

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Departamento de Biologia Celular – CEL

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional – LBTC

Efeitos na dinâmica do canal Kv1.2 causados pela interação com anestésicos gerais

Aluno: Caio Silva Souza

Orientador: Dr. Werner Treptow

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

Brasília, maio de 2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, sem a qual este trabalho não poderia ter se realizado. Obrigado pelo incentivo e pelo apoio dado em todas as minhas decisões.

À Carla pelos muitos incentivos, companheirismo, e pelos incontáveis momentos de estímulo.

Ao pessoal do laboratório pela disposição em ajudar sempre com bom humor.

Ao meu orientador, Werner Treptow, por sempre confiar no meu trabalho e apoiar as novas ideias que propus para este e outros projetos, bem como para o laboratório.

À banca examinadora, que disponibilizou seu tempo para tornar este trabalho ainda melhor.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

Todos os anos, anestésicos gerais são utilizados em procedimentos cirúrgicos em milhões de pacientes no mundo. Entretanto, o mecanismo de ação de anestésicos gerais ainda é pouco compreendido. Portanto, é imprescindível a descrição da anestesia em todos os níveis, permitindo o desenvolvimento de novos anestésicos mais eficientes e seguros. Sugere-se que os principais alvos da anestesia são os canais iônicos do sistema nervoso. Estudos recentes mostraram que diversos canais iônicos dependentes de voltagem que participam ativamente no potencial de ação são modulados por anestésicos gerais. Mais especificamente, mostrou-se que mutações pontuais em regiões específicas dos canais Kv1.2 e KShaw-2 são suficientes para alterar as respostas desses canais a anestésicos. Em nível molecular, ainda procura-se elucidar os efeitos dessas mutações e determinar se a modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem se dá pela sua interação direta com os anestésicos ou se essa modulação é fruto de modificações físico-químicas nas membranas. Com o uso de técnicas computacionais, este projeto visou trazer mais informações a essa discussão. Realizou-se uma série de simulações de dinâmica molecular a fim de obter estruturas equilibradas de diversas conformações e construções do canal Kv1.2. A partir dessas estruturas foi possível identificar prováveis regiões de interação de anestésicos gerais no Kv1.2 via *docking* molecular e cálculos de energia livre. Prosseguiu-se com simulações do tipo *flooding*, pela qual simula-se o processo espontâneo de migração e interação dos anestésicos com a proteína estudada. Novamente foi possível identificar regiões de interação dos anestésicos gerais com o canal Kv1.2. Essas simulações permitiram avaliar correlações entre a ligação de anestésicos com a proteína e a sua dinâmica interna. Mostrou-se também que efeitos não específicos mediados por membrana podem ter um papel importante na energética do Kv1.2. Por fim, sugeriu-se a hipótese de modulação por múltiplos sítios: a modulação do Kv1.2 seria o resultado do balanço final de efeitos opostos causados pela interação de anestésicos gerais com diferentes sítios nos canais e com a membrana simultaneamente.

Abstract

General anesthetics are used in millions of surgeries every year however their mechanism of action are yet poorly understood. Thus the study of anesthesia in all levels will have a great impact on the development of new and safer anesthetic compounds. Neuronal ion channels are seen as playing a major role in the anesthesia process. Recently, it was shown that neuronal voltage-gated ion channels were modulated by general anesthetics. Point mutations on Kv1.2 and KShaw-2 were able to change these channels response to inhaled anesthetics. Nevertheless it's not clear if the modulation of voltage-gated ion channels are a result of direct or indirect interactions with anesthetics and what are the effects caused by the aforementioned point mutations. The present study tried to clarify these questions with the help of computational techniques. Membrane equilibrated constructions of Kv1.2 in two of its conformations were obtained by molecular dynamics simulations. By using docking calculations of anesthetics against these proteins allied with free energy calculations we found several putative binding sites on Kv1.2. Flooding molecular dynamics simulations also showed similar binding sites and allowed us to trace correlations between anesthetics binding and the protein's internal dynamics. Furthermore we found that non-specific membrane-mediated effects may also play an important role in the modulation of Kv1.2 by general anesthetics. Lastly we proposed a multiple sites hypothesis that states that Kv1.2 modulation by general anesthetics would be caused by the net balance of opposed effects induced by the presence of anesthetic molecules on distinct binding sites and on the membrane simultaneously.

Sumário

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	15
Siglas	16
Capítulo 1 - Introdução	18
1.1 Potencial de repouso	18
1.2 Potencial de ação	20
1.3 Canais iônicos dependentes de voltagem	22
1.4 Anestésicos	26
1.4.1 Sevoflurano	28
1.4.2 Isoflurano	28
1.4.3 Halotano	29
1.4.4 Propofol	29
1.5 Modulação dos canais K-Shaw2 e Kv1.2 por moléculas anestésicas .	30
1.6 Objetivos	33
1.6.1 Objetivo principal	33
1.6.2 Objetivos específicos	33
Capítulo 2 - Docking e energia livre	35
2.1 Introdução	35
2.2 Metodologia	37
2.2.1 Simulações de dinâmica molecular	37
2.2.2 Docking	38
2.2.3 Classificação em sítios e constante de afinidade	39

2.2.4	LIE – Linear Interaction Energy	39
2.2.5	Free Energy Perturbation (FEP)	40
2.3	Resultados	42
2.3.1	RMSD	42
2.3.2	Docking no Kv1.2	42
2.3.3	Validação com o canal NaChBac e cálculos de FEP	45
2.3.4	Cálculos de energia livre via LIE	47
Capítulo 3 - Simulações de flooding		50
3.1	Introdução	50
3.2	Metodologia	51
3.2.1	Simulações de flooding	51
3.2.2	Classificação em sítios	52
3.2.3	Acoplamento de movimentos	52
3.2.4	Distância elétrica	53
3.2.5	Pressão lateral	56
3.2.6	Parâmetros de ordem	57
3.3	Resultados	58
3.3.1	Partição pela membrana e identificação de sítios	58
3.3.2	Efeitos diretos	69
3.3.3	Efeitos indiretos	71
Capítulo 4 - Conclusões e Perspectivas		86
Referências bibliográficas		89
Anexo 1 – Arquivo de configuração de dinâmica molecular com NAMD		97
Anexo 2 – Artigos publicados		99

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática de neurônio (verde), evidenciando canais iônicos dependentes de voltagem (laranja), potencial elétrico transmembrânico (sinais positivos e negativos) e voltímetro acoplado a eletrodos nos meios intracelular e extracelular. No potencial de repouso, o meio extracelular é mais positivamente carregado que o meio intracelular. Durante o potencial de ação, os canais iônicos de Na⁺ se abrem (região central do neurônio), e o influxo de íons Na⁺ eleva o potencial transmembrânico para valores positivos (curva azul, porção D). Em seguida, os canais de K⁺ abrem-se, restabelecendo o potencial de repouso (curva azul, porção R). Como estes canais são ativados por variações de voltagem, o processo segue do corpo celular até os dendritos do neurônio, assemelhando-se a uma corrente elétrica.22

Figura 2. Estrutura do canal Kv1.2. (A) Topologia da região transmembrânica de uma subunidade do canal contendo o domínio sensor de voltagem (ciano e vermelho) e o domínio do poro (laranja). Destaque para as cargas positivas presentes na hélice S4 e para a hélice L (ou S4-S5), responsável por comunicar os movimentos dos dois domínios. O filtro de seletividade (FS) se encontra entre as hélice P e S6. (B) Estrutura tridimensional de uma subunidade do Kv1.2. (C) Vista extracelular da estrutura tetramérica do Kv1.2. (D) Processo de abertura e fechamento do poro de condução do Kv1.2. Quando o poro se fecha, os aminoácidos do portão hidrofóbico (PH) desidratam o caminho de permeação dos íons, impedindo a sua difusão.23

Figura 3. Estrutura molecular do sevoflurano. Átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio e flúor estão representados em preto, vermelho, branco e verde respectivamente.28

Figura 4. Estrutura molecular do isoflurano. Átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio, flúor e cloro estão representados em preto, vermelho, branco, verde e violeta

respectivamente.29

Figura 5. Estrutura molecular do halotano. Átomos de carbono, hidrogênio, flúor, cloro e bromo estão representados em preto, branco, verde, violeta e marrom respectivamente.29

Figura 6. Estrutura molecular do propofol. Átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio estão representados em preto, vermelho e branco respectivamente.30

Figura 7. Curvas de resposta do Kv1.2 a anestésicos. (A) Curva dose-resposta da corrente iônica para diferentes anestésicos, indicando que apenas o isoflurano e o sevoflurano potencializam o canal. As linhas contínuas representam a equação de Hill ajustada para a resposta do sevoflurano e do n-butanol. Não foi possível realizar ajustes nos demais dados. (B) Curva de condutância normalizada por voltagem do canal Kv1.2, na presença (vermelho) e ausência (preto) de 1mM de sevoflurano. As curvas foram normalizadas pelo valor da condutância máxima, medida antes da exposição ao anestésicos. Adaptado de Qiansheng Liang et al¹⁰⁴.32

Figura 8. Curva dose-resposta da corrente iônica para a ação de vários anestésicos no canal mutante Kv1.2 FRAKT. As linhas contínuas representam os ajustes para a equação de Hill (propofol e n-butanol) e para a equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). Não foi possível realizar o ajuste para o clorofórmio. Adaptado de Qiansheng Liang et al¹⁰⁴.33

Figura 9. Estruturas utilizadas nas análises de docking molecular. Kv1.2 aberto (A) e fechado (B) sem o domínio citoplasmático. Kv1.2 com domínio T1 nas conformações aberta (C) e fechada (D). Detalhe da glicina na posição 329 (E) e da sua substituição por uma treonina (F). Esta mutação foi suficiente para alterar a modulação do Kv1.2 por anestésicos gerais.36

Figura 10. Média (linha verde) e desvio padrão (área cinza) do RMSD dos oito sistemas simulados. As cadeias principais das proteínas, todos os átomos pesados, o domínio sensor de voltagem e o domínio do poro foram considerados separadamente.43

Figura 11. Conjunto de sítios de docking espalhados pelas regiões do domínio sensor de

voltagem (vermelho), da hélice S4-S5 (azul), do filtro de seletividade (violeta) e do poro central (laranja). Visão geral da distribuição dos sítios (A) e detalhe da posição deles na estrutura dos canais (B).44

Figura 12. Análise de subtração das constantes de ligação (K_d) baseadas nas energias do AutoDock Vina. Afinidades que prevalecem nas conformações fechadas tendem para o azul, enquanto maiores afinidades para a conformação aberta tendem para o vermelho.45

Figura 13. Regiões com alta presença de moléculas de isoflurano nas simulações de flooding¹¹⁵ (A) e nos cálculos de docking (B). Em ambos os casos encontraram-se sítios na região extracelular (violeta), nas janelas do canal (vermelho), no poro (laranja) e na hélice S4-S5 (azul).46

Figura 14. Constantes de afinidade calculadas via LIE para a interação entre as construções do Kv1.2 e o anestésico sevoflurano. As constantes de afinidade foram calculadas para os sítios 3, 5, 9 e 12 nas conformações aberta (O) e fechada (C) do canal selvagem (Kv1.2) e mutante (Kv1.2*).48

Figura 15. Protocolo de desbalanço iônico para aplicação de potencial transmembrânico. (A) É acrescentada uma camada de vácuo além dos limites do sistema no eixo perpendicular à membrana. Em seguida íons potássio são translocados de forma que haja uma carga elétrica aparente negativa e ou positiva nos banhos de eletrólitos inferior (intracelular) e superior (extracelular) respectivamente.(B) Perfil de potencial eletrostático ao longo da membrana nos sistemas despolarizados em que ambos os banhos de eletrólitos encontram-se neutros. (C) Perfil de potencial eletrostático ao longo da membrana nos sistemas hiperpolarizados em que há diferença de carga elétrica líquida entre os banhos de eletrólitos de forma a criar um potencial transmembrânico de aproximadamente $V = 650$ mV. Adaptado de Caio et al.⁴⁵55

Figura 16. Cavidade interna do domínio sensor de voltagem do Kv1.2. Estão representados as cadeias laterais dos aminoácidos que formam a cavidade (cinza), a F233 (branco) e a região hidratada (rosa). A seta indica a direção do eixo central (\hat{z}). Adaptado de Caio et al.⁴⁵56

Figura 17. Migração de moléculas de anestésico nas simulações de flooding. Os anestésicos, inicialmente colocados no meio aquoso (área delimitada em azul), rapidamente migram para a membrana ou para o poro dos canais, quando na conformação aberta. Após 300 ns quase não há anestésicos na água. A membrana foi omitida para facilitar a visualização.58

Figura 18. Fração de moléculas de sevoflurano em cada meio dos sistemas de flooding. Estão representadas as frações de sevoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho). As curvas em amarelo e magenta correspondem às moléculas em contato com as proteínas provenientes da membrana e de água respectivamente.60

Figura 19. Fração de moléculas de isoflurano em cada meio dos sistemas de flooding. Estão representadas as frações de isoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho). As curvas em amarelo e magenta correspondem às moléculas em contato com as proteínas provenientes da membrana e de água respectivamente.61

Figura 20. Fração de moléculas de sevoflurano em cada meio das simulações de flooding a 10 mM e 150 mM. Estão representadas as frações de sevoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho).62

Figura 21. Fração de moléculas de isoflurano em cada meio das simulações de flooding a 10 mM e 150 mM. Estão representadas as frações de isoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho).62

Figura 22. Valores de RMSD ao longo das simulações contendo sevoflurano. Os gráficos correspondem ao RMSD da cadeia principal das proteínas, dos átomos pesados, do domínio sensor de voltagem e do domínio do poro. Os sistemas Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C estão representados respectivamente pelas cores verde, azul, vermelho e amarelo. A área em cinza corresponde ao desvio padrão amostrado entre as quatro subunidades dos canais.63

Figura 23. Valores de RMSD ao longo das simulações contendo isoflurano. Os gráficos correspondem ao RMSD da cadeia principal das proteínas, dos átomos pesados, do

domínio sensor de voltagem e do domínio do poro. Os sistemas Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C estão representados respectivamente pelas cores verde, azul, vermelho e amarelo. A área em cinza corresponde ao desvio padrão amostrado entre as quatro subunidades dos canais.64

Figura 24. Exemplos de localizações de sítios de interação dos anestésicos. Visualização da distribuição dos sítios por toda a proteína (A) e em regiões específicas (B, C e D). As nuvens em azul são exemplos da densidade de anestésicos encontrados nas diversas simulações de *flooding*.65

Figura 25. Probabilidades dos diferentes sítios nas simulações de *flooding* com sevoflurano. Ao centro, em verde, estão representadas as probabilidades de encontrar moléculas de sevoflurano em cada um dos 15 sítios para os quatro sistemas estudados. A direita, em azul, estão representados as diferenças entre as probabilidade nos canais selvagens e nos canais mutantes (ao longo das linhas). Em baixo, em azul, estão representadas as diferenças entre as probabilidades dos sítios entre os estados aberto e fechado (ao longo das colunas).67

Figura 26. Probabilidades dos diferentes sítios nas simulações de *flooding* com isoflurano. Ao centro, em verde, estão representadas as probabilidades de encontrar moléculas de isoflurano em cada um dos 15 sítios para os quatro sistemas estudados. A direita, em azul, estão representados as diferenças entre as probabilidade nos canais selvagens e nos canais mutantes (ao longo das linhas). Em baixo, em azul, estão representadas as diferenças entre as probabilidades dos sítios entre os estados aberto e fechado (ao longo das colunas).68

Figura 27. Variações nas redes de acoplamento de movimento entre diferentes partes do Kv1.2-O. Os cilindros unem aminoácidos cujos acoplamentos foram modificados pela presença de sevoflurano. Os cilindros vermelhos correspondem a aumentos no acoplamento, enquanto os cilindros azuis representam diminuições no acoplamento. O diâmetro dos cilindros reflete a magnitude das diferenças. (A) Exemplo de acoplamento interno no domínio sensor de voltagem, diminuição nos acoplamentos próximos ao sítio 10 (círculo preto) e aumento generalizado dos acoplamentos em toda a região do filtro de seletividade. (B) Exemplo de domínio sensor de voltagem que apresentou poucas

variações nos seus acoplamentos.70

Figura 28. Perfis de distância elétrica ao longo do eixo z para membrana (verde), Kv1.2 aberto (azul), Kv1.2 fechado (vermelho), sistemas com sevoflurano (amarelo) e sistemas com isoflurano (magenta). Os sistemas de flooding estão representados como curva média sombreada com o desvio padrão.73

Figura 29. Estimativas de para o Kv1.2 selvagem sem anestésicos (Kv1.2), mutante com sevoflurano (Kv1.2*-S), selvagem com sevoflurano (Kv1.2-S), mutante com isoflurano (Kv1.2*-I) e selvagem com isoflurano (Kv1.2-I). Valores na diagonal foram calculados entre as conformações aberta e fechada do mesmo sistema. Nos triângulos superior e inferior, o foi estimado somente entre as conformações abertas ou fechadas dos diferentes canais respectivamente.74

Figura 30. Perfis de pressão lateral e densidade eletrônica para flooding da membrana com sevoflurano. (Superior) Perfil de pressão lateral para membrana pura (verde), membrana com 10 mM de sevoflurano (vermelho) e membrana com 150 mM de sevoflurano (azul). (Centro) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 150 mM de sevoflurano. (Inferior). Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 10 mM de sevoflurano. Nos perfis de densidade eletrônica, estão representadas as densidade da água (verde), das cadeias polares da membrana (azul), das cadeias alifáticas da membrana (vermelho) e das moléculas de sevoflurano (magenta). As regiões sombreadas correspondem ao desvio padrão das medidas. A origem da coordenada z corresponde ao centro da membrana.76

Figura 31. Perfis de pressão lateral e densidade eletrônica para flooding da membrana com isoflurano. (Superior) Perfil de pressão lateral para membrana pura (verde), membrana com 10 mM de isoflurano (vermelho) e membrana com 150 mM de isoflurano (azul). (Centro) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 150 mM de isoflurano. (Inferior) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 10 mM de isoflurano. Nos perfis de densidade eletrônica, estão representadas as densidade da água (verde), das cadeias polares da membrana (azul), das cadeias alifáticas da membrana (vermelho) e das moléculas de isoflurano (magenta). As regiões sombreadas correspondem ao desvio padrão das medidas. A origem da

coordenada z corresponde ao centro da membrana.77

Figura 32. Perfil de área do Kv1.2 ao longo do eixo z (perpendicular a membrana).
Estão representadas as áreas das conformações aberta (verde) e fechada (azul).78

Figura 33. Curvas de condutância por voltagem experimentais e calculadas segundo modelo de Cantor modificado. Estão representadas as curvas para o Kv1.2 sem anestésicos (verde), Kv1.2 com sevoflurano (azul), flooding com sevoflurano (vermelho) e flooding com isoflurano (amarelo).79

Figura 34. Espessura das membranas nas simulações com sevoflurano considerando os grupos polares (A e C) ou apenas as caudas alifáticas (B e D) dos fosfolipídeos. (A e B) Evolução temporal da espessura das membranas ao longo das simulações para o Kv1.2*-O (verde), Kv1.2*-C (azul), Kv1.2-O (vermelho) e Kv1.2-C (amarelos). (C e D) Espessura média das membranas nas simulações de referência (hachurado) e nas simulações de flooding (liso).80

Figura 35. Espessura das membranas nas simulações com sevoflurano considerando os grupos polares (A e C) ou apenas as caudas alifáticas (B e D) dos fosfolipídeos. (A e B) Evolução temporal da espessura das membranas ao longo das simulações para o Kv1.2*-O (verde), Kv1.2*-C (azul), Kv1.2-O (vermelho) e Kv1.2-C (amarelos). (C e D) Espessura média das membranas nas simulações de referência (hachurado) e nas simulações de flooding (liso).81

Figura 36. Parâmetros de ordem para lipídeos próximos e afastados das proteínas na presença de sevoflurano. Os grupos de 1 a 15 (linhas sólidas) pertencem à cadeia insaturada da fosfatidilcolina e os grupos de 16 a 30 (linhas tracejadas) fazem parte da cadeia saturada. Os parâmetros de ordem das simulações de referência, de flooding e da diferença entre as duas estão representados em verde, azul e vermelho respectivamente. A área em cinza corresponde ao desvio padrão de cada medida apresentada.83

Figura 37. Parâmetros de ordem para lipídeos próximos e afastados das proteínas na presença de isoflurano. Os grupos de 1 a 15 (linhas sólidas) pertencem à cadeia insaturada da fosfatidilcolina e os grupos de 16 a 30 (linhas tracejadas) fazem parte da cadeia saturada. Os parâmetros de ordem das simulações de referência, de flooding e da

diferença entre as duas estão representados em verde, azul e vermelho respectivamente. A área em cinza corresponde ao desvio padrão de cada medida apresentada.84

Figura 38. Proporção de anestésicos por fosfolípídeo para o flooding de sevoflurano e isoflurano nas conformações aberta (O) e fechada (C) do Kv1.2 selvagem. As barras sólidas e hachuradas correspondem aos fosfolípídeos próximos ($< 5 \text{ \AA}$) e afastados ($> 5 \text{ \AA}$) da proteína.85

Figura 39. Exemplo de deformações causadas nos fosfolípídeos pela presença de anestésicos. (A) Fosfatidilcolina com a cadeia alifática saturada (azul) ocupando o sítio 1, impedindo a entrada de uma molécula de sevoflurano. (B) Após a entrada do sevoflurano no sítio 1, ambas as cadeias saturada (azul) e insaturada (violeta) são deformadas para acomodar o anestésico.85

Lista de tabelas

Tabela 1. Estimativas de energia livre de ligação via FEP e via Autodock Vina. As unidades estão em kcal/mol.	46
Tabela 2. Estimativas de energia livre via FEP. As unidades estão em kcal/mol.	47
Tabela 3. Correlações de Pearson entre a evolução temporal dos acoplamentos e as curvas de partição dos anestésicos. As correlações consideradas média e altas estão grifadas.	71

Siglas

Cav: canais iônicos seletivos a cálcio

CHARMM36: campo de força geral para dinâmica molecular

DBSCAN: (*Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*) método de agrupamento de dados

FEP: (*Free Energy Perturbation*) método de cálculo de energia livre

HCN: canais iônicos não seletivos

Kv: canais iônicos dependentes de voltagem seletivos a potássio

Kv1.2: canal iônico dependente de voltagem seletivo a potássio de mamíferos

Kv1.2-C: conformação fechada do domínio transmembrânico do Kv1.2

Kv1.2-O: conformação aberta do domínio transmembrânico do Kv1.2

Kv1.2-FRAKT: construção mutante do Kv1.2 com cinco substituições na hélice S4-S5

Kv1.2-T1-C: conformação fechada do Kv1.2 com domínio citoplasmático

Kv1.2-T1-O: conformação aberta do Kv1.2 com domínio citoplasmático

Kv1.2*-C: conformação fechada do domínio transmembrânico do Kv1.2 com a substituição G329T

Kv1.2*-O: conformação aberta do domínio transmembrânico do Kv1.2 com a substituição G329T

Kv1.2*-T1-C: conformação fechada do Kv1.2 com domínio citoplasmático e a substituição G329T

Kv1.2*-T1-O: conformação aberta do Kv1.2 com domínio citoplasmático e a substituição G329T

LIE: (*Linear Interaction Energy*) método aproximativo de cálculo de energia livre

NAMD: programa de simulações de dinâmica molecular

Nav: canais iônicos dependentes de voltagem seletivos a sódio

PME: (*Particle Mesh Ewald*) método de cálculo de interações de longo alcance

RMSD: desvio quadrático médio

SHAKE: método de restrição de geometria em simulações de dinâmica molecular

TASK: canal K₂P de humanos

TIP3P: modelo de água explícita utilizado em simulações de dinâmica molecular

TREK: canal K₂P de humanos

VMD: (*Visual Molecular Dynamics*) programa para visualizar, analisar e preparar simulações de dinâmica molecular

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 POTENCIAL DE REPOUSO

Células procarióticas e eucarióticas são separadas do meio que as circundam por membranas constituídas predominantemente por fosfolipídeos. Tais membranas mediam processos fundamentais para o metabolismo celular, não atuando apenas como barreiras passivas. Dentre os diversos papéis das membranas celulares, podemos destacar o transporte seletivo de moléculas. A natureza hidrofóbica dos fosfolipídeos permite que compostos com caráter hidrofóbico, como hormônios esteroides, e pequenas moléculas difundam-se livremente entre os meios intracelular e extracelular. Essa taxa de difusão depende predominantemente do potencial químico advindo das suas concentrações em cada meio. Já moléculas polares, como glicose, espécies iônicas e macromoléculas, encontram na membrana uma barreira física. No entanto, as células necessitam que tais compostos transitem entre os meios intracelular e extracelular em determinados momentos. Para isso, as células utilizam-se

de proteínas integrais de membrana que atuam como verdadeiros canais (permitem a livre difusão de solutos) ou transportadores (permitem o fluxo de solutos contra o gradiente eletroquímico) que controlam o fluxo de moléculas. Dentre esses processos, o transporte de espécies iônicas mostra-se bastante peculiar, dada a sua capacidade de criar potenciais elétricos em torno da membrana.¹

Em todas as células do nosso organismo, há uma diferença de potencial elétrico entre o meio intracelular e o meio extracelular, geralmente próximo a -75 mV. Esta diferença de potencial existe apenas nas proximidades da membrana plasmática, sendo comumente denominada de potencial transmembrânico, e é decorrente das forças eletroquímicas que atuam nas espécies iônicas ao redor da membrana.² Considere uma membrana plasmática separando duas soluções com concentrações diferentes de uma espécie iônica positivamente carregada (como o íon potássio), e que nesta membrana hajam canais que permitam a livre difusão deste íon. Considere também que não haja transporte de outro composto carregado. Assumindo que o íon positivo esteja mais concentrado no meio intracelular, é esperado que haja um efluxo dele, segundo o gradiente químico. Entretanto, cada vez que um íon atravessa a membrana, o meio intracelular se torna mais negativo e o meio extracelular mais positivo. Dessa forma, é gerado um campo elétrico contrário à sua difusão. À medida em que mais espécies carregadas atravessam a membrana, a componente elétrica do potencial eletroquímico atuante nelas torna-se maior até igualar-se à componente química (proveniente do potencial químico). Nesse momento a sua difusão é interrompida. Se introduzirmos eletrodos nos dois meios, será possível medir uma diferença de potencial elétrico, conhecida como o potencial de equilíbrio desta espécie carregada. Cada íon tem um valor de potencial de equilíbrio diferente que é regido pela equação de Nerst:

$$E_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[M]_e}{[M]_i} \quad [1.1]$$

onde M é um íon de carga z , R é a constante universal dos gases, T é a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday, e os subscritos e e i denotam o meio extracelular e o meio intracelular, respectivamente.

Em uma situação real, há diferentes espécies iônicas em diferentes concentrações dentro e fora das células, além de outras moléculas carregadas, como o aminoácido arginina. As células possuem mecanismos intrínsecos de controlar a entrada e saída desses compostos, como o bombeamento de íons potássio para o meio intracelular e de sódio para o meio

extracelular. Aos íons cloreto é permitido livre passagem pela membrana por meio de canais constitutivamente abertos, enquanto moléculas orgânicas carregadas geralmente ficam confinadas no interior da célula. Como explicado anteriormente, as diferenças de permeabilidade e de concentrações decorrentes desses processos de transporte resultam na difusão de alguns íons até que se alcance um potencial de equilíbrio. Nesse caso, tal potencial depende não mais de apenas duas espécies iônicas, e sim de todos os compostos carregados. A equação de Goldman² permite calcular este potencial de equilíbrio coletivo:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^n P_{M_i^+} [M_i^+]_{extra} + \sum_j^m P_{A_j^-} [A_j^-]_{intra}}{\sum_i^n P_{M_i^+} [M_i^+]_{intra} + \sum_j^m P_{A_j^-} [A_j^-]_{extra}} \right) \quad [1.2]$$

onde E_m é o potencial de membrana, P_{ion} é a permeabilidade de um dado íon, M^+ cátion, A^- é um ânion, $[ion]_{intra}$ e $[ion]_{extra}$ são as concentrações de um íon nos meios intracelular e extracelular, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura e F é a constante de Faraday. O balanço de cargas elétricas e suas respectivas permeabilidades resultam em uma diferença de potencial elétrico transmembrânico que se mantém aproximadamente constante ao longo do tempo (em torno de -75 mV). Esse potencial é denominado potencial de repouso. Dessa forma, as células possuem um mecanismo relativamente simples de criação de um campo elétrico, o qual pode ser utilizado em diversos processos, desde o transporte de glicose para o interior da célula, até o uso de correntes elétricas para transportar informações.

1.2 POTENCIAL DE AÇÃO

Como mostra a equação de Goldman (equação 1.2) o potencial de repouso é fortemente influenciado pela permeabilidade das espécies iônicas. Por exemplo, caso permita-se a livre difusão de íons sódio e mantenha-se uma baixa permeabilidade dos outros compostos, o potencial transmembrânico aproximar-se-ia do potencial de equilíbrio do sódio (+60 mV). Ou seja, haveria uma reversão do potencial transmembrânico, ou despolarização da membrana. Em contraste, como no estado despolarizado o meio intracelular tornou-se mais positivo, um aumento na permeabilidade dos íons potássio acarretaria no seu efluxo, levando o potencial

transmembrânico ao valor de equilíbrio do potássio (-90 mV). Essa diminuição no potencial transmembrânico é denominada repolarização.²

Os tipos celulares ditos excitáveis (como neurônios, miócitos cardíacos e células musculares), se valem destes dois processos para criar ou propagar sinais elétricos conhecidos como impulsos nervosos. Para isso, há um conjunto especial de proteínas de membrana, denominadas canais dependentes de voltagem, que permitem a passagem seletiva de íons em resposta a mudanças no potencial transmembrânico.² Para tanto, consideremos uma região de membrana contendo canais dependentes de voltagem de sódio e potássio em um estado dito fechado, ou seja, que não é permitido o fluxo de íons. Quando há uma despolarização nas imediações dessa região, ambos os canais são sensibilizados e iniciam o seu processo de abertura. No entanto, a abertura dos canais de sódio é mais rápida, causando um rápido influxo de íons sódio para o interior da célula e, conseqüentemente, uma despolarização da membrana. A passagem de íons por esses canais é interrompida rapidamente por um mecanismo intrínseco de bloqueio, impedindo que a despolarização em potenciais próximos a +20 mV. Nesse momento, todos os canais de potássio encontram-se na conformação aberta, promovendo um efluxo de íons potássio. Esse fluxo reduz o potencial transmembrânico a valores próximos de -80 mV, inferiores ao potencial de repouso da célula, em um processo denominado hiperpolarização. Essas proteínas também possuem um mecanismo de bloqueio que impede uma hiperpolarização exacerbada da célula. Após essas etapas, o potencial transmembrânico volta ao seu valor de repouso e ambos os canais aos seus estados iniciais, fechado e desbloqueado. Os canais estão, então, aptos a reiniciar o processo. A esse conjunto sincronizado de eventos, que resultam em variações do potencial de membrana, damos o nome de potencial de ação (figura 1). Como o potencial de ação é um evento local e iniciado a partir despolarizações em regiões adjacentes, ele é capaz de induzir novos potenciais nas porções seguintes da membrana de forma sucessiva. Desse modo, o potencial de ação se inicia em um ponto da membrana e se propaga por toda a extensão da célula sob a forma de um pulso elétrico caminhante: o impulso nervoso.

Hodgikín e Huxley foram os pioneiros na elucidação desse mecanismo, iniciando os seus estudos na década de 50. A partir da técnica de *voltage-clamp*, eles mediram as correntes elétricas associadas ao potencial de ação em neurônios de lula gigante. Eles determinaram que a fase de crescimento do potencial de ação corresponde a um influxo de Na⁺, enquanto que a volta ao potencial de repouso é ocasionada por um efluxo de K⁺.³⁻⁵ Estudos posteriores

mostraram a existência de canais transmembrânicos que controlavam especificamente o transporte dessas espécies iônicas.⁶⁻⁹ Apenas com o advento da técnica de *patch-clamp* e da biologia molecular, por volta dos anos 80, é que foi possível isolar o conjunto específico de proteínas de membrana responsáveis pela criação do potencial de ação e caracterizá-las como canais dependentes de voltagem.¹⁰⁻¹²

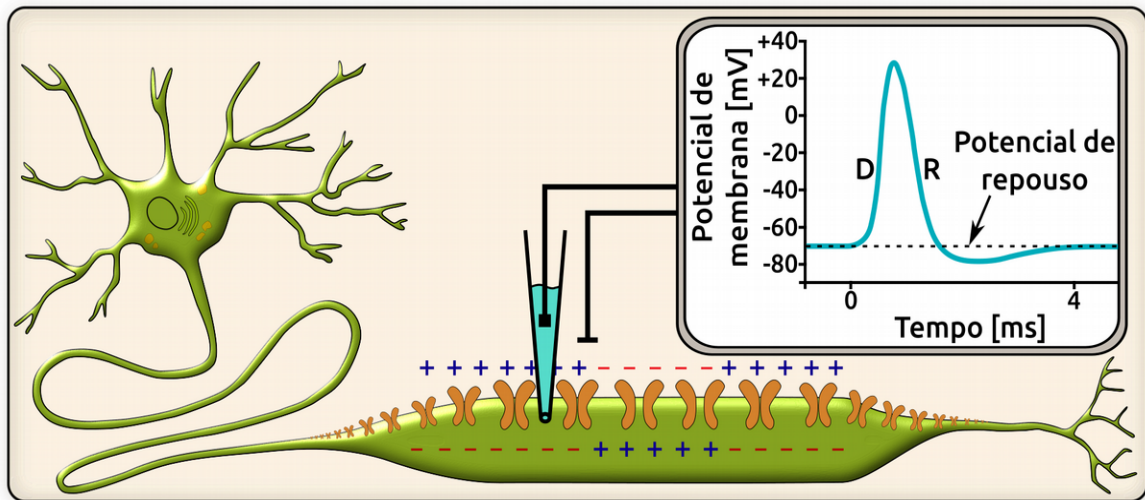


Figura 1. Representação esquemática de neurônio (verde), evidenciando canais iônicos dependentes de voltagem (laranja), potencial elétrico transmembrânico (sinais positivos e negativos) e voltímetro acoplado a eletrodos nos meios intracelular e extracelular. No potencial de repouso, o meio extracelular é mais positivamente carregado que o meio intracelular. Durante o potencial de ação, os canais iônicos de Na^+ se abrem (região central do neurônio), e o influxo de íons Na^+ eleva o potencial transmembrânico para valores positivos (curva azul, porção D). Em seguida, os canais de K^+ abrem-se, restabelecendo o potencial de repouso (curva azul, porção R). Como estes canais são ativados por variações de voltagem, o processo segue do corpo celular até os dendritos do neurônio, assemelhando-se a uma corrente elétrica.

1.3 CANAIS IÔNICOS DEPENDENTES DE VOLTAGEM

A superfamília dos canais iônicos dependentes de voltagem é composta por proteínas integrais de membrana que conduzem íons em resposta a variações no potencial transmembrânico. Essa família é subdividida em quatro classes principais, de acordo com a seletividade das proteínas: os canais seletivos a potássio (Kv), a cálcio (Cav), a sódio (Nav), e os canais não seletivos (HCN).¹³ Além de cruciais na geração e propagação dos impulsos nervosos, o mal funcionamento dessas proteínas está relacionado a diversas doenças, como epilepsia, síndrome QT longa, paralisia hipercalemica e hipocalêmica periódica, diabetes, desregulação da pressão sanguínea, hipertermia maligna, paramiotonia congênita, miotonia fluctuans, miotonia permanens e miotonia acetazolamida responsiva.¹⁴⁻¹⁷

Os canais iônicos geralmente apresentam uma estrutura tetramérica (formada por quatro subunidades independentes) ou pseudo-tetramérica (formada por uma única cadeia

polipeptídica contendo quatro repetições). A região transmembrânica de cada subunidade homóloga é composta por seis hélices (S1 a S6) que se dispõem radialmente em torno do poro central (figura 2).^{11,12,18} As quatro primeiras hélices (S1 a S4) pertencem ao domínio sensor de voltagem, enquanto as hélices seguintes (S5 a S6) formam o domínio do poro. Esses domínios estão conectados por uma hélice especial (S4-S5) que atua como uma alavanca que transmite mecanicamente os movimentos do domínio sensor de voltagem para o poro, controlando o processo de abertura/fechamento do poro.

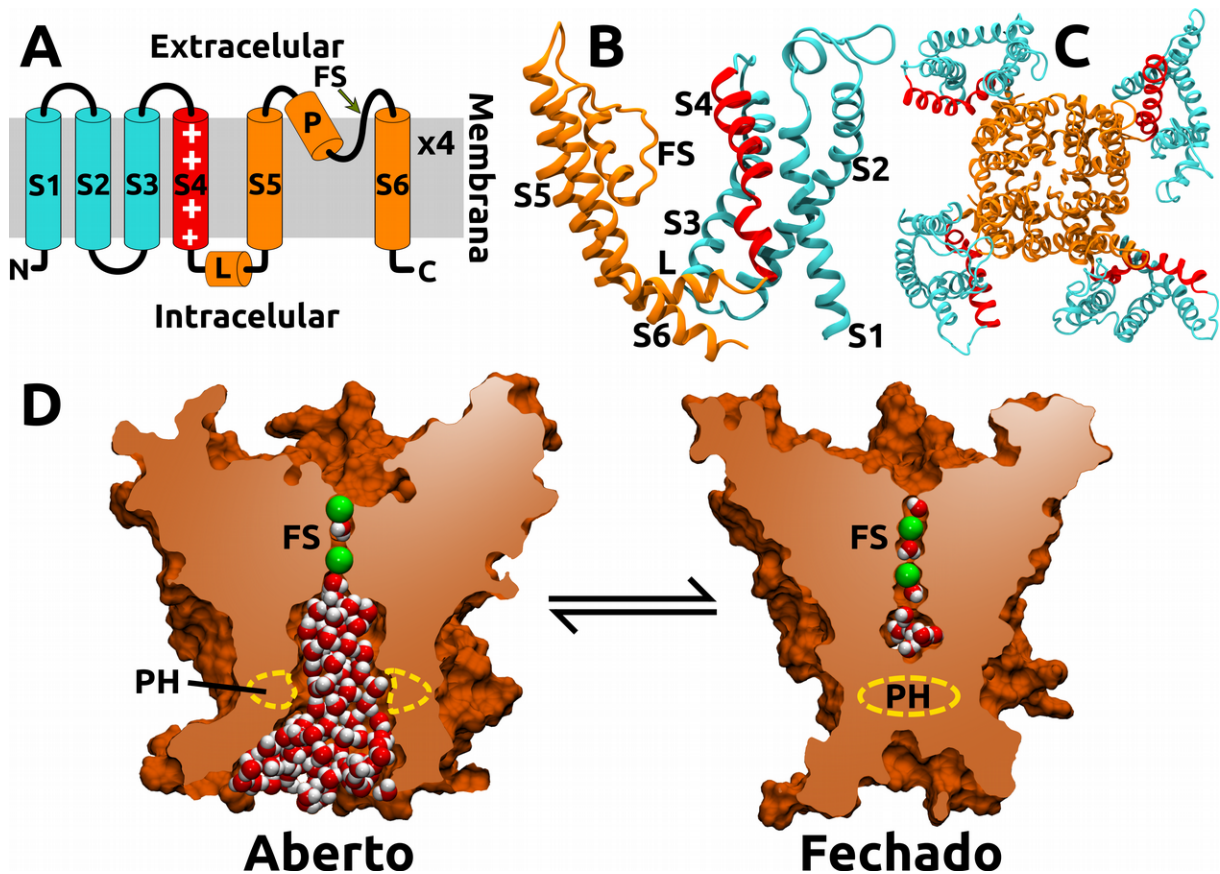


Figura 2. Estrutura do canal Kv1.2. (A) Topologia da região transmembrânica de uma subunidade do canal contendo o domínio sensor de voltagem (ciano e vermelho) e o domínio do poro (laranja). Destaque para as cargas positivas presentes na hélice S4 e para a hélice L (ou S4-S5), responsável por comunicar os movimentos dos dois domínios. O filtro de seletividade (FS) se encontra entre as hélice P e S6. (B) Estrutura tridimensional de uma subunidade do Kv1.2. (C) Vista extracelular da estrutura tetramérica do Kv1.2. (D) Processo de abertura e fechamento do poro de condução do Kv1.2. Quando o poro se fecha, os aminoácidos do portão hidrofóbico (PH) desidratam o caminho de permeação dos íons, impedindo a sua difusão.

O domínio sensor de voltagem é responsável por detectar e responder a variações do potencial transmembrânico. A sensibilidade desse domínio é da ordem de centésimos de Volt, graças à grande quantidade de aminoácidos carregados positivamente presentes na hélice S4 (figura 2 A). Geralmente há quatro argininas (R1 – R4) nesta hélice, algumas podendo ser substituídas por lisinas. Variações no campo elétrico transmembrânico realizam trabalho

sobre esses aminoácidos, induzindo movimentos na hélice S4 que culminam na abertura ou fechamento do poro.¹⁹⁻²² Quando a célula está despolarizada, as argininas da hélice S4 estão voltadas para o meio extracelular, e é dito que o domínio encontra-se ativado. Após a repolarização, há um movimento desses aminoácidos através do campo elétrico transmembrânico em direção ao meio intracelular, e o domínio passa a estar desativado.²³⁻²⁶ Este movimento é realizado em etapas, nas quais cada arginina atravessa uma região conhecida como o “centro catalítico” do domínio. No Kv1.2, este centro é composto pela F233, responsável por grande parte da barreira energética de cada transição, e pelos aminoácidos E236 e D259, que ajudam a estabilizar as argininas nesta região.^{27,28}

Tanto nos estados ativado e desativado, quanto nos estados intermediários, os aminoácidos básicos da hélice S4 são estabilizados por pontes salinas com os resíduos ácidos das hélices vizinhas (S1 – S3) e com os grupos polares dos lipídeos da membrana, o que explica a presença de hélices altamente carregadas no interior de uma membrana fosfolipídica. Cada transição pode, então, ser vista como uma sequência de quebras e criações de novas pontes salinas, como no movimento de um zíper. Para que isto ocorra, é necessário que a hélice S4 seja translocada cerca de 10–15 Å perpendicularmente à membrana e através de um campo elétrico estático, enquanto é rotacionada em aproximadamente 180°.²⁹⁻³⁷

As hélices que formam este domínio se dispõem circularmente e formam uma cavidade hidratada em forma de ampulheta e que também contribui para a estabilização dos aminoácidos positivamente carregados no seu interior. Moléculas de água e íons advindos dos meios intracelular e extracelular podem adentrar nessa região, mas a F233 forma uma constrição hidrofóbica no centro dessa cavidade que impede a troca dessas moléculas entre os dois meios (figura 16). Assim, os dois banhos de eletrólitos aproximam-se além do possível em uma membrana fosfolipídica pura sem que haja condução iônica. Com isso toda a variação do potencial eletrostático presente ao longo de uma membrana polarizada é focalizada nessa constrição hidrofóbica. Portanto os aminoácidos positivamente carregados da hélice S4 próximos a essa região estão sujeitos a forças elétricas mais intensas. Pequenas alterações no campo elétrico transmembrânico são, então, capazes de gerar forças motrizes com intensidade suficiente para deslocar as argininas da hélice S4 através da F233. Isso explica a grande sensibilidade desses domínios a variações do potencial transmembrânico.^{27,30,36-44} É interessante notar que apesar da grande variabilidade observada na sequência de canais iônicos presentes nos diversos reinos (de bactérias a mamíferos), a focalização do campo

elétrico está presente nos respectivos domínios sensores de voltagem. Hipotetiza-se, então, que há pressões seletivas direcionando para que mutações nesses domínios não perturbem a geometria responsável pela focalização do campo elétrico.⁴⁵

O movimento dos aminoácidos positivamente carregados da hélice S4 ao longo do campo elétrico transmembrânico durante os processos de ativação/desativação originam uma corrente elétrica (duas ordens de grandeza inferior à corrente iônica do canal), que pode ser medida em experimentos de *patch-clamp*.⁴⁶⁻⁴⁸ Com esta técnica, foi demonstrado que tal corrente elétrica está intimamente relacionada com a ativação dos canais, sendo, portanto, chamada de *gating current*. A sua integral ao longo do tempo (a uma voltagem transmembrânica constante) corresponde à quantidade total de cargas translocadas, ou *gating charge*. As *gating charges* constituem um dos mais importantes descritores experimentais do funcionamento dos canais iônicos dependentes de voltagem, tendo sido extensivamente utilizadas nos estudos mencionados anteriormente. Apenas recentemente é que as *gating charges* foram associadas a movimentos dos resíduos básicos da hélice S4.^{20,21,49,50}

Como os domínios sensores de voltagem são responsáveis por controlar a abertura/fechamento do poro de condução, eles são importantes alvos na modulação dos canais catiônicos dependentes de voltagem. O funcionamento destes domínios pode ser modulado por diversos fatores, destacando-se as mutações pontuais (que alteram ou a cinética de ativação/desativação ou a estrutura interna dos domínios), toxinas (como a HaTx)⁵¹ e até a composição lipídica das membranas (impedindo a formação de pontes salinas entre as argininas da hélice S4 e o grupo polar dos lipídeos). Há várias doenças relacionadas às mutações pontuais, como epilepsia, síndrome QT longa e paralisia hipocalêmica periódica.^{15,38,52,53} A modulação pela composição lipídica da membrana é usada para manter o domínio sensível a voltagem preferencialmente em um dos estados (ativado ou desativado), sendo controlada por enzimas que alteram quimicamente os grupos carregados dos lipídeos.^{54,55}

O domínio do poro forma, quando aberto, um canal hidratado dentro do qual os íons podem difundir-se livremente. Na porção extracelular desse domínio, há um motivo especial, composto por uma hélice e um segmento altamente conservado, que une as hélices S5 e S6. Esse segmento é conhecido como filtro de seletividade e é responsável pela discriminação entre as diferentes espécies iônicas que são conduzidas pelo canal (figura 2). Os filtros de seletividade apresentam uma capacidade impressionante de discriminar espécies iônicas muito

semelhantes, sem, no entanto, limitar o seu transporte difusivo. Por exemplo, no Kv1.2, para cada 10000 K⁺ conduzidos pelo filtro de seletividade, apenas um Na⁺ é capaz de atravessá-lo, sendo que ambos os íons apresentam a mesma carga elétrica e seus raios atômicos diferem em apenas 0,38 Å (frente a oscilações de até 3 Å observadas na estrutura das proteínas).⁵⁶⁻⁵⁸ Essa seletividade é alcançada por uma mimetização da camada de solvatação típica de cada íon. Na porção mais intracelular do domínio, há um conjunto de aminoácidos hidrofóbicos que formam o portão hidrofóbico, o qual controla a passagem de íons. Quando o canal encontra-se fechado, esses aminoácidos se aproximam de forma a desidratar o caminho de permeação do íon. Como consequência, íons que antes difundiam-se livremente por esta região agora experimentam uma barreira energética de até 45 kcal/mol, barreira essa similar à imposta pela membrana plasmática.^{18,59,60} Jansen *et al.* mostraram que o poro realiza um processo de abertura e fechamento autônomo.⁶¹ Quando o domínio sensor de voltagem está ativado e o poro aberto, este último pode se desidratar espontaneamente, voltando a hidratar-se caso um íon tente atravessá-lo. No entanto, quando o domínio sensor de voltagem encontra-se desativado, a conformação fechada do poro é estabilizada, impedindo a condução iônica (figura 2 D).

Há três possíveis estados conformacionais do poro que influenciam a condução iônica: aberto, fechado e inativado. Nos estados aberto e fechado, o poro encontra-se hidratado e desidratado, respectivamente. O estado inativado corresponde à inativação do tipo C, na qual deformações do filtro de seletividade bloqueiam a passagem de íons, mesmo quando o poro encontra-se aberto.⁶²⁻⁶⁴

1.4 ANESTÉSICOS

Anestésicos gerais são empregados em procedimentos cirúrgicos há mais de 165 anos. Todavia, os detalhes moleculares do seu mecanismo de ação permanecem desconhecidos.⁶⁵ Essas moléculas são conhecidas por deprimir rapidamente o sistema nervoso central e induzir perda de consciência, amnésia, relaxamento muscular e analgesia. Entretanto, elas também apresentam efeitos colaterais, como a redução na taxa de filtração glomerular⁶⁶, problemas de colapso pulmonar⁶⁷ ou até mesmo necrose hepática.⁶⁸ Apesar de os anestésicos gerais inalatórios geralmente serem pequenas moléculas orgânicas voláteis halogenadas e apolares, ainda não foram identificados grupos químicos específicos que conferem a analgesia. Esses

compostos apresentam, portanto, uma grande diversidade de características físico-químicas, sendo classificados primariamente pelos seus efeitos clínicos. A melhor compreensão dos mecanismos moleculares de ação dos anestésicos é de grande relevância, pois permitiria a criação de moléculas mais eficientes e com menos efeitos colaterais.

Atualmente, há duas hipóteses para o mecanismo molecular de ação dos anestésicos. Uma delas afirma que, por conta do seu caráter lipofílico, esses compostos se inserem nas membranas plasmáticas e alteram o seu volume, o que influenciaria de alguma forma a cinética das proteínas inseridas nela.⁶⁹⁻⁷³ No entanto, esta hipótese não é capaz de explicar o dito efeito *cut off*: há um limite máximo para o tamanho da cadeia alifática dos anestésicos, a partir do qual não é mais observado a ação analgésica.^{74,75} Além disso, estudos com proteínas solúveis, ou na ausência de membrana, mostraram modulações na cinética de proteínas dependentes das concentrações de anestésicos.^{76,77} Estudos posteriores envolvendo compostos quirais, como o isoflurano, mostram uma dependência do efeito anestésico com o enantiômero utilizado, sendo que o coeficiente de partição desses compostos para a membrana é independente de quiralidade. A dependência do enantiômero é uma característica típica de interações diretas com proteínas.⁷⁸ Além disso, as concentrações necessárias de anestésicos para que ocorram essas modificações nas propriedades das membranas é consideravelmente superior às doses clinicamente relevantes desses compostos.⁷⁹ Por fim, demonstrou-se que essas perturbações nas membranas também podiam ser obtidas a partir de variações de apenas 1° C sem que houvesse analgesia.⁸⁰ Recentemente, Cantor⁸¹ propôs um modelo mecanístico e termodinâmico para explicar a modulação de canais iônicos, inclusive nas situações supracitadas, a partir de variações microscópicas na pressão lateral das membranas.

Nesse contexto, a hipótese de que a ação dos anestésicos resulta de interações diretas com cavidades específicas nas proteínas de membrana vem ganhando força. Vale ressaltar que esta hipótese depende da partição das moléculas anestésicas para a membrana: quanto mais lipofílicas elas forem, maiores serão as chances de estarem interagindo com as proteínas pela interface proteína-membrana. Os canais iônicos de humanos TREK e TASK⁸²⁻⁸⁴, o canal procarioto NaChBac⁸⁵ e o canal de drosófila K-Shaw2⁸⁶ foram descritos como sensíveis a doses clinicamente relevantes de anestésicos gerais. Já nas famílias Kv e Nav, observou-se que diferentes tipos de anestésicos podem inibir ou potencializar a condução dos canais.⁸⁷⁻⁸⁹ Além disso, outros estudos mostraram que o mecanismo de ação dos anestésicos não envolve o bloqueio do caminho de permeação. Tais alterações na condução iônica seriam suficientes

para impedir a propagação de impulsos nervosos, culminando na analgesia. Dessa forma, fica evidente que o mecanismo modulatório de canais iônicos por anestésicos é diverso, envolvendo tanto ativação quanto inibição de vários integrantes dessas famílias de proteínas.

1.4.1 SEVOFLURANO

O sevoflurano (figura 3) é um anestésico geral de inalação amplamente utilizado em procedimentos cirúrgicos em crianças, dado seu cheiro adocicado e baixa irritação das mucosas. Ele é uma molécula orgânica halogenada não inflamável e que é utilizado desde meados da década de 1970. A sua ação é rápida e potente.^{90,91}

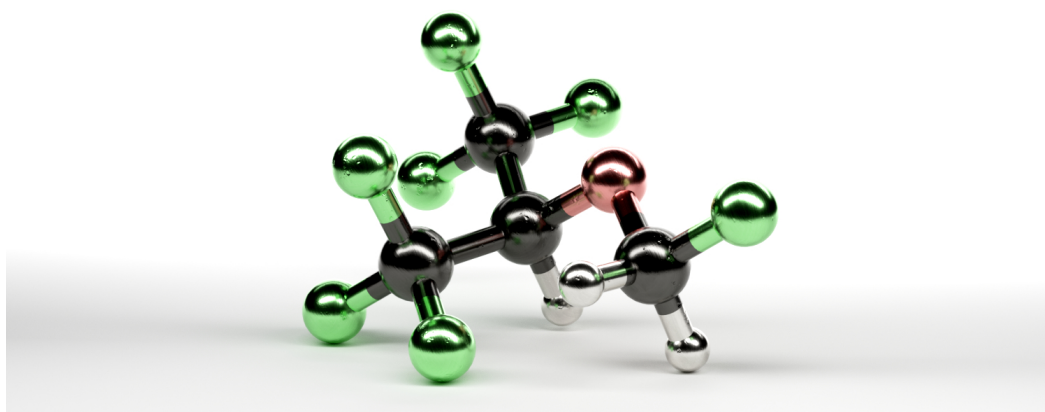


Figura 3. Estrutura molecular do sevoflurano. Átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio e flúor estão representados em preto, vermelho, branco e verde respectivamente.

1.4.2 ISOFLURANO

O Isoflurano (figura 4) é um anestésico geral inalatório de uso comum e que possui um excelente registro de segurança, apesar de ter sido associado a casos raros de lesão hepática aguda grave que se assemelham a lesões hepáticas induzidas por halotano. Dada a sua ação lenta e odor desagradável, ele é comumente utilizado na manutenção da anestesia, a qual é iniciada com a ajuda de outros compostos. O isoflurano é usado desde o fim da década de 1970.⁹²

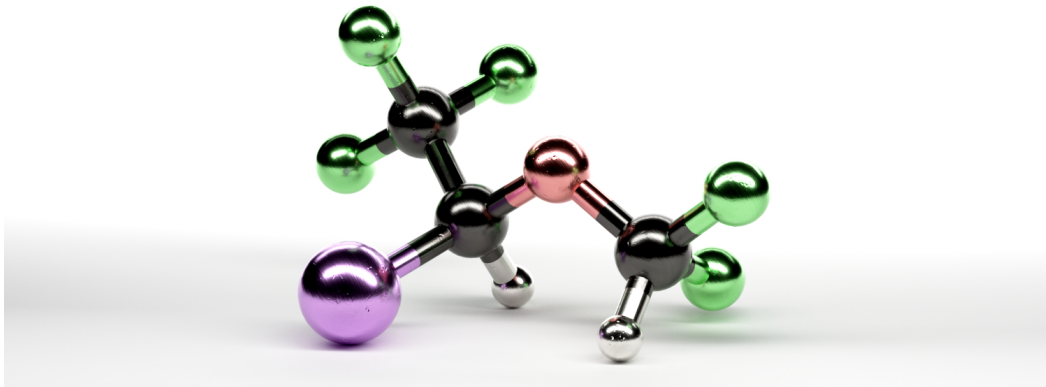


Figura 4. Estrutura molecular do isoflurano. Átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio, flúor e cloro estão representados em preto, vermelho, branco, verde e violeta respectivamente.

1.4.3 HALOTANO

O halotano (figura 5) é um anestésico geral de inalação e ação rápida utilizado tanto para a indução quanto para a manutenção da anestesia geral. Ele é conhecido por reduzir a pressão sanguínea e a frequência cardíaca, além de induzir relaxamento muscular. O halotano é uma molécula orgânica halogenada e não inflamável. O seu uso vem declinando com o tempo por conta do potencial de causar hepatotoxicidade e pela disponibilidade de outros anestésicos mais seguros.⁹²⁻⁹⁴



Figura 5. Estrutura molecular do halotano. Átomos de carbono, hidrogênio, flúor, cloro e bromo estão representados em preto, branco, verde, violeta e marrom respectivamente.

1.4.4 PROPOFOL

O propofol (figura 6) é um anestésico intravenoso sedativo-hipnótico de ação e recuperação muito rápidas. A injeção de doses terapêuticas de propofol causam hipnose

geralmente no intervalo de 40 segundos (tempo da circulação do braço até o cérebro). A sua ação rápida faz com que ele seja amplamente utilizado em pequenos procedimentos cirúrgicos e ambulatoriais, além da manutenção de coma induzido em unidade de terapia intensiva. O seu uso contínuo pode causar a síndrome do propofol, caracterizada por bradiarritmias, acidose metabólica, rabdomiólise, hiperlipidemia e fígado aumentado.^{95,96}



Figura 6. Estrutura molecular do propofol. Átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio estão representados em preto, vermelho e branco respectivamente.

1.5 MODULAÇÃO DOS CANAIS K-SHAW2 E Kv1.2 POR MOLÉCULAS ANESTÉSICAS

Dentre as várias medidas de eletrofisiologia, o perfil de condutância em função da voltagem ($G \times V$) desempenha um importante papel com respeito à caracterização da cinética dos canais iônicos dependentes de voltagem (figura 7 B). Por condutância entende-se a corrente, ou fluxo, de íons que atravessam o canal a uma voltagem fixa. A condutância depende essencialmente de três parâmetros:

$$G(V) = N P_0(V) \gamma \quad [1.3]$$

onde N é o número de canais expressos na membrana, $P_0(V)$ é a probabilidade do canal estar aberto em uma dada voltagem, e γ é a condutância unitária do canal. Os valores de N e γ são constantes ao longo dos experimentos. Ao aplicar voltagens muito baixas, todos os canais estão fechados e, portanto, não há eventos de condução (figura 7 B). Ao aumentar gradativamente a voltagem transmembrânica, observa-se um aumento na condutância como

resultado do aumento da probabilidade de abertura dos canais. A partir de determinado limiar de voltagem, todos os canais encontram-se abertos e, portanto, a condutância atinge o seu valor máximo (G_{max}). A voltagem na qual a condutância é metade do valor máximo é conhecido como $V_{1/2}$ e corresponde ao momento em que metade dos canais estão abertos e metade fechados. As medidas $V_{1/2}$ e G_{max} são os principais parâmetros utilizados para se comparar canais iônicos por representarem, respectivamente, a sensibilidade do canal a voltagem e o seu fluxo iônico típico.

O canal de potássio dependente de voltagem de drosófila K-Shaw2 é inibido de forma rápida e reversível por concentrações clínicas dos anestésicos halogenados halotano e isoflurano, além de álcoois de cadeias curta e média.^{86,97-100} Foi demonstrado que essas moléculas interagem com sítios discretos no K-Shaw2, estabilizando o estado fechado do canal, e que a hélice S4-S5 é suficiente e necessária para conferir a sua sensibilidade a anestésicos.^{86,98,101,102} Apesar de o anestésico sevoflurano também ser halogenado e similar ao isoflurano, este atua ativando e potencializando o K-Shaw2. Por ativação entende-se uma maior sensibilidade do canal a baixas voltagens, ou seja, há uma maior probabilidade dos canais encontrarem-se abertos nessas voltagens. A inibição é o oposto: são necessárias voltagens maiores para que o canal se abra. Esses efeitos são visíveis como translações da curva de condutância por voltagem do canal. A ativação corresponde a translações negativas, para a esquerda do gráfico, enquanto a inibição é caracterizada por movimentos em direção a direita do gráfico (figura 7 B). Já a potencialização é um evento independente de voltagem caracterizado por um fluxo aumentado de íons em um dado potencial de membrana (figura 7 A). Já o sevoflurano atua favorecendo o estado ativo do canal e impedindo a sua transição para um estado inativo (aberto porém não condutor) que impediria a condução iônica mesmo na conformação aberta.¹⁰³

Em estudo realizado por Qiansheng Liang *et al.*¹⁰⁴, foram avaliados os efeitos na cinética dos canais Kv1.2 e K-Shaw2 quando na presença dos anestésicos sevoflurano, isoflurano, halotano, propofol e clorofórmio e n-butanol. Cada uma dessas moléculas apresentou efeitos diversos no canal Kv1.2. O canal foi potencializado (aumento do G_{max}) em 13% pelo sevoflurano e isoflurano, enquanto foi fracamente inibido pelos outros compostos, com exceção do n-butanol (figura 7 A). A potencialização por isoflurano ocorreu em concentrações próximas a 0,1 mM. Já para o sevoflurano, foi necessária uma concentração de 1 mM para se alcançar a condutância máxima. No caso do sevoflurano, notou-se também uma

translação da curva condutância por voltagem do canal Kv1.2 para a esquerda (diminuição de $V_{1/2}$), indicando uma maior susceptibilidade deste canal a encontrar-se no estado aberto em baixas voltagens (figura 7 B). O sevoflurano foi, portanto, capaz de ativar e potencializar o canal Kv1.2.

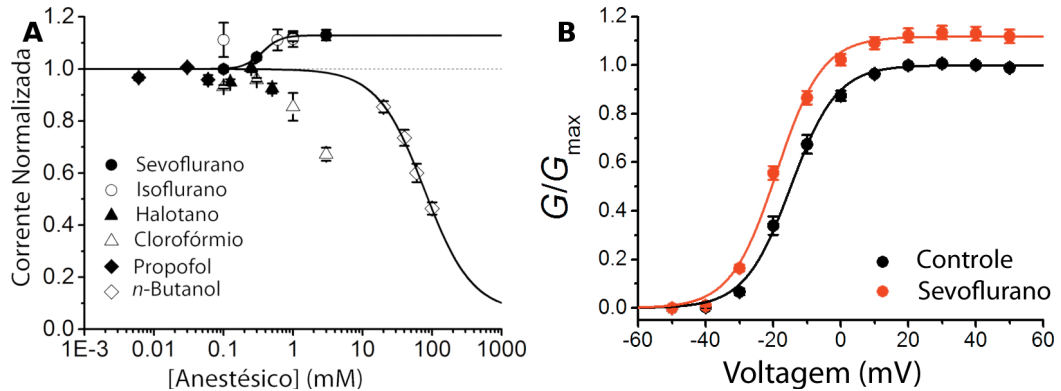


Figura 7. Curvas de resposta do Kv1.2 a anestésicos. (A) Curva dose-resposta da corrente iônica para diferentes anestésicos, indicando que apenas o isoflurano e o sevoflurano potencializam o canal. As linhas contínuas representam a equação de Hill ajustada para a resposta do sevoflurano e do n-butanol. Não foi possível realizar ajustes nos demais dados. (B) Curva de condutância normalizada por voltagem do canal Kv1.2, na presença (vermelho) e ausência (preto) de 1mM de sevoflurano. As curvas foram normalizadas pelo valor da condutância máxima, medida antes da exposição ao anestésicos. Adaptado de Qiansheng Liang et al¹⁰⁴.

A fim de investigar o papel da hélice S4-S5 na modulação do Kv1.2, realizaram-se mutações visando tornar essa hélice semelhante à região homóloga do canal K-Shaw2. Cinco dos seis aminoácidos divergentes na sequência do Kv1.2 foram substituídos pelos respectivos aminoácidos da hélice S4-S5 do K-Shaw2. A substituição remanescente não foi realizada por se tratar de uma mutação letal. Este canal mutante foi chamado Kv1.2-FRAKT. Diferentemente do canal selvagem, o Kv1.2-FRAKT passou a ser potencializado também pelo halotano, pelo clorofórmio e pelo propofol. O n-butanol continuou exibindo um efeito inibidor (figura 8). As respostas dependentes de concentração dessas moléculas tornaram-se parecidas com as observadas pela potencialização do K-Shaw2 por sevoflurano.¹⁰³ O comportamento observado foi condizente com a presença de duas classes de sítios de interação: um com alta afinidade e sem cooperatividade, e outro com baixa afinidade mas com uma alta cooperatividade. Posteriormente, investigou-se o papel de cada uma das cinco mutações individualmente. A substituição G329T foi única e suficiente para produzir os efeitos observados no Kv1.2-FRAKT, sugerindo que este resíduo de aminoácido é determinante da potencialização do Kv1.2 por anestésicos. Curiosamente, a substituição reversa (T330G) no KShaw-2 remove a resposta dependente de voltagem (translação da curva de condutância por voltagem), mas mantém a potencialização do canal na presença do

sevoflurano. Assim, especulou-se que há dois componentes na modulação positiva por sevoflurano: um dependente de voltagem, envolvendo a hélice S4-S5, que controla a abertura/fechamento do canal; e outro independente de voltagem, que atua impedindo, quando aberto, que o canal transite para o estado inativo, acarretando num aumento da sua condutância máxima.

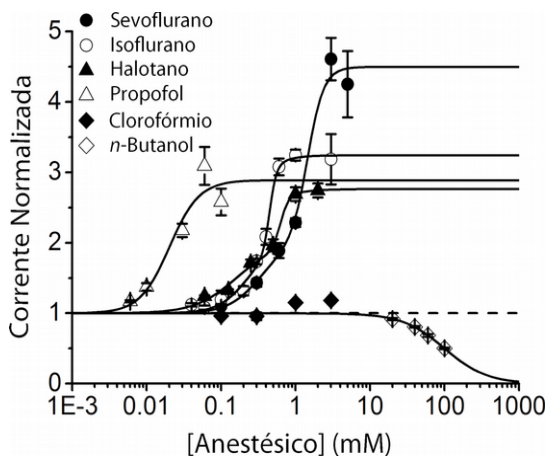


Figura 8. Curva dose-resposta da corrente iônica para a ação de vários anestésicos no canal mutante Kv1.2 FRAKT. As linhas contínuas representam os ajustes para a equação de Hill (propofol e n-butanol) e para a equação de Hill dupla (sevoflurano, isoflurano e halotano). Não foi possível realizar o ajuste para o clorofórmio. Adaptado de Qiansheng Liang et al¹⁰⁴.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O presente estudo buscou caracterizar a interação de anestésicos gerais com o canal iônico dependente de voltagem Kv1.2 e avaliar os efeitos dessa interação na sua dinâmica em nível atômico (mecânica clássica).

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Realizar simulações de dinâmica molecular de diferentes construções e conformações do Kv1.2;
- ii. Identificar e caracterizar as regiões de interação de anestésicos gerais nas várias construções do Kv1.2;
- iii. Quantificar efeitos na dinâmica do Kv1.2 causados pela interação direta com anestésicos gerais;
- iv. Quantificar os efeitos indiretos na dinâmica do Kv1.2 causados pela interação com

anestésicos gerais;

- v. Propor mecanismos de modulação do Kv1.2 e suas variantes por anestésicos gerais.

CAPÍTULO 2 - DOCKING E ENERGIA LIVRE

2.1 INTRODUÇÃO

A investigação dos mecanismos de modulação do canal Kv1.2 por anestésicos gerais passa obrigatoriamente pela descrição dos modos de interação entre essas moléculas. Faz-se necessário responder, por exemplo, quais são as regiões às quais os anestésicos se ligam nas proteínas? Qual é a afinidade de cada interação? Qual é o impacto dessa ligação no funcionamento do canal? O que ocorre com essas interações ao realizar mutações no canal? Dentre outras. Visando responder a algumas dessas perguntas, procedemos com uma série de cálculos de *docking* molecular e de energia livre dos resultados obtidos com o *docking*. Foram estudadas as conformações aberta e fechada do canal Kv1.2 com o domínio citoplasmático (Kv1.2-T1-O e Kv1.2-T1-C), sem esse domínio (Kv1.2-O e Kv1.2-C) e também as variantes mutantes (G329T) dessas quatro estruturas (Kv1.2*-T1-O, Kv1.2*-T1-C, Kv1.2*-O e

Kv1.2*-C). Essas estruturas estão representadas na figura 9.

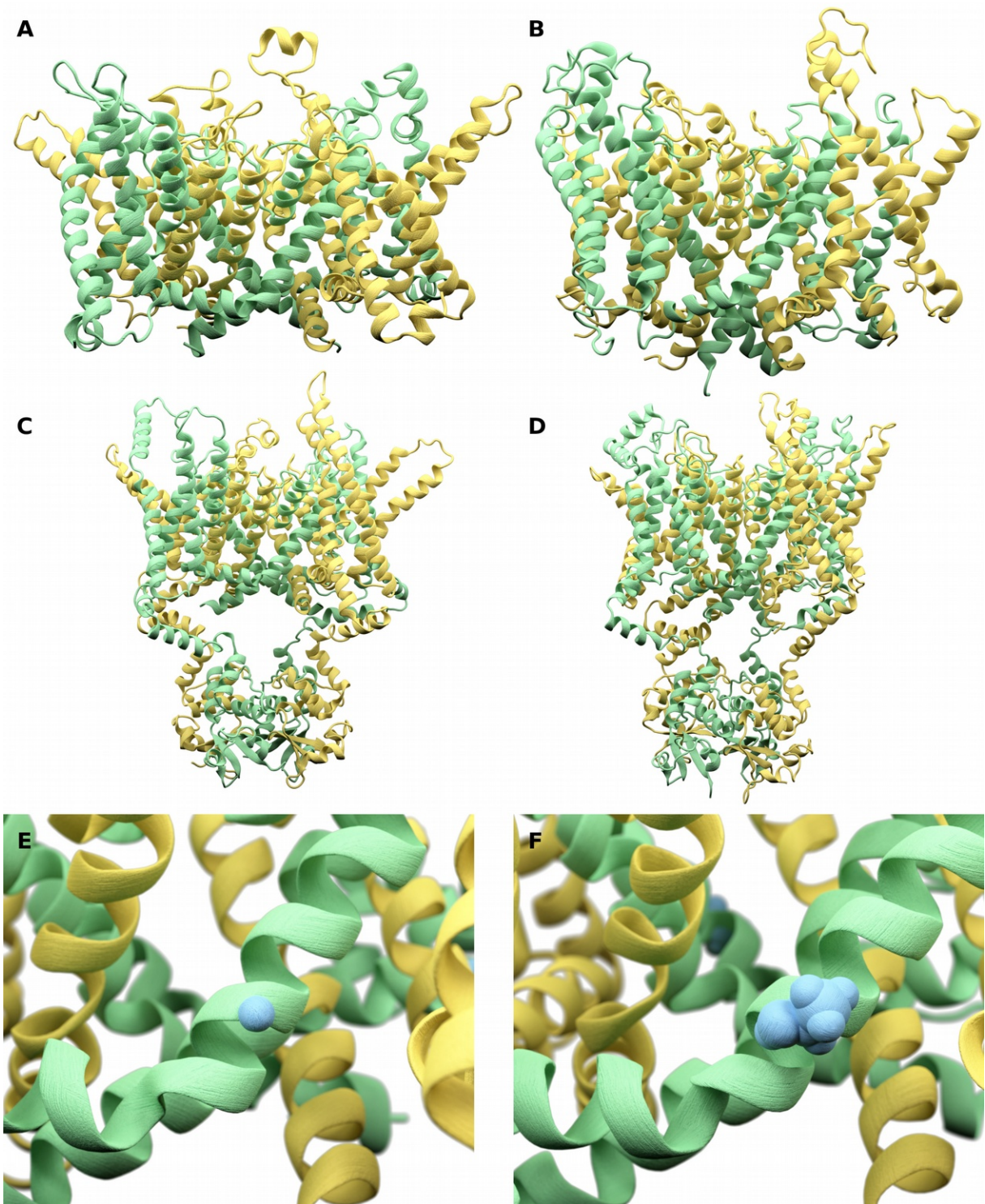


Figura 9. Estruturas utilizadas nas análises de docking molecular. Kv1.2 aberto (A) e fechado (B) sem o domínio citoplasmático. Kv1.2 com domínio T1 nas conformações aberta (C) e fechada (D). Detalhe da glicina na posição 329 (E) e da sua substituição por uma treonina (F). Esta mutação foi suficiente para alterar a modulação do Kv1.2 por anestésicos gerais.

A técnica de *docking* molecular foi escolhida devido ao seu baixo custo computacional

e rapidez na obtenção de resultados. Entretanto, como mostrado nesse capítulo, os valores de energia livre fornecidos pelo *docking* molecular tem uma baixa acurácia, e essa técnica apresenta muitos falsos positivos. Procedeu-se, então, com cálculos de energia livre dos resultados encontrados utilizando as técnicas de FEP e LIE. Por fim pode-se propor uma hipótese sobre o mecanismo de ação do anestésico sevoflurano na potencialização do Kv1.2.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

As estruturas equilibradas em membrana das conformações aberta e fechada do Kv1.2(Kv1.2-T1-O e Kv1.2-T1-C), ambas contendo o domínio citoplasmático, foram obtidas dos trabalhos de Delemotte *et al*³⁰ e Treptow and Tarek³⁶. Utilizou-se o programa psfgen (distribuído junto ao NAMD¹⁰⁵) para inserir a mutação G329T em ambas as conformações, gerando os sistemas Kv1.2*-T1-O e Kv1.2*-T1-C. Por fim removeu-se o domínio citoplasmático de todos esses sistemas com o auxílio do programa VMD¹⁰⁶, gerando os sistemas Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O, Kv1.2*-C. Cada estrutura foi inserida em uma membrana de fosfatidilcolina hidratada com moléculas de água explícitas. Adicionou-se íons KCl para neutralizar a carga total do sistema e alcançar uma concentração fisiológica de 150 mM. O número total de átomos foi de 300 mil e 200 mil para os sistemas completos e apenas com a porção transmembrânica respectivamente.

Prosseguiu-se com um protocolo de *annealing*, pelo qual forças harmônicas foram utilizadas para restringir o movimento da cadeia principal das proteínas. A intensidade dessas forças foi reduzida gradativamente ao longo de 4 ns. A partir deste ponto a simulação foi realizada sem restrições. O *annealing* é importante para evitar a desestruturação das proteínas causada por forças fora do equilíbrio, muito comuns nos momentos iniciais de uma simulação de dinâmica molecular.

Os sistemas foram, então, simulados por aproximadamente 14 ns no *ensemble* NPT com o auxílio do programa NAMD¹⁰⁵ 2.10 em conjunto com o campo de força CHARMM36^{107,108}. Utilizou-se solvente explícito com as moléculas de água descritas pelo modelo TIP3P¹⁰⁹. O termostato e barostato baseados na dinâmica de Langevin foram empregados para manter a pressão e a temperatura constantes em 1 atm e 300 K. O passo de integração foi de 2 fs e as

interações de curto e longo alcance foram calculadas a cada 1 e 2 passos, respectivamente, a partir do método PME. Devido ao passo de integração ser de 2 fs, foi empregado o algoritmo SHAKE para manter as ligações de hidrogênio rígidas. As simulações foram realizadas com condições periódicas de contorno a fim de evitar efeitos de borda no sistema. No anexo 1, há um exemplo de arquivo de configuração utilizado para esse tipo de simulações.

A construção dos sistemas para o cálculo do LIE iniciou-se com a seleção das soluções de *docking* molecular que melhor descreviam os sítios encontrados para o sevoflurano. Esses anestésicos foram, então, inseridos nos respectivos sítios e removeu-se quaisquer moléculas de água que estivessem ocupando esse mesmo volume. Visando minimizar as perturbações na afinidade de dois sítios próximos, o sevoflurano foi inserido em apenas duas das quatro subunidades, e evitou-se também adicionar moléculas de sevoflurano em sítios muito próximos uns dos outros. Assim, foi necessário construir dois sistemas para cada conformação e variante do Kv1.2. Após minimização da energia desses sistemas, eles foram simulados durante 60 ns para amostrar as energias de interação necessárias aos cálculos de LIE. Ao longo de toda a simulação foram aplicadas forças harmônicas para impedir a saída das moléculas de sevoflurano das cavidades dos sítios (ver seção 2.2.4).

2.2.2 DOCKING

Estruturas dos canais mutante e selvagem do Kv1.2 nas conformações aberta e fechada, com e sem o domínio citoplasmático (T1), foram utilizadas para realizar uma série de cálculos de *docking* molecular. Foram escolhidas aleatoriamente 120 estruturas diferentes dos 6 ns finais de cada uma das oito simulações para levar em consideração a flexibilidade das proteínas. Realizou-se, então, uma série de cálculos de *docking*, nos quais buscou-se as 50 melhores soluções para a interação de cada uma das estruturas das proteínas com os anestésicos sevoflurano, isoflurano, halotano e propofol. No total, foram realizadas 960 cálculos independentes de *docking*, os quais resultaram em 5.760.000 soluções. Utilizou-se uma versão modificada do programa AutoDock Vina¹¹⁰ para que soluções com RMSD menores que 0,5 Å fossem desconsideradas. O valor de *exhaustiveness* foi fixado em 200 e coletou-se as 50 melhores soluções de cada conta. As caixas de busca foram definidas de forma a englobar completamente as proteínas, tomando cuidado para sempre haver um espaço extra suficiente para caber um ligante entre os limites da caixa e da proteína. Manteve-se os átomos de hidrogênio polares tanto nas proteínas quanto no anestésicos. Considerou-se a flexibilidade apenas dos anestésicos.

2.2.3 CLASSIFICAÇÃO EM SÍTIOS E CONSTANTE DE AFINIDADE

As 6000 soluções de *docking* de cada proteína foram agrupadas segundo um critério de máxima vizinhança. As soluções com o maior número de vizinhos em um raio de 5 Å foram separadas, juntamente com os seus vizinhos, em novos grupos. Cada grupo encontrado foi classificado manualmente em sítios distintos de acordo com a região da proteína em que se encontravam.

A constante de afinidade de cada sítio foi calculada como¹¹¹

$$K_i = \frac{1}{8\pi^2} \int d\omega e^{-\beta \Delta G_i(\omega)} \quad [2.1]$$

$$\beta = \frac{1}{k_B T} \quad [2.2]$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura (300 K), $\Delta G_i(\omega)$ é a energia livre de ligação da solução ω no sítio i , conforme fornecida pelo AutoDock Vina.

2.2.4 LIE – LINEAR INTERACTION ENERGY

No método *Linear Interaction Energy* (LIE) proposto por Aqvist *et al.*¹¹², a energia livre de ligação entre um ligante e um receptor é dado por

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \alpha \left(\langle V^{\text{vdW}} \rangle_{\text{ligado}} - \langle V^{\text{vdW}} \rangle_{\text{água}} \right) + \beta \left(\langle V^{\text{elet}} \rangle_{\text{ligado}} - \langle V^{\text{elet}} \rangle_{\text{água}} \right) + \gamma \quad [2.3]$$

onde $\langle V^{\text{vdW}} \rangle$ e $\langle V^{\text{elet}} \rangle$ são os valores médios das energias de interação de van der Waals e eletrostática para o complexo ligante-receptor (ligado) e para o ligante em água (água). Os termos de van der Waals e eletrostático são escalonados pelos parâmetros empíricos α e β , enquanto γ está relacionado com a energia livre de solvatação do ligante. Os termos $\langle V^{\text{vdW}} \rangle$ e $\langle V^{\text{elet}} \rangle$ foram amostrados em simulações de 60 ns, nas quais moléculas de sevoflurano estavam ligadas em cada sítio determinado pelo *docking* ou livres em água. O módulo *Pair Interaction* do NAMD foi utilizado para obter, a cada passo de simulação, as energias de van der Waals e eletrostática provenientes apenas da interação do sevoflurano com a proteína ou com a água, dispensando cálculos extras contendo apenas a proteína ou o meio aquoso.

Diversos estudos mostraram que ao usar os valores $\alpha=0.18$ e $\beta=0.18$ é possível obter energias livres de ligação em concordância com dados experimentais para diferentes complexos ligante-receptor.^{89,113,114} Já o parâmetro γ foi fixado em -6,90 kcal/mol de forma a reproduzir os valores de energia livre de ligação do isoflurano no NaChBac.¹¹⁵ A escolha dos

parâmetros α , β e γ é menos crucial quando LIE é utilizado para comparar as afinidades de diferentes sítios de ligação, como é o caso desse estudo.

Visando melhorar a amostragem das configurações ligadas dos anestésicos, forças harmônicas ($h(\mathbf{r})=k/2(\mathbf{r}-\mathbf{r}_0)$) com $k=10\text{kcal/mol}\text{\AA}^2$ foram aplicadas sempre que o centro de massa dos anestésicos se encontrava a uma distância maior que 4 Å do centro da cavidade do sítio. Assim, os termos das energias potenciais foram corrigidos segundo a relação

$$\langle V \rangle = \frac{\left\langle \frac{V}{e^{-\beta h(\mathbf{r})}} \right\rangle}{\left\langle \frac{1}{e^{-\beta h(\mathbf{r})}} \right\rangle} \quad [2.4]$$

onde $\beta=(k_B T)^{-1}$, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura de simulação.

A constante de ligação também foi corrigida para levar em consideração as perdas entrópicas de se manter os ligantes presos na cavidade dos sítios:

$$K \approx \frac{\Delta v \Delta w}{8 \pi^2} e^{-\beta \Delta G_{\text{ligação}}} \quad [2.5]$$

onde Δv e Δw correspondem às perdas de liberdade de translação e rotação respectivamente. Os termos Δv e Δw foram estimados a partir das flutuações dos ângulos de Euler e da distância das moléculas de sevoflurano à cavidade do sítio.

2.2.5 FREE ENERGY PERTURBATION (FEP)

O FEP é um método proposto por Robert Zwanzig para o cálculo de diferenças de energia livre entre dois estados.¹¹⁶ Partindo-se de um estado inicial A , são aplicadas perturbações infinitesimais de forma a gerar um estado B . Se as perturbações forem suficientemente pequenas, Zwanzig propôs que a diferença de energia livre (ΔF) entre estes dois estados é dada por:

$$\Delta F(A \rightarrow B) = F_B - F_A = -k_B T \ln \langle e^{-\beta(H_B - H_A)} \rangle \quad [2.6]$$

$$\beta = \frac{1}{k_B T} \quad [2.7]$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura do sistema, H_A e H_B são os hamiltonianos dos sistemas A e B respectivamente. Assim, é possível calcular a energia

livre entre dois estados distantes se forem criados, a partir de pequenas perturbações, estados intermediários entre eles como

$$\Delta F(A \rightarrow B) = -k_B T \sum_{i=0}^N \ln \left\langle e^{-\beta(H(\lambda_{i+1}) - H(\lambda_i))} \right\rangle \quad [2.8]$$

sendo λ uma variável que descreva o caminho de reação escolhido e N o número de estados intermediários ao longo da transformação.

No caso dos anestésicos, a coordenada de reação escolhida foi remoção/reinserção gradual dos potenciais não ligados dos anestésicos com o meio ao qual ele estava inserido. As interações foram sucessivamente reduzidas em passos de 1,25% até estarem completamente desligadas. Em seguida procedeu-se com o religamento gradual das interações também em passos de 1,25%. Entre cada passo de transformação, o sistema foi simulado por 4 ps para que as forças voltassem aos valores de equilíbrio e então simulou-se mais 65 ps para amostrar a energia média do novo estado. O cálculo é realizado com uma molécula por vez. É construído um novo sistema para cada sítio a ser avaliado. A solução de *docking* mais representativa desse sítio é inserida na cavidade e remove-se quaisquer lipídeos ou moléculas de água que estejam ocupando essa região. Procede-se, então, com o cálculo do FEP, desligando-se as interações dessa molécula com todo o meio e religando-as em seguida. Uma força harmônica foi aplicada para restaurar a posição do anestésico sempre que ele saísse da cavidade. Ao fim do processo, obteve-se a energia livre de retirar o anestésico da fase gasosa e inseri-lo na proteína ($\Delta G_{\text{gás} \rightarrow \text{proteína}}$). O cálculo foi repetido para um sistema contendo somente o anestésico embebido em água para calcular a sua energia livre de solvatação $\Delta G_{\text{solvatação}}$. Por fim, a energia livre de ligação é dada por

$$\Delta G_{\text{ligação}} = -\Delta G_{\text{gás} \rightarrow \text{proteína}} - (\Delta G_{\text{solvatação}} + \Delta G_{\text{restrição}}) \quad [2.9]$$

$$\Delta G_{\text{restrição}} = \beta^{-1} \ln \left(\frac{V}{V^*} \right) \quad [2.10]$$

onde V e V^* são os volumes acessíveis ao anestésico dada a força harmônica aplicada ao longo da simulação e em uma solução padrão a 1 M.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 RMSD

Espera-se uma boa estabilidade estrutural de ambas as conformações do Kv1.2-T1, visto que elas foram sujeitas a longas simulações de dinâmica molecular.^{30,36} Todas as outras estruturas foram perturbadas de alguma maneira, seja pela remoção completa do domínio citoplasmático, seja pela adição de mutações pontuais. Como pode ser visto na figura 10, o desvio estrutural, medido sob a forma de RMSD (*Root Mean Squared Deviation*), permaneceu abaixo de 2,5 Å, independente da região considerada para o cálculo (cadeia principal, todos os átomos pesados, domínio sensor de voltagem e poro central). Variações de RMSD na faixa de 3 Å são típicas de simulações de proteínas de membrana, sendo causadas pela agitação térmica do sistema.^{30,37,117,118} Além disso, após cerca de 8 ns de simulação, os valores de RMSD se estabilizam. Pode-se, então, concluir que as estruturas simuladas são suficientemente estáveis e podem ser utilizadas para a coleta de dados.

2.3.2 DOCKING NO Kv1.2

Visando caracterizar a interação dos anestésicos sevoflurano, isoflurano, halotano e propofol com o canal Kv1.2, foram realizadas uma série de cálculos de *docking* molecular dessas moléculas em diversas estruturas desse canal obtidas a partir de simulações de dinâmica molecular (ver seção 2.2.2). Visto que, nos cálculos de *docking*, a proteína é considerada rígida, o uso de diferentes estruturas delas permite adicionar a influência da flexibilidade conformacional das proteínas na ligação com os anestésicos. Ao todo, foram encontradas 6.000 soluções de *docking* para cada um dos quatro sistemas estudados (Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C) com e sem o domínio citoplasmático (T1).

Para facilitar o tratamento desse grande conjunto de dados, procedeu-se com o agrupamento e classificação das soluções do *docking* em sítios de interação. Um sítio corresponde a uma área ou cavidade delimitada da proteína na qual há uma grande probabilidade de encontrar uma molécula de anestésico. No caso do *docking*, altas probabilidades correspondem a densos e delimitados aglomerados de soluções. As 5.760.000 soluções foram classificadas em 12 sítios distintos (figura 11) espalhados em quatro grandes regiões dos canais: na região da hélice S4-S5 (sítios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), na cavidade central (sítio 8), no domínio sensor de voltagem (sítios 10 e 11) e no filtro de seletividade (sítios 9 e 12). Algumas soluções foram desconsideradas por não fazerem parte de nenhum grupo. Os

sítios mostraram-se heterogêneos e com a uma grande diversidade de constantes de afinidade, as quais variaram de 1 a 100 mM⁻¹.

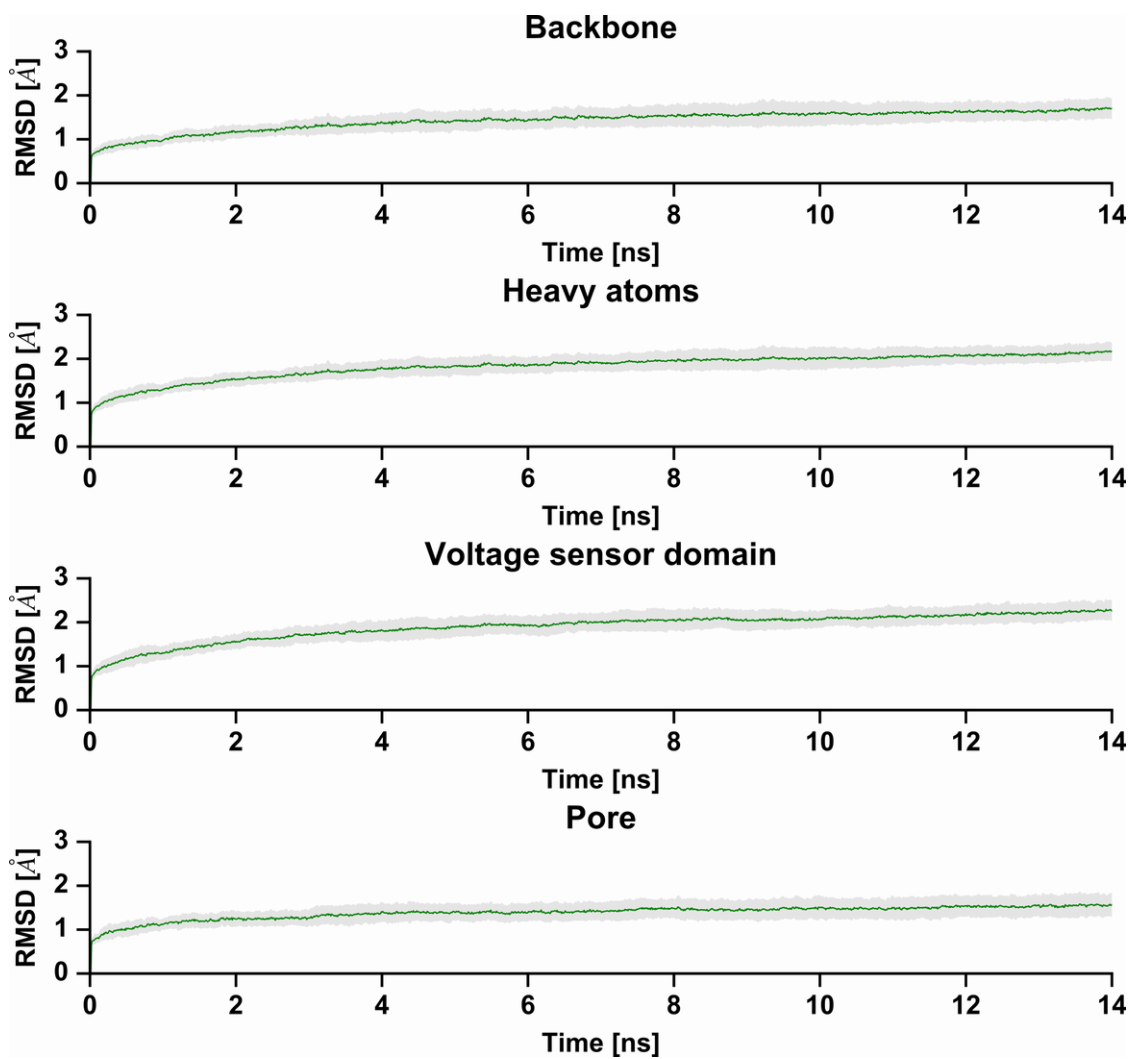


Figura 10. Média (linha verde) e desvio padrão (área cinza) do RMSD dos oito sistemas simulados. As cadeias principais das proteínas, todos os átomos pesados, o domínio sensor de voltagem e o domínio do poro foram considerados separadamente.

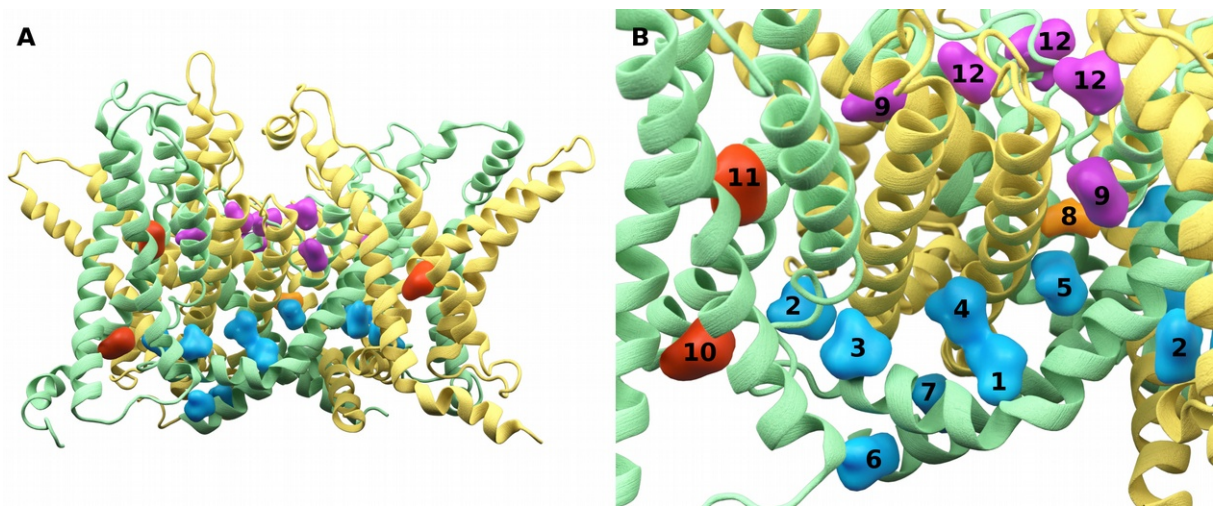


Figura 11. Conjunto de sítios de docking espalhados pelas regiões do domínio sensor de voltagem (vermelho), da hélice S4-S5 (azul), do filtro de seletividade (violeta) e do poro central (laranja). Visão geral da distribuição dos sítios (A) e detalhe da posição deles na estrutura dos canais (B).

A partir das diferenças ($\Delta K_i = K_i^o - K_i^c$) entre as afinidades das conformações aberta (K_i^o) e fechada (K_i^c), foi possível avaliar a dependência conformacional de diferentes construções de cada sítio i (figura 12). Houve pouca distribuição diferencial nos sítios 1, 2, 6, 7 e 12. Dentre os sistemas contendo apenas o domínio transmembrânico, os sítios da hélice S4-S5 (3, 4 e 5) e do filtro de seletividade (9) apresentaram variações entre as conformações tanto no canal selvagem quanto no mutante. Ao incluir as construções contendo o domínio T1, observou-se um padrão parecido, com exceção do sítio 6, o qual teve uma afinidade aumentada no estado aberto do Kv1.2*-T1. As constantes de afinidade dos sítios 3, 4 e 5 foram, de forma geral, maiores para as conformações fechadas, enquanto o sítio 9 mostrou uma preferência pelas conformações abertas. Assumindo que uma maior afinidade por um dado estado conformacional é um indicativo de que o anestésico estabiliza este estado, pode-se concluir que os sítios 3, 4 e 5 são promissores para explicar a estabilização do estado fechado, o que está em concordância com medidas realizadas no canal K-Shaw2. Além disso, o sítio 9 aparenta estar relacionado com a manutenção do canal no estado aberto.

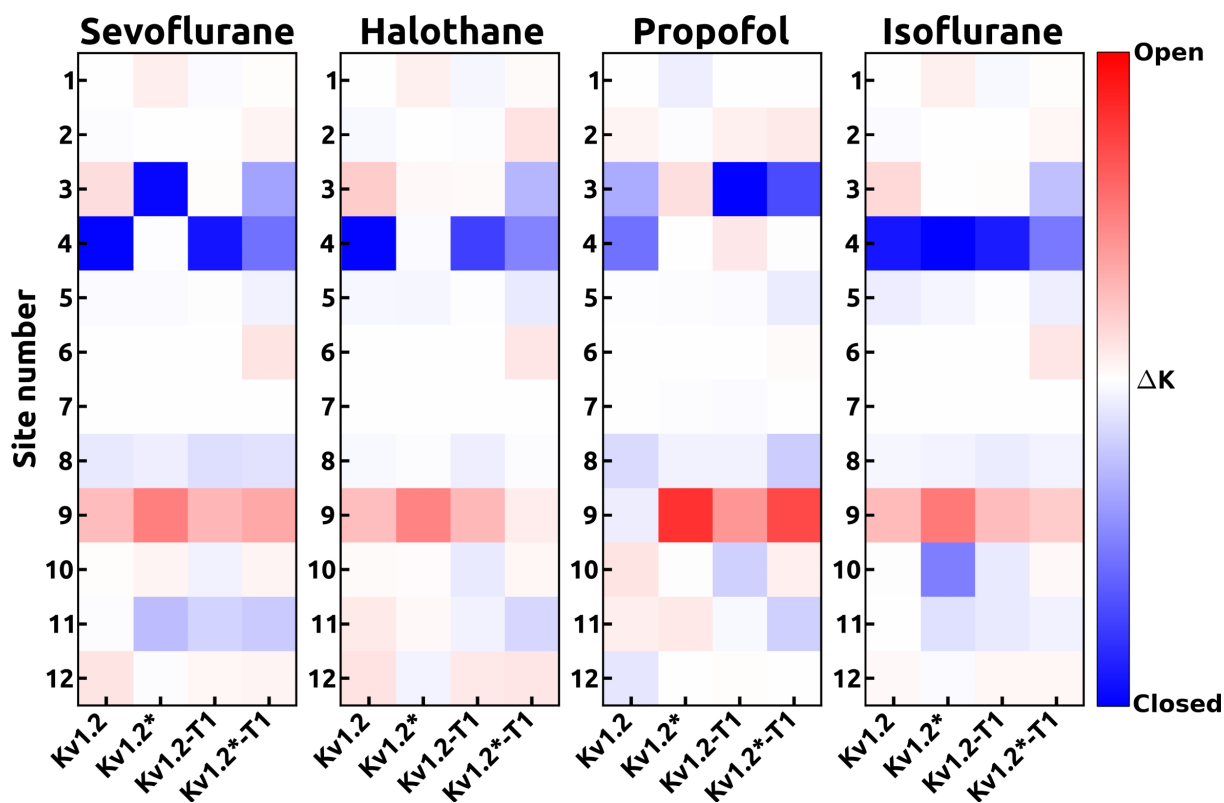


Figura 12. Análise de subtração das constantes de ligação ($\Delta K_i = K_i^o - K_i^c$) baseadas nas energias do AutoDock Vina. Afinidades que prevalecem nas conformações fechadas tendem para o azul, enquanto maiores afinidades para a conformação aberta tendem para o vermelho.

Apesar de haver diferenças nas constantes de afinidade dos sítios 10 e 11, estes foram inicialmente desconsiderados visto que não há indícios experimentais que apontem para a interação com o domínio sensor de voltagem interfira na modulação do Kv1.2 por anestésicos.

2.3.3 VALIDAÇÃO COM O CANAL NaChBAC E CÁLCULOS DE FEP

A metodologia de *docking* utilizada foi validada comparando-se os sítios encontrados para isoflurano no canal NaChBac com os dados obtidos de simulações de *flooding* conduzidas por Carnevale *et al.*¹¹⁵ Observou-se considerável presença de moléculas de isoflurano nas regiões do filtro de seletividade, da hélice S4-S5, da cavidade central e nas janelas desse canal (figura 13 A). Foram também calculadas a energia livre absoluta de ligação do isoflurano com o sítio no filtro de seletividade e na hélice S4-S5 (tabela 1) utilizando a técnica de FEP (*Free Energy Perturbation*). Utilizando o mesmo protocolo descrito nas seções 2.2.2 e 2.2.3, foi realizado o *docking* de isoflurano contra um conjunto de estruturas obtidas a partir das simulações de *flooding* do NaChBac. Após o agrupamento e classificação das soluções de *docking*, encontramos sítios em diversas regiões do canal, incluindo as descritas por Carnevale *et al.* (figura 13 B). Entretanto, houve discrepâncias entre

as energias livre de ligação dadas pelo Autodock Vina e as calculadas via FEP (tabela 1). Apesar dos valores próximos para o sítio do filtro de seletividade, o erro na região da hélice S4-S5 foi grande. Esses erros podem ser explicados pela função de pontuação do AutoDock Vina. Os termos dessa função foram ajustados para reproduzir as energias livres de ligação das estruturas cristalográficas de proteínas com seus ligantes provenientes do PDDBind.¹¹⁹ Visto que esse banco de dados contém predominantemente proteínas solúveis em água, a função de pontuação torna-se eficiente para descrever a interação de ligantes em cavidades expostas para a água ou mesmo circunscritas por cadeias proteicas, como é o caso do sítio extracelular. Já a região da hélice S4-S5 está na interface proteína-membrana. Além da presença de lipídeos nas proximidades dessa cavidade ser completamente ignorada durante os cálculos de *docking*, a função de pontuação utilizada não foi otimizada para este ambiente, fatos esses que geram erros nas estimativas de energia livre. Assim, fica evidente que a metodologia de *docking* aqui apresentada é útil para encontrar potenciais sítios de interação com proteínas (com falsos positivos), mas falha ao calcular a afinidade efetiva dessa interação.

Tabela 1. Estimativas de energia livre de ligação via FEP e via Autodock Vina. As unidades estão em kcal/mol.

Sítios	FEP	Autodock Vina
Extracelular	-4.2 ± 0.8	-3,9
S4-S5	-3.7 ± 0.4	-1,7

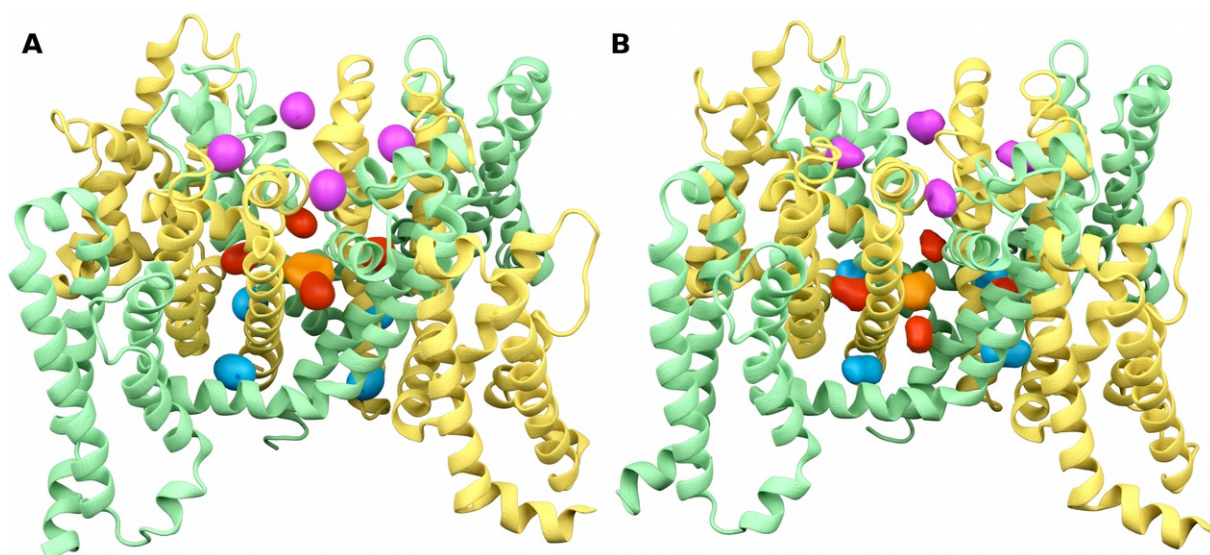


Figura 13. Regiões com alta presença de moléculas de isoflurano nas simulações de flooding¹¹⁵ (A) e nos cálculos de docking (B). Em ambos os casos encontraram-se sítios na região extracelular (violeta), nas janelas do canal (vermelho), no poro (laranja) e na hélice S4-S5 (azul).

As limitações dos métodos de *docking* molecular dificultam a racionalização de conexões entre os dados obtidos e as medidas experimentais. Visando melhorar este panorama, pode-se empregar cálculos de energia livre em cada um dos sítios encontrados para corrigir a estatística desses dados ou até mesmo realizar simulações de *flooding* para a aquisição de novos dados, os quais já seriam amostrados segundo a probabilidade real de ocorrência das interações entre as moléculas.

Ao aplicar o protocolo canônico do FEP (seção 2.2.5), conseguiu-se uma convergência satisfatória dos dados apenas para os cálculos de sevoflurano e isoflurano no sítio 3 (tabela 2). A necessidade de mover as cadeias lipídicas (sítios 1, 4, 5 e 9) ou até mesmo de remover moléculas de água em cavidades profundas (sítio 12) torna difícil retornar às mesmas configurações após transformações completas do FEP, dificultando portanto a convergência desses cálculos. Como a cavidade do sítio 3 tem um pequeno volume, os lipídeos são rapidamente removidos dela durante as simulações de reaparecimento do anestésico. Nos cálculos com isoflurano, houve uma grande diferença nas afinidades desse sítio entre as conformações, sendo a interação com o estado fechado mais favorável que a do estado aberto ($\Delta \Delta G = -3,24 \text{ kcal/mol}$). Mais uma vez fica evidente que, apesar de uma concordância qualitativa em relação à dependência conformacional, há um grande erro nas estimativas de energia livre do *docking*. Há, portanto, a necessidade de reavaliar os resultados de *docking* sob a perspectiva de cálculos de energia livre mais precisos.

Tabela 2. Estimativas de energia livre via FEP. As unidades estão em kcal/mol.

Molécula / conformação	$\Delta G_{\text{gás} \rightarrow \text{proteína}}$	$\Delta G_{\text{restrição}}$	$\Delta G_{\text{solvatação}}$	$\Delta G_{\text{ligação}}$
Isoflurano - aberto	7,40	-1,31	-0,05	-6,04
Isoflurano - fechado	4,76	-1,91	-0,05	-2,80
Sevoflurano - aberto	8,20	-1,91	-0,07	-6,22

2.3.4 CÁLCULOS DE ENERGIA LIVRE VIA LIE

Estimativas de energia livre da interação entre o sevoflurano e as variantes do Kv1.2 sem o domínio citoplasmático foram realizadas através do método LIE (seção 2.2.4). O valor do parâmetro γ foi ajustado de forma a reproduzir as estimativas via FEP da ligação do isoflurano com o NaChBac. O protocolo do LIE foi, então, aplicado para calcular as afinidades do isoflurano com sítios extracelular e S4-S5. Após as correções entrópicas e

usando $\gamma = -6,90 \text{ kcal/mol}$, os valores de energia livre encontrados para os sítios extracelular e S4-S5 foram respectivamente $-3,63 \text{ kcal/mol}$ e $-4,59 \text{ kcal/mol}$. Desta forma, foi possível reproduzir de forma satisfatória as energias livres de ligação obtidas por Raju *et al.*¹¹⁵

No Kv1.2, os cálculos de LIE foram realizados em um subconjunto dos sítios encontrados via *docking* molecular. Mais especificamente, selecionou-se os sítios 3 e 9 por conta da dependência conformacional evidenciada pelas suas constantes de ligação. Já os sítios 5 e 12 foram escolhidos em função da região da proteína na qual eles se encontram. O sítio 5 é promissor por estar ao lado da mutação G329T, enquanto a presença do sítio 12 nas imediações do filtro de seletividade fazem dele um candidato a explicar os aumentos na condutância máxima causada pelos anestésicos.

Apesar desses sítios estarem presentes em ambas as conformações do Kv1.2 e Kv1.2*, houveram variações nas afinidades calculadas (figura 14). As constantes de afinidade para os sítios 3, 5 e 9 variaram entre $0,01$ e $0,2 \text{ mM}^{-1}$, sendo consideravelmente mais baixas que as afinidades para o sítio 12 ($0,3$ a $0,4 \text{ mM}^{-1}$). Nos sítios 3 e 9, observou-se um aumento nas afinidades da conformação aberta na proteína mutante, enquanto as afinidades para as conformações fechadas mantiveram-se quase constantes. Já as afinidades para o sítio 5 foram cerca de sete vezes maiores na conformação fechada em comparação com a conformação aberta, tanto no Kv1.2 selvagem quanto no mutante. Apesar das altas afinidades, houve uma baixa dependência conformacional para o sítio 12. Visto que a estrutura do filtro de seletividade é minimamente impactada quando o Kv1.2 migra entre as conformações aberta e fechada, eram esperadas constantes de afinidade similares para o sítio 12.

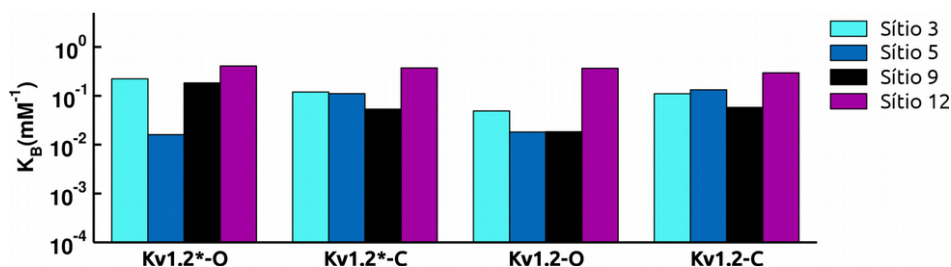


Figura 14. Constantes de afinidade calculadas via LIE para a interação entre as construções do Kv1.2 e o anestésico sevoflurano. As constantes de afinidade foram calculadas para os sítios 3, 5, 9 e 12 nas conformações aberta (O) e fechada (C) do canal selvagem (Kv1.2) e mutante (Kv1.2*).

Estes resultados são consistentes com o cenário no qual a modulação do Kv1.2 por anestésico seria o resultado de múltiplas interações em diferentes sítios. Alguns sítios (3 e 9) podem explicar a maior sensibilidade a voltagem na presença de sevoflurano causada pela mutação G329T, enquanto outros sítios (12) podem explicar o aumento na corrente iônica

máxima observada em ambas as proteínas. No entanto, as medidas apresentadas não foram capazes de esclarecer a potencialização do Kv1.2 selvagem pelo sevoflurano. Além disso, efeitos não específicos, como os mediados por membrana, podem também atuar de forma sinérgica neste cenário, tornando-o ainda mais complexo.

CAPÍTULO 3 - SIMULAÇÕES DE FLOODING

3.1 INTRODUÇÃO

Uma caracterização mais completa da modulação dos canais iônicos por anestésicos passa obrigatoriamente pela descrição mais detalhada do modo pelo qual essas moléculas interagem entre si e quais são as consequências dessa interação para a dinâmica das proteínas em questão. O *docking* molecular nos fornece pistas sobre as prováveis regiões de ligação dos anestésicos, mas há muitos falsos positivos e falsos negativos. Tratar esses resultados é uma tarefa complicada, pois o *docking* não fornece informações sobre a probabilidade com que as soluções encontradas de fato acontecem no sistema em estudo. Por exemplo, apesar do sítio atrás do filtro de seletividade ser um bom candidato para explicar o aumento da condutância máxima dos canais, outros estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que esta cavidade é altamente inacessível a anestésicos, e a energia livre de ligação de sevoflurano nela é baixa. Já

as simulações de dinâmica molecular amostram os eventos com a probabilidade correta, além de fornecer uma descrição com alta resolução espacial e temporal. Assim, é possível investigar com mais detalhes as relações de causa e efeito entre a ligação de anestésicos nos canais iônicos e o impacto na dinâmica dessas proteínas ocasionado por essa interação. O grande poder descritivo dessas simulações é, no entanto, inviabilizado pelo seu alto custo computacional, visto que esses eventos levam centenas de nanossegundos para acontecerem.

Com o intuito de obter uma descrição mais fidedigna da modulação do Kv1.2 pelos anestésicos sevoflurano e isoflurano, conduzimos uma série de oito simulações longas (300 ns cada) de todas as conformações e construções do Kv1.2 na presença de isoflurano ou sevoflurano, e de 4 simulações (150 ns) de membranas puras com isoflurano e sevoflurano. Esse tipo de simulação é conhecida como *flooding* e se caracteriza por simular a distribuição de uma dado ligante em todos os meios do sistema, incluindo a própria proteína. Partindo de um sistema contendo moléculas anestésicas espalhadas pela água a uma dada concentração, o sistema é simulado de forma que essas moléculas migrem espontaneamente para os ambientes mais favoráveis a elas.

Neste capítulo serão apresentados os resultados de análises realizadas nas simulações de *flooding* de sevoflurano e isoflurano com os canais nos estados aberto e fechado (Kv1.2-O e Kv1.2-C) e suas respectivas construções mutantes (Kv1.2*-O e Kv1.2*-C). Também serão apresentados os resultados advindos de simulações de *flooding* do sevoflurano e isoflurano em membranas puras de fosfatidilcolina.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 SIMULAÇÕES DE FLOODING

Para cada conformação e construção do Kv1.2 (Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C), foram construídos dois sistemas, um contendo sevoflurano e outro contendo isoflurano, a partir da última configuração das simulações de equilíbrio desses sistemas (capítulo 2). Foram, então, calculadas a quantidade de moléculas de anestésicos necessárias para se alcançar uma concentração total de aproximadamente 150 mM. As altas concentrações de anestésicos adicionadas foram necessárias para melhor amostrar a interação dessas moléculas com as proteínas. Se usássemos concentrações menores, seríamos obrigados a

realizar simulações mais longas. Nas simulações de flooding conduzidas por Raju *et al.*, a concentração inicial de isoflurano foi de 300 mM.¹¹⁵ As moléculas de anestésicos foram colocadas aleatoriamente no meio aquoso e removeu-se as moléculas de água que estivessem chocando com os anestésicos. Procedeu-se com o protocolo de *annealing* seguido de simulações de 300 ns sem a aplicação de nenhum viés. Os sistemas com membrana pura foram simulados por 150 ns em duas concentrações: a 150 mM (alta) e 10 mM (próxima à clinicamente relevante). Assim foi possível avaliar os efeitos de concentrações de anestésicos na pressão lateral das membranas. Englobando todos os sistemas, foram simulados ao total 3 μ s.

As condições de simulação e os algoritmos utilizados foram os mesmos das simulações de equilíbrio apresentadas na seção 2.2.1. As simulações levaram cerca de um ano e meio para serem concluídas e foram realizadas um *cluster* computacional de médio porte alocado no CPD da Universidade de Brasília.

3.2.2 CLASSIFICAÇÃO EM SÍTIOS

Primeiramente, eliminou-se qualquer translação e rotação do sistema sobrepondo todas as configurações da proteína ao longo de cada simulação. Foram extraídos, então, os centros de massa de todos os anestésicos que tinham pelo menos 10% dos seus átomos a até 4 Å de distância de algum átomo da proteína. Obtivemos, dessa forma, cerca de 700 mil pontos para cada simulação. Escolheu-se uma versão paralelizada¹²⁰ do método DBSCAN¹²¹ para agrupar esses pontos, pois este método é capaz de encontrar a separação entre conjuntos de alta densidade e pontos considerados como ruído. Fixou-se a densidade mínima de pontos 500 e a distância máxima de um ponto para o seu vizinho mais próximo em 1,5 Å. O DBSCAN retornou aproximadamente 70 conjuntos para cada simulação, os quais foram classificados manualmente em sítios de acordo com a região da proteína perto da qual eles se encontravam.

As probabilidades de cada sítio foram obtidas ao normalizar a quantidade de moléculas presentes nesse sítio pela quantidade total de anestésicos em contato com a proteína ao longo da simulação.

3.2.3 ACOPLAMENTO DE MOVIMENTOS

As redes de acoplamento do movimento dos aminoácidos de cada proteína foram

obtidas a partir do ferramenta NetworkView¹²² distribuída junto ao VMD¹⁰⁶. Os vértices da rede correspondem aos carbonos alfa de todos os aminoácidos. O tamanho da aresta (d_{ij}) entre os vértices i e j é dada pela probabilidade de transferência de informação entre estes vértices:

$$d_{ij} = -\log(|C_{ij}|) \quad [3.1]$$

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \mathbf{r}_i(t) \cdot \Delta \mathbf{r}_j(t) \rangle}{(\langle \Delta \mathbf{r}_i(t)^2 \rangle \langle \Delta \mathbf{r}_j(t)^2 \rangle)^{1/2}} \quad [3.2]$$

$$\Delta \mathbf{r}_i(t) = \mathbf{r}_i(t) - \langle \mathbf{r}_i(t) \rangle \quad [3.3]$$

onde C_{ij} é a correlação de pares entre os vértices i e j , e $\mathbf{r}_i(t)$ é a posição do vértice i em um dado tempo t .

Foram construídos dois conjuntos de redes a partir de cada simulação de *flooding*. O primeiro conjunto consiste na rede amostrada ao longo dos últimos 50 ns das simulações. No segundo caso, foram calculadas redes ao longo das simulações amostrando as posições dos vértices em intervalos de 5 ns. Por fim, foram obtidas redes de referência a partir dos 10 últimos nanosegundos das simulações sem a presença anestésicos.

A medida de variação ao longo do tempo, utilizada nas análises de correlação apresentadas nos resultados, foi calculada a partir do desvio quadrático médio entre as redes de acoplamento amostradas ao longo das simulações e a respectiva rede de referência, obtida na simulação sem anestésicos.

Na análise das modificações ocasionadas pela presença dos anestésicos, representou-se a subtração entre a rede obtida no fim da simulação de *flooding* e a rede de referência correspondente. Valores negativos indicam uma diminuição da distância entre os vértices e, consequentemente, um aumento no acoplamento entre os dois aminoácidos. Diferenças positivas representam, portanto, uma diminuição do acoplamento entre os vértices. Nessa análise, os vértices da rede foram representados como cilindros interligando os carbonos alfa apenas se o valor absoluto da variação no acoplamento entre eles tenha sido maior que 0,5. O raio dos cilindros corresponde à magnitude das diferenças, e as cores vermelha e azul indicam aumento e diminuição do acoplamento, respectivamente.

3.2.4 DISTÂNCIA ELÉTRICA

Os perfis de distância elétrica foram calculados explicitamente a partir de simulações de

dinâmica molecular segundo a definição

$$\phi(z) \equiv \frac{\partial}{\partial V} \Phi(z, V) |_{V=0} \quad [3.4]$$

onde $\Phi(z, V)$ é o potencial eletrostático local médio na posição z ao longo do eixo perpendicular à membrana a uma dada voltagem V .^{44,123} Dado o comportamento linear dessa relação,¹²⁴ o cálculo de distância elétrica pode ser aproximado por

$$\phi(z) \equiv \frac{\Phi(z, V_2) - \Phi(z, V_1)}{V_2 - V_1} \quad [3.5]$$

para $V_1 = 0 \text{ mV}$ e $V_2 = -650 \text{ mV}$, com $dV = -650 \text{ mV} \pm 50 \text{ mV}$.

Assim, foi necessário estender as simulações de *flooding* aplicando potenciais transmembrânicos de 0 mV e $650 \text{ mV} \pm 50 \text{ mV}$. Para realizar as simulações hiperpolarizadas ($V = 650 \pm 50 \text{ mV}$), foi necessário separar fisicamente os banhos de eletrólitos em ambas as faces da membrana. Para isso, utilizamos o protocolo de desbalanço iônico.¹²⁵ Assim a célula de simulação foi estendida em 50 \AA no eixo perpendicular à membrana (eixo Z) e o sistema foi simulado no ensemble NVT. Desse modo, criou-se efetivamente uma camada de vácuo separando os banhos de eletrólitos (figura 15A). Em seguida íons K^+ foram movidos de forma a manter um excesso de cargas positivas no banho extracelular e obter um potencial transmembrânico hiperpolarizado. Após 0,2 ns de simulação, mediu-se o potencial transmembrânico a fim de avaliar a necessidade de corrigir o desbalanço iônico entre os banhos (figura 15 C). Cada sistema foi então simulado por mais 2 ns sob essas condições a fim de amostrar o mapa de potenciais eletrostáticos locais. Apesar da criação de uma área de vácuo, foi mostrado que as propriedades físicas da água são minimamente perturbadas nas proximidades da membrana e da proteína.¹²⁵ Para obter simulações com potencial transmembrânico $V = 0 \text{ mV}$, bastou-se seguir o protocolo padrão aqui apresentado. Como nessas simulações são aplicadas condições periódicas de contorno nos três eixos cartesianos e há apenas uma membrana, ambas as faces da membrana são hidratadas pelo mesmo banho de eletrólitos. Assim não há desbalanço de íons e, conseqüentemente, o potencial transmembrânico é nulo (figura 15 B). Esses sistemas foram, então, simulados por 2,2 ns visando amostrar o mapa de potenciais eletrostáticos locais de forma semelhante ao sistema hiperpolarizado.

Os mapas de potencial eletrostático local foram calculados pelo *plugin* PMEpot do *software* VMD.¹²⁶ O PMEpot resolve, para cada posição \mathbf{r} de uma malha tridimensional, a

equação de Poisson:

$$\nabla^2 \Phi(\mathbf{r}, \Delta V) = -4\pi \sum_{i=1}^n \rho_i(\mathbf{r}) \quad [3.6]$$

onde $\rho_i(\mathbf{r})$ é a densidade de cargas elétricas de partícula i do sistema, aproximada por uma gaussiana esférica. Utilizou-se uma resolução de $1,0 \text{ \AA}$ para a malha tridimensional e uma largura $\sigma = 0,25 \text{ \AA}^{-1}$ para as gaussianas.

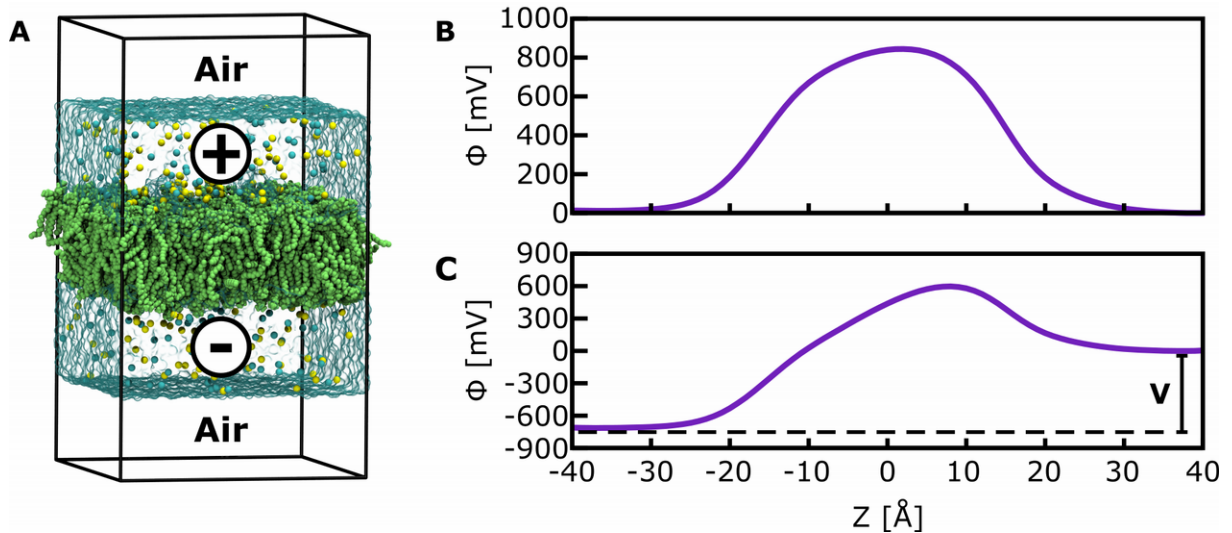


Figura 15. Protocolo de desbalanço iônico para aplicação de potencial transmembrânico. (A) É acrescentada uma camada de vácuo além dos limites do sistema no eixo perpendicular à membrana. Em seguida íons potássio são translocados de forma que haja uma carga elétrica aparente negativa e ou positiva nos banhos de eletrólitos inferior (intracelular) e superior (extracelular) respectivamente. (B) Perfil de potencial eletrostático ao longo da membrana nos sistemas despolarizados em que ambos os banhos de eletrólitos encontram-se neutros. (C) Perfil de potencial eletrostático ao longo da membrana nos sistemas hiperpolarizados em que há diferença de carga elétrica líquida entre os banhos de eletrólitos de forma a criar um potencial transmembrânico de aproximadamente $V = 650 \text{ mV}$. Adaptado de Caio et al.⁴⁵

Para o cálculo dos perfis de distância elétrica, foram selecionadas regiões cilíndricas dos mapas médios de potenciais eletrostáticos amostrados ao longo de cada simulação pelo PMEpot, com raio $r = 8 \text{ \AA}$ e eixo central (\mathbf{v}) coincidente com o eixo principal da cavidade interna de cada domínio sensor de voltagem (figura 16). Os potenciais eletrostáticos locais ($\Phi(z, V)$) foram então discretizados em z a partir das médias dos potenciais obtidos nos planos xy para cada altura z , e normalizados pelos potenciais do banho extracelular ($z = 21$).

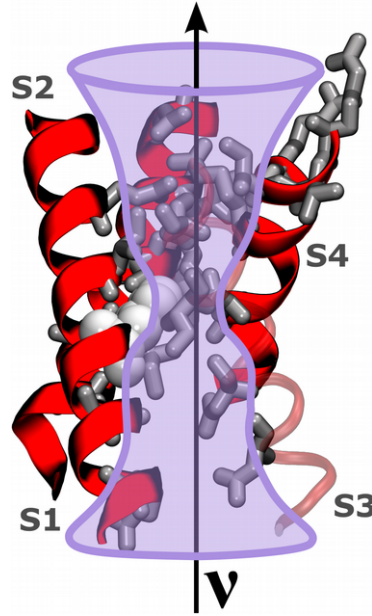


Figura 16. Cavidade interna do domínio sensor de voltagem do Kv1.2. Estão representados as cadeias laterais dos aminoácidos que formam a cavidade (cinza), a F233 (branco) e a região hidratada (rosa). A seta indica a direção do eixo central (\mathbf{v}). Adaptado de Caio et al.⁴⁵

3.2.5 PRESSÃO LATERAL

Pelo modelo proposto por Cantor⁸¹, assume-se que as proteínas apresentem apenas dois estados conformacionais (aberto e fechado, por exemplo) e que hajam diferenças na área ($A(z)$) de secções da proteína entre as conformações dependentes da altura em z ($\Delta A(z) = A_{aberto}(z) - A_{fechado}(z)$). O trabalho (w) realizado pela proteína na membrana dada uma variação na pressão lateral ($\Delta p(z)$) causada pela presença de anestésicos e a probabilidade das proteínas se encontrarem no estado aberto (P_{aberto}) podem ser descritos como:

$$w = \int \Delta A(z) \Delta p(z) dz \quad [3.7]$$

$$P_{aberto} = \frac{1}{1 + y_0 e^{-\beta w}} \quad [3.8]$$

onde $y_0 = [\text{fechado}]/[\text{aberto}]$ na ausência de anestésicos e $\beta = (k_B T)^{-1}$. A curva de condutância em função da voltagem pode, então, ser calculada como:

$$G/G_{max}(v) = \frac{g_{max}}{1 + y_0 e^{-\beta w + c(v_m - v)}} \quad [3.9]$$

onde g_{max} é a condutância máxima do canal, c é a *gating charge* e v_m é a voltagem na qual metade dos canais encontram-se abertos.

Os perfis de pressão lateral foram calculados com a ajuda do programa NAMD. O sistema é dividido e faixas discretas ao longo do eixo cartesiano z (nesse caso perpendicular à membrana). O programa calcula, então, metade da função virial para cada faixa e fornece o tensor de pressão resultante.¹²⁷ A pressão lateral P_L de uma determinada faixa é então calculada como

$$P_L = \frac{1}{2}(P_{xx} + P_{yy}) \quad [3.10]$$

onde P_{xx} e P_{yy} correspondem às entradas dos eixos x e y na diagonal do tensor de pressão \mathbf{P} . Os perfis aqui apresentados correspondem às médias dos cálculos de pressão realizados nas estruturas provenientes dos últimos 50 ns das simulações das membranas puras.

Por conta do uso do PME para tratar as interações eletrostáticas, o cálculo da pressão lateral precisou ser realizado em duas etapas. Primeiramente calculou-se o perfil de pressão proveniente da energia cinética, das interações ligadas e das interações não ligadas de curto alcance. Posteriormente, o NAMD foi utilizado novamente para calcular a contribuição das interações eletrostáticas de longo alcance à função virial.^{127,128}

Os cálculos de pressão foram realizados nas simulações de *flooding* das membranas puras, enquanto os perfis de área do Kv1.2 foram obtidas na fase de equilíbrio das simulações dessas proteínas. Dessa forma, foi possível realizar os cálculos de condutância em condições ultra diluídas, ou seja, do Kv1.2 inserido em membranas infinitas. Assim, foi possível descartar efeitos provenientes do reduzido tamanho dos sistemas de *flooding*.

3.2.6 PARÂMETROS DE ORDEM

Membranas fosfolipídicas são altamente dinâmicas e os lipídeos que as compõem podem mover-se de diversas formas. Os parâmetros de ordem medem a motilidade orientacional das ligações C-H das cadeias alifáticas dos fosfolipídeos e são uma importante fonte de informação estrutural e dinâmica sobre os lipídeos¹²⁹. Os parâmetros de ordem são definidos como

$$S = \left\langle \frac{3 \cos^2 \Theta(t) - 1}{2} \right\rangle \quad [3.11]$$

onde Θ é o ângulo entre a ligação C-H e o eixo de referência (eixo z, nesse caso) em um dado tempo t . Os parâmetros de ordem foram amostrados separadamente em dois grupos ao longo das simulações de referência (sem anestésicos) e as simulações de *flooding*. O primeiro

grupo consistiu em todos os lipídeos que faziam algum contato com a proteína (distância de corte de 5 Å), enquanto o segundo grupo englobou todos os outros lipídeos. Os 15 primeiros grupos apresentados nos gráficos correspondem à cadeia insaturada da fosfatidilcolina, enquanto os outros 15 grupos representam a cadeia saturada.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 PARTIÇÃO PELA MEMBRANA E IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS

Uma vez iniciadas as simulações, observa-se que parte das moléculas de sevoflurano e de isoflurano formam agregados ainda na água e se ancoram nas proteínas. O restante das moléculas iniciaram uma migração para as cadeias alifáticas dos lipídeos, passando rapidamente pelos grupos polares das fosfatidilcolinas (figura 17). Esse comportamento se reflete nos gráficos da fração de moléculas em cada um dos meios (figuras 18 e 19).

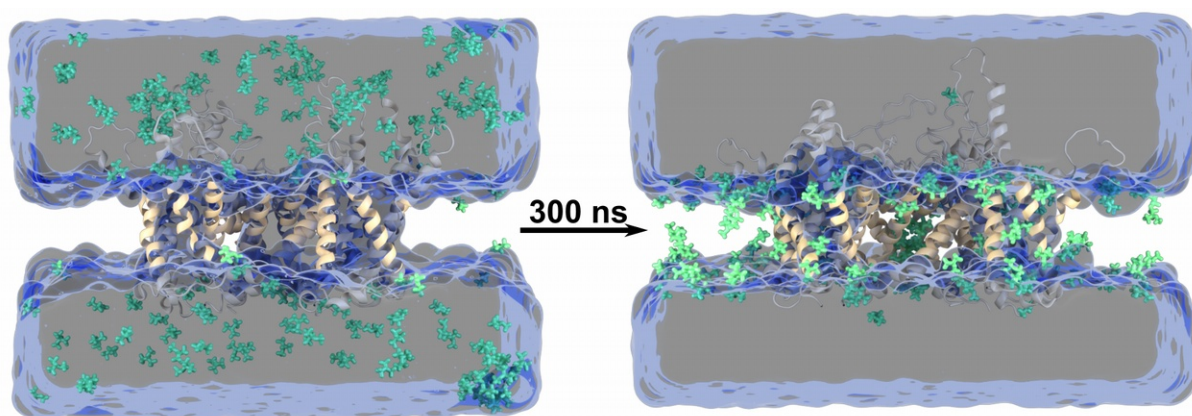


Figura 17. Migração de moléculas de anestésico nas simulações de flooding. Os anestésicos, inicialmente colocados no meio aquoso (área delimitada em azul), rapidamente migram para a membrana ou para o poro dos canais, quando na conformação aberta. Após 300 ns quase não há anestésicos na água. A membrana foi omitida para facilitar a visualização.

Em aproximadamente 18 ns, a fração de anestésicos na água caiu pela metade em todas as simulações. A fração que saiu da água nesse período se dividiu em dois grupos. Metade dos anestésicos passou a interagir predominantemente com a proteína (aqui há a participação dos agregados), enquanto a outra metade migrou para as cadeias alifáticas da membrana. Antes de alcançarem essa região, os moléculas anestésicas passaram rapidamente pela região polar dos fosfolipídeos, como foi evidenciado pela pequena fração nesse meio. Ao longo da simulação, a fração de anestésicos na água diminuiu gradativamente até se estabilizar por volta de 150 a

200 ns. No caso do sevoflurano, essa fração permaneceu em torno de 10%, caindo para aproximadamente 7% no isoflurano. Os anestésicos interagindo com a proteína pela interface aquosa alcançaram uma concentração máxima em torno de 30 ns para o sevoflurano e 18 ns para o isoflurano. Após esse momento, a baixa concentração de anestésicos no meio aquoso faz com que este grupo de moléculas migresse para a água e posteriormente para a membrana. Assim a fração de moléculas na membrana aumentou acompanhada de uma diminuição da fração deste último grupo e da água. Acompanhando o aumento do número de moléculas no interior da membrana, houve um incremento da fração de anestésicos interagindo com a proteína pela interface proteína-membrana até uma proporção de aproximadamente 20%. Esses últimos valores também se estabilizam em torno de 150 a 200 ns, o que é um indicativo de que há um equilíbrio na partição dos anestésicos entre os diferentes meios.

Nas simulações com membrana pura, a saída dos anestésicos do meio aquoso foi mais rápida. As frações de anestésicos no interior da membrana se estabilizaram, em ambas as concentrações após 100 ns no *flooding* com sevoflurano (figura 20) e após 75 ns para o isoflurano (figura 21). Como não há proteína nesses sistemas, quase a totalidade (85% para sevoflurano e 90% para isoflurano) das moléculas anestésicas migraram para as cadeias alifáticas da membrana. Uma fração residual de aproximadamente 2% ocupou a região dos grupos polares, enquanto o restante das moléculas encontravam-se na água. Assim como observado nas simulações com proteínas, os anestésicos passam rapidamente pela região dos grupos polares dos fosfolipídeos ao migrar para a membrana, como observado em outros estudos.¹³⁰ Nas simulações a 10 mM os comportamentos são semelhantes, mas devido ao baixo número absoluto de moléculas presentes na simulação (aproximadamente 4 moléculas), há mais ruído nas medidas. Visto que no *flooding* das membranas puras as frações de anestésicos se equilibram mais rapidamente, 150 ns de simulação foram suficientes para amostrar as propriedades de interesse.

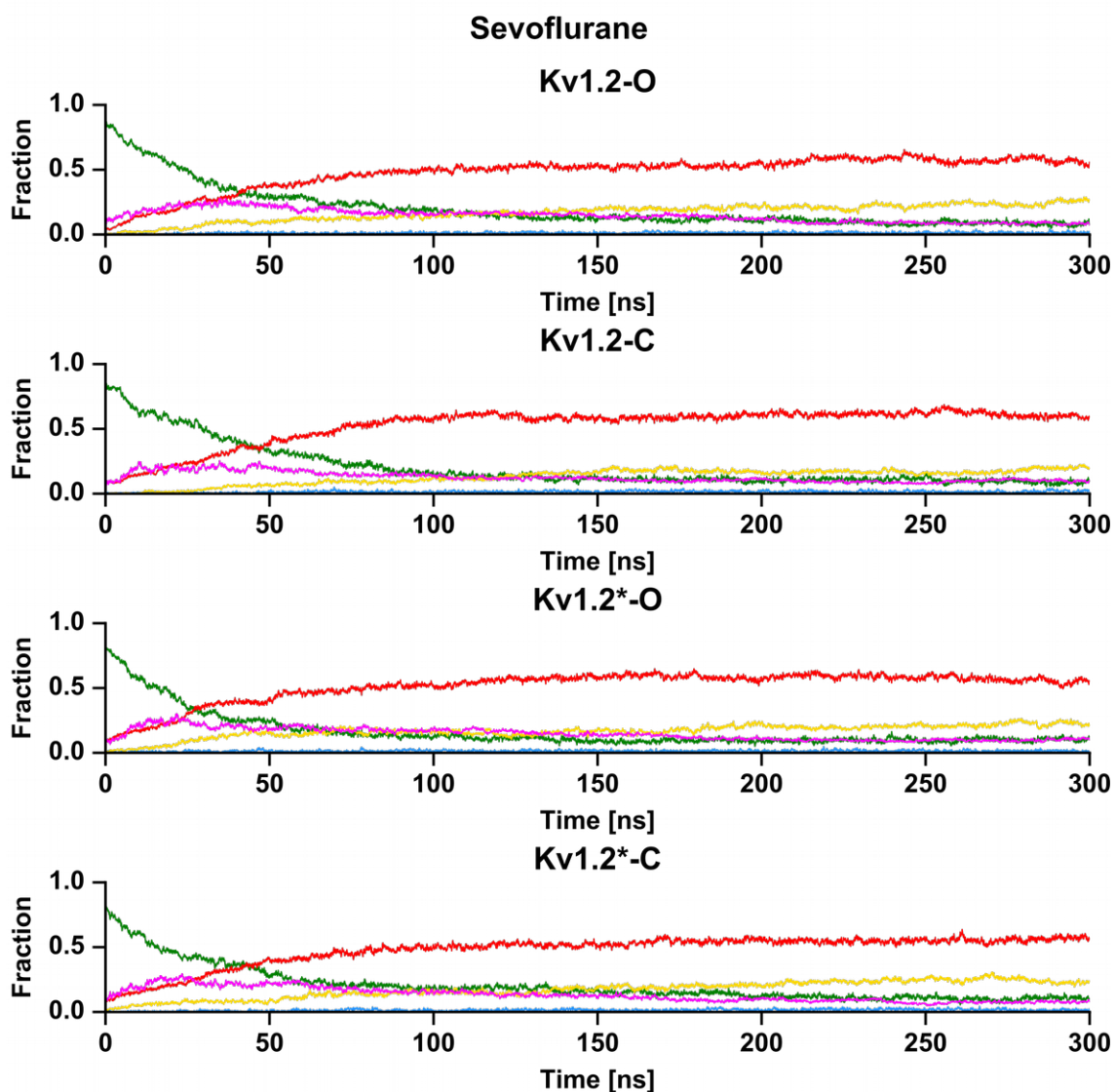


Figura 18. Fração de moléculas de sevoflurano em cada meio dos sistemas de flooding. Estão representadas as frações de sevoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho). As curvas em amarelo e magenta correspondem às moléculas em contato com as proteínas provenientes da membrana e de água respectivamente.

Apesar dos comportamentos do isoflurano e do sevoflurano serem similares, há pequenas diferenças nas suas cinéticas. Isso se deve às diferenças físico-químicas entre estes compostos. Há dois grupos aceptores de ligações de hidrogênio a mais no sevoflurano em comparação com o isoflurano, o que acarreta uma pequena diferença de solubilidade entre eles. Apesar dessa diferença ser pequena, os seus efeitos são perceptíveis na escala de tempo em que as análises anteriores foram realizadas (nanosegundos).

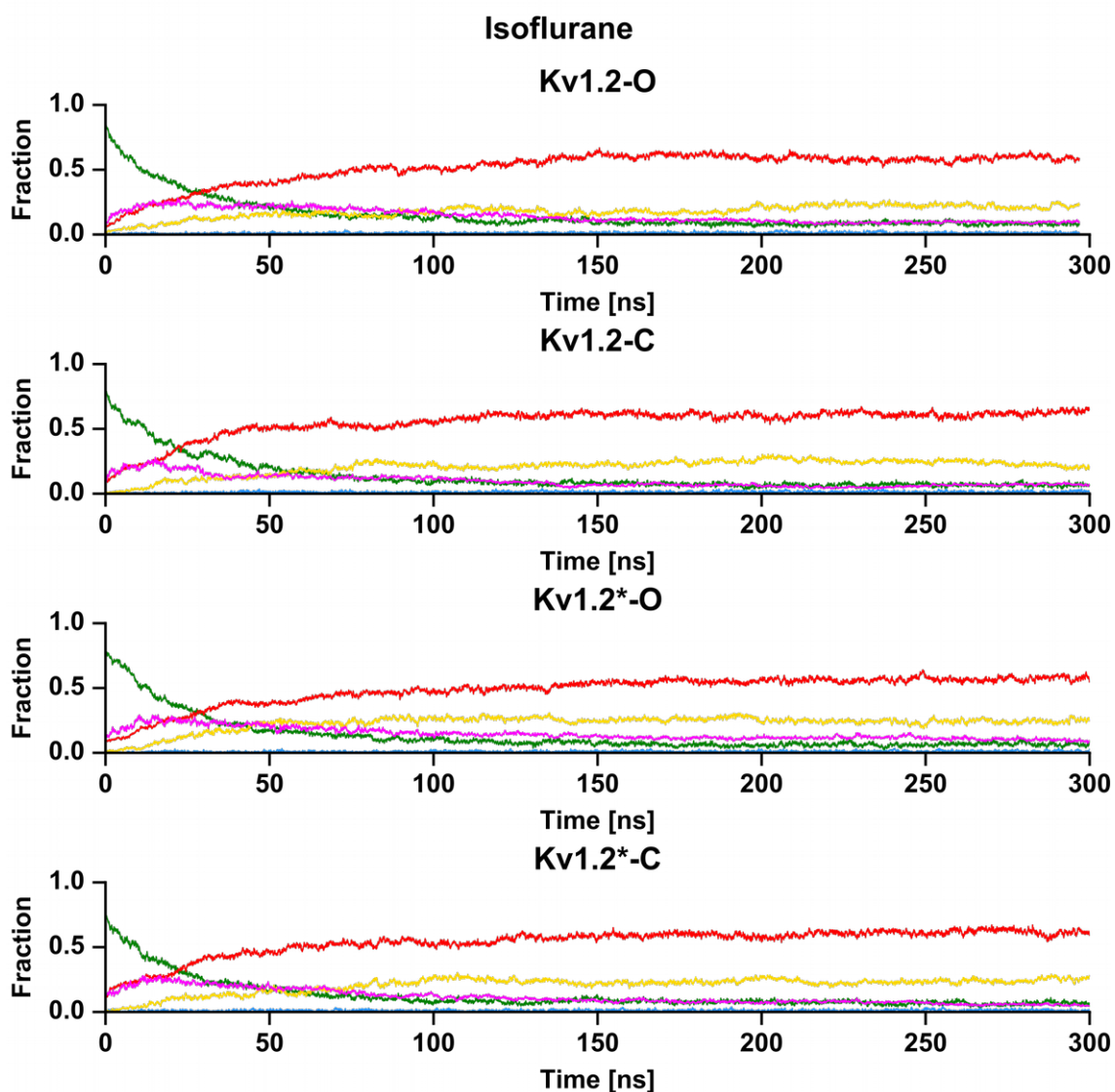


Figura 19. Fração de moléculas de isoflurano em cada meio dos sistemas de flooding. Estão representadas as frações de isoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho). As curvas em amarelo e magenta correspondem às moléculas em contato com as proteínas provenientes da membrana e de água respectivamente.

O cálculo do desvio estrutural de uma proteína em relação à estrutura inicial é um importante indicativo da estabilidade conformacional de uma proteína ao longo de simulações. Esse cálculo se torna imprescindível em simulações longas, visto que há tempo suficiente para que a proteína adote outras conformações impulsionada por vieses nas condições de simulação. Os valores de RMSD (figuras 22 e 23), tanto para a proteína inteira quanto para os domínios, aumentaram vagarosamente até aproximadamente 200 ns, quando eles se estabilizaram abaixo de 3 Å. Esse patamar corresponde ao desvio causado pelas oscilações térmicas e é um indicativo de estabilidade estrutural em simulações de proteínas.^{30,37,117,118}

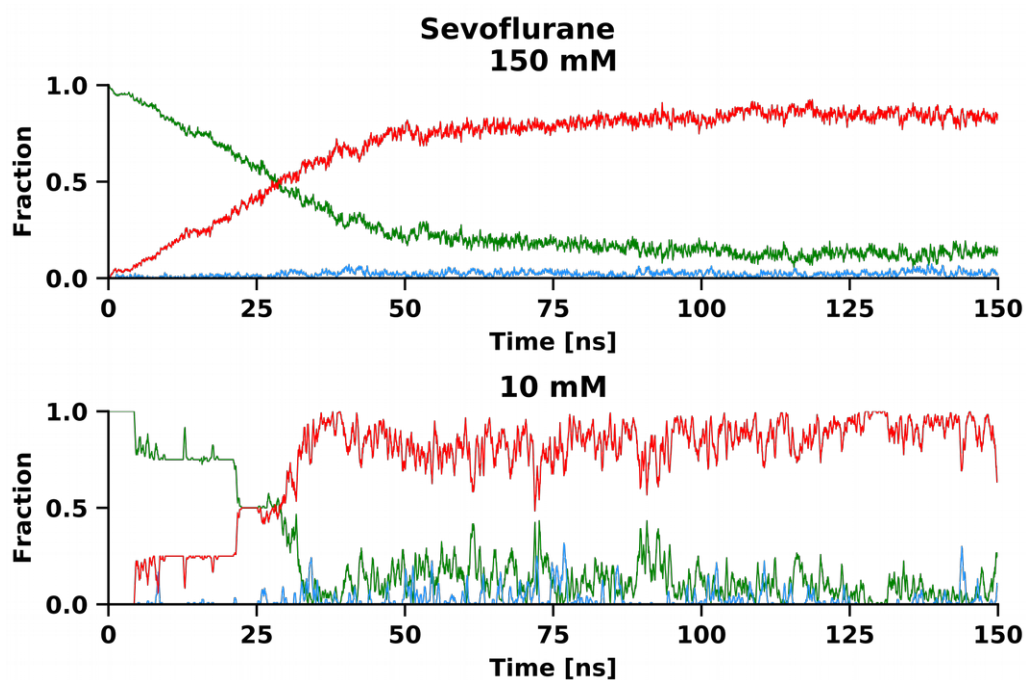


Figura 20. Fração de moléculas de sevoflurano em cada meio das simulações de flooding a 10 mM e 150 mM. Estão representadas as frações de sevoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho).

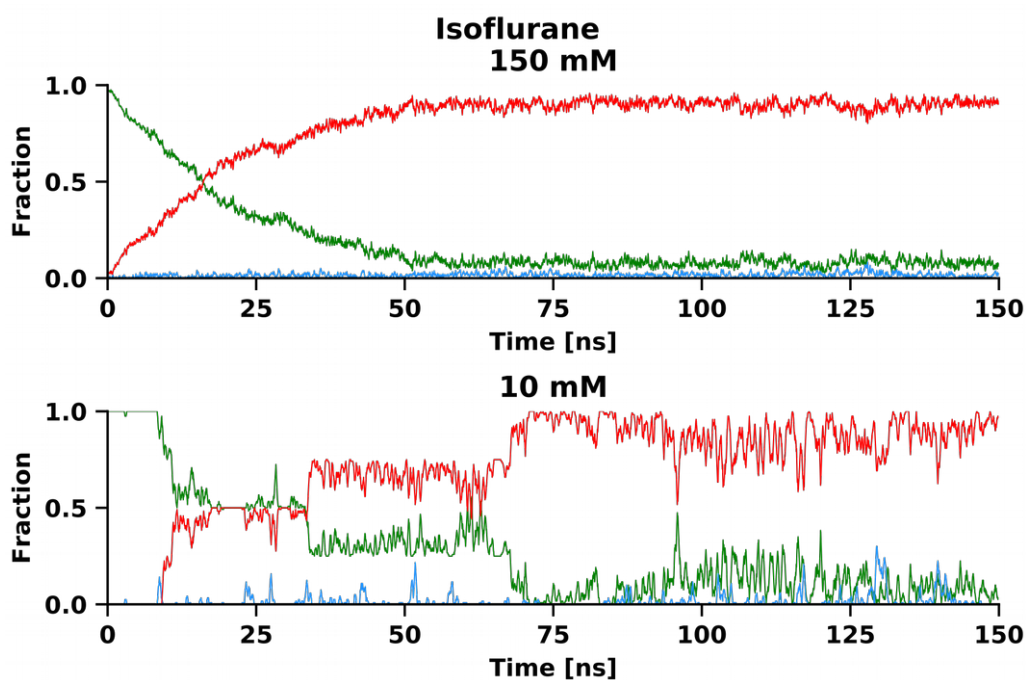


Figura 21. Fração de moléculas de isoflurano em cada meio das simulações de flooding a 10 mM e 150 mM. Estão representadas as frações de isoflurano na água (verde), nos grupos polares dos lipídeos (azul) e nas cadeias alifáticas dos lipídeos (vermelho).

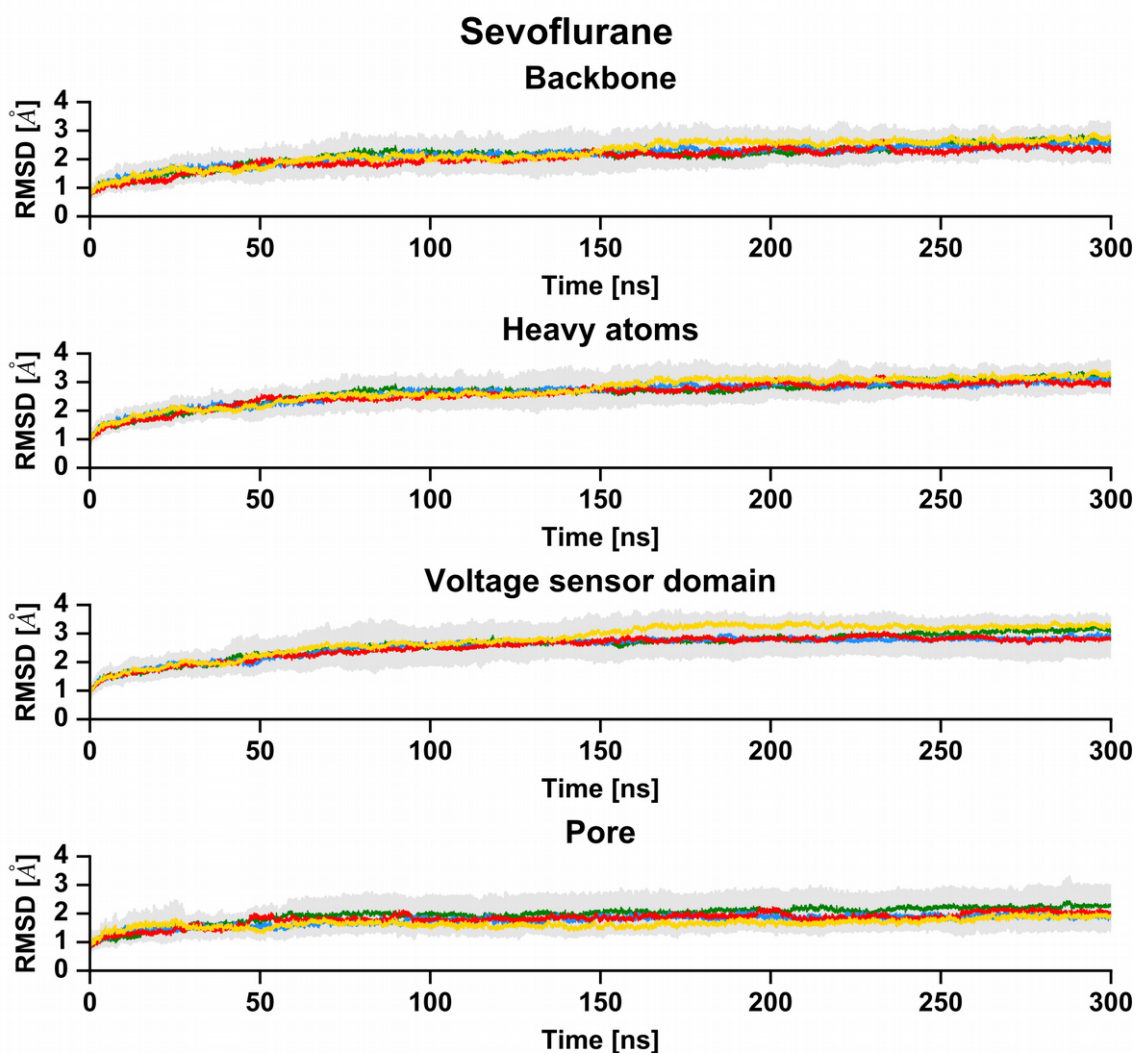


Figura 22. Valores de RMSD ao longo das simulações contendo sevoflurano. Os gráficos correspondem ao RMSD da cadeia principal das proteínas, dos átomos pesados, do domínio sensor de voltagem e do domínio do poro. Os sistemas Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C estão representados respectivamente pelas cores verde, azul, vermelho e amarelo. A área em cinza corresponde ao desvio padrão amostrado entre as quatro subunidades dos canais.

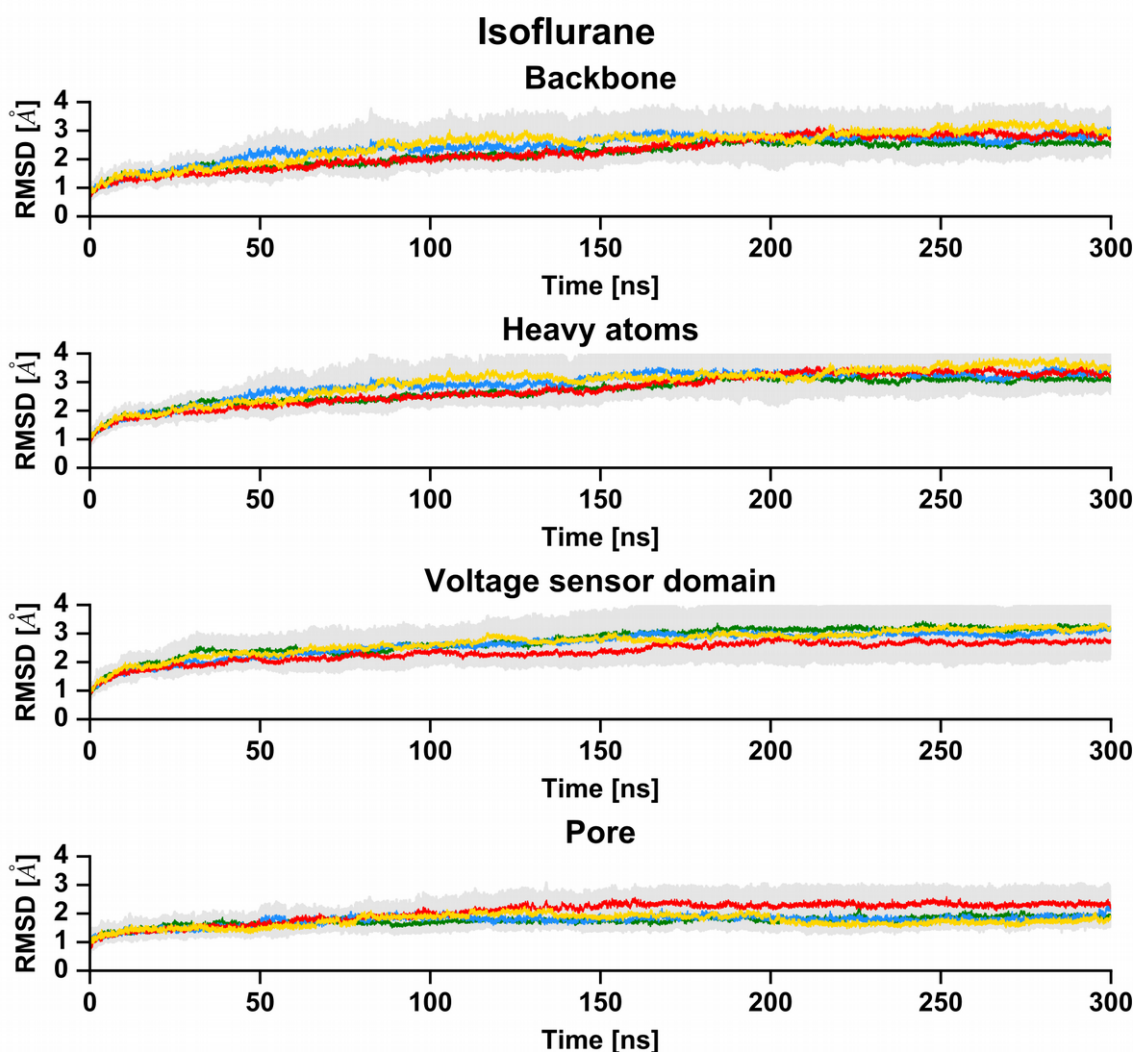


Figura 23. Valores de RMSD ao longo das simulações contendo isoflurano. Os gráficos correspondem ao RMSD da cadeia principal das proteínas, dos átomos pesados, do domínio sensor de voltagem e do domínio do poro. Os sistemas Kv1.2-O, Kv1.2-C, Kv1.2*-O e Kv1.2*-C estão representados respectivamente pelas cores verde, azul, vermelho e amarelo. A área em cinza corresponde ao desvio padrão amostrado entre as quatro subunidades dos canais.

Em seguida, procedeu-se com a classificação dos sítios de interação. Para isso, foram extraídos cerca de 800 mil pontos de cada simulação correspondendo ao centro de massa de todos os anestésicos que estavam em contato com as proteínas em qualquer momento das simulações. Apesar de haverem pontos dispersos por toda a extensão da proteína, algumas regiões apresentaram uma alta ocupação de anestésico, formando aglomerados bem definidos. Aplicando as técnicas descritas na seção 3.2.2, foi possível selecionar e classificar cada um desses aglomerados em sítios de interação baseando-se na região da proteína com a qual eles faziam contato. Dessa forma, chegou-se a um conjunto de 15 sítios distintos que englobam todas as regiões encontradas em todos os sistemas, tanto com sevoflurano quanto com isoflurano (figura 24).

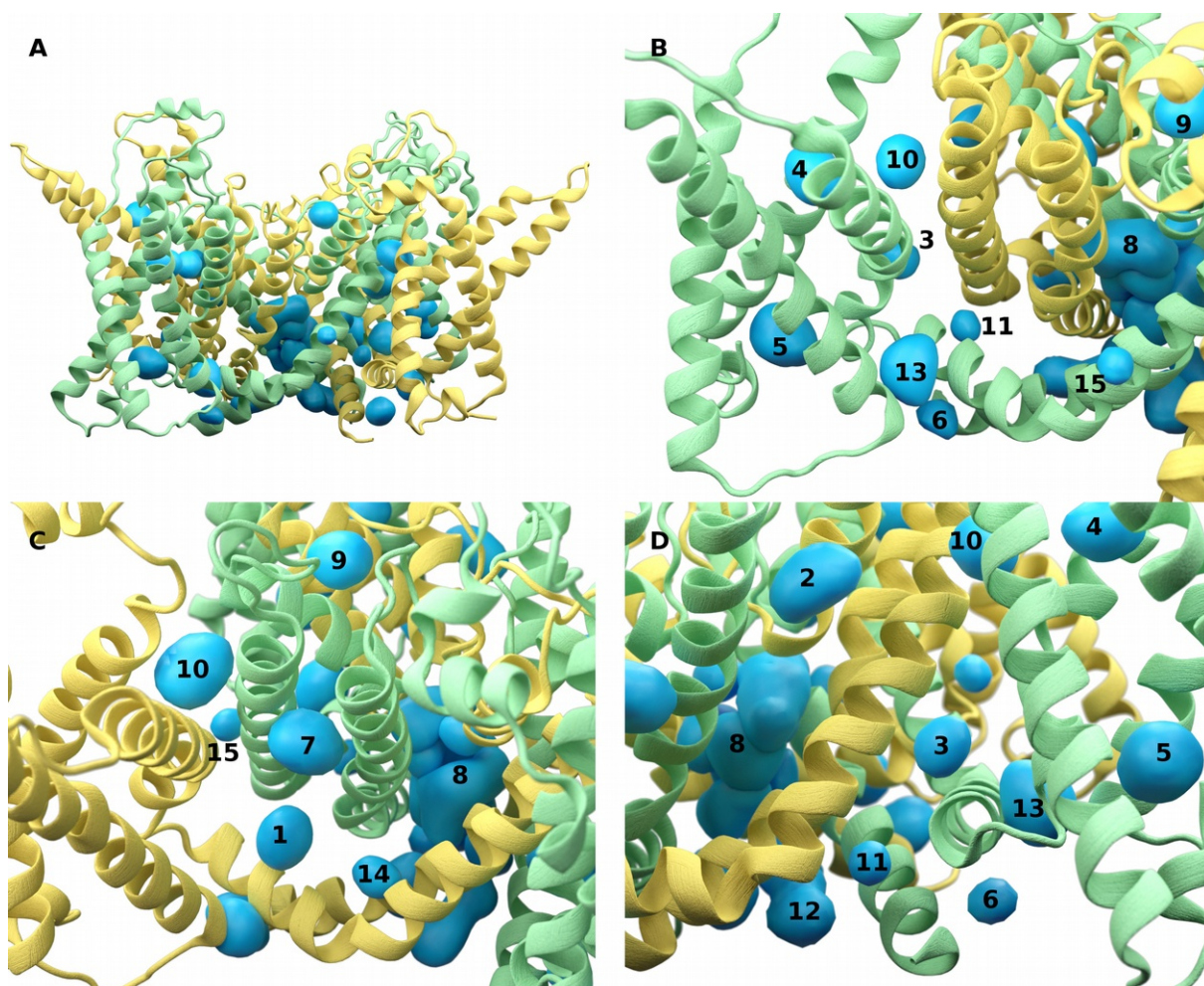


Figura 24. Exemplos de localizações de sítios de interação dos anestésicos. Visualização da distribuição dos sítios por toda a proteína (A) e em regiões específicas (B, C e D). As nuvens em azul são exemplos da densidade de anestésicos encontrados nas diversas simulações de flooding.

A fim de compreender a distribuição dos sítios entre as diferentes conformações, construções e anestésicos, calculou-se a probabilidade de encontrar um anestésico em cada sítio (figuras 25 e 26). A partir das diferenças entre essas probabilidades, pode-se evidenciar a dependência conformacional de cada sítio e a influência da mutação G329T para ambos os anestésicos.

Os sítios 1, 8 e 13 se destacam por terem uma maior probabilidade nas conformações abertas do Kv1.2 com ambos os anestésicos (figuras 25 e 26, gráficos inferiores). Uma maior probabilidade por uma dada conformação é um forte indicativo de que esse sítio, quando ocupado por anestésicos, atue estabilizando esta conformação. Nesse caso, os sítios supracitados atuariam estabilizando o estado aberto dos canais em detrimento dos estados fechados. Em outras palavras, a interação com esses sítios deslocaria o equilíbrio entre as conformações do Kv1.2 em direção ao estado aberto, aumentando, assim, a sensibilidade

desses canais a voltagem. Além disso, os sítios 1, 8 e 13 se destacam por se localizarem em regiões importantes para a mecânica dessas proteínas. O sítio 1 encontra-se na região da alça S4-S5, crucial para a comunicação entre o domínio sensor de voltagem e o poro. O sítio 13 faz contato direto com essa mesma região e com o domínio sensor de voltagem. Portanto moléculas anestésicas ligadas a esses sítios poderiam interferir diretamente na mecânica dependente de voltagem do canal e influenciar, por exemplo, na facilidade de migrar do estado fechado para o estado aberto. Além disso, estudos realizados por Jensen *et al.*⁶¹ mostraram que, uma vez que os sensores de voltagem estejam ativados, a hidratação do poro central, e conseqüentemente a sua abertura, são facilitadas pela presença de íons tentando adentrar essa região. Visto que o sítio 8 encontra-se na cavidade central da proteína, pode-se especular que os anestésicos tenham um papel similar aos íons, facilitando a hidratação/abertura do poro. Portanto, os sítios 1, 8 e 13 são bons candidatos para explicarem a potencialização dependente de voltagem do Kv1.2.

Ao analisar as diferenças de probabilidades entre os canais selvagens e os canais mutantes (figuras 25 e 26, coluna da direita), observa-se que há também uma maior afinidade dos sítios 8 e 9 pelo canal mutante na conformação aberta (Kv1.2*-O). O sítio 9 encontra-se entre a hélice P e a hélice S6, região importante por conferir estabilidade estrutural ao filtro de seletividade. O sítio 8 encontra-se, como dito anteriormente, na cavidade central do poro. Moléculas de anestésicos que se localizem em ambos os sítios podem provocar mudanças estruturais no filtro de seletividade capazes de impedir que o filtro adote uma conformação não condutora. A desestabilização desse possível estado inativo do filtro refletiria, do ponto de vista macroscópico, em um aumento na corrente iônica máxima.

Somando-se a influência dos sítios 1, 8 e 13 na mecânica de abertura e fechamento do Kv1.2 com a manutenção do filtro de seletividade em um estado condutor pelo sítio 8, é possível explicar os efeitos de potencialização tanto do isoflurano quanto do sevoflurano. O primeiro conjunto de sítios seriam responsáveis por aumentar a sensibilidade do canal a voltagem, enquanto o segundo conjunto garantiria uma maior corrente iônica no estado aberto. Curiosamente o sítio 8 teria um papel duplo, interferindo tanto nos componente dependente e independente de voltagem da potencialização.

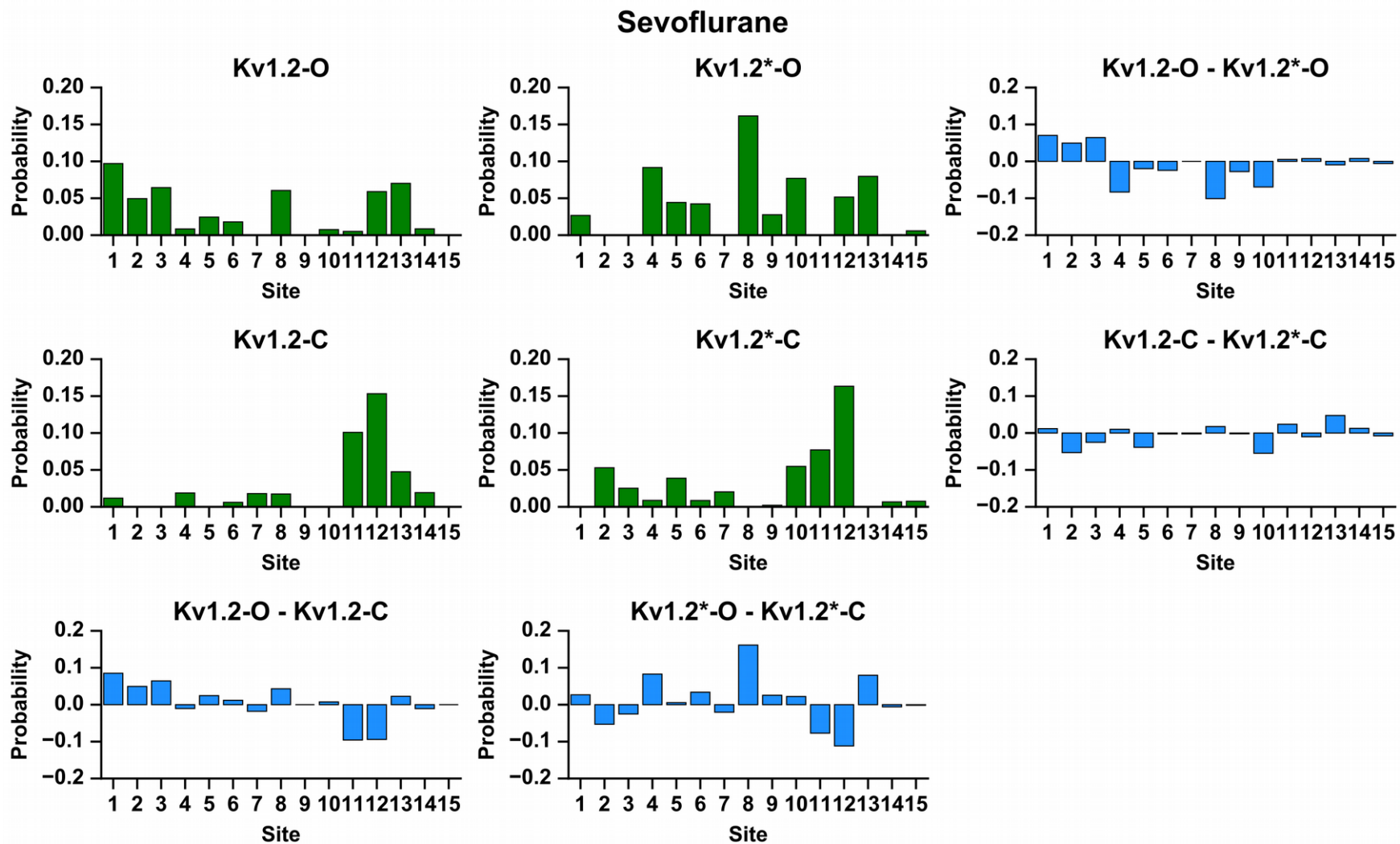


Figura 25. Probabilidades dos diferentes sítios nas simulações de flooding com sevoflurano. Ao centro, em verde, estão representadas as probabilidades de encontrar moléculas de sevoflurano em cada um dos 15 sítios para os quatro sistemas estudados. A direita, em azul, estão representados as diferenças entre as probabilidade nos canais selvagens e nos canais mutantes (ao longo das linhas). Em baixo, em azul, estão representadas as diferenças entre as probabilidades dos sítios entre os estados aberto e fechado (ao longo das colunas).

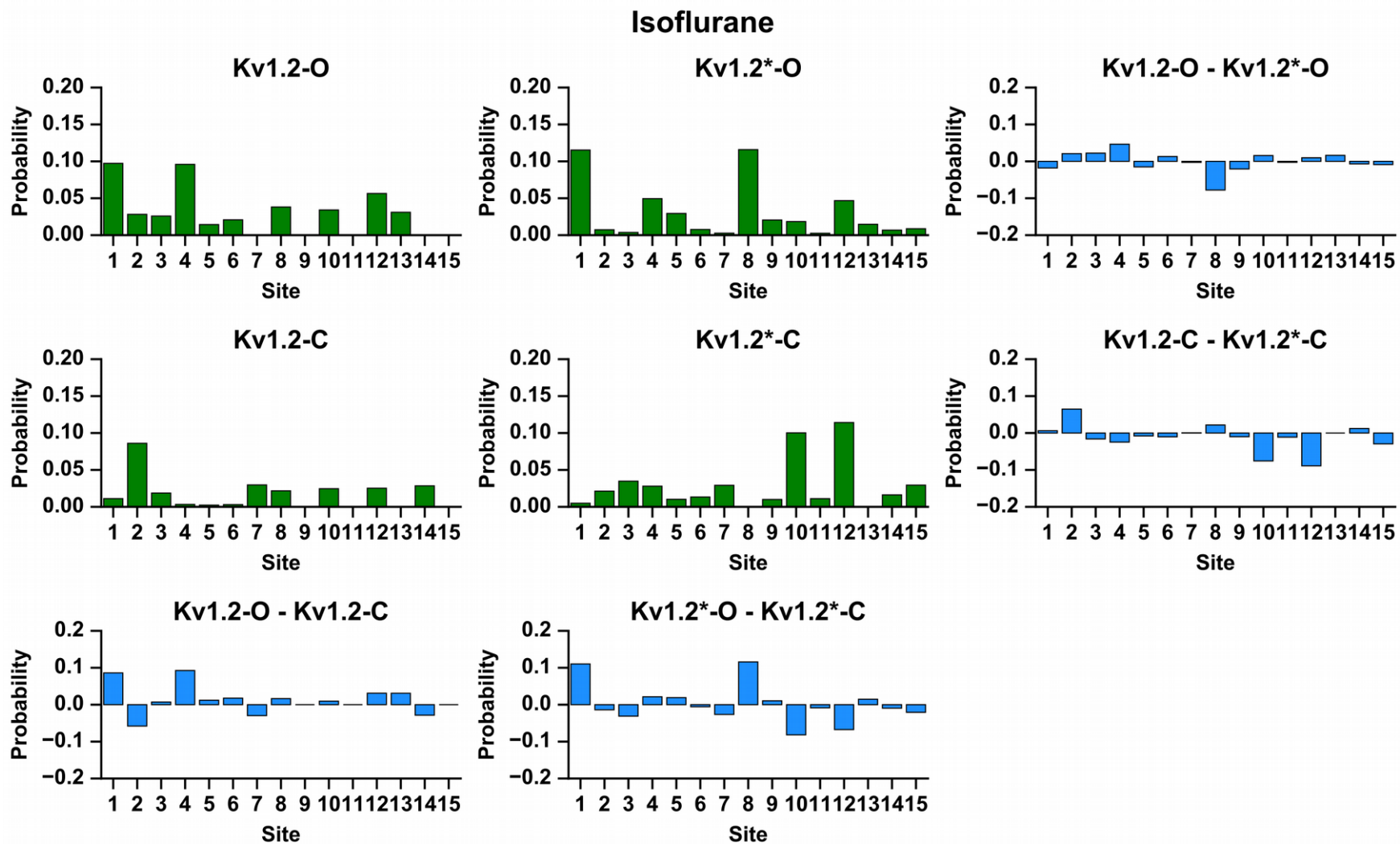


Figura 26. Probabilidades dos diferentes sítios nas simulações de flooding com isoflurano. Ao centro, em verde, estão representadas as probabilidades de encontrar moléculas de isoflurano em cada um dos 15 sítios para os quatro sistemas estudados. A direita, em azul, estão representados as diferenças entre as probabilidade nos canais selvagens e nos canais mutantes (ao longo das linhas). Em baixo, em azul, estão representadas as diferenças entre as probabilidades dos sítios entre os estados aberto e fechado (ao longo das colunas).

É importante ressaltar que, ao contrário das contas de *docking*, não é necessário realizar cálculos de energia livre para validar os sítios encontrados via *flooding*. Ao realizar simulações de dinâmica molecular sem viés e suficientemente longas, as frequências com que os diversos sítios são amostrados tendem a se igualar às probabilidades termodinâmicas ditadas pelos perfis de energia livre desses eventos. Com isso, pode-se usar essas frequências obtidas diretamente das simulações como parâmetro de comparação.

3.3.2 EFEITOS DIRETOS

Ao quantificar o acoplamento do movimento entre cada um dos aminoácidos dos canais, é possível obter um panorama geral sobre a dinâmica atual dessas proteínas sob um ponto de vista mecano-funcional. Esses acoplamentos (figura 27) indicam quais regiões da proteína se movem junto e permitem traçar caminhos pelos quais os movimentos são propagados entre duas regiões funcionais, como por exemplo, a propagação dos movimentos do domínio sensor de voltagem até a constrição hidrofóbica do poro central. Ao calcular a diferença entre as redes de acoplamento obtidas nas simulações com e sem anestésicos, pode-se, então, quantificar as mudanças na dinâmica dos canais iônicos ocasionadas pela presença dos anestésicos.

O acoplamento entre o sensor de voltagem e as hélices S5 e S4-S5 foi diminuído nas subunidades do Kv1.2-O em que havia sevoflurano nos sítios 3 e 5. O sítio 5 também aparenta participar no menor acoplamento entre as hélices que formam o domínio sensor de voltagem. Já o sítio 13 aparenta aumentar a correlação entre a parte intracelular do domínio sensor de voltagem e a hélice S4-S5. No estado aberto do sistema mutante, os acoplamentos entre essas regiões foi intensificado em todas as subunidades. Em ambas as construções houve um aumento generalizado no acoplamento da estrutura interna do filtro de seletividade e entre essa região e as proximidades da hélice S6. Na porção intracelular do poro houve um aumento considerável no acoplamento entre as hélices S6 no Kv1.2-O. Já no canal mutante, esse aumento ocorreu apenas na porção final dessas hélices, sendo que o acoplamento foi fortemente reduzido na região contendo os aminoácidos responsáveis pelo fechamento do poro.

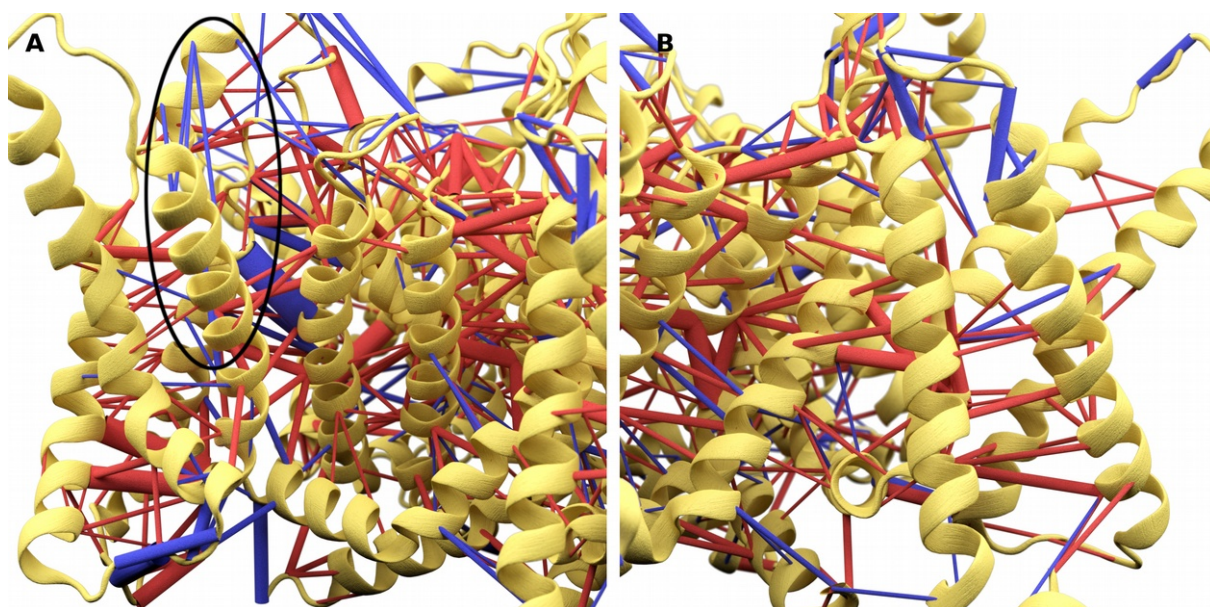


Figura 27. Variações nas redes de acoplamento de movimento entre diferentes partes do Kv1.2-O. Os cilindros unem aminoácidos cujos acoplamentos foram modificados pela presença de sevoflurano. Os cilindros vermelhos correspondem a aumentos no acoplamento, enquanto os cilindros azuis representam diminuições no acoplamento. O diâmetro dos cilindros reflete a magnitude das diferenças. (A) Exemplo de acoplamento interno no domínio sensor de voltagem, diminuição nos acoplamentos próximos ao sítio 10 (círculo preto) e aumento generalizado dos acoplamentos em toda a região do filtro de seletividade. (B) Exemplo de domínio sensor de voltagem que apresentou poucas variações nos seus acoplamentos.

No Kv1.2-C houve um aumento generalizado do acoplamento entre as hélices que formam o domínio sensor de voltagem. Apenas na subunidade do canal mutante em que o sítio 5 estava ocupado houve uma diminuição do acoplamento interno do domínio. Já o acoplamento entre este domínio e as hélices S5 e S4-S5 permaneceu próximo ao observado no canal aberto, sendo que nesse caso os sítios 3 e 5 não estavam presentes. Em contraste com o observado nas conformações abertas, quase não houve modificação do acoplamento em toda a região do filtro de seletividade. Já na parte intracelular do poro, percebe-se modificações no acoplamento similares às das conformações abertas, mas com uma intensidade menor.

Dois mecanismos distintos capazes de explicar a potencialização do Kv1.2 por sevoflurano emergem dos dados apresentados. O primeiro mecanismo estaria relacionado com um maior sincronismo das hélices S6 durante a abertura do poro e uma maior mobilidade do domínio sensor de voltagem, permitindo que ele responda mais rapidamente à variações no potencial transmembrânico. No canal mutante, este processo seria ainda mais facilitado por uma maior mobilidade na região do portão hidrofóbico do poro. O resultado seria o aumento da sensibilidade do Kv1.2 a voltagem quando na presença de sevoflurano. O segundo mecanismo envolveria a estabilização da estrutura do filtro de seletividade, impedindo que ele adote uma configuração não condutora. Assim, os canais no estado aberto passariam mais

tempo conduzindo íons, resultando em um aumento da condutância dos canais. São necessárias mais análises para filtrar quais sítios são responsáveis pelas mudanças de acoplamento observadas.

Investigou-se também a dependência de mudanças nas redes de acoplamento ao longo do tempo com a migração de anestésicos entre os diversos meios. Para isso, foram calculadas correlações de Pearson¹³¹ entre as mudanças nas redes de acoplamento e as curvas de fração de anestésicos em cada meio ao longo do tempo (tabela 3). Os resultados mostram que há correlações moderadas e fortes entre as mudanças na dinâmica das proteínas e o aumento de anestésicos em contato com a proteína através da membrana. A correlação moderada com as frações de anestésicos nas cadeias alifáticas dos lipídeos e as correlações negativas com as frações de anestésicos na água reforçam a ideia que os anestésicos migram da água para a membrana, interagem com os canais iônicos e causam mudanças na sua dinâmica. Não se pode descartar um efeito advindo dos anestésicos que se encontram na água, no entanto, as correlações com as curvas dos lipídeos foi maior em todos os casos analisados.

Tabela 3. Correlações de Pearson entre a evolução temporal dos acoplamentos e as curvas de partição dos anestésicos. As correlações consideradas média e altas estão grifadas.

	Água	Grupo polar	Cauda alifática	Proteína vindo do lipídeo	Proteína vindo da água
Kv1.2-O	-0,4542; p = 2,67 ⁻⁴	0,1478; p = 2,60 ⁻¹	0,4606; p = 2,13 ⁻⁴	<u>0,5570</u> ; p = 3,80 ⁻⁶	-0,4820; p = 9,64 ⁻⁵
Kv1.2-C	<u>-0,5647</u> ; p = 2,60 ⁻⁶	0,0366; p = 7,81 ⁻¹	<u>0,5380</u> ; p = 9,30 ⁻⁶	<u>0,6659</u> ; p = 6,41 ⁻⁹	<u>-0,6158</u> ; p = 1,64 ⁻⁷
Kv1.2*-O	<u>-0,5753</u> ; p = 1,52 ⁻⁶	0,2137; p = 1,01 ⁻¹	<u>0,5453</u> ; p = 6,63 ⁻⁶	<u>0,7836</u> ; p = 1,34 ⁻¹³	<u>-0,6340</u> ; p = 5,40 ⁻⁸
Kv1.2*-C	<u>-0,6538</u> ; p = 1,65 ⁻¹³	0,3719; p = 1,39 ⁻⁴	<u>0,6233</u> ; p = 4,33 ⁻¹²	<u>0,7885</u> ; p = 2,07 ⁻²²	<u>-0,7326</u> ; p = 4,64 ⁻¹⁸

3.3.3 EFEITOS INDIRETOS

Os resultados de *flooding* juntamente com as análises de *docking* molecular evidenciaram a presença de moléculas anestésicas ocupando a cavidade central dos domínios sensores de voltagem (sítios 10 e 11 do *docking* e sítios 4 e 5 no *flooding*). Tanto o potencial eletrostático dessas moléculas quanto a remoção de moléculas de água dessa região podem perturbar o campo elétrico no interior dos domínios sensores de voltagem e alterar o perfil de energia livre entre os estados ativado e desativado. A diferença de energia livre entre duas configurações **X** e **Y** desses domínios a uma dada voltagem **V** pode ser descrita por

$$\Delta F(\mathbf{XY}, V) = \Delta F(\mathbf{XY}, 0) + V \Delta Q(\mathbf{XY}) \quad [3.12]$$

onde $\Delta F(\mathbf{XY}, 0)$ corresponde à energia potencial resultante das interações químicas¹³² e $V \Delta Q(\mathbf{XY})$ é a energia elétrica associada ao transporte efetivo das cargas elétricas da hélice S4 (Q) ao longo do campo elétrico V .¹³³ Nesse caso, a carga efetiva é dada pelo somatório das cargas atômicas da hélice S4 (q) escalonadas pela fração do campo elétrico por elas percorrido (ϕ):

$$\Delta Q(\mathbf{XY}) = \sum_i q_i [\phi(\mathbf{Y}) - \phi(\mathbf{X})] \quad [3.13]$$

A quantidade ϕ , também denominada distância elétrica, é um campo escalar adimensional cujos valores variam de 0 (face intracelular) a 1 (face extracelular). A distância elétrica é influenciada primariamente pela morfologia do campo elétrico no interior do domínio sensor de voltagem, justificando a sua dependência com as configurações (\mathbf{X} ou \mathbf{Y}).¹³³ Assim mostramos ser possível quantificar a remodelação do campo elétrico entre duas estruturas (k e l) a partir dos perfis de distância elétrica ao longo do domínio sensor de voltagem usando a relação

$$\mu_{kl} = \frac{1}{Z_{extra} - Z_{intra}} \int_{Z_{intra}}^{Z_{extra}} [\phi_k(\mathbf{v}(z)) - \phi_l(\mathbf{v}(z))] |\dot{\mathbf{v}}(z)| dz \quad [3.14]$$

em que \mathbf{v} é o vetor paramétrico correspondente ao eixo principal da cavidade do domínio sensor de voltagem (figura 16), cujos limites são denotados por Z_{extra} e Z_{intra} . Quando calculada entre as conformações ativada (\mathbf{X}) e desativada (\mathbf{Y}) de um mesmo sistema, μ_{kl} representa uma estimativa da remodelação do campo elétrico proveniente dos movimentos da hélice S4. Se o cálculo de for realizado entre as mesmas conformações de diferentes sistemas (\mathbf{XX}^* ou \mathbf{YY}^*), o valor de μ_{kl} corresponde à remodelação do campo elétrico ocasionada por perturbações químicas entre os diferentes sistemas.⁴⁵

Os perfis de distância elétrica (figura 28) utilizados para os cálculos de μ_{kl} mostraram-se similares entre os diferentes sistemas. Nos estados ativado e desativado do Kv1.2 sem anestésicos há uma queda substancial da distância elétrica em uma faixa de 20 Å em torno da F233, a qual corresponde a aproximadamente 72% de todo o acoplamento com o campo elétrico. Já no caso de membranas puras, essa queda é menos pronunciada e tende a ser linear ao longo da espessura da membrana (40 Å) da membrana. A inclinação mais acentuada dos perfis de distância elétrica em torno da F233, em contraste com perfis de membrana pura, é o

indicativo de focalização do campo elétrico.^{36,45} Esse mesmo comportamento foi observado para os sistemas de *flooding*. Apesar de apresentarem pequenas variações, os perfis de distância elétrica se mantiveram próximos aos perfis do Kv1.2 sem anestésicos e preservaram a focalização do campo elétrico.

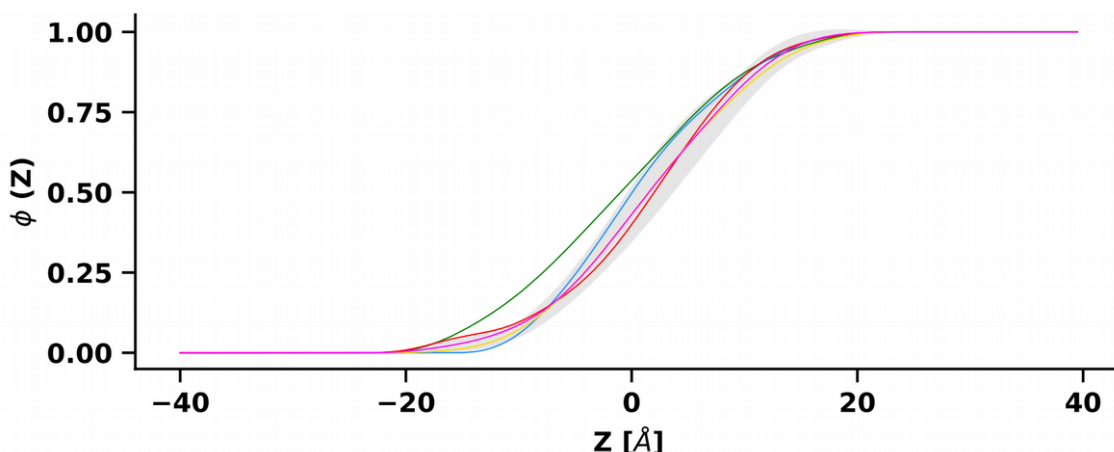


Figura 28. Perfis de distância elétrica ao longo do eixo z para membrana (verde), Kv1.2 aberto (azul), Kv1.2 fechado (vermelho), sistemas com sevoflurano (amarelo) e sistemas com isoflurano (magenta). Os sistemas de *flooding* estão representados como curva média sombreada com o desvio padrão.

Na figura 29 são mostradas as estimativas de μ_{kl} para os sistemas de *flooding* na forma de matriz. Valores na diagonal representam os cálculos realizados entre conformações do mesmo sistema (XX). Já na região triangular superior são mostrados os valores de μ_{kl} entre as conformações ativadas dos diferentes sistemas (XX^*), enquanto na região triangular inferior estão representadas as estimativas para as conformações desativadas (YY^*). As variações mais proeminentes foram de $\mu_{kl}^{XY} = 0,98$, $\mu_{kl}^{XX^*} = 0,57$ e $\mu_{kl}^{YY^*} = 0,83$, as quais correspondem aos sistemas Kv1.2*-sevoflurano/Kv1.2*-sevoflurano, Kv1.2*-sevoflurano/Kv1.2*-isoflurano, Kv1.2*-isoflurano/Kv1.2*-sevoflurano. É interessante notar que os sistemas mutantes com sevoflurano apresentaram as remodelações mais proeminente do campo elétrico no interior dos domínios sensores de voltagem.

Como no Kv1.2 há quatro aminoácidos positivamente carregados que atravessam o campo elétrico, esses valores de μ_{kl} correspondem a variações de ΔQ_{kl} de no máximo $0,4e_0$. No âmbito de potenciais transmembrânicos fisiologicamente relevantes (100 mV ou $3,86kT/e_0$), a contribuição das remodelações do campo elétrico nos sistemas contendo anestésicos para a energética dos domínios sensores de voltagem foi de no máximo $1,6kT$, valores compatíveis com a energia térmica dos canais. Além disso, os valores de μ_{kl} aqui

apresentados estão abaixo dos observados entre proteínas evolutivamente não aparentadas e cujas sequências primárias são consideravelmente distintas.⁴⁵ Com isso, pode-se concluir que as remodelações do campo elétrico causadas pela presença de anestésicos não contribuem para as diferenças de energia livre entre as conformações dos domínios sensores de voltagem e, portanto, não contribuem para a modulação do canal Kv1.2 por anestésicos gerais.

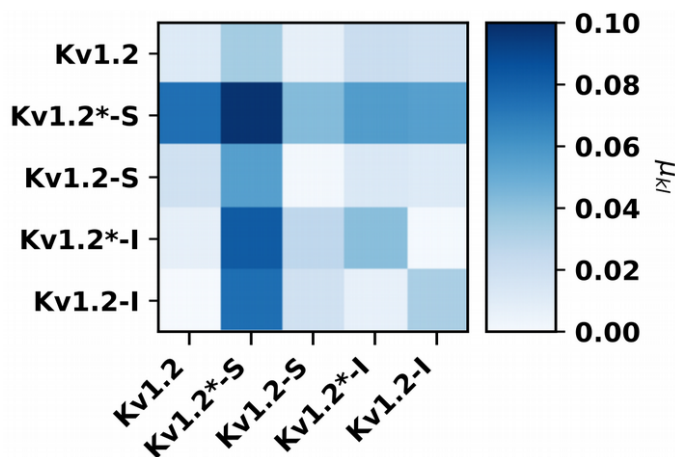


Figura 29. Estimativas de μ_{kl} para o Kv1.2 selvagem sem anestésicos (Kv1.2), mutante com sevoflurano (Kv1.2*-S), selvagem com sevoflurano (Kv1.2-S), mutante com isoflurano (Kv1.2*-I) e selvagem com isoflurano (Kv1.2-I). Valores na diagonal foram calculados entre as conformações aberta e fechada do mesmo sistema. Nos triângulos superior e inferior, o μ_{kl} foi estimado somente entre as conformações abertas ou fechadas dos diferentes canais respectivamente.

A pressão lateral exercida pela membrana nos canais iônicos pode ter uma grande impacto no seu mecanismo de ação, como é observado em canais mecanossensíveis.¹³⁴ Cantor propôs que a modulação de canais iônicos por anestésicos pode se dar por mudanças no perfil de pressão lateral de membranas fosfolipídicas.⁸¹ A natureza anfipática dos fosfolípeos faz com que as regiões polares se contraiam de forma a esconder as caudas alifáticas, que por sua vez tendem a ocupar um volume maior e compensar o estresse da região de interface. Visto que o núcleo hidrofóbico tem aproximadamente 30 Å de espessura e que cada região de interface tem aproximadamente 5 Å, esperam-se pressões laterais na faixa de 350 atm e 1000 atm respectivamente. Assim, mesmo perturbações locais relativamente pequenas na pressão lateral podem resultar em grandes efeitos energéticos, dada a magnitude das pressões laterais nas membranas. Mudanças na pressão lateral das membranas podem, por fim, ter um impacto funcional em proteínas de membrana caso haja variações na área dessas proteínas ao longo do eixo perpendicular às membranas e entre diferentes conformações.^{81,134}

Os perfis de pressão lateral dos sistemas contendo apenas membrana (figuras 30 e 31, gráfico superior, curva verde) mostraram-se concordantes com os perfis encontrados em

outros estudos.¹³⁴ Há uma queda de pressão na região da interface membrana-água (figuras 30 e 31, gráficos inferiores, curvas verde e azul) devido à compactação dos grupos polares da membrana. Essa queda é seguida de um aumento compensatório da pressão lateral no início das cadeias alifáticas, o qual se reduz em direção ao centro da membrana. Há uma simetria nos perfis de pressão lateral visto que as membranas são homogêneas e há a mesma quantidade de fosfolípídeos em cada monocamada. Ao adicionar anestésicos (figuras 30 e 31, gráfico superior, curvas azul e vermelha), há um aumento generalizado na pressão lateral proporcional à concentração. Esse aumento é mais pronunciado na interface entre os grupos polares e as cadeias alifáticas dos fosfolípídeos, provavelmente causado pela grande quantidade de anestésicos nessa região, como evidenciado pelas curvas magenta dos perfis de densidade eletrônica (figuras 30 e 31). Há estudos reportando a preferência dessas moléculas por essa região interfacial.¹³⁰ No caso do isoflurano, quando a 150 mM as moléculas anestésicas tendem a se espalhar mais ao longo das cadeias alifáticas, fazendo com que o aumento da pressão lateral seja menos localizado. Apesar das mudanças no perfil de densidade eletrônica serem pequenas, é importante ressaltar que o valor absoluto da pressão local nas regiões interfaciais da membrana são altas e, portanto, pequenas alterações nesse ambiente causam grandes variações nos perfis de pressão. Assim como descrito por Cantor⁸¹, observou-se que a presença de anestésicos é capaz de provocar perturbações na pressão lateral de membranas, mesmo que em baixas concentrações (como 10 mM).

As áreas das secções do Kv1.2 variaram ao longo do eixo z (perpendicular à membrana) de forma diferente entre as conformações aberta e fechada (figura 32). Na região da membrana (-25 a 25 Å), o perfil de área da conformação fechada apresenta, de forma geral, valores menores comparados com os da conformação aberta. Entretanto, ao se aproximar das extremidades da membrana, a área da conformação fechada tende a ser maior (diferenças de até 220 Å²). Pode-se, portanto, afirmar que há mudanças na forma do Kv1.2 quando este transita entre as duas conformações. As alterações de área associadas com as perturbações nos perfis de pressão lateral são um indicativo de que os anestésicos aqui estudados podem mudar a energética do Kv1.2 de uma forma não específica mediada pela membrana.

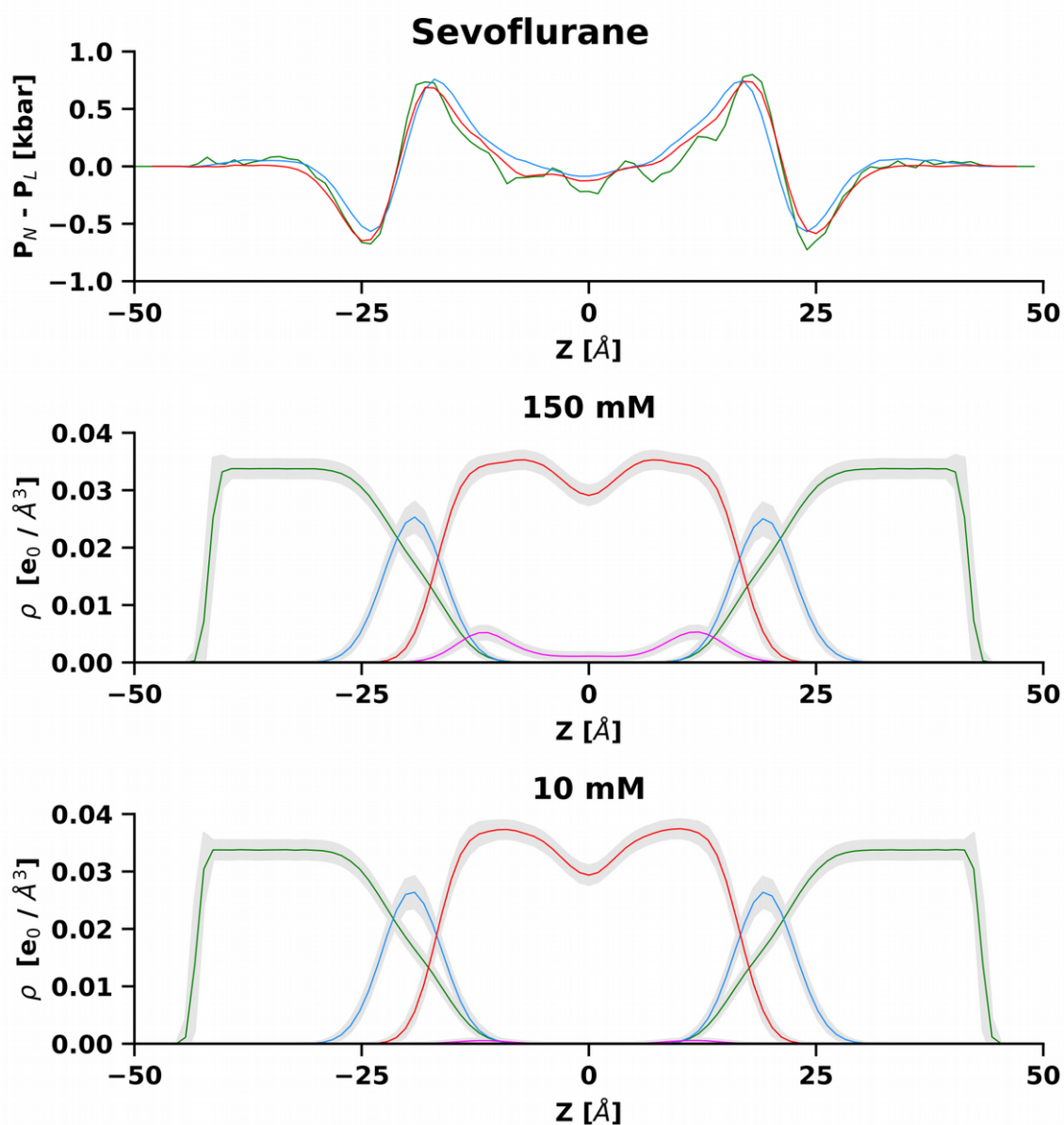


Figura 30. Perfis de pressão lateral e densidade eletrônica para flooding da membrana com sevoflurano. (**Superior**) Perfil de pressão lateral para membrana pura (verde), membrana com 10 mM de sevoflurano (vermelho) e membrana com 150 mM de sevoflurano (azul). (**Centro**) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 150 mM de sevoflurano. (**Inferior**) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 10 mM de sevoflurano. Nos perfis de densidade eletrônica, estão representadas as densidade da água (verde), das cadeias polares da membrana (azul), das cadeias alifáticas da membrana (vermelho) e das moléculas de sevoflurano (magenta). As regiões sombreadas correspondem ao desvio padrão das medidas. A origem da coordenada z corresponde ao centro da membrana.

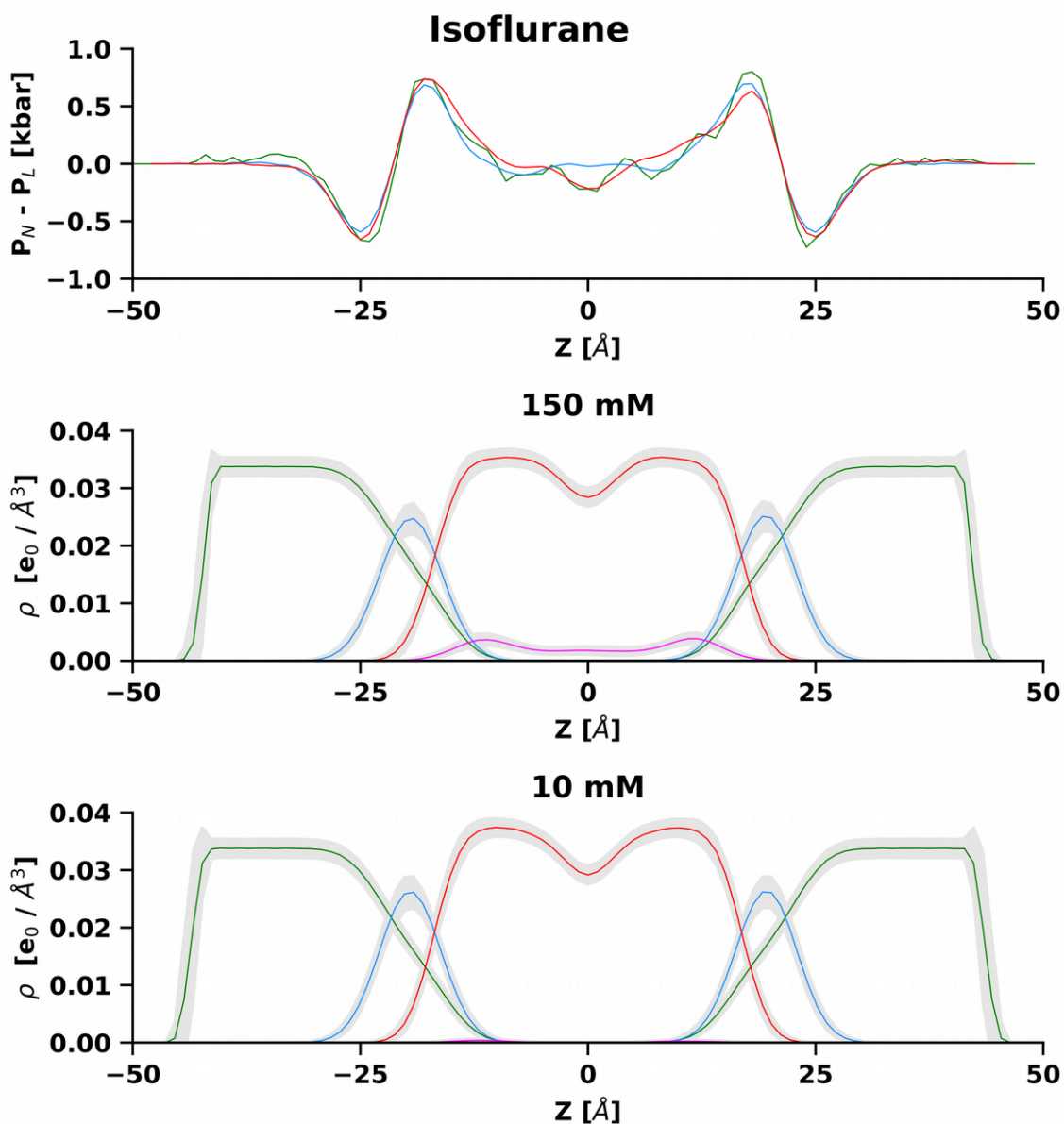


Figura 31. Perfis de pressão lateral e densidade eletrônica para flooding da membrana com isoflurano. (**Superior**) Perfil de pressão lateral para membrana pura (verde), membrana com 10 mM de isoflurano (vermelho) e membrana com 150 mM de isoflurano (azul). (**Centro**) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 150 mM de isoflurano. (**Inferior**) Perfil de densidade eletrônica para o sistema com membrana e 10 mM de isoflurano. Nos perfis de densidade eletrônica, estão representadas as densidade da água (verde), das cadeias polares da membrana (azul), das cadeias alifáticas da membrana (vermelho) e das moléculas de isoflurano (magenta). As regiões sombreadas correspondem ao desvio padrão das medidas. A origem da coordenada z corresponde ao centro da membrana.

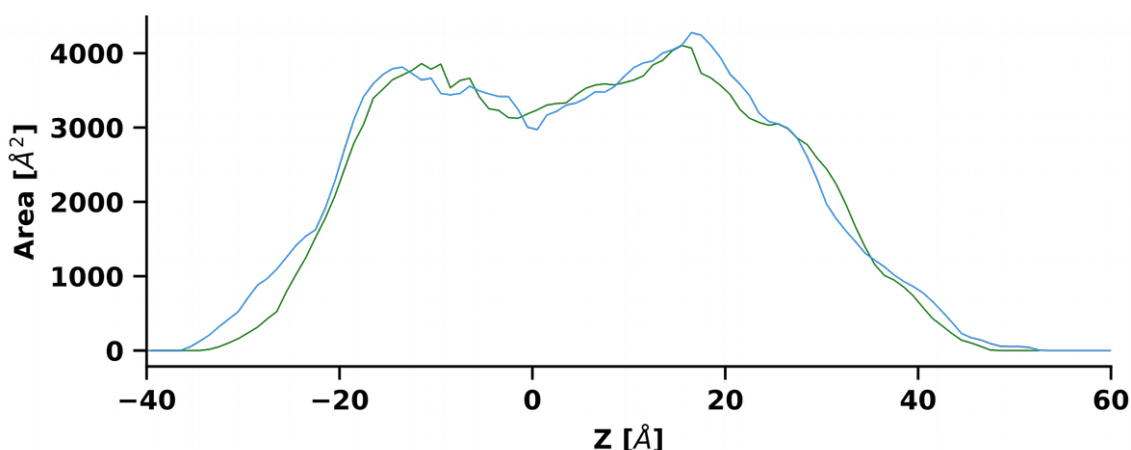


Figura 32. Perfil de área do Kv1.2 ao longo do eixo z (perpendicular a membrana). Estão representadas as áreas das conformações aberta (verde) e fechada (azul).

A condução iônica do Kv1.2 se inicia em potenciais transmembrânicos de aproximadamente -50mV e atinge o seu ápice por volta de 25 mV (figura 33, curvas verdes). Na presença de sevoflurano, o canal começa a conduzir com voltagens menores, ocasionando um deslocamento para a esquerda nas curvas de condutância (figura 33, curvas azul). Há também um aumento da condutância máxima, ou seja, uma potencialização do Kv1.2.¹⁰⁴ Ao avaliar as curvas de condutância segundo o modelo proposto na seção 3.2.5, observou-se que o sevoflurano e o isoflurano, tanto em 10 mM quanto em 150 mM, deslocam as curvas de condutância para a esquerda, assim como observado nos dados experimentais. Assim, o modelo indica que esses anestésicos aumentam a sensibilidade do Kv1.2 a voltagens menores (figura 33, curvas vermelha e amarela). No entanto, esse deslocamento foi consideravelmente maior que o observado nos dados experimentais. Além disso, o aumento de sensibilidade na presença de sevoflurano foi proporcional à sua concentração, mas inversamente proporcional no caso do isoflurano, reforçando a existência de um erro quantitativo nessas previsões.

Um sistema termodinâmico com apenas dois estados conformacionais, como é o caso do modelo da figura 33, não é capaz de explicar o aumento de condutância máxima causado pelos anestésicos. Os estados aberto e fechado modulam a condução iônica de forma binária, ou seja, na conformação aberta há condução iônica sob uma taxa fixa enquanto na conformação fechada não há condução. Seria necessário adicionar um terceiro estado (aberto porém não condutor) para modelar corretamente o aumento na condutância em presença de sevoflurano e isoflurano.¹⁰³

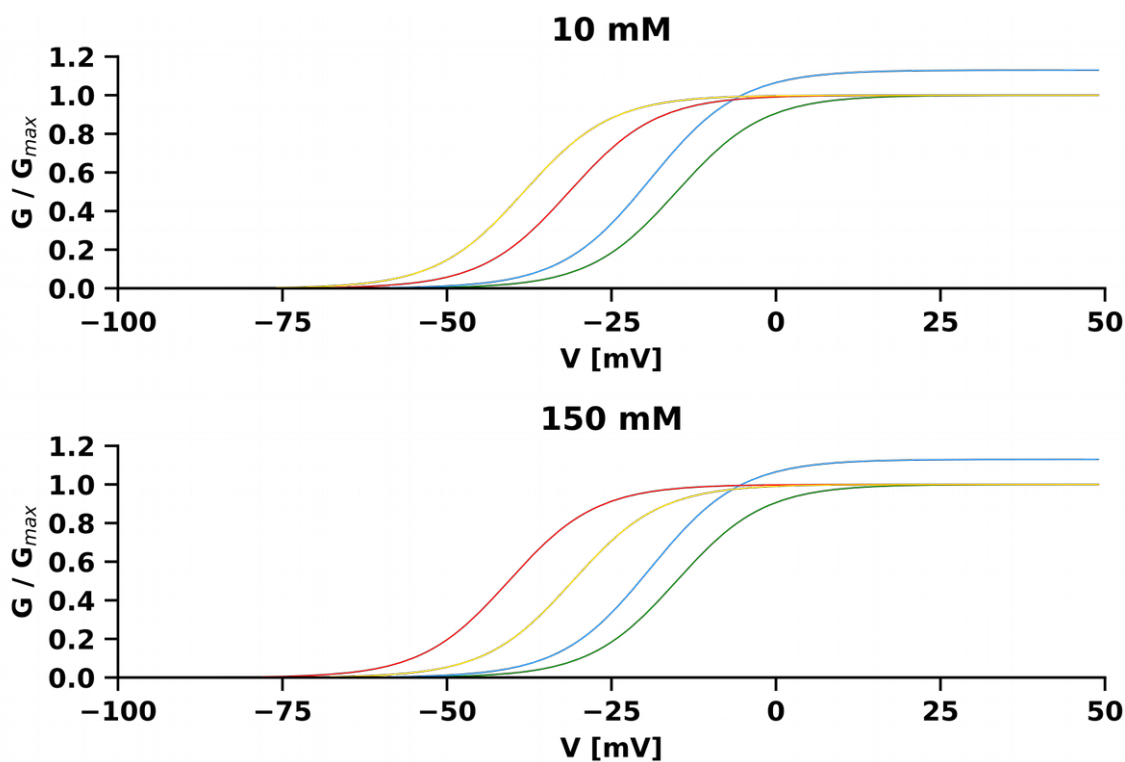


Figura 33. Curvas de condutância por voltagem experimentais e calculadas segundo modelo de Cantor modificado. Estão representadas as curvas para o Kv1.2 sem anestésicos (verde), Kv1.2 com sevoflurano (azul), flooding com sevoflurano (vermelho) e flooding com isoflurano (amarelo).

As curvas de condutância calculadas estão qualitativamente de acordo com os dados experimentais, no entanto não foram capazes de reproduzir fielmente os valores absolutos. Apesar desse modelo não ser capaz de explicar completamente as curvas de condutância do Kv1.2 na presença de anestésicos gerais, infere-se dele que os efeitos mediados por membrana podem ter um papel importante na modulação dessas proteínas. Essa observação reforça a hipótese de que a modulação do Kv1.2 por anestésicos gerais se dá por múltiplos mecanismos envolvendo tanto efeitos diretos quanto indiretos.

Prosseguiu-se a análise dos efeitos indiretos, avaliando mudanças na espessura das membranas na presença de 150 mM de sevoflurano e isoflurano. As figuras 34 e 35 mostram que não houveram alterações significativas entre as espessuras das membranas com e sem a presença de anestésicos, tanto levando em consideração os grupos polares quanto as cadeias alifáticas dos lipídeos. Os valores das espessuras permaneceram praticamente constantes ao longo do 300 ns de simulação. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores que mostraram que anestésicos nessas concentrações não são capazes de causar alterações neste tipo de propriedades físicas das membranas.^{79,80}

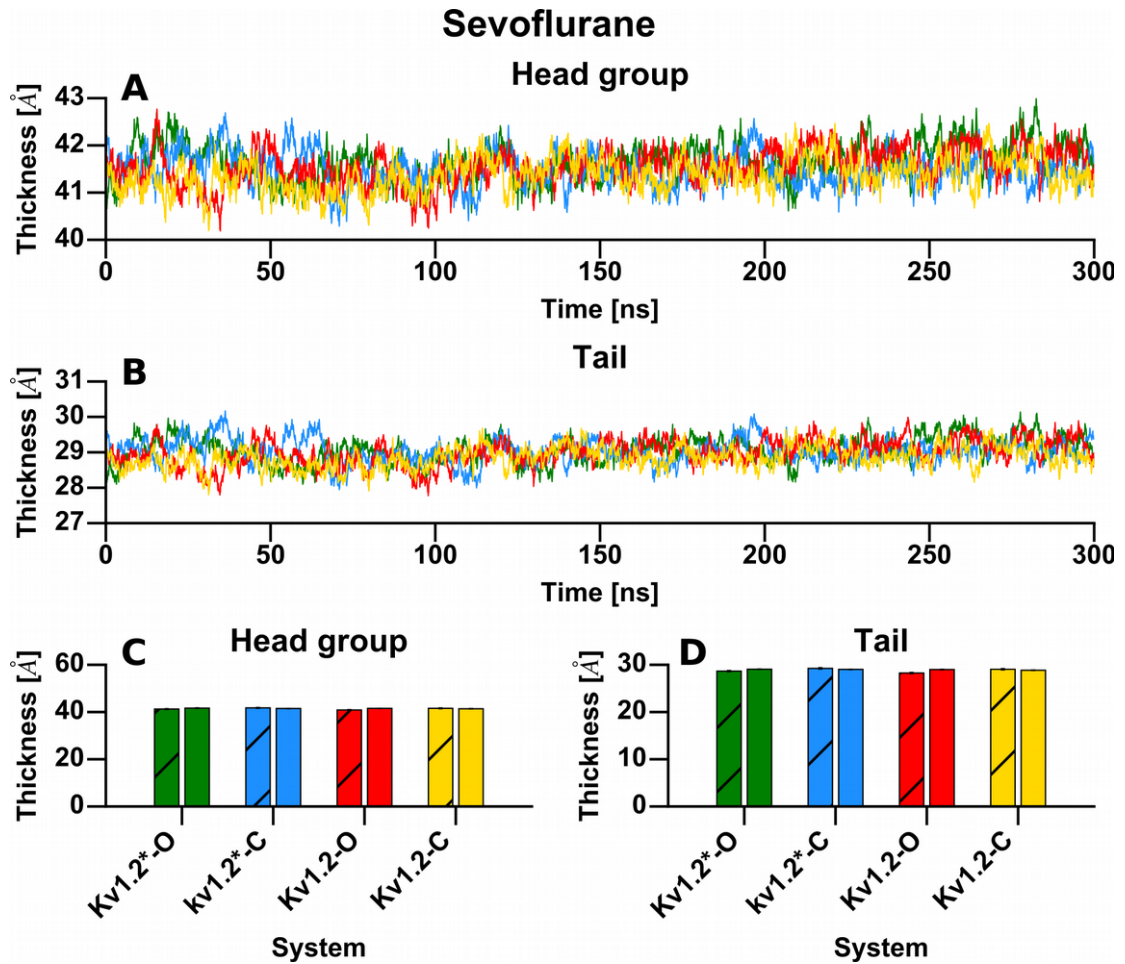


Figura 34. Espessura das membranas nas simulações com sevoflurano considerando os grupos polares (A e C) ou apenas as caudas alifáticas (B e D) dos fosfolípidos. (A e B) Evolução temporal da espessura das membranas ao longo das simulações para o Kv1.2*-O (verde), Kv1.2*-C (azul), Kv1.2-O (vermelho) e Kv1.2-C (amarelos). (C e D) Espessura média das membranas nas simulações de referência (hachurado) e nas simulações de flooding (liso).

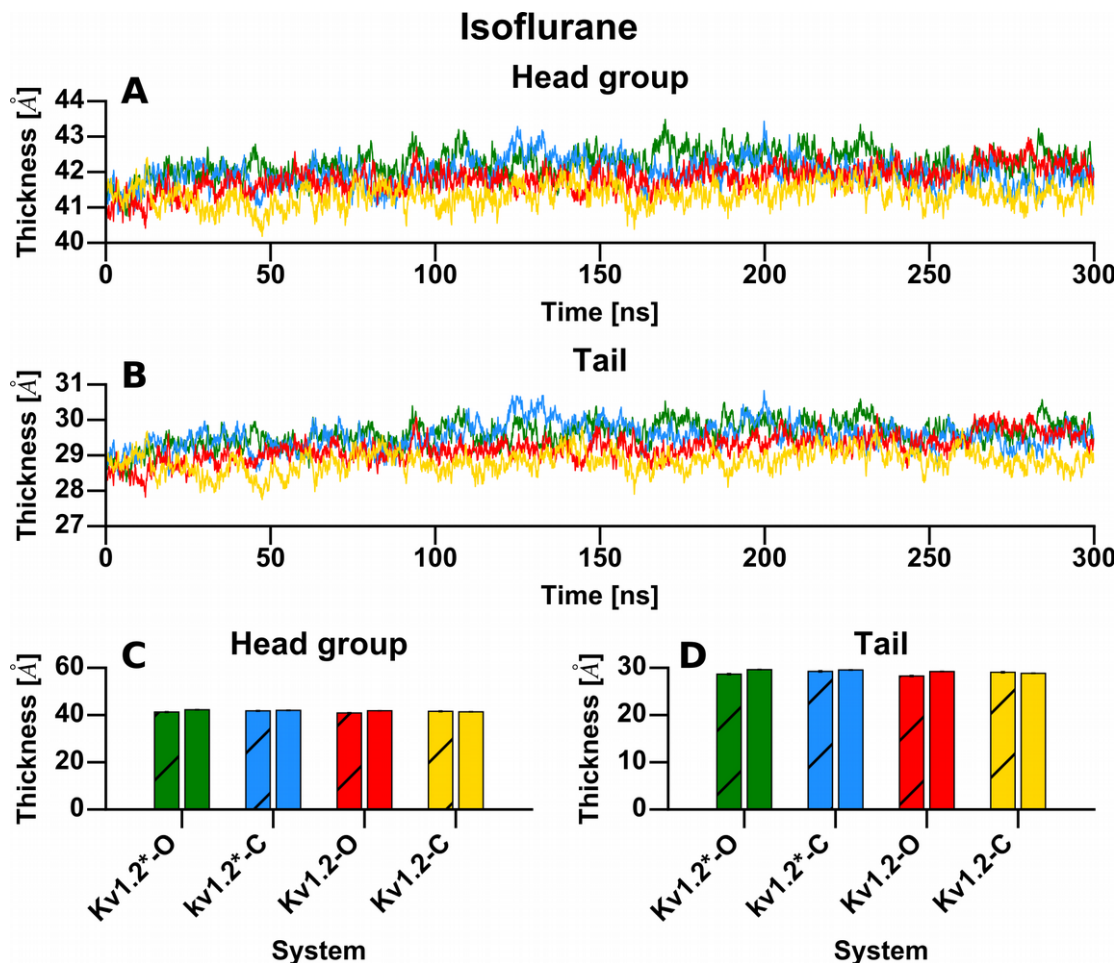


Figura 35. Espessura das membranas nas simulações com sevoflurano considerando os grupos polares (A e C) ou apenas as caudas alifáticas (B e D) dos fosfolípideos. (A e B) Evolução temporal da espessura das membranas ao longo das simulações para o Kv1.2*-O (verde), Kv1.2*-C (azul), Kv1.2-O (vermelho) e Kv1.2-C (amarelos). (C e D) Espessura média das membranas nas simulações de referência (hachurado) e nas simulações de flooding (liso).

Parâmetros de ordem são um indicativo comumente usados para averiguar a organização dos fosfolípideos nas membranas. Nas figuras 36 e 37 foram representados os parâmetros de ordem tanto para os lipídeos próximos quanto para os afastados das proteínas. Os valores obtidos em todas as análises estão de acordo com medidas realizadas anteriormente para membranas de fosfatidilcolina.¹³⁵ Com exceção dos lipídeos próximos às proteínas nas conformações abertas, não houveram mudanças significativas entre os parâmetros de ordem dada a presença de anestésicos. As variações observadas nos lipídeos perto das proteínas podem ser explicadas pela maior concentração de anestésicos nas proximidades das proteínas em comparação com áreas mais afastadas da membrana juntamente com a maior acessibilidade de anestésicos na conformação aberta. Há cerca de 80% mais moléculas de sevoflurano por fosfolípideo nas proximidades da proteína (figura 38). Para o isoflurano, esse aumento de concentração chega a 67%. No entanto, essas altas

concentrações não explicam por si só a dependência conformacional das alterações dos parâmetros de ordem. É necessário também levar em consideração a presença de anestésicos em sítios onde as cadeias alifáticas dos lipídeos comumente se ancoram no Kv1.2, como é o caso do sítio 1. Este sítio é uma cavidade exposta para os lipídeos da membrana. O volume dessa cavidade aumenta na conformação aberta do Kv1.2, permitindo que as cadeias alifáticas dos lipídeos se ancoram nela. Ao interagir com esse sítio, as moléculas anestésicas deslocam as cadeias lipídicas que antes ocupavam este volume, causando reorientações das cadeias alifáticas, que são refletidas no parâmetro de ordem dos lipídeos (figura 39). Essas reacomodações reforçam a hipótese de que efeitos não específicos podem tanto regular o Kv1.2 quanto influenciar na interação dos anestésicos sevoflurano e isoflurano com este canal.

Sevoflurane

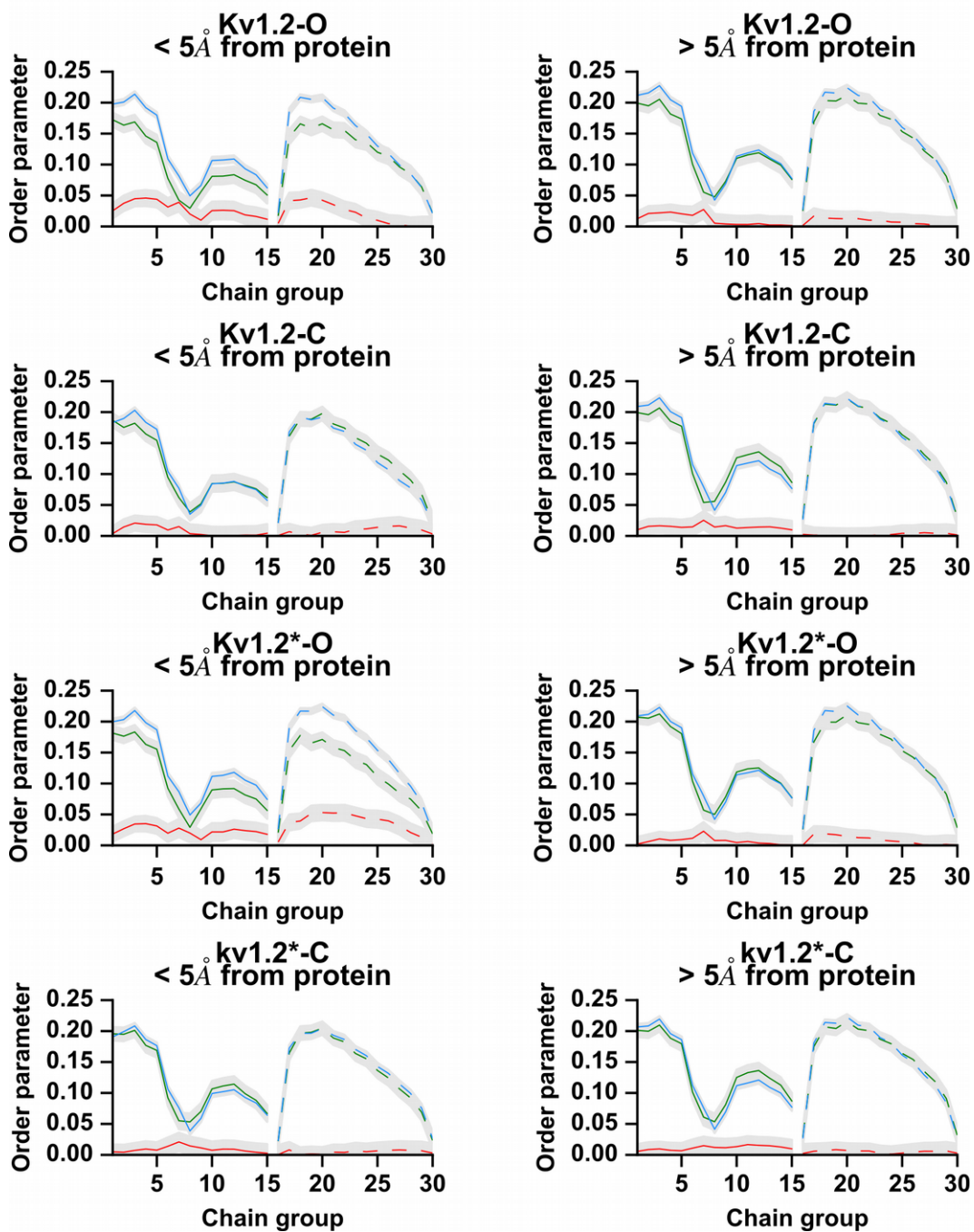


Figura 36. Parâmetros de ordem para lipídeos próximos e afastados das proteínas na presença de sevoflurano. Os grupos de 1 a 15 (linhas sólidas) pertencem à cadeia insaturada da fosfatidilcolina e os grupos de 16 a 30 (linhas tracejadas) fazem parte da cadeia saturada. Os parâmetros de ordem das simulações de referência, de flooding e da diferença entre as duas estão representados em verde, azul e vermelho respectivamente. A área em cinza corresponde ao desvio padrão de cada medida apresentada.

Isoflurane

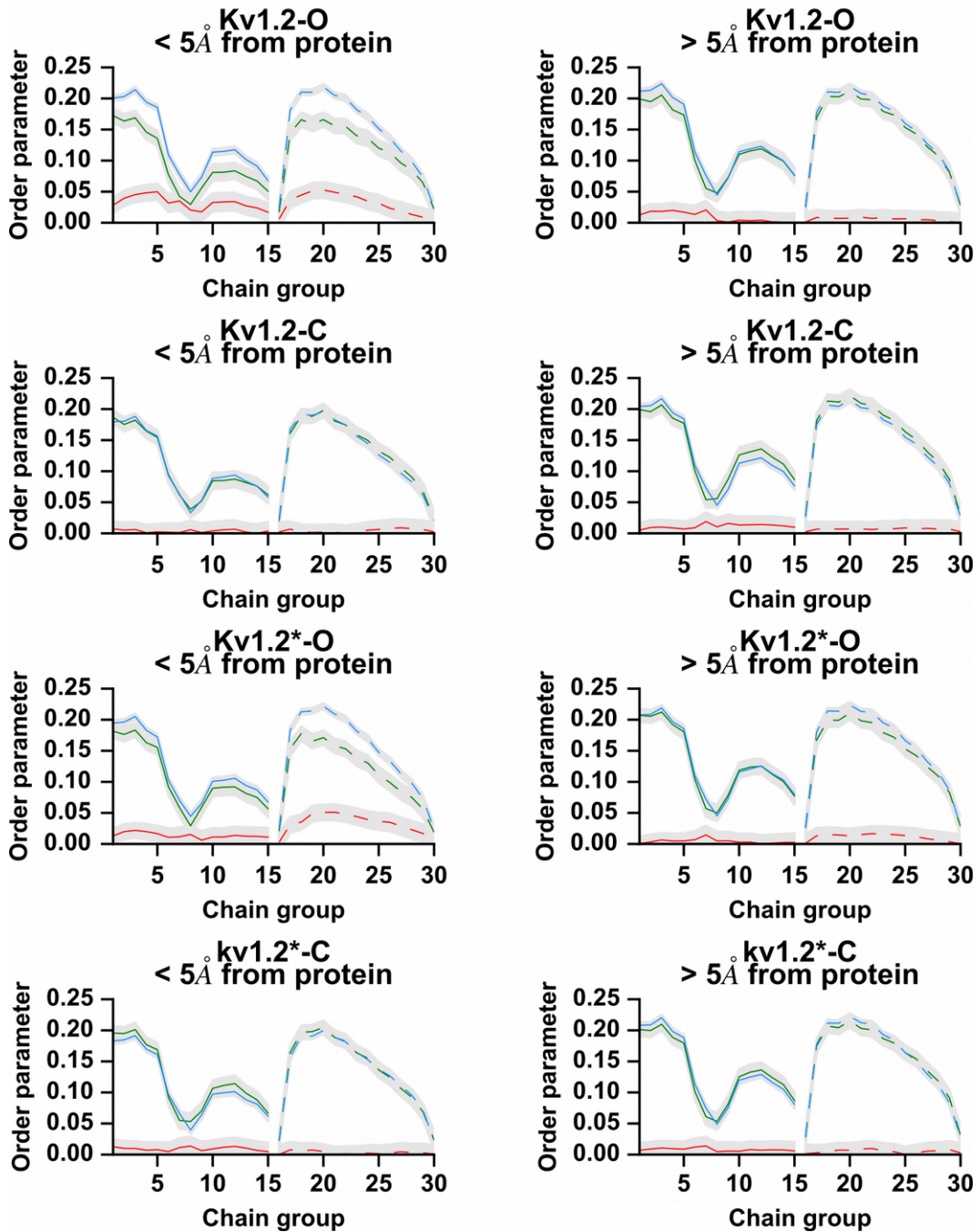


Figura 37. Parâmetros de ordem para lipídeos próximos e afastados das proteínas na presença de isoflurano. Os grupos de 1 a 15 (linhas sólidas) pertencem à cadeia insaturada da fosfatidilcolina e os grupos de 16 a 30 (linhas tracejadas) fazem parte da cadeia saturada. Os parâmetros de ordem das simulações de referência, de flooding e da diferença entre as duas estão representados em verde, azul e vermelho respectivamente. A área em cinza corresponde ao desvio padrão de cada medida apresentada.

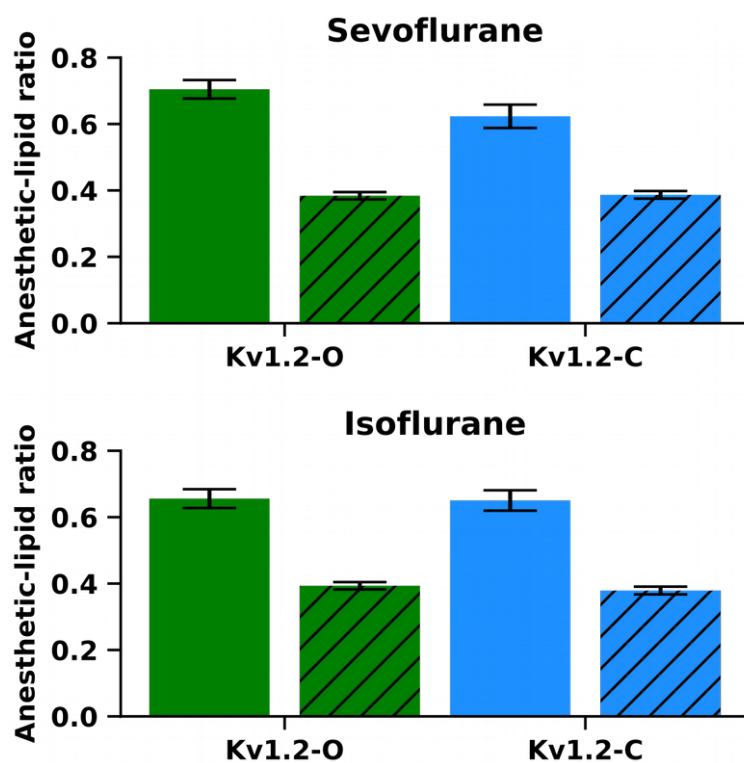


Figura 38. Proporção de anestésicos por fosfolípido para o flooding de sevoflurano e isoflurano nas conformações aberta (O) e fechada (C) do Kv1.2 selvagem. As barras sólidas e hachuradas correspondem aos fosfolípidos próximos (< 5 Å) e afastados (> 5 Å) da proteína.

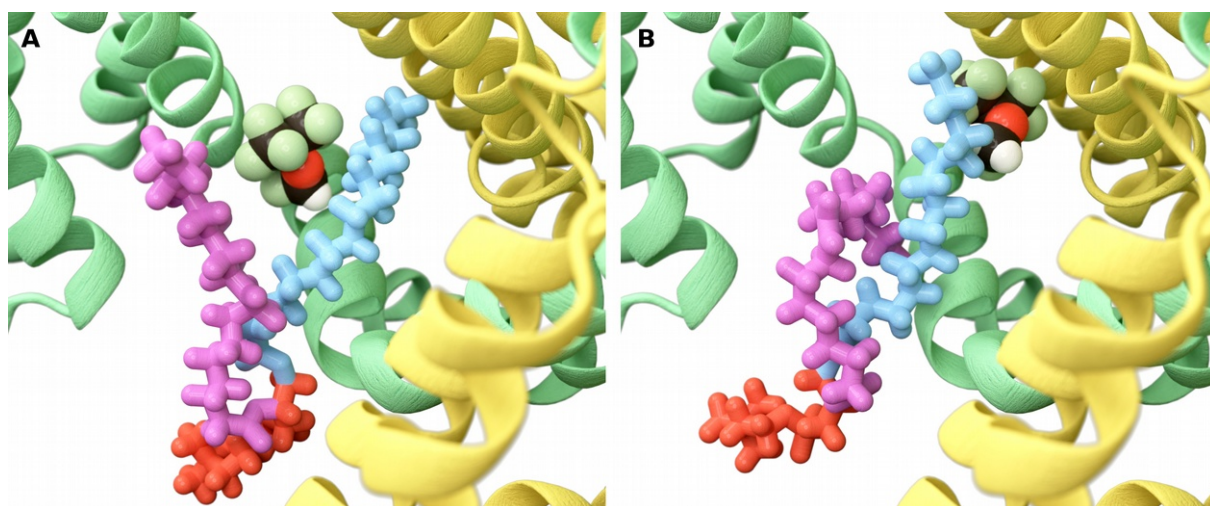


Figura 39. Exemplo de deformações causadas nos fosfolípidos pela presença de anestésicos. (A) Fosfatidilcolina com a cadeia alifática saturada (azul) ocupando o sítio 1, impedindo a entrada de uma molécula de sevoflurano. (B) Após a entrada do sevoflurano no sítio 1, ambas as cadeias saturada (azul) e insaturada (violeta) são deformadas para acomodar o anestésico.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo analisou a interação de alguns anestésicos gerais com as conformações aberta e fechada do canal Kv1.2 selvagem e de sua variante mutante (G329T). Valendo-se de diversas técnicas computacionais, como *docking* molecular e *flooding*, buscou-se compreender como essas moléculas anestésicas interagem com o Kv1.2 e racionalizar os efeitos de potencialização observados nesses canais.

O sevoflurano e o isoflurano interagem de forma desigual em diversas regiões das proteínas estudadas. Tanto o *docking* molecular quanto o *flooding* evidenciaram a existência de diversos sítios de interação, regiões nas quais há uma maior presença de anestésicos, dependentes da conformação do canal ou da presença da mutação G329T. Os resultados de *docking* molecular apontaram para uma maior afinidade dos anestésicos gerais por sítios na região da hélice S4-S5 nas conformações fechadas do Kv1.2, e por um sítio próximo ao filtro de seletividade (hélice P) na conformação aberta. Cálculos de energia livre do sevoflurano nesses sítios também mostraram que há em geral uma maior afinidade pela conformação

fechada do Kv1.2. No caso do canal mutante, entretanto, os sítios 3 e 9 apresentaram uma maior afinidade pela conformação aberta. Segundo esses cálculos, não houve dependência conformacional para o sítio 12, que se localiza atrás do filtro de seletividade. Nas simulações de *flooding*, a frequência de anestésico nos sítios da hélice S4-S5 e nos sítios relacionados ao filtro de seletividade é maior para a conformação aberta tanto do canal selvagem quanto do canal mutante.

Análises posteriores mostraram a correlação entre a interação do sevoflurano e isoflurano com a dinâmica interna do Kv1.2. A presença desses anestésicos modificou o acoplamento dos movimentos de regiões importantes para o funcionamento dos canais, como a região de comunicação do domínio sensor de voltagem com o domínio do poro, ou a região do filtro de seletividade. A diminuição no acoplamento do portão hidrofóbico, no domínio do poro no canal mutante, pode explicar a maior facilidade de abertura dessa proteína em potenciais transmembrânicos menores. Já a maior coesão da estrutura do filtro de seletividade apontam para uma facilitação da condução iônica na presença dos anestésicos gerais.

Efeitos indiretos e não específicos também podem também influenciar na modulação do Kv1.2. A partição de moléculas anestésicas para a membrana foi capaz de alterar os perfis de pressão lateral neste ambiente. A associação desses efeitos com variações na área do Kv1.2 entre conformações apontaram para um possível efeito mediado por membrana no equilíbrio entre as conformações desse canal. Mudanças no microambiente da membrana, como evidenciadas pelos parâmetros de ordem, podem inclusive alterar a cinética ou termodinâmica da ligação de anestésicos nos sítios localizados na interface proteína-membrana. Já outros efeitos indiretos, como a compactação da membrana ou alterações no acoplamento da hélice S4 com o campo elétrico, mostraram-se menos relevantes para esse processo.

Os resultados apresentados neste estudo reforçam a hipótese de que a modulação do Kv1.2 por anestésicos gerais ocorre através do balanço entre múltiplas forças que atuam concomitantemente. Os anestésicos sevoflurano e isoflurano podem interagir simultaneamente em sítios que contribuem tanto com a manutenção do estado aberto quanto com a estabilização do estado fechado, ou mesmo com a manutenção da condução iônica máxima. Além das interações diretas, há também a modulação via efeitos não específicos, como alterações na pressão lateral das membranas ou na dinâmica dos fosfolípidos. Assim, a modulação do Kv1.2 por anestésicos seria o resultado do balanço final de todos esses efeitos. Nesse cenário, a mutação G329T seria responsável por realizar uma espécie de ajuste fino

nesse processo ao alterar seletivamente a ação de alguns desses elementos, como por exemplo diminuindo a afinidade de sítios que favoreçam o estado fechado.

Para validar a hipótese de múltiplos efeitos, é crucial a compreensão do impacto funcional, tanto dos efeitos diretos quanto dos efeitos indiretos. Análises energéticas são úteis para validar o papel modulatório dos sítios encontrados frente a dados experimentais, mas não são suficientes para explicar os mecanismos moleculares que delineiam esses processos. Assim, é necessário investigar os efeitos na dinâmica dos canais causados pela presença de anestésicos em sítios específicos e pelas alterações no ambiente da membrana.

A grande quantidade de dados fornecidos pelas simulações de *flooding* aliadas a descritores estruturais ou dinâmicos forneceram informações valiosas acerca do impacto funcional da presença de anestésicos ou de mutações, como a G329T. Ao calcular as redes de acoplamento de movimento ao longo dos 100 últimos nanossegundos das simulações de *flooding*, obteve-se um conjunto de dados com cerca de 11 bilhões de pontos para cada um dos 8 sistemas. Pode-se, então, empregar métodos estatísticos capazes de encontrar padrões e gerar modelos preditivos entre esses dados e as 5 milhões de configurações de anestésicos ligados ao Kv1.2 provenientes das simulações de *flooding*. Esses modelos auxiliariam na compreensão do impacto funcional da interação do Kv1.2 com anestésicos gerais e na investigação dos efeitos da mutação G329T. Por fim, pode-se propor novos experimentos com mutações visando validar as predições desse modelo.

Referências bibliográficas

1. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman, 2013).
2. Kandel, E. R. *Principles of neural science*. (McGraw-Hill, 2013).
3. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* 116, 449–472 (1952).
4. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* 116, 497–506 (1952).
5. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* 116, 473–496 (1952).
6. Narahashi, T., Moore, J. W. & Scott, W. R. Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *The Journal of General Physiology* 47, 965–974 (1964).
7. Nakamura, Y., Nakajima, S. & Grundfest, H. Analysis of Spike Electrogenesis and Depolarizing K Inactivation in Electroplaques of *Electrophorus electricus*, L. *The Journal of General Physiology* 49, 321–349 (1965).
8. Kao, C. Y. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacological reviews* 18, 997–1049 (1966).
9. Tasaki, I. & Hagiwara, S. Demonstration of Two Stable Potential States in the Squid Giant Axon Under Tetraethylammonium Chloride. *The Journal of General Physiology* 40, 859–885 (1957).
10. Sakmann, B. & Neher, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology* 46, 455–472 (1984).
11. Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. & Numa, S. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127 (1984).
12. Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775 (1987).
13. Moore, J. W. Membranes, Ions and Impulses. A Chapter of Classical Biophysics. Kenneth S. Cole. University of California, Berkeley, 1968. x + 572 pp., illus. \$15. Biophysics Series, Vol. 1. *Science* 163, 268–268 (1969).
14. Kullmann, D. M. & Hanna, M. G. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. *The*

- Lancet Neurology* 1, 157–166 (2002).
15. Sokolov, S., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 446, 76–78 (2007).
 16. Goldin, A. L. Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 38–50 (1999).
 17. Napolitano, C., Rivolta, I. & Priori, S. G. Cardiac Sodium Channel Diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41, (2003).
 18. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* 309, 897–903 (2005).
 19. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. (Sinauer, 2001).
 20. Seoh, S.-A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F. Voltage-Sensing Residues in the S2 and S4 Segments of the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* 16, 1159–1167 (1996).
 21. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* 16, 1169–1177 (1996).
 22. Treptow, W., Tarek, M. & Klein, M. L. Initial Response of the Potassium Channel Voltage Sensor to a Transmembrane Potential. *Journal of the American Chemical Society* 131, 2107–2109 (2009).
 23. Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* 31, 239–295 (1998).
 24. Catterall, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13–25 (2000).
 25. Liu, J. & Siegelbaum, S. A. Change of Pore Helix Conformational State upon Opening of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Neuron* 28, 899–909 (2000).
 26. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382 (2007).
 27. Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A. & MacKinnon, R. A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors. *Science* 328, 67–73 (2010).
 28. Lacroix, J. J. & Bezanilla, F. Control of a final gating charge transition by a hydrophobic residue in the S2 segment of a K⁺ channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6444–6449 (2011).
 29. Vargas, E., Yarov-Yarovoy, V., Khalili-Araghi, F., Catterall, W. A., Klein, M. L., Tarek, M., Lindahl, E., Schulten, K., Perozo, E., Bezanilla, F. & Roux, B. An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *The Journal of General Physiology* 140, 587–594 (2012).
 30. Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C. & Treptow, W. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6109–6114 (2011).
 31. Catterall, W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67, 915–928 (2010).
 32. Vargas, E., Bezanilla, F. & Roux, B. In Search of a Consensus Model of the Resting State of a Voltage-

- Sensing Domain. *Neuron* 72, 713–720 (2011).
33. DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Sharp, E. M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 22498–22503 (2009).
 34. DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na⁺ channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 18825–18830 (2011).
 35. Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P. G., Westenbroek, R. E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D. & Catterall, W. A. Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E93–E102 (2012).
 36. Treptow, W. & Tarek, M. Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* 90, L64–L66 (2006).
 37. Jogini, V. & Roux, B. Dynamics of the Kv1.2 Voltage-Gated K⁺ Channel in a Membrane Environment. *Biophysical Journal* 93, 3070–3082 (2007).
 38. Sokolov, S., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Ion Permeation through a Voltage- Sensitive Gating Pore in Brain Sodium Channels Having Voltage Sensor Mutations. *Neuron* 47, 183–189 (2005).
 39. Krepiy, D., Mihailescu, M., Freitas, J. A., Schow, E. V., Worcester, D. L., Gawrisch, K., Tobias, D. J., White, S. H. & Swartz, K. J. Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* 462, 473–479 (2009).
 40. Bezanilla, F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 166–168 (2005).
 41. Schwaiger, C. S., Bjelkmar, P., Hess, B. & Lindahl, E. 310-Helix Conformation Facilitates the Transition of a Voltage Sensor S4 Segment toward the Down State. *Biophysical Journal* 100, 1446–1454 (2011).
 42. Ahern, C. A. & Horn, R. Focused Electric Field across the Voltage Sensor of Potassium Channels. *Neuron* 48, 25–29 (2005).
 43. Starace, D. M. & Bezanilla, F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548–553 (2004).
 44. Islas, L. D. & Sigworth, F. J. Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels. *The Journal of general physiology* 117, 69–89 (2001).
 45. Souza, C. S., Amaral, C. & Treptow, W. Electric fingerprint of voltage sensor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201413971 (2014). doi:10.1073/pnas.1413971111
 46. Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. Currents Related to Movement of the Gating Particles of the Sodium Channels. *Nature* 242, 459–461 (1973).
 47. Keynes, R. D. & Rojas, E. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *The Journal of Physiology* 239, 393–434 (1974).
 48. Schneider, M. F. & Chandler, W. K. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242, 244–246 (1973).
 49. Bezanilla, F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiological Reviews* 80, 555–592 (2000).

50. Horn, R. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* 39, 15653–15658 (2000).
51. Swartz, K. J. & MacKinnon, R. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15, 941–949 (1995).
52. Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiological Reviews* 79, 1317–1372 (1999).
53. Struyk, A. F. & Cannon, S. C. A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *The Journal of general physiology* 130, 11–20 (2007).
54. Ramu, Y., Xu, Y. & Lu, Z. Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* 442, 696–699 (2006).
55. Xu, Y., Ramu, Y. & Lu, Z. Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451, 826–829 (2008).
56. LeMasurier, M., Heginbotham, L. & Miller, C. KcsA It's a Potassium Channel. *The Journal of General Physiology* 118, 303–314 (2001).
57. Neyton, J. & Miller, C. Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *The Journal of General Physiology* 92, 549–567 (1988).
58. Nimigeon, C. M. & Miller, C. Na⁺ block and permeation in a K⁺ channel of known structure. *The Journal of general physiology* 120, 323–335 (2002).
59. Treptow, W. & Tarek, M. Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels. *Biophysical Journal* 91, L26–L28 (2006).
60. Beckstein, O., Tai, K. & Sansom, M. S. P. Not Ions Alone: Barriers to Ion Permeation in Nanopores and Channels. *Journal of the American Chemical Society* 126, 14694–14695 (2004).
61. Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O. & Shaw, D. E. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* 336, 229–233 (2012).
62. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G. & Perozo, E. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 319–322 (2006).
63. Domene, C., Klein, M. L., Branduardi, D., Gervasio, F. L. & Parrinello, M. Conformational Changes and Gating at the Selectivity Filter of Potassium Channels. *Journal of the American Chemical Society* 130, 9474–9480 (2008).
64. Imai, S., Osawa, M., Takeuchi, K. & Shimada, I. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 6216–6221 (2010).
65. Weiser, T. G., Regenbogen, S. E., Thompson, K. D., Haynes, A. B., Lipsitz, S. R., Berry, W. R. & Gawande, A. A. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *The Lancet* 372, 139–144 (12).
66. H, B. & G, K. The effect of anaesthesia on renal function. *European journal of anaesthesiology* 11, 163–168 (1994).
67. Ferreyra, G., Long, Y. & Ranieri, V. M. Respiratory complications after major surgery: *Current Opinion in Critical Care* 15, 342–348 (2009).
68. Berthoud, M. C. & Reilly, C. S. Adverse Effects of General Anaesthetics. *Drug Safety* 7, 434–459 (1992).

69. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 300, 487–493 (1982).
70. Chen, J., Chen, L., Wang, Y., Wang, X. & Zeng, S. Exploring the Effects on Lipid Bilayer Induced by Noble Gases via Molecular Dynamics Simulations. *Scientific Reports* 5, (2015).
71. Goldstein, D. B. The Effects of Drugs on Membrane Fluidity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 24, 43–64 (1984).
72. Miller, K. W., Firestone, L. L., Alifimoff, J. K. & Streicher, P. Nonanesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 1084–1087 (1989).
73. Moss, G. W., Lieb, W. R. & Franks, N. P. Anesthetic inhibition of firefly luciferase, a protein model for general anesthesia, does not exhibit pressure reversal. *Biophysical Journal* 60, 1309–1314 (1991).
74. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature* 316, 349–351 (1985).
75. Alifimoff, J. K., Firestone, L. L. & Miller, K. W. Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *British Journal of Pharmacology* 96, 9–16 (1989).
76. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310, 599–601 (1984).
77. Slater, S. J., Cox, K. J. A., Lombardi, J. V., Ho, C., Keily, M. B., Rubin, E. & Stubbs, C. D. Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364, 82–84 (1993).
78. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Stereospecific Effects of Inhalational General Anesthetic Optical Isomers on Nerve Ion Channels. *Science* 254, 427–430 (1991).
79. Franks, N. P. Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology* 147, S72–S81 (2006).
80. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367, 607–614 (1994).
81. Cantor, R. S. The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36, 2339–2344 (1997).
82. Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Gray, C. W., Green, P. J., Ranson, J. L., Randall, A. D. & Meadows, H. J. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 103, 899–919 (2001).
83. Patel, A. J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G. & Lazdunski, M. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience* 2, 422–426 (1999).
84. Patel, A. J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F. & Lazdunski, M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *The EMBO Journal* 17, 4283–4290 (1998).
85. Ouyang, W., Jih, T.-Y., Zhang, T.-T., Correa, A. M. & Hemmings, H. C. Isoflurane Inhibits NaChBac, a Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322, 1076–1083 (2007).
86. Bhattacharji, A., Klett, N., Go, R. C. V. & Covarrubias, M. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *British Journal of Pharmacology* 159, 1475–1485 (2010).

87. Huang, P.-T., Shiau, Y.-S. & Lou, K.-L. The interaction of spider gating modifier peptides with voltage-gated potassium channels. *Toxicon* 49, 285–292 (2007).
88. Holmgren, M., Smith, P. L. & Yellen, G. Trapping of Organic Blockers by Closing of Voltage-dependent K⁺ Channels Evidence for a Trap Door Mechanism of Activation Gating. *The Journal of General Physiology* 109, 527–535 (1997).
89. 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).
90. Wallin, R. F., Regan, B. M., Napoli, M. D. & Stern, I. J. Sevoflurane: A New Inhalational Anesthetic Agent. *Anesthesia & Analgesia* 54, 758–766 (1975).
91. Delgado-Herrera, L., Ostroff, R. D. & Rogers, S. A. Sevoflurane: Approaching the Ideal Inhalational Anesthetic A Pharmacologic, Pharmacoeconomic, and Clinical Review. *CNS Drug Reviews* 7, 48–120 (2001).
92. Quail, A. W. Modern inhalational anaesthetic agents. A review of halothane, isoflurane and enflurane. *The Medical journal of Australia* 150, 95–102 (1989).
93. Black, G. W. A review of the pharmacology of halothane. *British Journal of Anaesthesia* 37, 688–705 (1965).
94. Neuberger, J. & Williams, R. Halothane anaesthesia and liver damage. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 289, 1136–1139 (1984).
95. Chidambaran, V., Costandi, A. & D’Mello, A. Propofol: A Review of its Role in Pediatric Anesthesia and Sedation. *CNS Drugs* 29, 543–563 (2015).
96. Deegan, R. J. Propofol: A Review of the Pharmacology and Applications of an Intravenous Anesthetic Agent. *The American Journal of the Medical Sciences* 304, 45–49 (1992).
97. Covarrubias, M. & Rubin, E. Ethanol selectively blocks a noninactivating K⁺ current expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 6957–6960 (1993).
98. Covarrubias, M., Vyas, T. B., Escobar, L. & Wei, A. Alcohols Inhibit a Cloned Potassium Channel at a Discrete Saturable Site INSIGHTS INTO THE MOLECULAR BASIS OF GENERAL ANESTHESIA. *Journal of Biological Chemistry* 270, 19408–19416 (1995).
99. Eckenhoff, R. G., Xi, J., Shimaoka, M., Bhattacharji, A., Covarrubias, M. & Dailey, W. P. Azi-isoflurane, a Photolabel Analog of the Commonly Used Inhaled General Anesthetic Isoflurane. *ACS Chemical Neuroscience* 1, 139–145 (2010).
100. Shahidullah, M., Harris, T., Germann, M. W. & Covarrubias, M. Molecular Features of an Alcohol Binding Site in a Neuronal Potassium Channel. *Biochemistry* 42, 11243–11252 (2003).
101. Bhattacharji, A., Kaplan, B., Harris, T., Qu, X., Germann, M. W. & Covarrubias, M. The Concerted Contribution of the S4-S5 Linker and the S6 Segment to the Modulation of a Kv Channel by 1-Alkanols. *Molecular Pharmacology* 70, 1542–1554 (2006).
102. Harris, T., Shahidullah, M., Ellingson, J. S. & Covarrubias, M. General Anesthetic Action at an Internal Protein Site Involving the S4-S5 Cytoplasmic Loop of a Neuronal K⁺Channel. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4928–4936 (2000).
103. Barber, A. F., Liang, Q. & Covarrubias, M. Novel Activation of Voltage-gated K⁺ Channels by

- Sevoflurane. *Journal of Biological Chemistry* 287, 40425–40432 (2012).
104. Liang, Q., Anderson, W. D., Jones, S. T., Souza, C. S., Hosoume, J. M., Treptow, W. & Covarrubias, M. Positive Allosteric Modulation of Kv Channels by Sevoflurane: Insights into the Structural Basis of Inhaled Anesthetic Action. *PLOS ONE* 10, e0143363 (2015).
 105. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L. & Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1781–1802 (2005).
 106. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 14, 33–38 (1996).
 107. Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M. & MacKerell, A. D. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation* 8, 3257–3273 (2012).
 108. Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D. & Pastor, R. W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B* 114, 7830–7843 (2010).
 109. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 79, 926–935 (1983).
 110. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31, 455–461 (2010).
 111. Luo, H. & Sharp, K. On the calculation of absolute macromolecular binding free energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10399–10404 (2002).
 112. Aqvist, J., Medina, C. & Samuelsson, J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering* 7, 385–391 (1994).
 113. Aqvist, J., Luzhkov, V. B. & Brandsdal, B. O. Ligand binding affinities from MD simulations. *Accounts of Chemical Research* 35, 358–365 (2002).
 114. Carlsson, J., Boukharta, L. & Aqvist, J. Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 2648–2656 (2008).
 115. 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).
 116. Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *The Journal of Chemical Physics* 22, 1420–1426 (1954).
 117. Bernèche, S. & Roux, B. Molecular Dynamics of the KcsA K⁺ Channel in a Bilayer Membrane. *Biophysical Journal* 78, 2900–2917 (2000).
 118. Shrivastava, I. H. & Sansom, M. S. P. Simulations of Ion Permeation Through a Potassium Channel: Molecular Dynamics of KcsA in a Phospholipid Bilayer. *Biophysical Journal* 78, 557–570 (2000).

119. Wang, R., Fang, X., Lu, Y. & Wang, S. The PDBbind Database: Collection of Binding Affinities for Protein–Ligand Complexes with Known Three-Dimensional Structures. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 2977–2980 (2004).
120. Patwary, M. A., Palsetia, D., Agrawal, A., Liao, W., Manne, F. & Choudhary, A. A New Scalable Parallel DBSCAN Algorithm Using the Disjoint-set Data Structure. in *Proceedings of the International Conference on High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis* 62:1–62:11 (IEEE Computer Society Press, 2012). at <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=2388996.2389081>>
121. Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J. & Xu, X. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. in 226–231 (AAAI Press, 1996).
122. Eargle, J. & Luthey-Schulten, Z. NetworkView: 3D display and analysis of protein–RNA interaction networks. *Bioinformatics* 28, 3000–3001 (2012).
123. Sigworth, F. J. Voltage gating of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 27, 1–40 (1994).
124. Roux, B. The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophysical journal* 95, 4205–4216 (2008).
125. Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W. & Tarek, M. Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 5547–5550 (2008).
126. Aksimentiev, A. & Schulten, K. Imaging α -Hemolysin with Molecular Dynamics: Ionic Conductance, Osmotic Permeability, and the Electrostatic Potential Map. *Biophysical Journal* 88, 3745–3761 (2005).
127. Lindahl, E. & Edholm, O. Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* 113, 3882–3893 (2000).
128. Sonne, J., Hansen, F. Y. & Peters, G. H. Methodological problems in pressure profile calculations for lipid bilayers. *The Journal of Chemical Physics* 122, 124903 (2005).
129. Vermeer, L. S., Groot, B. L. de, Réat, V., Milon, A. & Czaplinski, J. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2H NMR experiments. *European Biophysics Journal* 36, 919–931 (2007).
130. Arcario, M. J., Mayne, C. G. & Tajkhorshid, E. Atomistic Models of General Anesthetics for Use in in Silico Biological Studies. *The Journal of Physical Chemistry B* 118, 12075–12086 (2014).
131. Pearson, K. VII. Note on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London* 58, 240–242 (1895).
132. Ben-Tal, N., Ben-Shaul, A., Nicholls, A. & Honig, B. Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers. *Biophysical journal* 70, 1803–1812 (1996).
133. Roux, B. Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophysical Journal* 73, 2980–2989 (1997).
134. Gullingsrud, J. & Schulten, K. Lipid Bilayer Pressure Profiles and Mechanosensitive Channel Gating. *Biophysical Journal* 86, 3496–3509 (2004).
135. Heller, H., Schaefer, M. & Schulten, K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *The Journal of Physical Chemistry* 97, 8343–8360 (1993).

Anexo 1 – Arquivo de configuração de dinâmica molecular com NAMD

```
# Structures
coordinates popc.fld.0.pdb
structure popc.fld.0.psf

# Restart files (Only for restart!!)
bincoordinates popc.fld.44r.coor
extendedsystem popc.fld.44r.xsc
binvelocities popc.fld.44r.vel

# Initial parameters
set temp 300
#temperature $temp           ;# Only for initial
seed 12345

# Periodic Boundary Conditions
#cellBasisVector1 133.27  0.0  0.0
#cellBasisVector2  0.0 136.8  0.0
#cellBasisVector3  0.0  0.0 100.8
#cellOrigin        0.06 0.0002  6.0

# Harmonic constraints
constraints off
consexp 2
consref popc.fld.45.hrm
conskfile popc.fld.45.hrm
conskcol B
constraintScaling 1.0

# Output params
binaryoutput no
outputname popc.fld.45
outputenergies 10000
outputtiming 10000
outputpressure 10000
binaryrestart yes
dcdfile popc.fld.45.dcd
dcdfreq 5000
XSTFreq 5000
restartname popc.fld.45r
restartfreq 5000
```

```

# PME parameters
PME on
PMEtolerance 10e-6
PMEInterpOrder 4
PMEGridSpacing 1.2

# Temperature control and equilibration
langevin on
langevintemp $temp
langevindamping 0.1
#reassignfreq 100           ;# Only for initial
#reassigntemp 273          ;# Only for initial
#reassignincr 0.06775     ;# Only for initial
#reassignhold $temp       ;# Only for initial

# Pressure control
usegrouppressure yes
useflexiblecell yes
langevinpiston on
langevinpistontarget 1
langevinpistonperiod 200
langevinpistondecay 100
langevinpistontemp $temp
surfacetensiontarget 0.0
strainrate 0. 0. 0.

# brnch_root_list_opt
splitpatch hydrogen
hgroupcutoff 2.8

# Integrator params
timestep 2.0
fullElectFrequency 2
nonbondedfreq 1

# Force field params
paratypecharmm on
parameters /home/user/charmm/charmm36/par_all36_prot.prm
parameters /home/user/charmm/charmm36/toppar_water_ions.str
parameters /home/user/charmm/charmm36/par_all36_lipid.prm
parameters /home/user/charmm/other/par_sevoflurane.par
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
rigidbonds all
rigidtolerance 0.00001
rigiditerations 400
cutoff 11.0
pairlistdist 13.0
stepspercycle 16
switching on
switchdist 8.0

# Run
#minimize 800           ;# Only for initial

run 500000

```

Anexo 2 – Artigos publicados

Electric fingerprint of voltage sensor domains

 Caio S. Souza¹, Cristiano Amaral¹, and Werner Treptow²

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

Edited by Richard W. Aldrich, The University of Texas at Austin, Austin, TX, and approved October 24, 2014 (received for review July 22, 2014)

A dynamic transmembrane voltage field has been suggested as an intrinsic element in voltage sensor (VS) domains. Here, the dynamic field contribution to the VS energetics was analyzed via electrostatic calculations applied to a number of atomistic structures made available recently. We find that the field is largely static along with the molecular motions of the domain, and more importantly, it is minimally modified across VS variants. This finding implies that sensor domains transfer approximately the same amount of gating charges when moving the electrically charged S4 helix between fixed microscopic configurations. Remarkably, the result means that the observed operational diversity of the domain, including the extension, rate, and voltage dependence of the S4 motion, as dictated by the free energy landscape theory, must be rationalized in terms of dominant variations of its chemical free energy.

voltage sensor | ion channel | free energy | molecular dynamics | electrostatics

Voltage sensor (VS) domains are electrically charged membrane proteins made of four packed helices (1). The fourth segment (S4) contains four highly conserved positively charged amino acids, R₁ through R₄. By interchanging its conformation between two main states (resting and activated) in response to voltage variations, VS domains displace the S4 charges across the membrane capacitance, giving rise to ΔQ , the so-called gating charge (2). As a result of their function of converting voltage variations into molecular motions, VS domains are ubiquitous in a number of electrically mediated processes, either as domain components of phosphatases (2) or proton (3) and ion channels (4–8).

Despite the conservation of S4 sequences, nature has designed a variety of constructs (2) that present a wide range of voltage dependence and absolute rates of activation. For instance, the VS kinetics is markedly distinct between voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels (9), a feature that complies with their respective role in the fast and slow phases of the action potential. Drastic kinetic shifts can even be observed in VS differing by point mutations (10, 11). In all of these constructs, the S4 operation results from the fine balance between the chemical and the electrical components of the relative free energy of the segment. Whereas the former depends on the S4 energy in the absence of an electrical driving force, the latter arises essentially from $\phi(\mathbf{r})$ (12), a dimensionless scalar field that reports the fraction of the membrane voltage coupled to every S4 charge q_i . As mostly embodied in the transporter model (13), the reshaping of $\phi(\mathbf{r})$ along with S4 displacements appears as one potential mechanism impacting the sensing process. Facing the VS diversity, it has been unknown to which extent the field reshaping may impact the S4 operation in distinct constructs and account for its energetic differences.

Here, by benefiting from an increasing number of atomistic structures of VS-containing channels or enzymes made available recently, we use all-atom molecular dynamics (MD) simulations (14–16) in combination with electrostatic calculations (17, 18) to investigate voltage-coupling properties of sensor domains. Anticipating our results, we find that, although primarily conformation independent, $\phi(\mathbf{r})$ is minimally modified over the VS variants. This finding points to marginal dynamic contributions of the membrane voltage field to the energetics and diversity of VS proteins.

Theory and Methods

Energetics of Voltage-Sensor Domains. Given its critical role in the sensing mechanism, we focus our analysis on a reduced thermodynamic system formed by S4. We consider the helix embedded along with the other VS segments in an impermeable membrane bathed by salt solutions and in presence of an external voltage V (Fig. 1). Under these conditions, the free energy of S4 in a fixed microscopic configuration X can be expressed as (19)

$$F(X, V) = F(X, 0) + \Delta F(X, V) \quad [1]$$

where $F(X, 0)$ denotes the chemical free energy of the helix that depends on the system energy in the absence of an electrical driving force ($V = 0$), and $\Delta F(X, V)$ denotes its excess free energy when coupled to an external voltage. Here, $X \equiv \{r_1, \dots, r_N\}$ maps specifically the Cartesian coordinates of all atoms of S4.

The voltage-independent term accounts for the microscopic potential energy of S4 and its (polar and nonpolar) solvation energy in the protein-membrane environment (20). Differently

$$\Delta F(X, V) = VQ(X), \quad [2]$$

depends on V and on the effective charge $Q(X)$ of S4

$$Q(X) = \sum_i q_i \phi_X(r_i), \quad [3]$$

in which q_i is the i th S4 atom charge, and $\phi_X(r_i)$ is a dimensionless scalar field (12); it varies between 0 (intracellular side) and 1 (extracellular side). Note that $\phi(r)$ depends on the intradomain dielectric for the fixed configuration of S4 (Eq. 11), justifying its dependence with X made explicit in Eq. 3; that is, we use the subscript X for that purpose.

As discussed in ref. 19, the meaning of $\phi(r)$ runs deeper than the definition of the effective charge of S4 as it transduces the molecular motions of the segment into the gating charge ΔQ . To make this explicit, let us consider any set of atomic displacements $\Delta X \equiv \{\Delta r_1, \dots, \Delta r_N\}$ leading S4 to a new configuration $Y \equiv \{r_1 + \Delta r_1, \dots, r_N + \Delta r_N\}$ relative to its protein-membrane surroundings.

Significance

A central paradigm in the subject of cellular excitability is whether or not a dynamic membrane voltage field contributes to the operation of voltage sensor proteins. This issue has challenged an entire generation of scientists because static and dynamic contributions of the field cannot be discriminated from electrophysiology measurements. The dilemma imposes that structure-based calculations are required to solve the issue. By following this approach, we report that reshaping or dynamics of the field does not impact significantly the domain energetics or operation. As such, the functional diversity of voltage sensors observed in nature originates from variations in the detailed atom-atom interactions of the domain (chemical free energy) rather than in its coupling with the membrane voltage.

Author contributions: W.T. designed research; C.S.S. and C.A. performed research; C.S.S., C.A., and W.T. analyzed data; and W.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹C.S.S. and C.A. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: treptow@unb.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1413971111/-DCSupplemental.

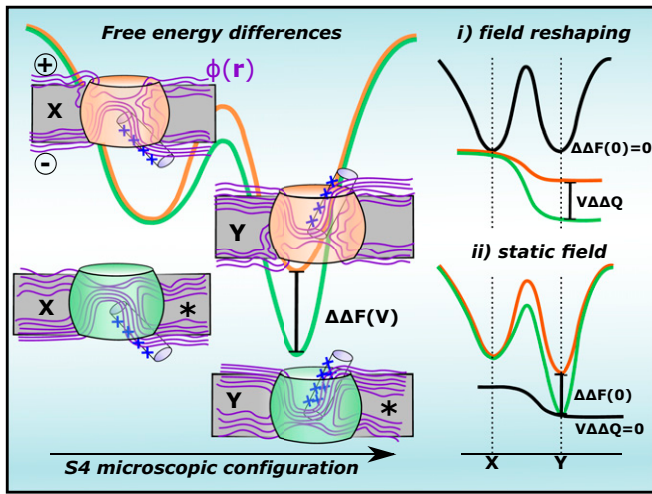


Fig. 1. Hypothetical free energy landscapes showing the S4 energetics in distinct VSs. For fixed X and Y microscopic configurations of S4 under voltage V , $\Delta\Delta F(V) = \Delta\Delta F(0) + V\Delta\Delta Q$ is the variation of the helix energy upon perturbation (*) of the protein-membrane surroundings, where $\Delta\Delta F(0)$ and $\Delta\Delta Q$ are, respectively, perturbation-induced changes of the chemical free energy and the gating charge. In two contrasting scenarios, $\Delta\Delta F(V)$ may arise from (i) reshaping of the membrane-voltage field $\phi(r)$ that accounts for energetic differences via $V\Delta\Delta Q$ and/or (ii) chemical free energy modifications that account for $\Delta\Delta F(0)$.

From Eq. 1, the voltage-dependent free energy difference associated with the configuration change of the helix writes as

$$F(Y,V) - F(X,V) = F(Y,0) - F(X,0) + V[Q(Y) - Q(X)], \quad [4]$$

in which $F(Y,0) - F(X,0)$ is the voltage-independent chemical free energy change, and $V[Q(Y) - Q(X)]$ is the electrical energy related to the transfer of the gating charge $\Delta Q = Q(Y) - Q(X)$ in the process. Thus, from Eq. 3,

$$\Delta Q = \sum_i q_i [\phi_Y(r_i + \Delta r_i) - \phi_X(r_i)], \quad [5]$$

is the direct link of ΔQ with the microscopic displacement of S4 via the voltage-coupling variation of the segment.

Eq. 5 shows that ΔQ does not measure the physical displacements of S4 charges but rather the fraction of the membrane potential each charge traverses. As such, gating charges could arise (i) from displacements of q_i relative to a static voltage field across the membrane or (ii) from the field reshaping itself, induced by changes in the environment of a rather static q_i , or any combination of (i) and (ii). Here, we make this notion explicit as

$$\Delta Q = \sum_i q_i [\phi_X(r_i + \Delta r_i) - \phi_X(r_i) + \delta_{XY}^i], \quad [6]$$

with

$$\delta_{XY}^i = \phi_Y(r_i + \Delta r_i) - \phi_X(r_i + \Delta r_i),$$

denoting the dynamic field contribution to ΔQ (the mathematical notation δ_{XY} reads as the field reshaping between configurations X and Y at the fixed space position $r + \Delta r$; Fig. 2). Eq. 6 suggests the reshaping of $\phi(r)$ as one potential mechanism that impacts the free energy landscape of S4. Indeed, reshaping is one key feature of the so-called transporter model trying to rationalize ΔQ in terms of molecular motions of S4 (13).

One direct consequence is that reshaping may also underlie the energetic variations in distinct sensor constructs. To show this clearly, we generalize Eq. 4 to include the energetics of S4 conditioned to an alchemical perturbation (*) of its adjacent protein-membrane components induced by protein mutations. By plugging Eq. 4 into a thermodynamic cycle analysis, the variation of the S4 energetics $\Delta\Delta F(V)$ due to the perturbation is written accordingly to

$$\Delta\Delta F(V) = \Delta\Delta F(0) + V\Delta\Delta Q, \quad [7]$$

where

$$\Delta\Delta F(0) = [F^*(Y,0) - F^*(X,0)] - [F(Y,0) - F(X,0)],$$

and

$$\Delta\Delta Q = [Q^*(Y) - Q^*(X)] - [Q(Y) - Q(X)],$$

are, respectively, the perturbation-induced variations of the relative chemical free energy of the helix and of its gating charge. From Eq. 5, it follows that

$$\Delta\Delta Q = \sum_i q_i [\delta_{YY}^i - \delta_{XX}^i], \quad [8]$$

with

$$\delta_{XX}^i = \phi_X^*(r_i) - \phi_X(r_i),$$

and

$$\delta_{YY}^i = \phi_Y^*(r_i + \Delta r_i) - \phi_Y(r_i + \Delta r_i),$$

describing, respectively, the perturbation-induced variations of $\phi(r)$ for the fixed X and Y configurations of S4. Both of these terms denote dynamic contributions of the voltage field to $\Delta\Delta Q$, thereby clarifying how such quantities may account for energetic differences in distinct sensor domains.

Voltage Coupling $\phi(r)$. In terms of a continuum electrostatic treatment for the ionic solution that bathes the protein and membrane components, the function $\phi(r)$ can be defined from a linearized Poisson-Boltzmann (PB-V) equation that accounts for the effect of the transmembrane (TM) electrostatic potential (12)

$$\nabla \cdot [\epsilon(r) \nabla \phi(r)] - \bar{\kappa}^2(r) [\phi(r) - V\Theta(r)] = 0 \quad [9]$$

where, $\epsilon(r)$ and $\bar{\kappa}$ are, respectively, the space-dependent dielectric constant and Debye-Huckel ionic screening factor, and $\Theta(r)$ is a Heaviside step function equal to 0 on one side of the membrane and 1 on the other side. Eq. 9 shows that $\phi(r)$ is independent of any charge densities $\rho(r)$ provided by S4 and its adjacent protein-membrane medium. However, it depends on the dielectric and accessibility maps for the fixed configuration of S4 within the surroundings.

Alternatively, $\phi(r)$ can be further expressed via an explicit all-atom formulation, the so-called electrical distance (21, 22)

$$\phi(r) \equiv \frac{\partial}{\partial V} \Phi(r, V)|_{V=0}, \quad [10]$$

in which $\Phi(r, V)$ is the electrostatic potential defined from Poisson's equation (18) that relates the potential with the local charge density $\rho_i(r, V)$, the sum running over all atoms of S4, and the surroundings (protein + membrane + solution). As previously demonstrated, this formulation is a linear-response approximation (19). Because the charge-density contributions to $\Phi(r, V)$ cancel out in Eq. 10, the electrical distance definition also embodies the unique dependency of the coupling parameter with the dielectric morphology of the system as described in Eq. 9.

Within the gating charge equation, these voltage coupling definitions have been extensively used to make concrete connections between microscopic models and experiments (23–28).

Computational Methods. Table S1 presents the set of VSs considered in the study. Each of these structures was obtained from MD simulations based on

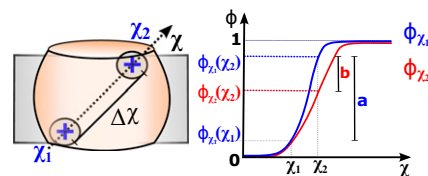


Fig. 2. Voltage coupling variation $\Delta\phi = [\phi_{Y_2}(x_2) - \phi_{X_1}(x_1)]$ of the charge q_i when displacing $\Delta\chi$ along a given path χ within the sensor domain. By assuming that $\phi_Y(\chi)$ reshapes as the particle moves along χ , $\Delta\phi$ can be decomposed into static (a) and dynamic (b) contributions.

the available X-ray crystal structures (2–7, 29). Their detailed description can be found in the original papers (25, 27, 28, 30–32). It is important to clarify that, besides the structure by Delemotte et al. (8), other resting state models were proposed for Kv1.2 (33–35). Given that these structures were proven to provide with a consensus model for the resting state of the channel (36), we focus our investigation on the former model. Here, the dataset was first characterized as a variant set of sequences and conformations through sequence/structural analysis. Then, each of the structures was embedded in a lipid bilayer for MD simulation and subsequent computation of the voltage-coupling map $\phi(r)$. Specifically, $\phi(r)$ was independently determined via solution of the PB-V equation and the electrical distance definition to evaluate the dependence of the results with both formulations (continuum vs. all-atom). Whereas the PB-V route is based on continuum electrostatics, the electrical distance is in contrast computed directly from MD simulations, thereby taking into account the solvent explicitly. A detailed description of the calculations is provided as *SI Text*.

Results and Discussion

Dataset of VS Structures. Over the years, X-ray crystal structures of distinct voltage-gated channels have been determined, including KvAP (4), Kv1.2 (5), Kv1.2/Kv2.1 (6), NavAb (7), and NavRh (8); all of them feature sensor domains in the activated state. Following characterization of their structural details in a lipid bilayer (24, 25, 28, 30, 32), atomistic models of the resting state (27, 28, 31, 32), explaining most of the experimental data, have been further proposed for these channels, except for NavRh, as described in recent reviews (1). Besides the voltage-sensitive channels, the resolved X-ray structures of the phosphatase domain Ci-VSP (2) (activated and resting) and the proton channel mHv1cc (3) (resting) have provided additional exemplars of the construct.

The structures reveal that VSs have an hourglass-like construction, featuring water crevices disconnected by an occluding hydrophobic site within the domain that provides a gating pore for the S4 arginines (Fig. 3). The activation involves the S4 charges moving across the occluding site while forming conformation-dependent salt bridges with VS acidic residues (1). Despite such common features, primary sequence variations within the gating pore suggest functional differences, as amino acid replacements in this region profoundly impact the domain energetics (9–11). From the multiple sequence alignment presented in Fig. S1, the pairwise sequence similarities within the gating pore region are spread between 60% and 99%. By graphing every pairwise similarity, we find that the sensor domains Kv1.2/Kv1.2 and mHv1cc are, for instance, minimally and maximally distant from Kv1.2. Careful inspection

of the VS structures suggests that the sequence variability is reflected in the resting and activated states of the S4 helix, which are fairly heterogeneous across the domains (Fig. 3). This conclusion is supported by the quantification of structural distances via a contact matrix mapping the microscopic configuration of S4 within the protein (see *SI Text* for details). Fig. S2 shows structural distances that amount to ~ 10 Å between resting configurations of distinct VS domains; these differences are attributed in part to a variable transmembrane (TM) positioning (~ 2 – 10 Å) and twist ($\sim 10^\circ$ – 100°) of S4. Similar estimates are reported for the activated configuration of S4. The present results reflect that the extensions of the conformational changes taking place in each VS domain separately are variable, thus reinforcing the notion of functional differences among them (*i.e.*, different free energy landscapes).

Taken together, the available dataset provides us with a variant set of sequences and conformations of the VS that is particularly useful for comparative analysis of electrical properties of the domain.

Voltage Coupling Analysis and Field Reshaping. Eqs. 6 and 8 indicate how any given dependence of the voltage coupling with sequence (δ_{XY}^i or δ_{YY}^i) and structure (δ_{XY}^j) might affect the energetics of S4. In the following, we exploit these equations to investigate $\phi(r)$ across the VS structures. For that purpose, the domain isoforms are seen as alchemically perturbed versions of each other, featuring amino acid replacements outside S4, and their activated and resting conformations as distinct *X* and *Y* configurations of the segment within its surroundings. Because each of these conformational states are heterogeneous across the domain variants, the definitions of *X* and *Y* are loose when analyzing the set of structures through Eq. 8.

Accordingly, the variations δ_{XY}^i , δ_{XX}^i , and δ_{YY}^i are estimated here in the form of the μ_{kl} parameter, which reports the field reshaping between two VS structures *k* and *l*. Specifically, μ_{kl} is defined as the line integral of $\Delta\phi_{kl}$ along the gating pore axis ν

$$\mu_{kl} = \frac{1}{|z_{\text{out}} - z_{\text{in}}|} \int_{z_{\text{in}}}^{z_{\text{out}}} [\phi_k(\nu(z)) - \phi_l(\nu(z))] |\dot{\nu}(z)| dz, \quad [11]$$

in which $\nu(z) = a\hat{i} + b\hat{j} + z\hat{k}$ is the axis in parametric form, with $\nu(z_{\text{in}})$ and $\nu(z_{\text{out}})$ denoting the pore edges along the transmembrane

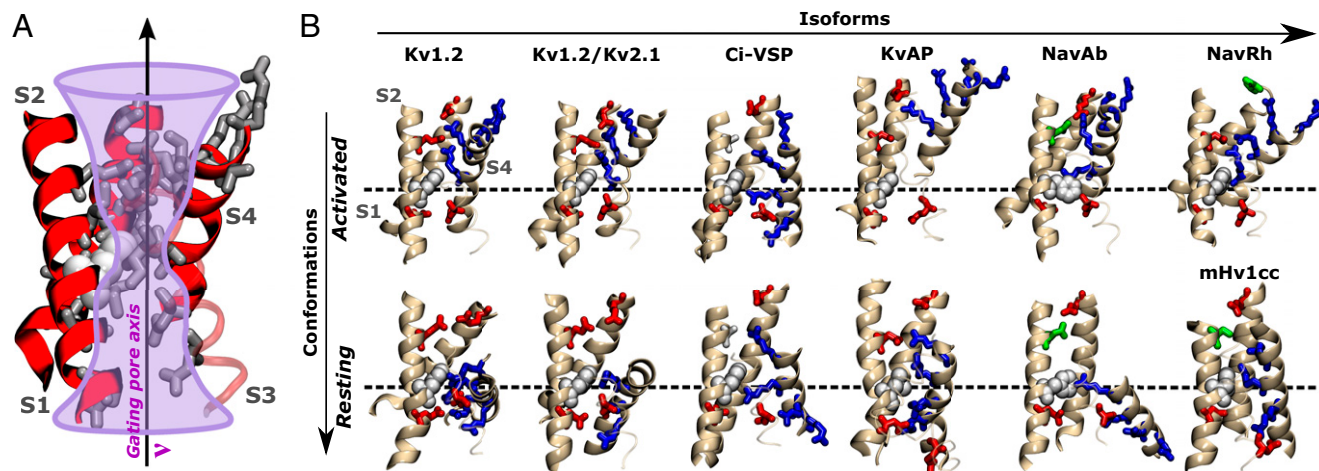


Fig. 3. Dataset of VS structures. (A) General hourglass-like construction of sensor domains. Shown is the gating pore along which the S4 charges travel during activation. A highly conserved phenyl group (white) plugs the most constricted hydrophobic region along the gating pore and disconnects internally and externally open water crevices. (B) Molecular views of the VS structures. Highlighted is the conformation-dependent position of the S4 basic residues (blue sticks) and the salt-bridges/hydrogen-bonds they form with the acidic/polar residues (red/green sticks) of other VS segments (see Table S2 for details). Only segments S1, S2, and S4 are shown for clarity.

direction z (see the graphical representation of ν in Fig. 3A). The gating pore supplies the immediate environment for the S4 charges during activation, justifying our choice of evaluating the field reshaping along this path. In Eq. 11, $\phi[\nu(z)]$ reads as the voltage coupling profile along the gating pore of the VS, which is extracted directly from the 3D voltage-coupling map $\phi(\mathbf{r})$. Fig. 4A shows the profiles calculated over the entire dataset of VS structures. Thus, the computation of μ_{kl} is reduced in practice to the integration of the differences between two coupling profiles, normalized by the transmembrane length of the gating pore. Within this framework, the μ_{kl} parameter has the following meanings to our ultimate goal: (i) when computed between the activated and resting conformations of the same domain isoform, μ_{kl} provides an estimate for the average field reshaping impacting the S4 charge i on the helical motion (that is, δ_{XY}^i); (ii) when determined between resting or activated conformations of two distinct domain isoforms, it reports the average field reshaping under perturbation of the protein-membrane environment of S4 (that is, $\delta_{XX^*}^i$ or $\delta_{YY^*}^i$). We denote each of these

estimates as μ_{kl}^{XY} , $\mu_{kl}^{XX^*}$, and $\mu_{kl}^{YY^*}$. By replacing them back into Eqs. 6 and 8, $\Delta Q_{kl} = +4e_0\mu_{kl}^{XY}$ and $\Delta\Delta Q_{kl} = +4e_0[\mu_{kl}^{YY^*} - \mu_{kl}^{XX^*}]$ report the dynamic contribution of the voltage field to ΔQ and $\Delta\Delta Q$, assuming voltage coupling with four gating residues.

Fig. 4C presents, in matrix representation, the μ_{kl} estimates computed over the dataset of sensor structures. The on-diagonal entries show the μ_{kl}^{XY} values between conformations of the same domain. Note that μ_{kl}^{XY} cannot be evaluated for mHv1cc and NavRh as only one conformational state of the VS is known for these channels (Table S1). In contrast, the off-diagonal entries in the lower triangular region of the matrix show the field reshaping between the resting conformation of distinct domains ($\mu_{kl}^{XX^*}$), whereas those in the upper triangular region are the same estimates for the activated conformation ($\mu_{kl}^{YY^*}$). The most significant variations $\mu_{kl}^{XY} = 0.14$, $\mu_{kl}^{XX^*} = 0.08$, and $\mu_{kl}^{YY^*} = 0.14$ are, respectively, found for KvAP/KvAP, mHv1cc/NavRh, and Ci-VSP/KvAP, indicating that the field reshaping is worth at most 0.15 across the entire dataset. As such, the μ_{kl} estimates calculated here correspond to marginal values of ΔQ_{kl} and $\Delta\Delta Q_{kl}$, in the order of $0.6 e_0$. In terms of electrical energies, the contributions $V\Delta Q_{kl}$ and $V\Delta\Delta Q_{kl}$ are ~ 2.5 kT for the physiologically relevant voltage of 100 mV (3.86 kT/ e_0).

The conclusion emerging from this analysis is that the estimates fall into the range of thermal energy, thereby pointing to a weak dependence of the voltage-coupling map with sequence and structure across the dataset. Not only for Kv1.2 (27) or Kv1.2/Kv2.1 (28) as previously suggested, our result supports that the voltage field intrinsic to sensor domains is primarily static or conformation independent. More importantly, it reveals the conservation of the voltage field over distinct constructs. This conservation is a remarkable finding that contrasts with their operational differences, including the extension of the S4 activation motion (Fig. 3) and ΔQ values (Table S1). It is worth mentioning that the results in Fig. 4 were obtained following calculations of ϕ via the electrical distance definition (Eq. 10). As shown in Fig. S5, the same analysis was independently reproduced through calculations of ϕ via solution of the PB-V equation (Eq. 9). Despite the intrinsic differences between the PB-V and the electrical distance (continuum vs. all-atom), the estimates agree in both formulations, thus strengthening our conclusions.

Energetic Implications. Because $\phi(\mathbf{r})$ drops substantially across the occluding hydrophobic site within the domain (Fig. 4A), the static nature of the field ensures that most of the electrical energy $V\Delta Q$ arises from the physical displacement of S4 charges across that region. Specifically, up to 72% of the total gating charge potentially transported by one of the S4 basic amino acids across the entire membrane results from its displacement over a narrower (20 Å) region nearby the occluded site. This result is consistent with previous measurements (37) and calculations (24, 27) showing the existence of a focused electrical field within the domain.

The corroboration here that the voltage field is static in distinct constructs is of particular interest, given the long-lasting controversy concerning the activation mechanism of VSs. Until now, three competing models have been proposed: transporter, paddle, and sliding-helix (1). The transporter proposes that hydration of S4 focuses the electric field within the domain and activation involves reshaping this intensely focused field around the helix rather than extensively displacing it across the membrane. In contrast, the sliding-helix devises that S4 goes through a large piston-like motion on activation, forming conformation-dependent salt bridges while crossing a focused, motionless field. Finally, the paddle states that S4 and the C-terminal region of S3 form a “voltage-sensor paddle” that would move a large distance within the membrane during activation (a revised model was recently proposed based on the X-ray structure of Kv1.2-Kv2.1) (6). Currently, although not refuting key features of the paddle

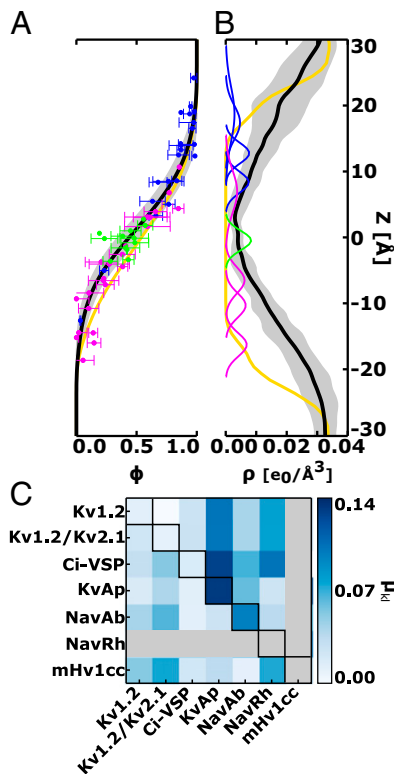


Fig. 4. Voltage-coupling analysis and field reshaping. (A) Voltage coupling $\phi(z)$ and (B) water density $\rho(z)$ profiles along the TM direction z of the gating pore. For clarity, the entire dataset is presented as an average curve (black) with associated error bars (gray shading). Also shown are coupling and density values for the phenyl center (green) and the S4 basic amino acids in their activated (dark blue) and resting (pink) positions. Note that the average coupling profile (black) is fundamentally distinct from that of a bare lipid bilayer (yellow). The steepest part of ϕ at the phenyl center implies the existence of a focused voltage gradient across the domain compared with the lipid bilayer. (C) Field reshaping μ_{kl} between voltage-sensor structures k and l . Diagonal values report the μ_{kl}^{XY} estimates between conformations of a fixed domain isoform, whereas lower and upper triangular regions of the matrix representation present, respectively, the $\mu_{kl}^{XX^*}$ and $\mu_{kl}^{YY^*}$ estimates for a fixed conformation over distinct isoforms. In the computation of μ_{kl} , each of the profiles $\phi_k(z)$ and $\phi_l(z)$ corresponds to an average over four independent domain subunits. Here, the voltage coupling was determined via an all-atom formulation through the electrical distance definition (Figs. S3 and S4). Independent estimates based on continuum electrostatic calculations are presented in Fig. S5.

or transporter models, i.e., the S3-S4 forming paddle, hydration of the domain and field focalization, the emerging picture from the VS structures and their manifold studies (including the presented one) depicts major characteristics of the sliding-helix.

The consequence of the voltage field being conserved across distinct constructs relies on marginal contributions of $V\Delta\Delta Q$ to their energetic differences, i.e., distinct sensor domains transfer about the same amount of gating charges when moving their S4 helices between fixed microscopic configurations. The latter is one critical result meaning that their diversity, including the extension, rate, and voltage dependence of the S4 motion or ΔQ as dictated by the free energy landscape, must be rationalized in terms of dominant modifications of their chemical free-energies $\Delta\Delta F(0)$ (scenario *ii* in Fig. 1). Consistent with this notion, one recent computational study shows that gating pore mutations in Kv1.2 destabilizes, in ~ 4 kcal/mol, the chemical free energy associated with the transfer of a single S4 charge across the domain hydrophobic core (38). This estimate, that represents a lower boundary for $\Delta\Delta F(0)$ involving sequential transfer of four S4 charges, is substantially larger than the estimates of $V\Delta\Delta Q$ computed herein. Given that the electrical energy depends further on the S4 charges, the present conclusion must hold for every perturbations not resulting into charge neutralization of the helix. In practice, the statement above can be understood in terms of ensemble average gating charge displacement vs. voltage measurements, which is familiar to most experimentalists in the form of $\langle Q \rangle(V)$ curves. Hence, rightward or leftward shifts between the $\langle Q \rangle(V)$ curves of distinct VS domains read as differences in the chemical free energy stability of their resting or activated states. This concept is illustrated in Fig. S6 for a minimalist continuum electrostatic model of the VS. The rational would also apply for kinetic measurements of the gating charge [i.e., variations of the activation time (τ) in distinct VSs would derive from differences in the chemical free energy barrier for activation].

The intradomain dielectric $\epsilon(r)$ imposed by the distribution of protein atoms, lipids, and waters (Fig. 4B) reflects deep structure-function relationships in the construct. At the origin of the solvation energies of S4 (23), $\epsilon(r)$ seems to be optimum for the stability of the segment within the protein-membrane environment, suggesting that significant modifications would come at the expenses of structural defects. At the origin of $\phi(r)$ the dielectric also appears to be optimum for the VS sensitivity within physiological (millivolt) ranges of the membrane potential by

ensuring the focalization of the voltage field within the domain (37). This hypothesis raises the idea that sensor domains were subjected to evolutionary pressure while restrained by $\epsilon(r)$, thereby rationalizing the conservation of $\phi(r)$ over the domain sequence itself.

Concluding Remarks. The present work deals with a central paradigm in the subject of excitable systems in biology, namely dynamic contributions of the membrane voltage field to VS energetics. Far from being trivial, this issue has challenged an entire generation of scientists because static and dynamic contributions of the voltage field cannot be discriminated from measurements of ΔQ , as reflected in the competing models trying to rationalize the VS function. As described above, the issue emerges because ΔQ reports electrical displacements of S4. As such, gating charges could arise from displacements of S4 relative to a static field or from the field reshaping itself. The dilemma imposes that structure-based calculations are required to solve the issue. Here, we followed this approach by quantifying the field reshaping μ across a number of VS structures. In light of barely modifiable coupling properties, our conclusion is that the diversity in the extension, rate, and voltage dependence of the S4 motion observed in nature must be rationalized in terms of chemical free energy differences (i.e., differences in the detailed atom-atom interactions of the domain rather than in its electrical coupling properties). In typical gating charge vs. voltage measurements, variations in the amount of ΔQ transported by distinct VSs at a fixed voltage arise from modifications in their chemical free-energies.

We believe the results are of broad interest as they provide an important clarification about the energetics of sensor domains and are synchronous with recent advances in theoretical and experimental fronts dealing with the VS structure and operation. Structure-based calculations (38) or recently devised median-voltage methods (39) have just started to be applied for determination of chemical free energy variations of the domain. The present study reinforces the referred methods as powerful strategies to assess VS perturbations.

ACKNOWLEDGMENTS. The comments of B. Roux and M. Klein on the manuscript are gratefully acknowledged. The research described herein was supported in part by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel, under Grants 483968/2013-7 and BEX9046/11-9. W.T. thanks CNPq for a postdoctoral fellowship to C.A. (150545/2013-4).

- Stock L, Souza C, Treptow W (2013) Structural basis for activation of voltage-gated cation channels. *Biochemistry* 52(9):1501–1513.
- Li Q, et al. (2014) Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain. *Nat Struct Mol Biol* 21(3):244–252.
- Takeshita K, et al. (2014) X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol* 21(4):352–357.
- Jiang Y, et al. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423(6935):33–41.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309(5736):897–903.
- Long SB, Tao X, Campbell EB, Mackinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450(7168):376–382.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475(7356):353–358.
- Zhang X, et al. (2012) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486(7401):130–134.
- Lacroix JJ, Campos FV, Frezza L, Bezanilla F (2013) Molecular bases for the asynchronous activation of sodium and potassium channels required for nerve impulse generation. *Neuron* 79(4):651–657.
- Lacroix JJ, Bezanilla F (2011) Control of a final gating charge transition by a hydrophobic residue in the S2 segment of a K⁺ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(16):6444–6449.
- Lacroix JJ, Bezanilla F (2012) Tuning the voltage-sensor motion with a single residue. *Biophys J* 103(3):L23–L25.
- Roux B (1997) Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophys J* 73(6):2980–2989.
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436(7052):852–856.
- Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781–1802.
- Feller SE, MacKerell AD, Jr (2000) An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* 104(31):7510–7515.
- MacKerell AD, Jr, Feig M, Brooks CL, 3rd (2004) Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J Am Chem Soc* 126(3):698–699.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10037–10041.
- Aksimentiev A, Schulten K (2005) Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys J* 88(6):3745–3761.
- Roux B (2008) The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys J* 95(9):4205–4216.
- Ben-Tal N, Ben-Shaul A, Nicholls A, Honig B (1996) Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers. *Biophys J* 70(4):1803–1812.
- Sigworth FJ (1994) Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27(1):1–40.
- Islas LD, Sigworth FJ (2001) Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels. *J Gen Physiol* 117(1):69–89.
- Grabe M, Lecar H, Jan YN, Jan LY (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating of ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(51):17640–17645.
- Jogini V, Roux B (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys J* 93(9):3070–3082.
- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131(6):2107–2109.

26. Khalili-Araghi F, et al. (2010) Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel. *Biophys J* 98(10):2189–2198.
27. Delemotte L, Tarek M, Klein ML, Amaral C, Treptow W (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(15):6109–6114.
28. Jensen MØ, et al. (2012) Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336(6078):229–233.
29. Zhang X, et al. (2012) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486(7401):130–134.
30. Freites JA, Tobias DJ, White SH (2006) A voltage-sensor water pore. *Biophys J* 91(11):L90–L92.
31. Schow EV, Freites JA, Gogna K, White SH, Tobias DJ (2010) Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel. *Biophys J* 98(12):2857–2866.
32. Amaral C, Carnevale V, Klein ML, Treptow W (2012) Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(52):21336–21341.
33. Pathak MM, et al. (2007) Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron* 56(1):124–140.
34. Vargas E, Bezanilla F, Roux B (2011) In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron* 72(5):713–720.
35. Henrion U, et al. (2012) Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(22):8552–8557.
36. Vargas E, et al. (2012) An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J Gen Physiol* 140(6):587–594.
37. Starace DM, Bezanilla F (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427(6974):548–553.
38. Schwaiger CS, Liin SI, Elinder F, Lindahl E (2013) The conserved phenylalanine in the K+ channel voltage-sensor domain creates a barrier with unidirectional effects. *Biophys J* 104(1):75–84.
39. Chowdhury S, Chanda B (2012) Estimating the voltage-dependent free energy change of ion channels using the median voltage for activation. *J Gen Physiol* 139(1):3–17.

Supporting Information

Souza et al. 10.1073/pnas.1413971111

SI Materials and Methods

Sequence and Structural Analysis. The pairwise primary sequence similarity s_{kl} was calculated as the percentage of similar amino acids between voltage-sensor sequences k and l . Only amino acids delineating the S4-gating pore were considered for computation of s_{kl} . Fig. S1 shows the multiple sequence alignment considered for computation of s_{kl} and its representation in the form of a graph.

For any given VS structure k , the microscopic configuration of S4 relative to its protein environment was described via a contact matrix $M_k = [r_{ij}]_{m \times n}$ mapping the helix electrostatic interactions. Specifically, r_{ij} is the separation distance between the geometrical centers of the charged moiety of a given S4 residue $i = \{R1, \dots, R4\}$ and the charge moiety of a given negatively charged group $j = \{B1, \dots, B4\}$; Table S2 presents the identity for the ij sets considered in the study. Within this scheme, the structural difference Δr_{kl} between structures k and l was computed as the root squared deviation of their contact matrices. The microscopic configuration of S4 within the protein surroundings was further described in terms of its (center of mass) transmembrane position z_k and twist angle ω_k . The values of z_k and ω_k were determined after elimination of overall rotation and translation of the VS structures, by fitting the binding sites j over the structures. Only the backbone atoms of the S4 residues were included in the calculations. From these definitions, the structural distances Δz_{kl} and $\Delta \omega_{kl}$ were computed as root squared deviations. The structural analysis is presented in Fig. S2.

Molecular Dynamics. The structures were embedded in the lipid bilayer for MD simulation and subsequent voltage coupling calculations. In detail, each structure inserted in a fully hydrated and neutral (zwitterionic) phospholipid bilayer was relaxed over an MD trajectory spanning ~ 20 ns, at constant temperature (300 K) and pressure (1 atm), neutral pH, and with no applied TM electrostatic potential. In these simulations, the root mean square deviation (RMSD) profile of the VS converges to a plateau value less than $1.5 \pm 1.0 \text{ \AA}$, indicative of structural stability of the domain in the lipid bilayer (Fig. S3). The observed stability is consistent with the equilibrium conditions of the domain reported in the previous MD studies originating some of these structures (Table S1). In particular, these results show that the recently determined X-ray structures of the proton channel mHv1cc and the phosphatase sensor domain Ci-VSP are stable on the time-scale of the MD simulations when equilibrated in a lipid bilayer.

The MD simulations were carried out using the program NAMD2 (1). Langevin dynamics was applied to keep the temperature fixed at 300 K. The equations of motion were integrated using a multiple time step algorithm (2). Short- and long-range forces were calculated every one and two time steps, respectively, with a time step of 2.0 fs. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Long-range electrostatic forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach (3), and water molecules were described using the TIP3P model (4). The simulation used

the CHARMM22-CMAP (5) force field with torsional cross-terms for the protein and CHARMM27 for lipids (6). A united-atom representation was adopted for the acyl chains of the lipid molecules (7). All the protein charged amino acids were simulated in their full-ionized state (pH = 7.0). Simulations were performed on a local high performance cluster facility at Laboratório de Biologia Teórica e Computacional.

Voltage-Coupling Calculations. The voltage coupling map $\phi_k(\mathbf{r})$ for the voltage-sensor structure k was estimated at position \mathbf{r} by solving the PB-V equation (Eq. 9). $\phi_k(\mathbf{r})$ was computed as an ensemble average $\phi_k(\mathbf{r}) \equiv \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \phi_k^j(\mathbf{r})$ over $\phi_k^j(\mathbf{r})$; the PB-V solution for the instantaneous configuration j taken from the last 2 ns of the MD trajectory. We used APBS 1.3 (8) to compute $\phi_k^j(\mathbf{r})$ following the procedure described in previous studies (9, 10). Briefly, the PB-V equation was solved through a finite-difference scheme, by considering a 200-\AA cubed box and a grid of $1.0 \times 1.0 \times 1.0 \text{ \AA}^3$. By-representing explicitly the protein atoms without any charges, a dummy run was first carried out with APBS to generate dielectric, charge, and accessibility maps for the molecule in solution. Following the molecular surface definition, the internal dielectric constant of the protein was set to 2. The electrolyte solution was represented with a dielectric constant of 80 and a salt concentration of 100 mM. These maps were then modified for the inclusion of a low-dielectric ($\epsilon = 2$) lipid surrogate and boundary conditions required to impose voltage differences across the membrane. Specifically, the boundary conditions were obtained from the analytical solution of the PB-V equation for a planar slab of low dielectric material embedded within symmetric electrolyte solutions and under applied voltage. Input files and maps for APBS were generated with APBSmem (11).

In order to evaluate the dependence of the results with the continuum electrostatic assumption within the PB-V framework, we also quantified $\phi_k(\mathbf{r})$ following the all-atom formulation embodied in the electrical distance definition. To solve Eq. 10, the electrostatic potential map $\Phi_k(\mathbf{r}, V)$ was first computed for $V_l = 0$ mV following the average scheme as before i.e., $\Phi_k(\mathbf{r}, V) \equiv \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \Phi_k^j(\mathbf{r}, V)$, in which $\Phi_k^j(\mathbf{r}, V)$ is the solution to the Poisson equation for configuration j taken from the last 2 ns of the MD trajectory (as described above). One second average map $\Phi_k(\mathbf{r}, V)$ at $V_2 = 650$ mV was then computed from the 2-ns trajectory, but recalculated through an independent MD simulation under applied voltage. As illustrated in Fig. S4A, the charge imbalance protocol that was devised in ref. 12 to impose a transmembrane voltage in protein-membrane systems was used for that purpose. Finally, $\Phi_k(\mathbf{r}, V_1)$ and $\Phi_k(\mathbf{r}, V_2)$ were replaced into Eq. 10 to solve $\phi_k(\mathbf{r})$ for $dV = 650$ mV. The value of dV is not important here given the linearity of the electrical distance definition with the external voltage. Fig. S4B shows the profiles of $\Phi_k(\mathbf{r}, V_1)$ and $\Phi_k(\mathbf{r}, V_2)$ along the transmembrane direction of the system. For the computation of the electrostatic potential maps, we used the PME method (13) as implemented in VMD (14), with a spherical Gaussian of inverse width $\sigma = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$ and a grid of $1.0 \times 1.0 \times 1.0 \text{ \AA}^3$.

1. Phillips JC, et al. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781–1802.
2. Izaguirre JA, Reich S, Skeel R (1999) Longer time steps for molecular dynamics. *J Chem Phys* 110(26):9853–9864.
3. Darden T, York D, Pedersen L (1993) Particle mesh Ewald - An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98(12):10089–10092.
4. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79(2):926–935.

5. MacKerell AD, Jr, Feig M, Brooks CL, 3rd (2004) Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J Am Chem Soc* 126(3):698–699.
6. Feller SE, MacKerell AD, Jr (2000) An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* 104(31):7510–7515.
7. Héning J, Shinoda W, Klein ML (2008) United-atom acyl chains for CHARMM phospholipids. *J Phys Chem B* 112(23):7008–7015.
8. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10037–10041.

9. Grabe M, Lecar H, Jan YN, Jan LY (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating of ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(51):17640–17645.
10. Jogini V, Roux B (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys J* 93(9):3070–3082.
11. Callenberg KM, et al. (2010) APB5mem: A graphical interface for electrostatic calculations at the membrane. *PLoS ONE* 5(9):e12722.
12. Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Phys Chem B* 112(18):5547–5550.
13. Aksimentiev A, Schulten K (2005) Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys J* 88(6):3745–3761.
14. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38, 27–28.

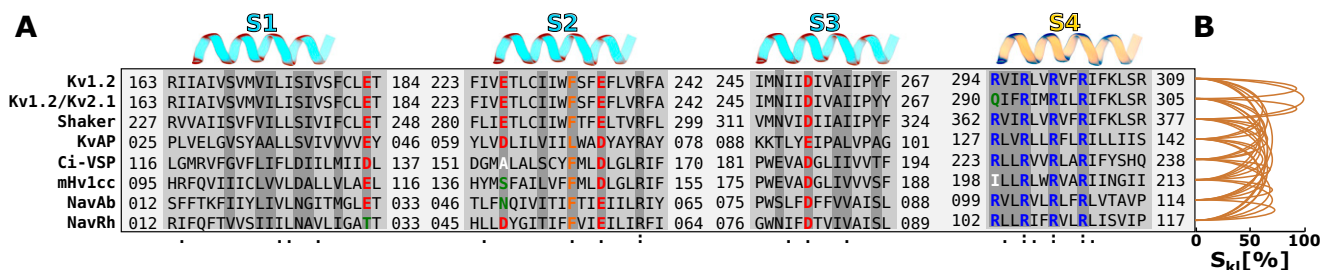


Fig. S1. (A) Multiple sequence alignment. Amino acids belonging to segments S1 through S4 and the gating pore (dark gray) are highlighted. «:» and «.» indicate the identical and the similar amino acids matches along the sequence alignment. (B) Graph representation of the primary sequence similarities S_{kl} between sensor domains k and l . Only amino acids delineating the gating pore region were included in the computation.

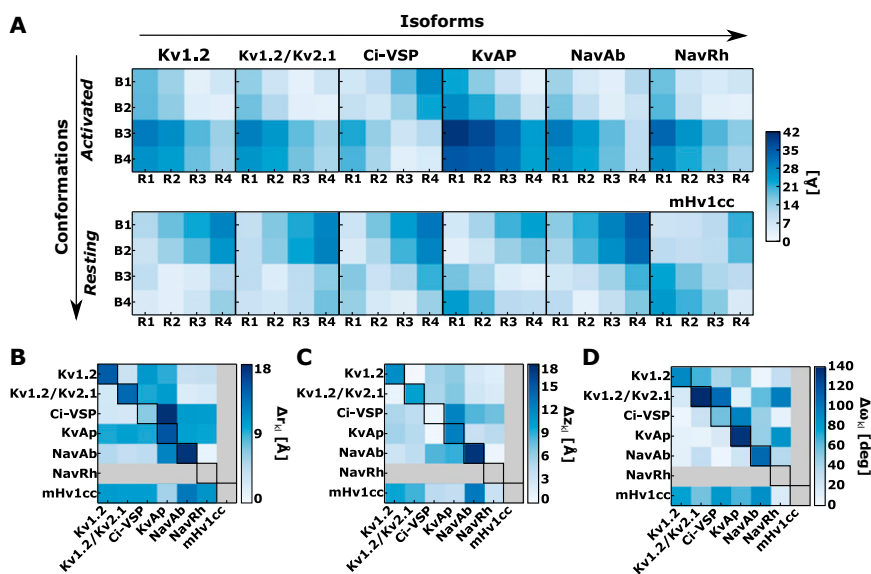


Fig. S2. Structural analysis. (A) Contact matrix M_k of VS structure k . Here, the matrix maps the domain electrostatic interactions between the S4-basic residues (numbered R_1 to R_4) and their binding sites (numbered B_1 to B_4). Table S2 gives the identity and numbering of these residues/groups for the VS domains. (B–D) Structural distances Δr_{kl} , Δz_{kl} , and $\Delta \omega_{kl}$ mapping, respectively, differences in the contact map, the transmembrane position, and the helical twist of S4 between sensor domains k and l . In each matrix representation, the on-diagonal entries report structural distances between conformations of the same domain. In contrast, the off-diagonal entries in the lower triangular region of the matrix show the distances between the resting conformation of distinct domains, whereas those in the upper triangular region are the same estimates for the activated conformation. Note that, the structural distances between the resting and the activated configuration of the S4 helix cannot be evaluated for mHv1cc and NavRh as only one of these states is known for these domains. In the computation of Δr_{kl} , Δz_{kl} , and $\Delta \omega_{kl}$, each of the estimates M_k , Z_k , and ω_k corresponds to an average over four independent domain subunits.

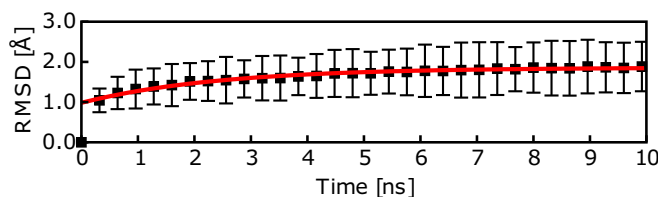


Fig. S3. Root mean square deviation (RMSD) profile of membrane-bound VS domains. The dataset (black) is shown as an average over simulations and adjusted to one single exponential fit (red). Only heavy atoms of the helical segments S1 through S4 were included in the calculation.

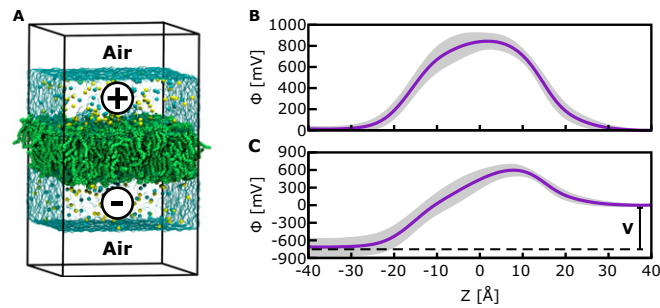


Fig. 54. Channel simulations under TM potentials. (A) Charge-imbalance simulation protocol. The channel embedded in a fully hydrated phospholipid bilayer at ~ 100 mM salt solution is simulated in the NVT ensemble with 3D periodic-boundary conditions by considering air–water interfaces at both ends of the system along the z direction, normal to the bilayer. Because the membrane/channel system behaves as a condenser, an imposed net charge imbalance q_0 between the upper and lower electrolytes creates the transmembrane potential V . Here, an excess of cations was displaced into the upper electrolyte of the system thus creating a hyperpolarized voltage difference of ~ 650 mV. (B) Electrostatic potential profile $\Phi(z, V)$ across the bilayer. As a reference, $\Phi(z, V)$ is set to zero in the upper electrolyte. Considering the present protocol, the difference between the plateau values at the two electrolytes corresponds to the TM potential V .

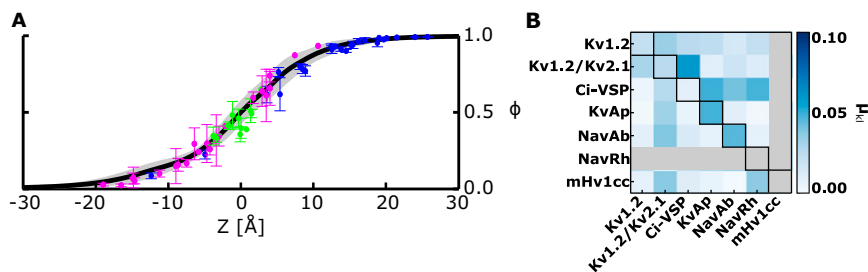


Fig. 55. Voltage coupling analysis through continuum electrostatic calculations. (A) Voltage coupling ϕ profile along the TM direction z of the gating pore. The dataset (black) is presented as an average over the dataset, with associated error bars (gray shading). Also shown are coupling values for the phenyl center (green) and the S4 basic amino acids in their activated (dark blue) and resting (pink) positions along the *gating* pore. (B) Field reshaping μ_{kl} between voltage-sensor structures k and l . Diagonal values report the μ_{kl}^{XY} estimates between conformations of a fixed domain isoform, whereas lower and upper triangular regions of the matrix representation present, respectively, the $\mu_{kl}^{XX^*}$ and $\mu_{kl}^{YY^*}$ estimates for a fixed conformation over distinct isoforms. In the computation of μ_{kl} , each of the profiles $\phi_k(z)$ and $\phi_l(z)$ corresponds to an average over four independent domain subunits. Note that, the present estimates strongly agree with those following the all-atom formulation through the electrical distance definition (Fig. 4).

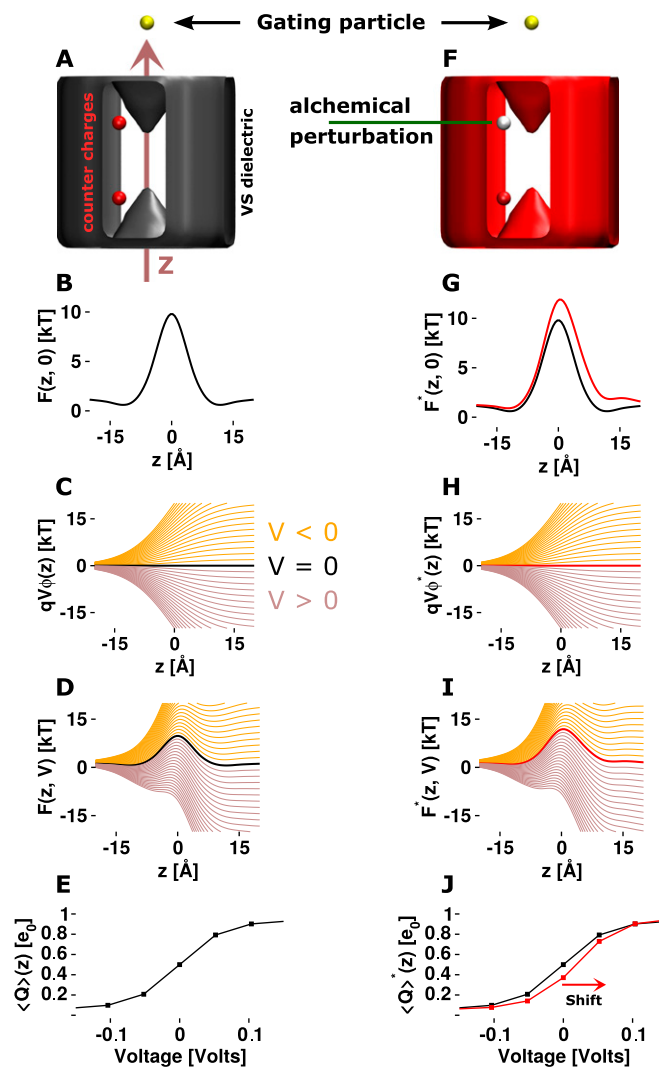


Fig. S6. Voltage-dependent operation of a minimalist continuum electrostatic model of the VS. By construction, the model (A) consists of a single gating particle q embedded in a hourglass-like, low dielectric that disconnects two outwardly oriented high dielectric regions along the transmembrane direction z of the *gating* pore; q is assumed further to interact with two counter charges. The position-dependent chemical free energy of the particle $F(z, 0)$ (B) is an expected profile featuring two equally stable states (resting and activated) spaced by an activation barrier as a result of nonbonded interactions and solvation energies of q ; resting and activated stand for configurations in which q is, respectively, positioned below and above the hydrophobic core of the gating pore. Hence, the position and voltage-dependent free energy of the particle $F(z, V)$ arises from balancing $F(z, 0)$ with the electrical energy component $qV\phi(z)$ (C) in which, $\phi(z)$ is the voltage coupling of q with the external voltage V . The landscape $F(z, V)$ (D) determines the operation of the particle that features all-or-none state occupancy at various voltage potentials as indicated by the $\langle Q \rangle(V)$ curve (E); $\langle Q \rangle(V)$ is the average gating charge displacement $\langle Q \rangle(V) = \int dz' q\phi(z')P(z', V)$ with, $P(z, V)$ denoting the canonical probability density of the particle that is $P(z, V) = e^{-\beta F(z, V)} / \int dz' e^{-\beta F(z', V)}$. An alchemical perturbation induced by partial neutralization of the counter charges (F) modifies the chemical free energy of the gating particle $F^*(z, 0)$ (G) via destabilization of its activated configuration. In light of a hardly modifiable voltage coupling $\phi^*(z) \approx \phi(z)$ (H), the resulting free energy landscape $F^*(z, V)$ (I) dictates an altered voltage-dependent operation of the gating particle as reflected in the rightward shift of $\langle Q \rangle^*(V)$ (J). The rightward shift means that relatively to the former scenario, an equal average gating charge displacement is achieved under perturbation as the destabilization of the chemical free energy of the activated state is balanced with a larger electrical energy at higher voltages. Here, chemical free energy and voltage-coupling profiles were computed with APBS (1) and APBSmem (2), assuming typical dielectric constants for the protein ($\epsilon = 2$), lipids ($\epsilon = 2$), and solvent ($\epsilon = 80$). The apolar contribution of the solvation energy of the gating particle was neglected in the calculation. Note that perturbation-induced left- or rightward shifts in gating charge vs. voltage measurements of real VSs are familiar to most experimentalists. Such an experimental result is suggested here to arise primarily from chemical free energy perturbations of the voltage sensor.

1. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10037–10041.
2. Callenberg KM, et al. (2010) APBSmem: A graphical interface for electrostatic calculations at the membrane. *PLoS ONE* 5(9):e12722.

Table S1. Membrane-equilibrated VS structures considered in the study

VS	Activated	Time (ns)*	Resting	Time (ns)*	$\Delta Q(e)^{\dagger}$
Kv1.2	Treptow et al. (1)	50	Delemotte et al. (2)	2×10^3	3.20 ± 0.08
Kv1.2/Kv2.1	Jensen et al. (3)	15×10^3	Jensen et al. (3)	15×10^4	3.25 ± 0.10
KvAp	Freites et al. (4)	15	Schow et al. (5)	75	2.51 ± 0.05
Ci-VSP	Li et al. (6) [‡]	—	Li et al. (6) [‡]	—	1.2 ± 0.20
mHv1cc	—	—	Takeshita et al. (7) [‡]	—	—
NavAb	Amaral et al. (8)	40	Amaral et al. (8)	40	3.02 ± 0.01
NavRh	Amaral et al. (8)	40	—	—	—

*Time scale corresponding to the unconstrained equilibrated part of the original trajectories.

[†]Gating charge calculated per VS domain as described in the original papers.

[‡]Membrane equilibrated structures for Ci-VSP and mHv1cc were obtained by simulating the respective X-ray structures.

- Treptow W, Tarek M, Klein ML (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J Am Chem Soc* 131(6):2107–2109.
- Delemotte L, Tarek M, Klein ML, Amaral C, Treptow W (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(15):6109–6114.
- Jensen MØ, et al. (2012) Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336(6078):229–233.
- Freites JA, Tobias DJ, White SH (2006) A voltage-sensor water pore. *Biophys J* 91(11):L90–L92.
- Schow EV, Freites JA, Gogna K, White SH, Tobias DJ (2010) Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel. *Biophys J* 98(12):2857–2866.
- Li Q, et al. (2014) Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain. *Nat Struct Mol Biol* 21(3):244–252.
- Takeshita K, et al. (2014) X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol* 21(4):352–357.
- Amaral C, Carnevale V, Klein ML, Treptow W (2012) Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(52):21336–21341.

Table S2. S4 arginines and their binding sites in the voltage-sensor variants

Channel	R ₁ to R ₄ *	B ₁ to B ₄ *
Kv1.2	R ²⁹⁴ , R ²⁹⁷ , R ³⁰⁰ , R ³⁰³	E ¹⁸³ , E ²²⁶ , E ²³⁶ , D ²⁵⁹
Kv1.2/Kv2.1	Q ²⁹⁰ , R ²⁹³ , R ²⁹⁶ , R ²⁹⁹	E ¹⁸³ , E ²²⁶ , E ²³⁶ , D ²⁵⁹
KvAP	R ¹²⁷ , R ¹³⁰ , R ¹³³ , R ¹³⁶	E ⁰⁴⁵ , D ⁰⁶² , D ⁰⁷² , E ⁰⁹³
Ci-VSP	R ²²³ , R ²²⁶ , R ²²⁹ , R ²³²	D ¹³⁶ , A ¹⁵⁴ , D ¹⁶⁴ , D ¹⁸⁶
mHv1cc	I ¹⁹⁸ , R ²⁰¹ , R ²⁰⁴ , R ²⁰⁷	E ¹¹⁵ , S ¹³⁹ , D ¹⁴⁹ , D ¹⁸⁰
NavAb	R ⁰⁹⁹ , R ¹⁰² , R ¹⁰⁵ , R ¹⁰⁸	E ⁰³² , N ⁰⁴⁹ , E ⁰⁵⁹ , E ⁰⁸⁰
NavRh	R ¹⁰² , R ¹⁰⁵ , R ¹⁰⁸ , R ¹¹¹	T ⁰³² , D ⁰⁴⁸ , E ⁰⁵⁸ , E ⁰⁸¹

*For computation of the r_{ij} distances in the VS distance matrix, the ij moieties correspond to the side-chain atoms $H_2N = C_\alpha(NH_2) - N_\alpha - C_\beta H_2(Arg)$, $-OOC_\gamma - C_\beta H_2(Asp)$, $H_2N_{\delta 2} O_{\delta 1} C_\delta - C_\beta H_2(Asn)$, $-OOC_\delta - C_\gamma H_2(Glu)$, and the lipid phosphate group PO_4^- .

RESEARCH ARTICLE

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

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

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

* Manuel.Covarrubias@jefferson.edu



OPEN ACCESS

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

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

Received: March 26, 2015

Accepted: November 4, 2015

Published: November 24, 2015

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

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

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

Materials and Methods

Molecular biology and heterologous expression

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

Ethics Statement

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

Electrophysiology

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

Data analysis

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

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

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

or the double Boltzmann equation:

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

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

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

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

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

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

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

or a double Hill equation:

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

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

Computational Methods

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

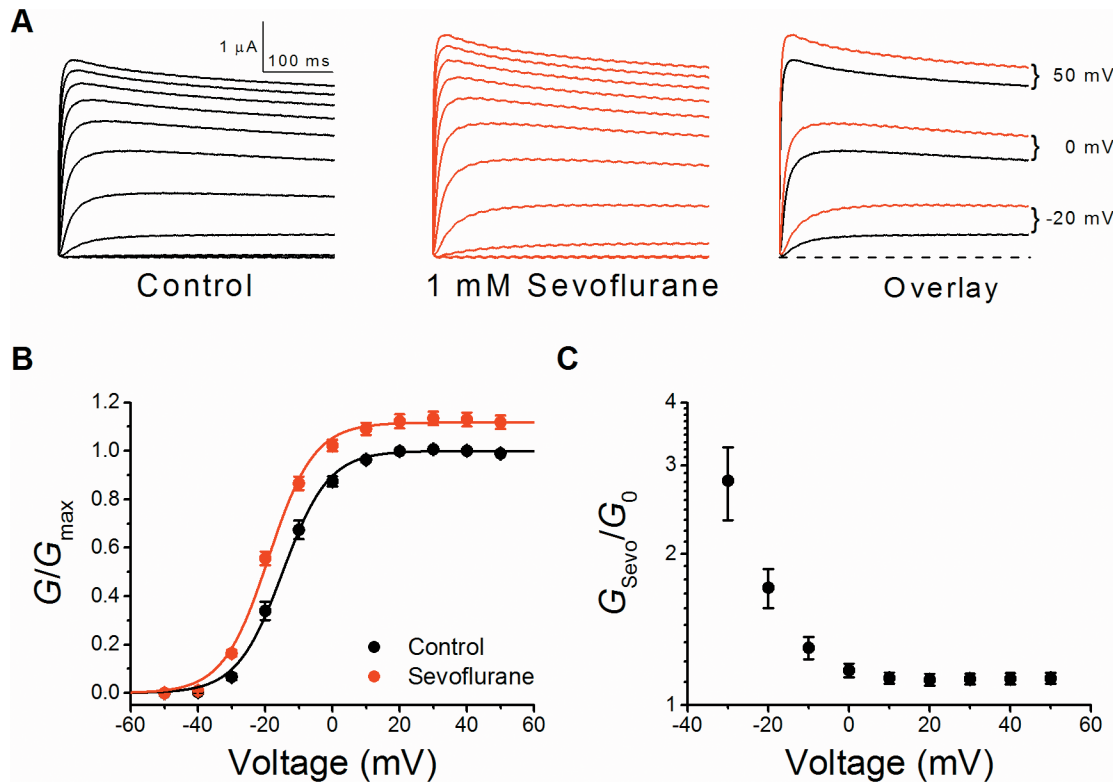


Fig 1. Positive modulation of the Kv1.2 conductance by sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte Kv1.2 currents before (*left*) and after exposure to 1 mM sevoflurane (*center*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The steps were delivered in increments of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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g001

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

Results

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

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

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

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

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.t001

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

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

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

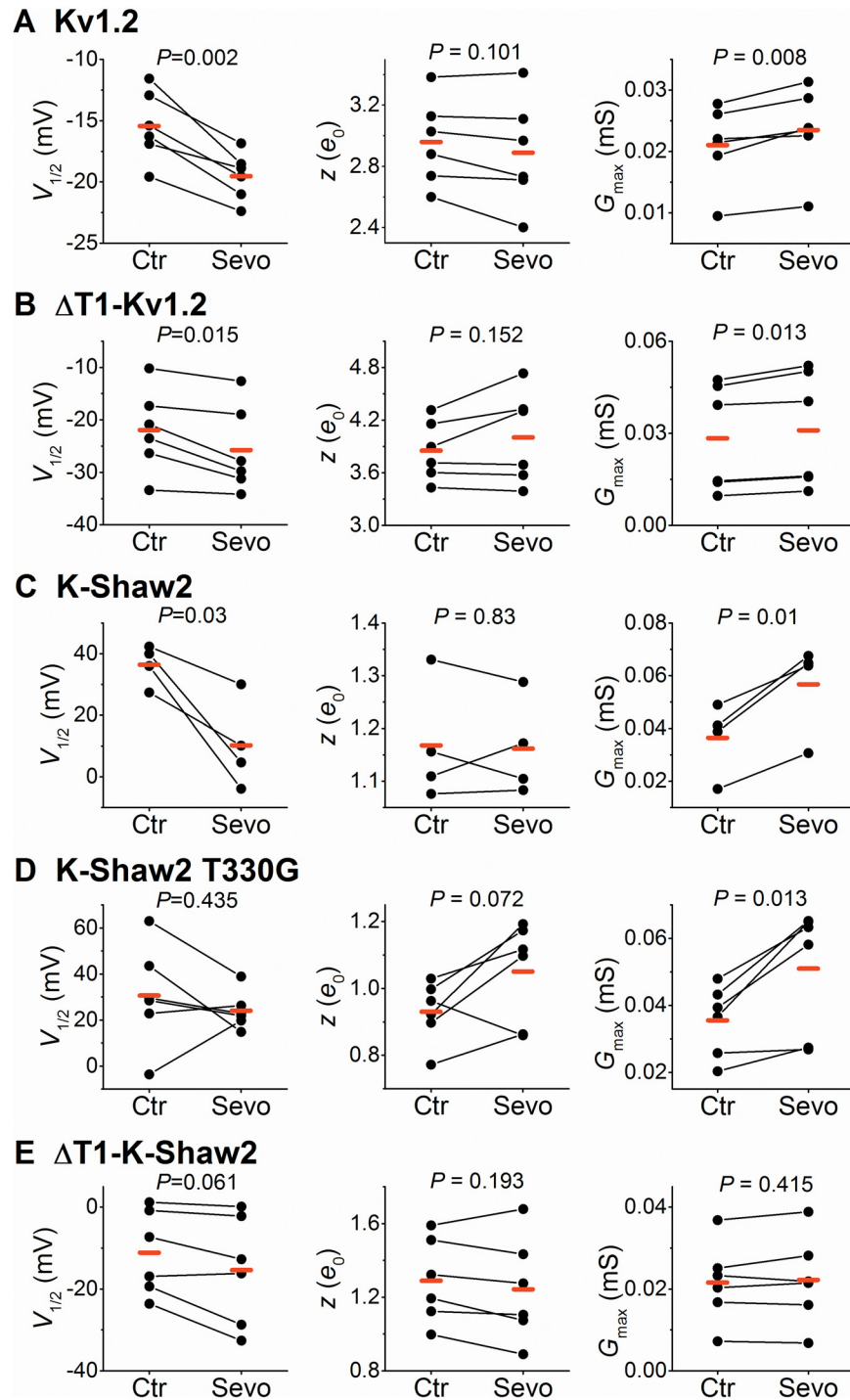


Fig 2. Analysis of G-V relations from Kv1.2, ΔT1-Kv1.2, K-Shaw2, K-Shaw2 T330G and ΔT1-K-Shaw2. (A) Best-fit Boltzmann parameters ($V_{1/2}$, z and G_{max}) from individual paired measurements before (Ctr) and after exposure to 1 mM sevoflurane (Sevo). Each pair of symbols connected by a *solid* line represents an individual paired experiment (Materials and Methods). The G_{max} graphs depict raw values before normalization (in mS). The P value resulting from a paired Student-*t* test is shown above each graph, and the red marks indicate the mean values of the sample. (B)–(E) are as described for panel A. The number oocytes examined for each Kv channel was 6, 6, 4, 6 and 6, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g002

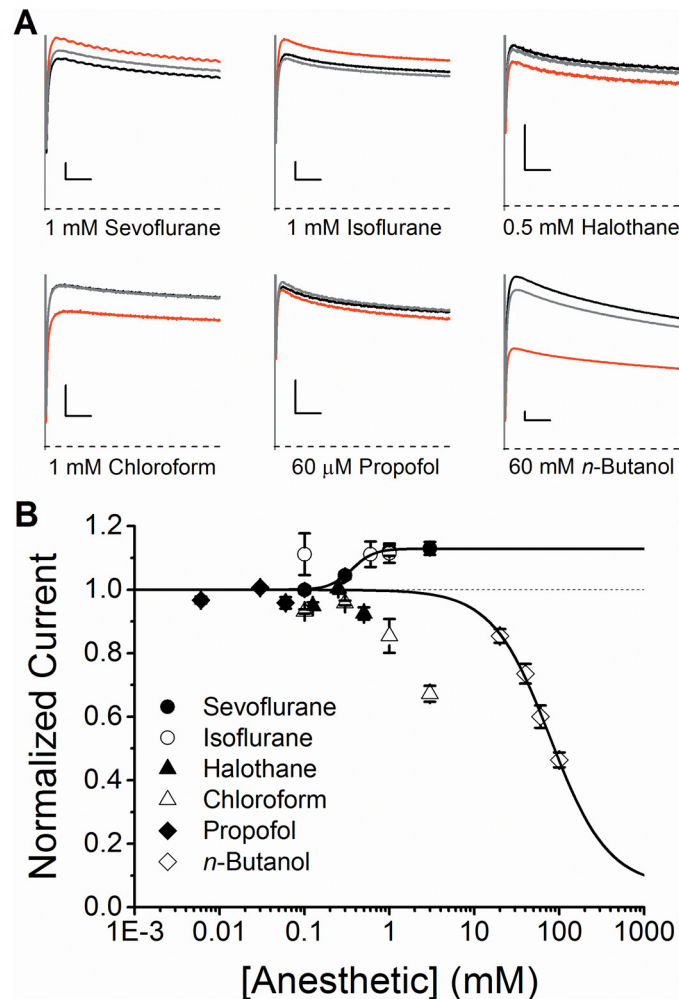


Fig 3. Modulation of the Kv1.2 channel by general anesthetics. (A) Effects of general anesthetics on the whole-oocyte Kv1.2 currents evoked by a voltage step to +60 mV from a holding voltage of -100 mV. Black, red and grey current traces correspond to control, anesthetic-exposed, and washout, respectively.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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g003

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

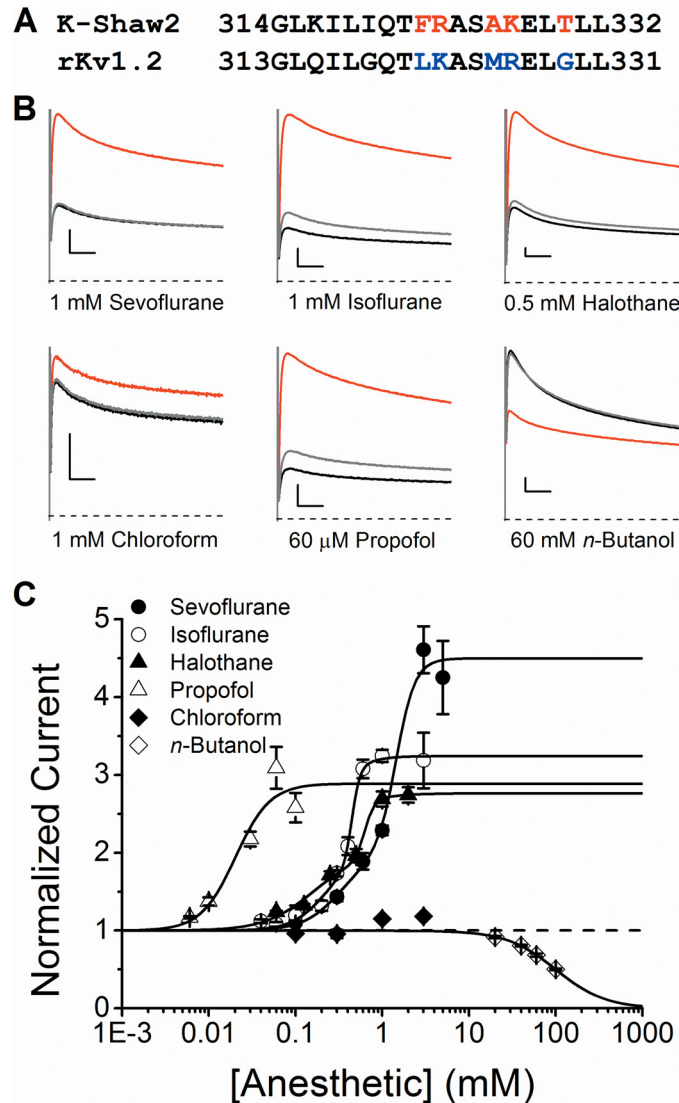


Fig 4. Modulation of Kv1.2 FRAKT by general anesthetics. (A) Sequence alignment of the S4-S5 linker from K-Shaw2 (314–332) and Kv1.2 (313–331) channels. Starting and ending residue numbers of the shown segments are indicated. In Kv1.2, the blue colored residues were swapped for the red colored residues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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g004

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

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

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

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

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

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

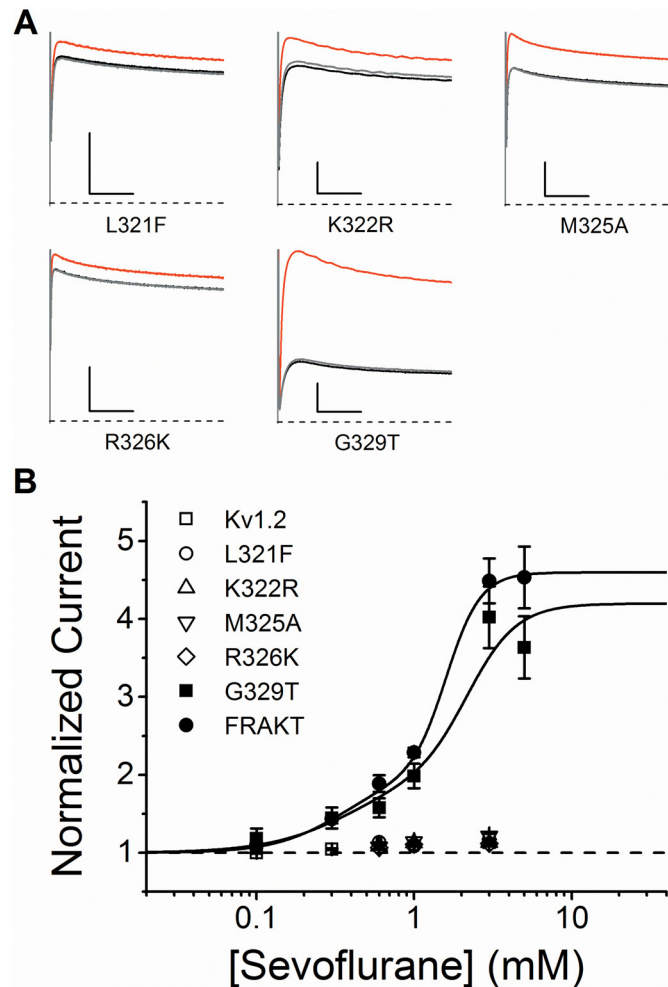


Fig 5. Kv1.2 G329T recapitulates the magnified positive modulation of Kv1.2 FRAKT by sevoflurane. (A) Effects of 1 mM sevoflurane on mutant whole-oocyte Kv1.2 currents evoked by a voltage step to +60 mV from a holding voltage of -100 mV. *Black, red and grey* current traces correspond to control, anesthetic-exposed,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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g005

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

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

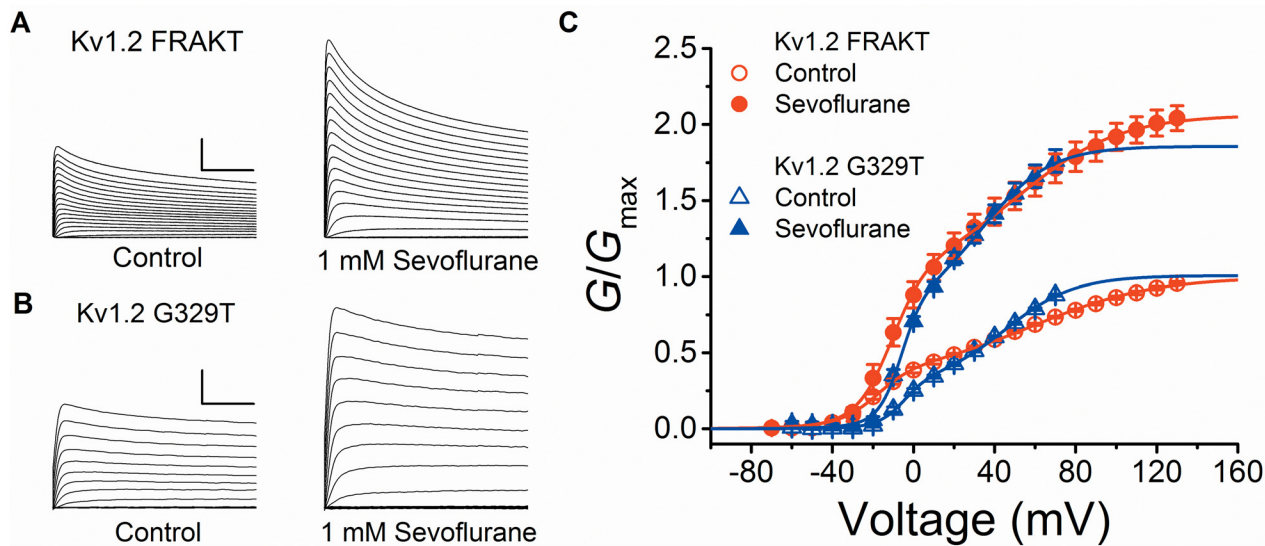


Fig 6. Novel G-V relations of Kv1.2 FRAKT and Kv1.2 G329T in the absence and presence of sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte Kv1.2 FRAKT currents in the absence (*left*) and presence of 1 mM sevoflurane (*right*). Currents were evoked by step depolarizations from a holding voltage of -100 mV. The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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g006

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

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

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

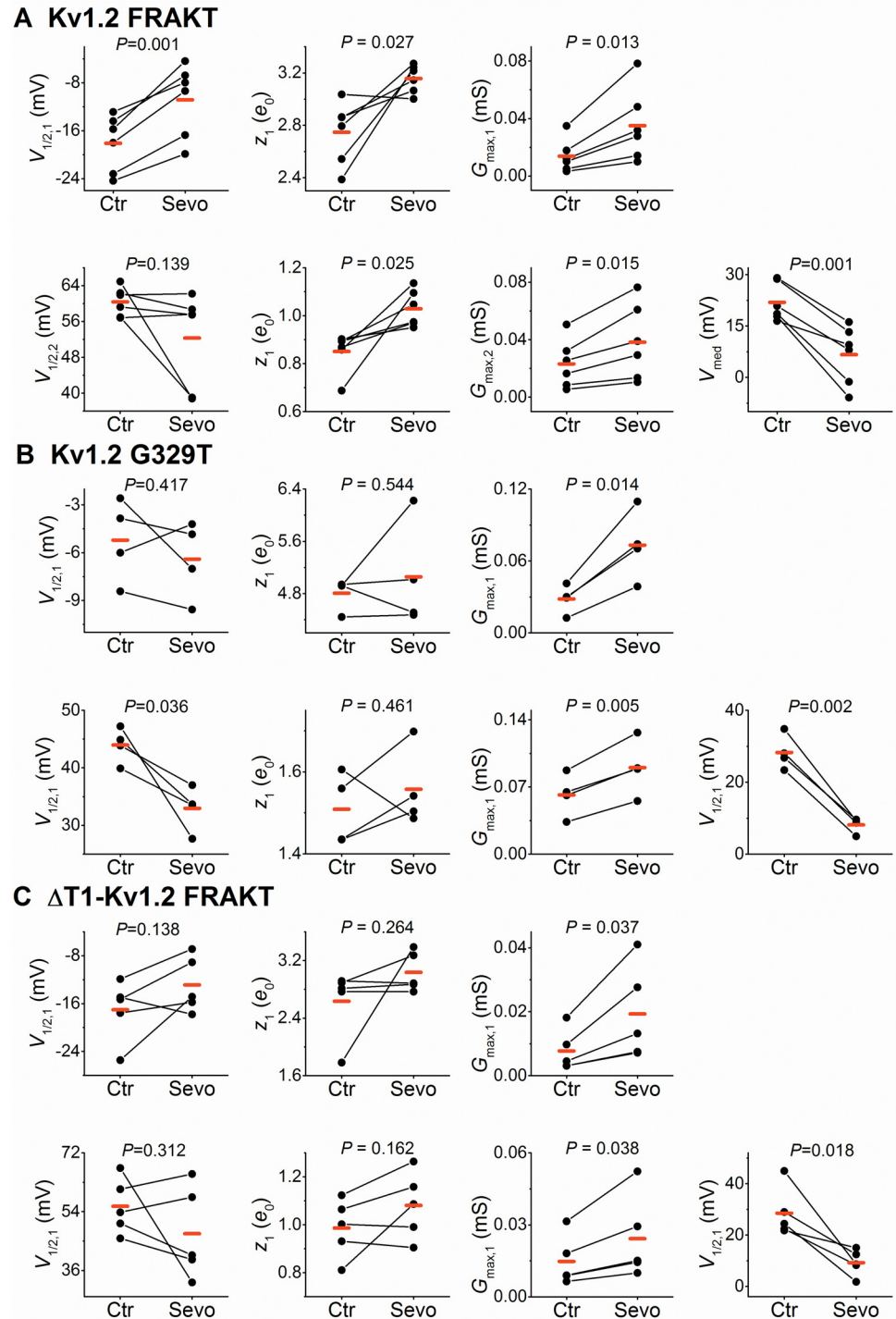


Fig 7. Analysis of bimodal G-V relations from Kv1.2 FRAKT, Kv1.2 G329T and ΔT1-Kv1.2 FRAKT. (A) Best-fit double Boltzmann parameters ($V_{1/2,1}$, Z_1 , $G_{max,1}$, $V_{1/2,2}$, Z_2 , $G_{max,2}$) and V_{med} from individual paired measurements before (Ctr) and after exposure to 1 mM sevoflurane (Sevo).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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g007

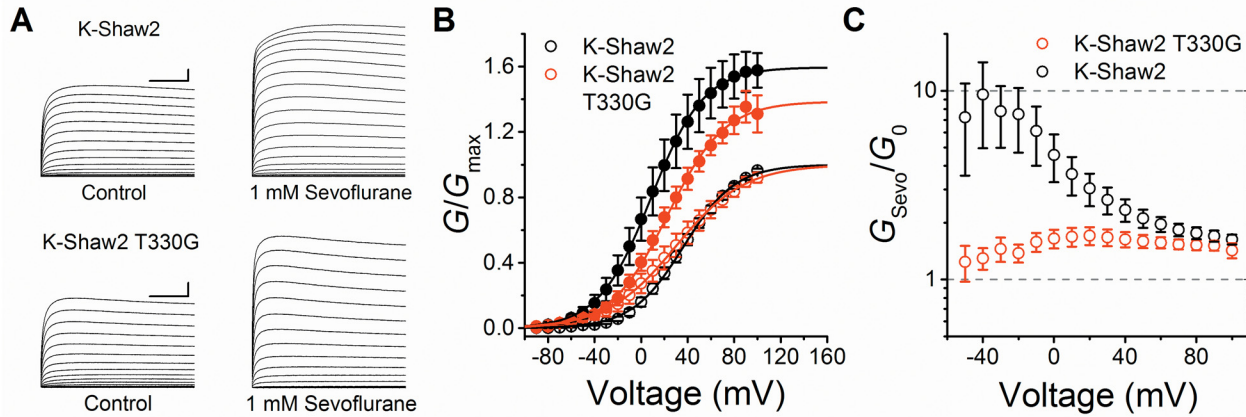


Fig 8. The T330G mutation eliminates the voltage-dependent potentiation of the K-Shaw2 conductance by sevoflurane. (A) Families of whole-oocyte K-Shaw2 (N = 4) and K-Shaw2 T330G (N = 6) currents in the absence (*left*) and presence of 1 mM sevoflurane (*right*). Currents were evoked by step depolarizations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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g008

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

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

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

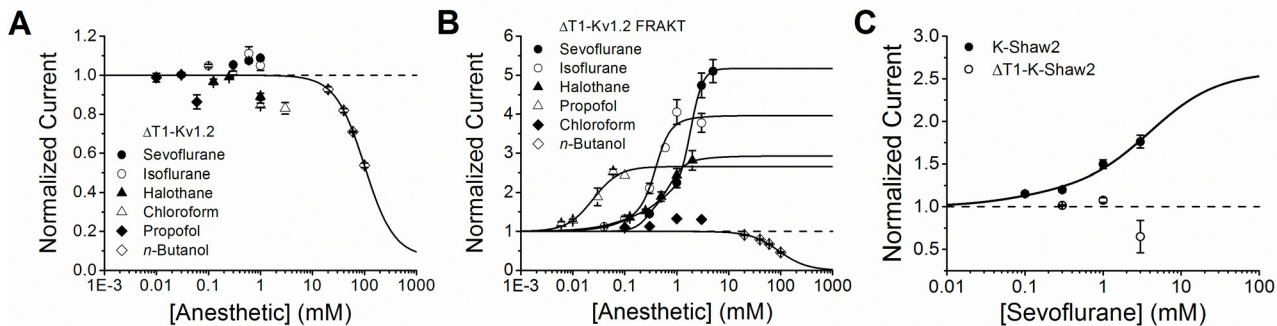


Fig 9. Positive modulation by sevoflurane is T1 domain-independent in Kv1.2 and Kv1.2-FRAKT, and T1 domain-dependent in K-Shaw2. (A) Concentration-response relations of various general anesthetics acting on Δ T1-Kv1.2. *Solid* line is the best fit to the Hill equation for *n*-butanol. (B) Concentration-response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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g009

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

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

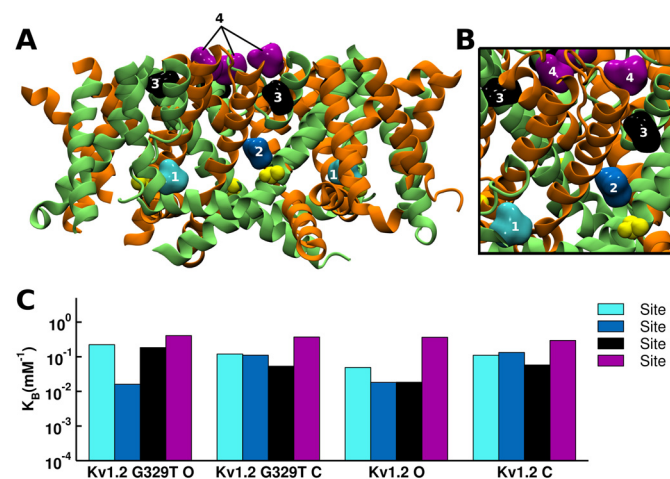


Fig 10. Putative sevoflurane binding sites in the Kv1.2 channel. (A) Representation of four distinct sevoflurane binding locations on Kv1.2: site 1 (light blue), 2 (blue), 3 (black) and 4 (purple). Each pair of subunits is represented in green and orange. Mutation G329T is highlighted yellow. (B) Close-up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

doi:10.1371/journal.pone.0143363.g010

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

Discussion

Distinct gating processes in Kv channels

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

Putative mechanism of sevoflurane action on Kv channels

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

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

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

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

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

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

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

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

Concluding remarks

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

Supporting Information

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

Acknowledgments

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

Author Contributions

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

References

1. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(5):370–86. doi: [10.1038/nrn2372](https://doi.org/10.1038/nrn2372) PMID: [18425091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425091/)
2. Kopp Lugli A, Yost CS, Kindler CH. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. *Eur J Anaesth*. 2009; 26(10):807–20. doi: [10.1097/EJA.0b013e32832d6b0f](https://doi.org/10.1097/EJA.0b013e32832d6b0f) PMID: [19494779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19494779/); PubMed Central PMCID: [PMC2778226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2778226/).
3. Hemmings HC Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth*. 2009; 103(1):61–9. doi: [10.1093/bja/aep144](https://doi.org/10.1093/bja/aep144) PMID: [19508978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19508978/)
4. Herold KF, Hemmings HC Jr. Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Front Pharmacol*. 2012; 3:50. Epub 2012/04/06. doi: [10.3389/fphar.2012.00050](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00050) PMID: [22479247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22479247/); PubMed Central PMCID: [PMC3316150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3316150/).
5. Barber AF, Carnevale V, Klein ML, Eckenhoff RG, Covarrubias M. Modulation of a voltage-gated Na⁺ channel by sevoflurane involves multiple sites and distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(18):6726–31. Epub 2014/04/23. doi: [10.1073/pnas.1405768111](https://doi.org/10.1073/pnas.1405768111) PMID: [24753583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24753583/); PubMed Central PMCID: [PMC34020080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC34020080/).
6. Barber AF, Liang Q, Amaral C, Treptow W, Covarrubias M. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys J*. 2011; 101(7):1613–22. doi: [10.1016/j.bpj.2011.08.026](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.026) PMID: [21961587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21961587/)
7. Barber AF, Liang Q, Covarrubias M. Novel activation of voltage-gated K⁺ channels by sevoflurane. *J Biol Chem*. 2012; 287(48):40425–32. Epub 2012/10/06. doi: [10.1074/jbc.M112.405787](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405787) PMID: [23038249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23038249/); PubMed Central PMCID: [PMC3504757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3504757/).
8. Alkire MT, Asher CD, Franciscus AM, Hahn EL. Thalamic microinfusion of antibody to a voltage-gated potassium channel restores consciousness during anesthesia. *Anesthesiology*. 2009; 110(4):766–73. Epub 2009/03/27. PMID: [19322942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19322942/).
9. Lioudyno MI, Birch AM, Tanaka BS, Sokolov Y, Goldin AL, Chandy KG, et al. Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics. *J Neurosci*. 2013; 33(41):16310–22. Epub 2013/10/11. doi: [10.1523/jneurosci.0344-13.2013](https://doi.org/10.1523/jneurosci.0344-13.2013) PMID: [24107962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24107962/); PubMed Central PMCID: [PMC3792466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3792466/).
10. Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol*. 2004; 66:477–519. PMID: [14977411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14977411/)
11. Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(7):548–62. PMID: [16791144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16791144/)
12. Robbins CA, Tempel BL. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia*. 2012; 53 Suppl 1:134–41. doi: [10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x) PMID: [22612818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22612818/).
13. Bhattacharji A, Klett N, Go RC, Covarrubias M. Inhalational anaesthetics and n-alcohols share a site of action in the neuronal Shaw2 Kv channel. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(7):1475–85. doi: [10.1111/j.1476-5381.2010.00642.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00642.x) PMID: [20136839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20136839/)
14. Blunck R, Batulan Z. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol*. 2012; 3:166. doi: [10.3389/fphar.2012.00166](https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00166) PMID: [22988442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22988442/)
15. Chowdhury S, Haehnel BM, Chanda B. Interfacial gating triad is crucial for electromechanical transduction in voltage-activated potassium channels. *J Gen Physiol*. 2014; 144(5):457–67. doi: [10.1085/jgp.201411185](https://doi.org/10.1085/jgp.201411185) PMID: [25311635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25311635/); PubMed Central PMCID: [PMC4210428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4210428/).

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



✦ Author's Choice

Biophysical studies of cholesterol effects on chromatin^S

Isabel T. G. Silva,^{1,*} Vinícius Fernandes,^{1,*†} Caio Souza,[†] Werner Treptow,^{2,†}
and Guilherme M. Santos^{2,*}

Laboratório de Farmacologia Molecular, Departamento de Farmácia,* and Laboratório de Biologia Teórica e Computacional, Departamento de Biologia Celular,[†] Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

ORCID ID: 0000-0003-1489-2161 (G.M.S.)

Abstract Changes in chromatin structure regulate gene expression and genome maintenance. Molecules that bind to the nucleosome, the complex of DNA and histone proteins, are key modulators of chromatin structure. Previous work indicated that cholesterol, a ubiquitous cellular lipid, may bind to chromatin in vivo, suggesting a potential function for lipids in modulating chromatin architecture. However, the molecular mechanisms of cholesterol's action on chromatin structure have remained unclear. Here, we explored the biophysical impact of cholesterol on nucleosome and chromatin fibers reconstituted in vitro and characterized in silico the cholesterol binding to the nucleosome. Our findings support that cholesterol assists 10 and 30 nm chromatin formation and induces folding of long chromatin fibers as a result of direct interaction of the cholesterol to six nucleosomal binding sites.—Silva, I. T. G., V. Fernandes, C. Souza, W. Treptow, and G. M. Santos. **Biophysical studies of cholesterol effects on chromatin.** *J. Lipid Res.* 2017. 58: 934–940.

Supplementary key words lipids • physical biochemistry • molecular biology

Chromatin is a macromolecular complex composed of distinct molecules. The nucleosome is the repetitive basic unit of chromatin. Nucleosomes arise from the precise stoichiometric interaction of proteins and DNA. Positively charged histone proteins interact with the DNA and provide an optimal strategy to functionally pack the genetic code inside a cell.

Changes in chromatin architecture are decisive for regulating the access of transcription factors, coregulators, and the basic transcription machinery to specific enhancers in target genes [reviewed in (1)]. Thus, chromatin state defines the functional genomic regulation.

The influence of different ions, such as of divalent cations Mg²⁺ or Ca²⁺, on the nucleosome and chromatin structure has been well-characterized in vitro (2). Under low-salt conditions in vitro, chromatin adopts an open conformation known as “beads on a string” or the 10 nm fiber. In a physiological ionic environment, with the presence of Mg²⁺ and the correct linker histone stoichiometry, the chromatin can fold to form a compacted chromatin structure, the 30 nm fiber (3). However, the impact of chromatin folding states on gene expression and phenotypic outcomes is difficult to predict due to the dynamic movement of the chromatin fibers in the nuclear environment. Furthermore, the full complement of nuclear molecules that affect chromatin structure and affect fundamental processes in the cell, such as transcription and DNA repair, is still unknown (4).

Although chromatin structural and functional states are largely defined by nucleosome binding proteins (NBPs) and the state of the histone H4 tail (5), the nuclear environment comprises several small molecules that may directly bind to chromatin [e.g., magnesium (6) and lipids (7)]. Conceivably, all these substances may have a considerable impact on chromatin architecture.

The characterization of endonuclear lipids has motivated a growing number of studies to hypothesize that this class of molecules may have an important and functional role on chromatin structure and gene expression (8).

Cholesterol is a ubiquitous cellular lipid, which is essential for steroid hormone production, the structural integrity of cellular membranes, and cell growth. Seminal studies in rats have shown that labeled cholesterol administered by gavage was detected within 2 h in the nuclei, associated with chromatin fibers purified from rats (9). Moreover, binding assays suggested that cholesterol binds to chromatin through

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Grants 483968/2013-7, 305008/2015-3, 23038.010052/2013-95, and 14/2013.

The authors declare no competing financial interests.

***Author's Choice**—Final version free via Creative Commons CC-BY license.

Manuscript received 16 January 2017 and in revised form 20 March 2017.

Published, JLR Papers in Press, March 22, 2017

DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.M074997>

Abbreviations: HO, histone octamer; MD, molecular dynamics; MNase, micrococcal nuclease; NBP, nucleosome binding protein; NCP, nucleosome core particle; TBE, 18 mM Tris-borate EDTA buffer (pH 8) and 0.4 mM EDTA.

¹I. T. G. Silva and V. Fernandes contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed.

e-mail: gsantos@unb.br (G.M.S.); treptow@unb.br (W.T.)

^SThe online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains a supplement.

one or more proteins (10). Later studies increased the understanding of the mechanisms of interaction between chromatin and small lipids and suggested that small lipid molecules, such as cholesterol and short-chain fatty acids, can regulate important epigenetic modifications that lead to chromatin structure changes (11). It has also been observed that the phosphoinositide pathway and changes in its nuclear profile may have a direct role in modulating chromatin structure (12).

Herein, motivated by the biophysical and biochemical aspects of chromatin interactions, we investigated the mechanism of cholesterol action on chromatin structure. *In vitro*, low concentration of cholesterol assisted 10 and 30 nm fibers and mononucleosome formation. Moreover, micrococcal nuclease (MNase) digestion, which targets nucleosome-free regions of long chromatin fibers, was inhibited in the presence of cholesterol. Finally, we used docking and molecular dynamics (MD) simulations to show that cholesterol interacts with nucleosomes through multiple binding sites.

METHODS

In vitro chromatin and mononucleosome reconstitution

The histone octamer (HO) and linker histone (H5) were purified from chicken erythrocyte nuclei as described in Ref. 13. To form mononucleosomes and long chromatin fibers, we used respectively, short DNA (167 bp) and long array (177 bp repeated 36 times) of 601 sequence (14). Titration of HO was performed to determine the saturation point, as described in Ref. 13. Competitor DNA was added only to form long chromatin fibers. Folding of nucleosomal arrays was carried out by dialysis into 1 mM MgCl₂. Soluble cholesterol (S5442; Sigma) was added to the binding buffer or after dialysis when fibers or mononucleosomes were already formed. The analyses of reconstitution and folding were verified by electrophoresis in native agarose gels (0.8%) for long chromatin fibers and native bis-acrylamide gels (6%) for mononucleosomes. Electrophoresis was carried out with 0.2× TBE [18 mM Tris-borate (pH 8) and 0.4 mM EDTA] electrophoresis buffer at 20 mA. For folded chromatin, the samples were first fixed with 0.1% (v/v) glutaraldehyde on ice for 20 min. Densitometry was performed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) version 1.49.

MNase assay

Reconstituted long chromatin fibers (60 nM), in presence or absence of soluble cholesterol, were digested for 8 min with 0.08 u of MNase (New England Biolabs) at 37°C. Aliquots of samples were collected at 0, 1, 2, 4, and 8 min of digestion and stopped with 10 mM EDTA (pH 8.0). The digestion was analyzed by electrophoresis in native agarose gels (0.8%), carried out with 0.2× TBE electrophoresis buffer at 20 mA.

Compaction of long chromatin fibers induced by Mg²⁺

Chromatin compaction by Mg²⁺ was adapted from Rhodes laboratory protocol (13). Briefly, long chromatin fibers were incubated with increasing concentrations of soluble cholesterol (1, 10, and 100 μM final) or labeled cholesterol (0.5 and 1 μM final) [TopFluor® cholesterol, 23-(dipyrrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol; Avanti Polar Lipids] on ice for 30 min (water was used as control). Next, 4.5 mM MgCl₂ were added and incubated

for 15 min on ice. The compacted fibers were pelleted by centrifugation at 15,493 g for 15 min (4°C). The supernatants and pellets were verified by electrophoresis in native 0.8% agarose gels, carried out with 0.2× TBE electrophoresis buffer at 20 mA. Typhoon 9200 was used with 532 nm green laser excitation to visualize cholesterol fluorescence.

Computational methods

Atomistic models were built using high-resolution X-ray structure of the nucleosome core particle (NCP), Protein Data Bank code 1KX5 (15), and cholesterol, Protein Data Bank code 1N83 (16). Following the strategy adopted in our previous studies on ligand binding to proteins (17), AutoDock Vina (18) was used to probe the binding of the cholesterol molecule against 120 NCP independent structures to account for receptor flexibility. These structures were extracted from the last 6 ns of ~20 ns equilibration simulation of the NCP system. All docking solutions were clustered into different groups based on distance. Six putative binding sites for the cholesterol molecule were selected based on the protein region they were bound to. Two systems were then simulated for 200 ns in the presence of three cholesterol molecules representing the most stable conformation found at each binding site. Sites s1, s4, and s6 were simulated in one system, and sites s2, s3, and s5 were simulated in another one. Energy averages were sampled from these simulations in order to compute the binding constants for each cholesterol molecule by the linear interaction energy method (19, 20) (supplemental Fig. S6). All simulations were performed with the program, Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) (21), using the CHARMM 36 force field (22, 23) and TIP3 water model (24). The particle-mesh Ewald (PME) method (25) was employed on the electrostatic calculations and nonbonded interactions were cut off at 11 Å. All systems were simulated at 300 K, 1 atm, and with a 2 fs time step.

All images created and computational analyses were performed using visual MD (26). More details are provided as supplemental material.

RESULTS

Cholesterol assists mononucleosome and chromatin fiber formation in vitro

To better understand the effects of cholesterol on chromatin, we reconstituted long chromatin fibers and mononucleosomes *in vitro* using HOs purified from chicken erythrocytes (supplemental Fig. S1A) on a 601 bp DNA array. As a quality control of the chromatin reconstitution system, we analyzed open and compacted fibers by electron microscopy showing that this system was successful (supplemental Fig. S1B).

We used soluble cholesterol (SintheChol® NS0 supplement; Sigma) with proven physiological relevance (27, 28). Initially, we titrated three different concentrations of cholesterol during mononucleosome reconstitution (1, 10, and 100 μM) (Fig. 1A). When cholesterol was present, the HO concentration needed for DNA saturation was smaller than that needed for reconstitution without cholesterol (Fig. 1A). We observed that cholesterol, at final concentration at 1 μM, led to earlier DNA saturation by HO binding (Fig. 1A), as observed by the formation of mononucleosomes and loss of naked DNA. Pronounced cholesterol effects were also observed at 100 μM final cholesterol concentration. Under

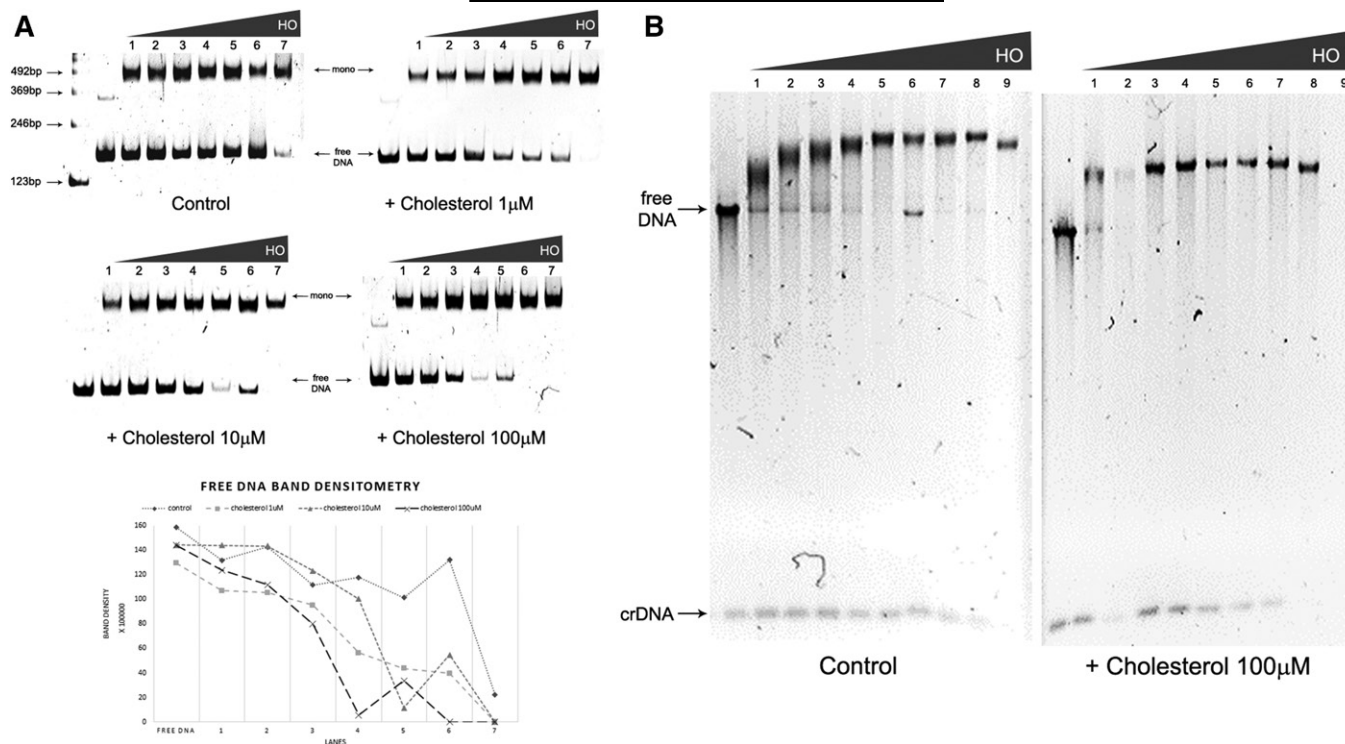


Fig. 1. Effect of cholesterol on nucleosomes and chromatin fibers reconstituted in vitro. A: Mononucleosome formation: Chicken HO titration (1 = 1.3 μM ; 2 = 1.5 μM ; 3 = 1.8 μM ; 4 = 2.0 μM ; 5 = 2.2 μM ; 6 = 2.5 μM ; 7 = 2.7 μM) in the absence (control) or presence of increasing cholesterol concentration (1, 10, and 100 μM) analyzed by EMSA in acrylamide gel 6%. DNA: 167.1. Gels were run under the same experimental conditions; free DNA band densitometry graph of upper gels; B: Chromatin fiber formation: Chicken HO titration (1 = 2.0 μM ; 2 = 2.2 μM ; 3 = 2.5 μM ; 4 = 2.7 μM ; 5 = 2.9 μM ; 6 = 3.1 μM ; 7 = 3.4 μM ; 8 = 4.0 μM ; 9 = 4.7 μM) in the absence (control) or presence of cholesterol (100 μM), analyzed by EMSA in agarose gel 0.8%. Array: 177.36. Gels run under the same experimental conditions. Legend: crDNA, competitor DNA. All gels are representative of three separate experiments.

those conditions, addition of 2.0 μM (Fig. 1A, lane 4) HO was sufficient for complete DNA saturation. This effect is graphically represented in the free DNA band densitometry, showing the faster decrease of the DNA band in the presence of cholesterol. The same effect is demonstrated in another representative gel, presented in the supplemental material (supplemental Fig. S1C).

A similar phenomenon was observed when cholesterol was present during the long fiber reconstitution in vitro. In this case, DNA saturation was reached at lower HO concentrations. In the presence of cholesterol, the array 177.36 was saturated at 2.0 μM HO (Fig. 1B, lane 1) compared with control samples that were saturated at 2.9 μM HO (Fig. 1B, lane 5). Detailed analysis of HO titration on DNA also revealed DNA saturation at lower HO concentration in the presence of cholesterol (supplemental Fig. S1D, lanes 1–3). This result is made clearer by the formation of an unstructured material (faster migration in the gel and precipitation) at 2.7–3.4 μM HO (supplemental Fig. S1D, lanes 11–13) compared with control samples at the same HO concentration.

Cholesterol favors chromatin folding in vitro

Because open chromatin fibers may behave differently from compacted fibers when exposed to cholesterol, we next evaluated the effect of cholesterol on in vitro reconstituted 30 nm fibers with purified linker histones (H5) from

chicken erythrocytes (supplemental Fig. S1A) in the presence of Mg^{2+} , which is a divalent ion with characterized properties to induce chromatin folding (3). Similarly to the previous results with 10 nm fibers, we observed that cholesterol also assisted the formation of the 30 nm fiber in vitro (Fig. 2A). Control samples showed diffuse bands in the native gel, indicating a high degree of heterogeneity in the system; the reconstitution performed in the presence of cholesterol showed sharper bands, suggesting a more homogenous compacted chromatin.

Because we observed that chromatin folding was facilitated by cholesterol, we wondered whether the effect of cholesterol on chromatin formation might have structural consequences. To evaluate this possibility, we performed MNase digestion of chromatin fibers formed in the presence or absence of cholesterol. We found that MNase digestion of long chromatin fibers was inhibited in the presence 100 μM of cholesterol (Fig. 2B). Importantly, the presence of cholesterol did not affect MNase digestion of free DNA (supplemental Fig. S1F); in fact, it improved the DNA digestion. These results are consistent with a model in which cholesterol affects chromatin formation by increasing chromatin compaction.

Next, we sought to verify whether cholesterol exerts its effects by directly binding to chromatin and inducing compaction of long chromatin fibers. It is well-described that chromatin compaction is induced by cations such as Mg^{2+} ,

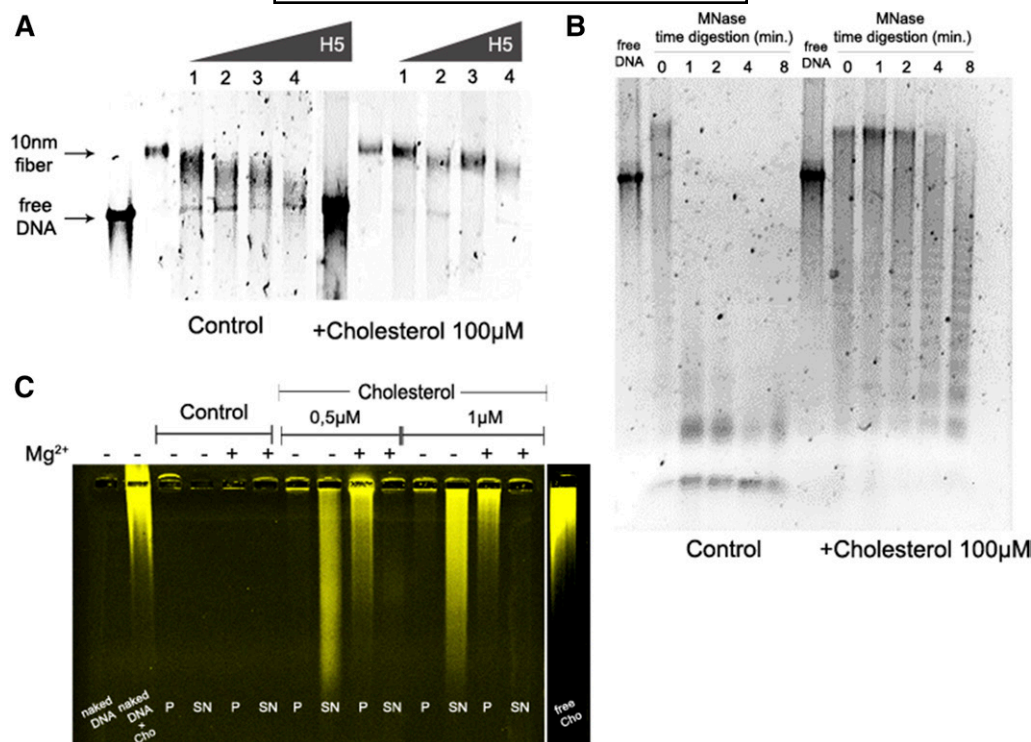


Fig. 2. Cholesterol favors chromatin compaction in vitro. **A:** Compacted chromatin fiber formation: Titration of H5 [linker histone (1 = 1.5 μM ; 2 = 3.0 μM ; 3 = 4.6 μM ; 4 = 6.2 μM)] on long chromatin fibers reconstituted in the absence (control) or presence of 100 μM cholesterol, analyzed by EMSA in agarose gel 0.8%. Array: 177.36. Gels were run under the same experimental conditions. **B:** Chromatin fiber digestion: MNase digestion of 10 nm fibers in the presence or absence of 100 μM cholesterol. Agarose gel 0.8%. Array: 177.36; **C:** Chromatin compaction assay: Compaction of 10 nm fibers induced by Mg^{2+} in the absence (control) or presence of labeled cholesterol (0.5 or 1 μM), analyzed by EMSA in agarose gel 0.8%. Array: 177.36. Pellets (P), indicates compacted fibers; supernatant (SN), indicates open fibers; Cho, cholesterol. All gels are representative of three separate experiments.

which is known for promoting nucleosome-nucleosome interactions (6). Long chromatin fibers treated with 0.5–1.0 μM of labeled cholesterol were exposed to Mg^{2+} to induce compaction. Strikingly, cholesterol bound avidly to open or compacted chromatin fibers. In low concentrations (0.5 and 1 μM), labeled fibers moved from the supernatant to the pellet in the presence of Mg^{2+} (Fig. 2C). Labeled compacted fibers induced by Mg^{2+} showed decreased electrophoretic mobility when compared with open fibers, with the majority of compacted fibers being retained in the well. The presence of extensive smears in the gel was noticeable, which was due to the presence of free labeled cholesterol dissociated from the chromatin fibers. Due to technical limitations, we did not perform analytical ultracentrifugation with the long chromatin fibers in the presence of cholesterol to verify the precise degree of compaction.

It was not trivial to define the optimal concentration of cholesterol to be used in our in vitro system that would be physiologically relevant. The physiological concentration of cholesterol in the blood is approximately 5 mM. However, the apparent K_d of cholesterol bound to chromatin was estimated to be approximately 1 nM (10). Herein, our in vitro system rendered chromatin fibers at a final concentration of 60 nM and mononucleosomes at 0.9 μM , and the cholesterol used was at 100 μM . This concentration gave approximately 1,600 cholesterol molecules per chromatin

fiber with 36 nucleosomes, providing 45 cholesterol molecules per nucleosome. Considering that approximately 3,000 water molecules were found in the atomic structure of a nucleosome (29), with 121 molecules being important for HO interactions with the DNA, we believe that 45 cholesterol molecules per one nucleosome is stoichiometrically reasonable.

Cholesterol interacts with nucleosomes through multiple binding sites

Collectively, our findings indicate that cholesterol plays an important role in chromatin structure in vitro, a result that may rely on cholesterol binding to nucleosomes. To evaluate this hypothesis, we applied docking and MD-based free-energy calculations to study binding of cholesterol at the atomic level. Specifically, we docked the ligand against an ensemble of equilibrated structures of nucleosomes, generated from tens of nanoseconds of MD simulation of the X-ray structure of the construct (29). Starting from cholesterol-bound structures, we carried out free energy calculations to resolve site-specific affinities of the ligand against the nucleosomes. The linear interaction energy method was used for that purpose (see the supplemental material).

The docking results were clustered into 20 cholesterol groups at the protein-nucleosome surface (Fig. 3A).

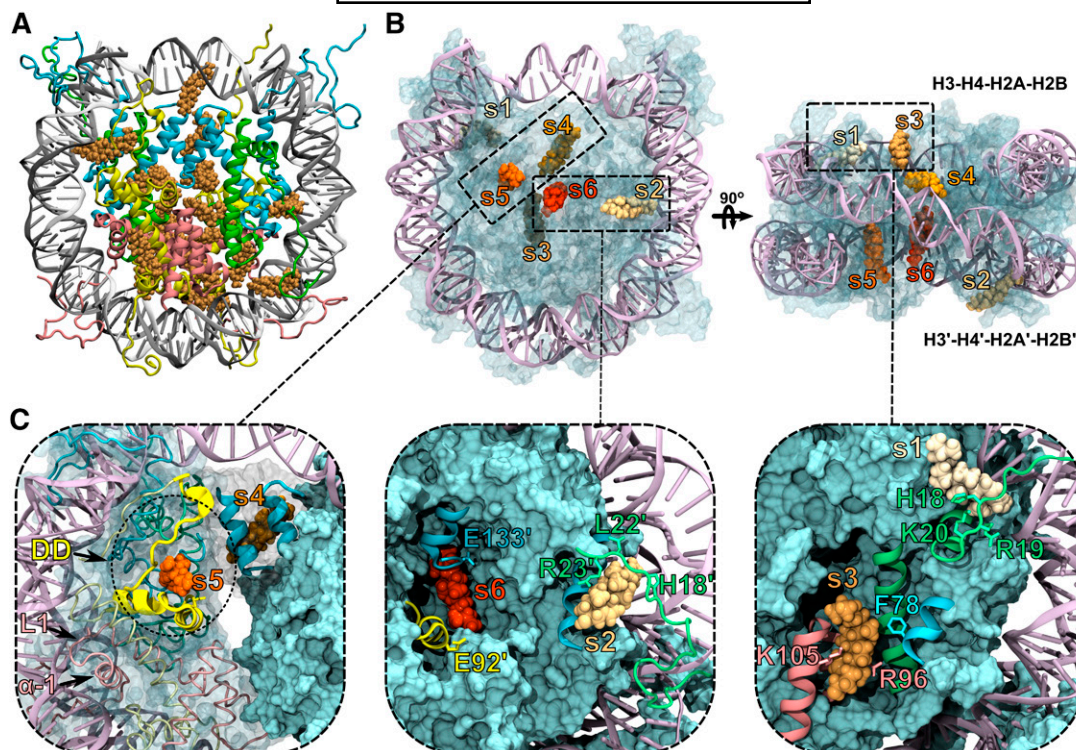


Fig. 3. Cholesterol binds the nucleosome through multiple sites. **A:** Docking solutions for cholesterol (orange) against the NCP. **B, C:** Bound cholesterol at sites s1 through s6 along each of the histone units H3 and H3' (blue), H4 and H4' (green), H2A and H2A' (yellow), H2B and H2B' (pink). The docking domain (DD) and H2B loop 1 (L1) and helix 1 (α -1). Highlighted are amino acids of the acidic patch (E91' and E92' from H2A'), of the H4/H4' tail (H18, R19, K20, L22, R23), and amino acids F78, E133' from H3 and R96, K105 from H2B, which were previously reported to bind NBP5 (5).

Interestingly, in six sites, the cholesterol lays very close to several amino acids, well-known to participate in the nucleosome structure and chromatin dynamics. Moreover, some cholesterol-contacting amino acids have also been correlated to nucleosome-nucleosome interactions or to nucleosome binding molecules. These interaction spots, hereafter called sites s1 through s6 (Fig. 3B, C), were selected for further MD and free energy calculations.

As detailed in supplemental Table S1, by binding to these multiple sites, cholesterol interacts with key nucleosome amino acids at the H4 tail, the acidic patch, and the docking domain in between the histone clusters H3-H4 and H2A-H2B (30).

After 200 ns of simulation, all six cholesterol molecules remained bound to the nucleosome under equilibrium conditions. As presented in supplemental Fig. S2, the nucleosome structure remained stable in its starting conformation throughout the simulation. In the presence of ligands, the root-mean-square deviation profile for the nucleosome converges to a plateau value of 2.0 Å, indicative of structural stability of the construct. Contrasting to the nucleosome structure, the bound ligand remains as flexible as in the free state in solution, which ensures a dynamic binding mode across the receptor binding sites (supplemental Fig. S3).

The close interaction between cholesterol and nucleosome suggests favorable binding affinities of the ligand to the receptor sites. To quantitatively evaluate this, we

proceeded with a series of independent free energy calculations to estimate the per-site affinity of cholesterol to nucleosome. As shown in **Table 1**, ligand affinities are heterogeneous and span a large range of values (0.01–0.2 mM^{-1}). For every site, the estimated absolute free energies favor cholesterol binding, rationalizing the stability of the molecular complex observed in the equilibrium MD simulations.

DISCUSSION

Cholesterol, an abundant cellular lipid, is among the molecules interacting with eukaryotic chromatin in vivo. However, very little is known about the mechanism and biological role of cholesterol-chromatin interactions.

Herein, we showed, in vitro and in silico, that cholesterol has an anticipated role in modulating chromatin structure

TABLE 1. Calculated values of binding free energies of cholesterol against the nucleosome

Sites	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	K (mM ⁻¹)
s1	-1.75 ± 0.18	0.0188
s2	-2.78 ± 0.16	0.1060
s3	-1.29 ± 0.17	0.0087
s4	-1.66 ± 0.17	0.0162
s5	-3.13 ± 0.16	0.1906
s6	-2.43 ± 0.16	0.0589

and provided atomistic insights into the impact of cholesterol on the nucleosome structure. Specifically, cholesterol appears to facilitate chromatin folding, verified by its effect on compacted chromatin fiber formation and by the inhibition of MNase digestion of long chromatin fibers. Complementary computational studies suggested direct molecular interaction of cholesterol with the nucleosome through six binding sites nearby important interacting regions for NBPs. Thus, our results support a model in which cholesterol induces chromatin formation and folding via direct interaction with nucleosomes through multiple binding sites.

Within this scenario, we speculate that the observed macroscopic effects on chromatin structure and stability might result from dewetting of the nucleosome, triggered by cholesterol binding. Specifically, dewetting transitions may impact core-to-core interactions at hydrophobic regions, including the docking domain and the H3-H3 four helix bundle, with global impact on chromatin. Consistent with this hypothesis, we found that cholesterol dehydrates the nucleosome surface in $\sim 17 (\pm 3)$ water molecules per binding site (Fig. 4B, C). As such, bound cholesterol reduces atom-to-atom position correlations at the docking domain and its neighboring regions, H2B loop 1 (L1) and helix 1 (α -1) (Fig. 4A), which likely influence critical packing interactions at the NCP. Note that in supplemental Fig. S4, this clear result also reflected on their increased root-mean-square fluctuations in the presence of bound

cholesterol. Besides dewetting and packing effects, we also speculate that additional mechanisms accounting for chromatin modulation might exist. Specifically, cholesterol binding to the H4 tail, well-known to assist chromatin compaction by making contacts with the acidic patch of adjacent nucleosome units, may also interfere with the final chromatin state. Consistent with this notion, note that in Fig. 4A, the bound cholesterol reduces coupling between the nucleosome and the H4 tail, enhancing its mobility freedom (root-mean-square fluctuations) up to $\sim 2 \text{ \AA}$, as compared with the ligand-free particle. Altogether, as shown in supplemental Fig., these views can be merged into a pictorial model that embodies the potential role of cholesterol in modulating particle-to-particle nucleosome interactions in chromatin.

It is known that some forms of transcriptionally silenced heterochromatin are localized adjacent to the nuclear lamina (31). Nevertheless, dynamically regulated genes have been found at the nuclear periphery when turned on (32). Despite that it is not clear how cholesterol under physiological conditions may interfere with chromatin structure inside the cell, together with previous evidence that it binds to chromatin (10), our findings suggest that cholesterol influences chromatin condensation by directly binding to the nucleosome.

Lipid microdomains, containing sphingomyelin and cholesterol in the inner nuclear membrane, have been suggested to provide a resting place for active chromatin and

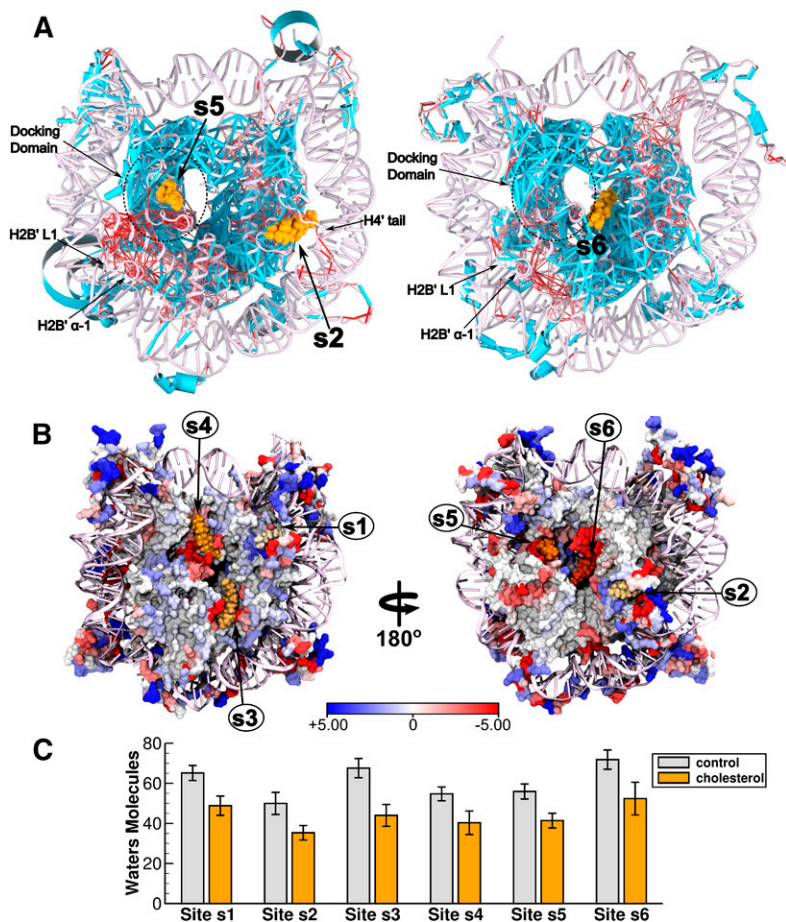



Fig. 4. Position correlation analysis and hydration properties of the nucleosome. A: Shown are the cholesterol-induced C α -C α position correlation changes of the nucleosome. Edge thickness distinguishes between enhanced (light blue) and weakened (red) correlation changes due to cholesterol binding. By binding at sites s2, s5, and s6, note that cholesterol reduces coupling of specific regions nearby the docking domain and the H4 tail in both simulation systems. Here, C α -C α correlation values were calculated with Carma (35). B: Cholesterol-induced changes on the net number of water molecules bound to NCP residues within a cut-off distance of 3.5 \AA . C: Average number of water molecules occupying each of the binding sites within a cut-off distance of 10 \AA . Averages and associated standard errors were computed from 200 ns of simulation.

transcription factors (33). In addition, the tethering of chromatin to the nuclear periphery has an important role in the chromatin flow by defining changes in nuclear shape (34). We could raise the hypothesis that cholesterol might trigger chromatin structural changes that may contribute to the intra-nuclear organization of chromatin. It would be very interesting to precisely follow the changes in nuclear cholesterol circadian rhythm following the chromatin structural changes and nuclear localization, correlating them with the transcriptional activity. 

The authors are grateful to LME/LNNano for the use of the electron microscopy facility. The authors thank Rodrigo Portugal for technical assistance, Daniela Rhodes for providing the DNA constructions, Carlos Pantoja for critical reading of the manuscript, and the anonymous reviewers for the important comments and suggestions on the manuscript.

REFERENCES

- Voss, T. C., and G. L. Hager. 2014. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* **15**: 69–81.
- Korolev, N., A. Allahverdi, Y. Yang, Y. Fan, A. P. Lyubartsev, and L. Nordenskiöld. 2010. Electrostatic origin of salt-induced nucleosome array compaction. *Biophys. J.* **99**: 1896–1905.
- Routh, A., S. Sandin, and D. Rhodes. 2008. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 8872–8877.
- Bartman, C. R., and G. A. Blobel. 2015. Perturbing chromatin structure to understand mechanisms of gene expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **80**: 207–212.
- da Silva, I. T. G., P. S. L. de Oliveira, and G. M. Santos. 2015. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**: 263–269.
- Finch, J. T., and A. Klug. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 1897–1901.
- Albi, E., and M. P. Viola Magni. 2004. The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell.* **96**: 657–667.
- Ledeer, R. W., and G. Wu. 2004. Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues. *J. Lipid Res.* **45**: 1–8.
- Erickson, S. K., A. M. Davison, and R. G. Gould. 1975. Correlation of rat liver chromatin-bound free and esterified cholesterol with the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **409**: 59–67.
- Regenass-Klotz, M., and H. J. Heiniger. 1984. Specific binding of cholesterol to chromatin prepared from mouse spleen cells. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**: 94–99.
- Zaina, S., K. B. V. Døssing, M. Wickstro, and G. Lund. 2005. Chromatin modification by lipids and lipoprotein components: an initiating event in atherogenesis? *Curr. Opin. Lipidol.* **16**: 549–553.
- Jones, D. R., and N. Divecha. 2004. Linking lipids to chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 196–202.
- Huynh, V. A. T., P. J. J. Robinson, and D. Rhodes. 2005. A method for the in vitro reconstitution of a defined “30 nm” chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. *J. Mol. Biol.* **345**: 957–968.
- Lowary, P. T., and J. Widom. 1998. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* **276**: 19–42.
- Richmond, T. J., and C. A. Davey. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* **423**: 145–150.
- Kallen, J. A., J.-M. Schlaepfli, F. Bitsch, S. Geisse, M. Geiser, I. Delhon, and B. Fournier. 2002. X-ray structure of the hROR α LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure.* **10**: 1697–1707.
- Barber, A. F., Q. Liang, C. Amaral, W. Treptow, and M. Covarrubias. 2011. Molecular mapping of general anesthetic sites in a voltage-gated ion channel. *Biophys. J.* **101**: 1613–1622.
- Trott, O., and A. J. Olson. 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.
- Åqvist, J., C. Medina, and J.-E. Samuelsson. 1994. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* **7**: 385–391.
- Carlsson, J., and J. Åqvist. 2006. Calculations of solute and solvent entropies from molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**: 5385–5395.
- Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, and K. Schulten. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**: 1781–1802.
- Huang, J., and A. D. MacKerell, Jr. 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**: 2135–2145.
- Lim, J. B., B. Rogaski, and J. B. Klauda. 2012. Update of the cholesterol force field parameters in CHARMM. *J. Phys. Chem. B.* **116**: 203–210.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**: 926–935.
- Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald: an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**: 10089–10092.
- Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**: 33–38.
- Fonseca, A. C. R. G., T. Proença, R. Resende, C. R. Oliveira, and C. M. F. Pereira. 2009. Neuroprotective effects of statins in an in vitro model of Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.* **17**: 503–517.
- Ding, J., D. Jiang, M. Kurczy, J. Nalepka, B. Dudley, E. I. Merkel, F. D. Porter, A. G. Ewing, N. Winograd, J. Burgess, et al. 2008. Inhibition of HMG CoA reductase reveals an unexpected role for cholesterol during PGC migration in the mouse. *BMC Dev. Biol.* **8**: 120.
- Davey, C. A., D. F. Sargent, K. Luger, A. W. Maeder, and T. J. Richmond. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **319**: 1097–1113.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**: 251–260.
- Towbin, B. D., A. Gonzalez-Sandoval, and S. M. Gasser. 2013. Mechanisms of heterochromatin subnuclear localization. *Trends Biochem. Sci.* **38**: 356–363.
- Casolari, J. M., C. R. Brown, S. Komili, J. West, H. Hieronymus, and P. A. Silver. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell.* **117**: 427–439.
- Cascianelli, G., M. Villani, M. Tosti, F. Marini, E. Bartocchini, M. V. Magni, and E. Albi. 2008. Lipid microdomains in cell nucleus. *Mol. Biol. Cell.* **19**: 5289–5295.
- Schreiner, S. M., P. K. Koo, Y. Zhao, S. G. J. Mochrie, and M. C. King. 2015. The tethering of chromatin to the nuclear envelope supports nuclear mechanics. *Nat. Commun.* **6**: 7159.
- Glykos, N. M. 2006. Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. *J. Comput. Chem.* **27**: 1765–1768.