n_1', \dots, n_s') \quad (19)$$

416 denotes the marginal probability of site j to be occupied by n_j ligands regardless the occupancy of the other sites.

417 Eq. [18] establishes a formal relation between space-dependent and state-dependent densities of the system. At a fine level, this
418 relation involves the set of equilibrium constants $K_X(n_1, \dots, n_s)$ satisfying $\rho_X(n_j)$. From eq. [18], spatial projections of $\rho_X(\mathbf{R})$
419 along the transmembrane z direction of the system can be achieved as

$$\rho_X(z) = \bar{\rho} \times A(z) + \sum_{j=1}^s \rho_X^j(z) \quad (20)$$

420 where, $A(z) = \Delta x \Delta y$ is the total area of the membrane-aqueous region along the Cartesian x and y directions.

421 **Coarse-Graining Over States.** Consider any macrostate $O_X^*(n)$ of the system mapping an ensemble of accessible states
422 $O_X^*(n_1, \dots, n_s)$ in which n ligands bind the receptor regardless their specific distributions over the binding sites. Because $O_X^*(n)$
423 is degenerate, the probability density of the macrostate

$$\rho_X(n) = \sum_{n_1, \dots, n_s} \delta_{n, n} \rho_X(n_1', \dots, n_s') \quad (21)$$

424 can be determined by coarse-graining over the receptor states $O_X^*(n_1, \dots, n_s)$ featuring exactly $n = n_1 + \dots + n_s$ bound ligands. Here, the
425 Kronecker delta function $\delta_{n, n}$ ensures summation over states accessible to $O_X^*(n)$ only.

426 **Binding of Potassium and Sevoflurane at the Main-Pore of Kv1.2.** FEP calculations to quantify the binding free-energy of
427 sevoflurane against a preoccupied central cavity of Kv1.2 with bound potassium was computed as described in the Free-Energy
428 Perturbation (FEP) section. Specifically, the free-energy change $W_o^*(2_j)$ for double occupancy of the central-cavity by potassium
429 and sevoflurane was computed as a two-step FEP process involving coupling of the ion to the central cavity $W_o^*(1_j)$ followed by
430 binding of the anesthetic at the preoccupied cavity $W_o^*(2_j|1_j)$ that is, $W_o^*(2_j) = W_o^*(1_j) + W_o^*(2_j|1_j)$. Absolute binding free energies
431 $\Delta G_o^o(0_1, \dots, 1_j, \dots, 0_s)$ and $\Delta G_o^o(0_1, \dots, 2_j, \dots, 0_s)$ were then computed from the respective binding constants $K_o(0_1, \dots, 1_j, \dots, 0_s)$
432 and $K_o(0_1, \dots, 2_j, \dots, 0_s)$ according to eq. [11 and 15]. An in-water *excess* potential of $-69.52 \text{ kcal.mol}^{-1}$ was estimated for potassium.
433 Specifically for K^+ , a total binding free-energy was obtained by summing up its absolute binding free energy with its charge (q)
434 excess free energy ($q\phi V$) under an applied external voltage V (Dong et al., 2013; Souza et al., 2014). The voltage coupling ϕ
435 was determined in the form of the ‘‘electrical distance’’

$$\delta_\epsilon = \frac{\partial}{\partial V} \Phi(V) \Big|_{V=0} \quad (22)$$

436 where, $\Phi(V)$ is the local-electrostatic potential of the ion at the central cavity of the open channel. In practice, we applied the
437 charge imbalance protocol (see next) to solve δ_ϵ from two independent 2ns-long simulations at voltages $V=0 \text{ mV}$ and
438 $V=600 \text{ mV}$. For both runs, $\Phi(V)$ was estimated from the electrostatic potential map of the system and subsequently applied into
439 eq. [22] to solve δ_ϵ for $\delta V=600 \text{ mV}$.

440 To investigate the conduction properties of Kv1.2 with bound sevoflurane at the main pore, the open channel structure was simulated
441 under depolarized-membrane conditions using a charge-imbalance protocol (Delemotte et al., 2008).

442 **Partition Function Decomposition.** In the limit of s independent sites, binding constants can be factorized as the product of
443 independent equilibrium constants eq. [11] then ensuring the associated partition function to be factorized in terms

$$Z_X(n_1, \dots, n_s) = Z_X(n_1, 0_2, \dots, 0_s) \times \dots \times Z_X(0_1, \dots, 0_{s-1}, n_s) \quad (23)$$

444 of per-site contributions. Eq. [23] is useful to estimate the per-site contributions impacting the opening probability of the channel as
445 defined in eq. [9]. For any given site j , ratio values

$$\frac{Z_c(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s)}{Z_o(0_1, \dots, n_j, \dots, 0_s)} \begin{cases} =1 \\ >1 \\ <1 \end{cases} \quad (24)$$

446 mean respectively that ligand binding is not conformational dependent, stabilizes the open structure or stabilizes the closed structure.

447

448 Acknowledgements

449 The research was supported in part by the Brazilian Agencies CNPq, CAPES and FAPDF under Grants 305008/2015-3,
450 23038.010052/2013-95 and 193.001.202/2016. WT thanks CNPq for doctoral fellowship to LS (140845/2014-3).

451

452 Competing interests statement

453 The authors declare there are no financial or non-financial competing interests.

454

455 References

- Arcario, M.J., Mayne, C.G., Tajkhorshid, E., 2017. A membrane-embedded pathway delivers general anesthetics to two interacting binding sites in the *Gloeobacter violaceus* ion channel. *J. Biol. Chem.* 292, 9480–9492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780197>
- Barber, A.F., Carnevale, V., Klein, M.L., Eckenhoff, R.G., Covarrubias, M., 2014a. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6726–6731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405768111>
- Barber, A.F., Carnevale, V., Klein, M.L., Eckenhoff, R.G., Covarrubias, M., 2014b. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6726–6731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405768111>
- Barber, A.F., Carnevale, V., Raju, S.G., Amaral, C., Treptow, W., Klein, M.L., 2012. Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2120–2125. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.05.002>
- Barber, A.F., Liang, Q., Amaral, C., Treptow, W., Covarrubias, M., 2011. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys. J.* 101, 1613–1622. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.026>
- Barber, A.F., Liang, Q., Covarrubias, M., 2012. Novel activation of voltage-gated K⁺ channels by sevoflurane. *J. Biol. Chem.* 287, 40425–40432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405787>
- Brannigan, G., LeBard, D.N., Hémin, J., Eckenhoff, R.G., Klein, M.L., 2010. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14122–14127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008534107>
- Bu, W., Liang, Q., Zhi, L., Maciunas, L., Loll, P.J., Eckenhoff, R.G., Covarrubias, M., 2017. Sites and Functional Consequence of Alkylphenol Anesthetic Binding to Kv1.2 Channels. *Mol. Neurobiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0437-2>
- Cantor, R.S., 1997. The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 2339–2344. <https://doi.org/10.1021/bi9627323>
- Chipot, C., Pohorille, A. (Eds.), 2007. *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer.
- Covarrubias, M., Barber, A.F., Carnevale, V., Treptow, W., Eckenhoff, R.G., 2015. Mechanistic Insights into the Modulation of Voltage-Gated Ion Channels by Inhalational Anesthetics. *Biophys. J.* 109, 2003–2011. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.032>
- Darden, T., York, D., Pedersen, L., 1993. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., Tarek, M., 2008. Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Chem Phys B* 112, 5547–5550.
- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M.L., Amaral, C., Treptow, W., 2011. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6109–6114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102724108>
- Deng, N., Forli, S., He, P., Perryman, A., Wickstrom, L., Vijayan, R.S.K., Tiefenbrunn, T., Stout, D., Gallicchio, E., Olson, A.J., Levy, R.M., 2015. Distinguishing Binders from False Positives by Free Energy Calculations: Fragment Screening Against the Flap Site of HIV Protease. *J. Phys. Chem. B* 119, 976–988. <https://doi.org/10.1021/jp506376z>
- Dong, H., Fiorin, G., Carnevale, V., Treptow, W., Klein, M.L., 2013. Pore waters regulate ion permeation in a calcium release-activated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201316969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316969110>
- Finol-Urdaneta, R.K., McArthur, J.R., Juranka, P.F., French, R.J., Morris, C.E., 2010. Modulation of KvAP Unitary Conductance and Gating by 1-Alkanols and Other Surface Active Agents. *Biophys. J.* 98, 762–772. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.053>
- Fiorin, G., Klein, M.L., Hémin, J., 2013. Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Mol. Phys.* 111, 3345–3362. <https://doi.org/10.1080/00268976.2013.813594>
- Franks, N.P., 2008. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 370–386.
- Franks, N.P., Honoré, E., 2004. The TREK K₂P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.09.003>
- Gilson, M.K., Given, J.A., Bush, B.L., McCammon, J.A., 1997. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophys. J.* 72, 1047–1069.
- Hess, B., 2002. Convergence of sampling in protein simulations. *Phys. Rev. E* 65, 031910. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.031910>
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski,

- M., 2004. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684–2695.
- Huang, J., MacKerell, A.D., 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 34, 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Izaguirre, J.A., Reich, S., Skeel, R.D., 1999. Longer time steps for molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 110, 9853–9864. <https://doi.org/10.1063/1.478995>
- Jayakar, S.S., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., Cohen, J.B., 2013. Identification of Propofol Binding Sites in a Nicotinic Acetylcholine Receptor with a Photoreactive Propofol Analog. *J. Biol. Chem.* 288, 6178–6189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435909>
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L., 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kinde, M.N., Bondarenko, V., Granata, D., Bu, W., Grasty, K.C., Loll, P.J., Carnevale, V., Klein, M.L., Eckenhoff, R.G., Tang, P., Xu, Y., 2016. Fluorine-19 NMR and computational quantification of isoflurane binding to the voltage-gated sodium channel NaChBac. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 13762–13767. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609939113>
- LeBard, D.N., Hélin, J., Eckenhoff, R.G., Klein, M.L., Brannigan, G., 2012. General Anesthetics Predicted to Block the GLIC Pore with Micromolar Affinity. *PLoS Comput. Biol.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002532>
- Liang, Q., Anderson, W.D., Jones, S.T., Souza, C.S., Hosoume, J.M., Treptow, W., Covarrubias, M., 2015. Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLoS ONE* 10, e0143363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143363>
- Long, S.B., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- Lu, N., Kofke, D.A., Woolf, T.B., 2004. Improving the efficiency and reliability of free energy perturbation calculations using overlap sampling methods. *J. Comput. Chem.* 25, 28–40. <https://doi.org/10.1002/jcc.10369>
- Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J.-P., Sonner, J.M., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2011. X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469, 428–431. <https://doi.org/10.1038/nature09647>
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Raju, S.G., Barber, A.F., LeBard, D.N., Klein, M.L., Carnevale, V., 2013. Exploring Volatile General Anesthetic Binding to a Closed Membrane-Bound Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel via Computation. *PLoS Comput Biol* 9, e1003090. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003090>
- Roth, R., Gillespie, D., Nonner, W., Eisenberg, R.E., 2008. Bubbles, Gating, and Anesthetics in Ion Channels. *Biophys. J.* 94, 4282–4298. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120493>
- Roux, B., 2008. The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys. J.* 95, 4205–4216. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.136499>
- Roux, B., Nina, M., Pomès, R., Smith, J.C., 1996. Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.* 71, 670–681. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79267-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79267-6)
- Souza, C.S., Amaral, C., Treptow, W., 2014. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 17510–17515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413971111>
- Stock, L., Hosoume, J., Treptow, W., 2017. Concentration-Dependent Binding of Small Ligands to Multiple Saturable Sites in Membrane Proteins. *Sci. Rep.* 7, 5734. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05896-8>
- Stock, L., Souza, C., Treptow, W., 2013. Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 1501–1513. <https://doi.org/10.1021/bi3013017>
- Treptow, W., Tarek, M., 2006. Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 90, L64–66. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.080754>
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Woll, K.A., Peng, W., Liang, Q., Zhi, L., Jacobs, J.A., Maciunas, L., Bhanu, N., Garcia, B.A., Covarrubias, M., Loll, P.J., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., 2017. Photoaffinity Ligand for the Inhalational Anesthetic Sevoflurane Allows Mechanistic Insight into Potassium Channel Modulation. *ACS Chem. Biol.* 12, 1353–1362. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00222>