

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Departamento de Biologia Celular – CEL

Laboratório de Biologia Teórica e Computacional – LBTC

Análise Eletrostática de Domínios Proteicos Sensíveis a Voltagem

Aluno: Caio Silva Souza

Orientador: Dr. Werner Treptow

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

Brasília, Janeiro de 2014

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.

Ao meu orientador, Werner Treptow, pela paciência e disposição em ajudar no meu crescimento científico e pessoal, e também pela amizade e confiança.

Ao pessoal do laboratório, Cristiano, Letícia e Juliana pela disposição em ajudar nas mais diversas tarefas, mesmo de madrugada, e sempre com muito bom humor.

À Carla, pelo companheirismo ao longo de tantos anos, me proporcionando momentos de felicidade e me incentivando nos momentos de tristeza. Também por me escutar mesmo quando o sono está muito forte.

Ao pessoal da biofísica, em especial à Mary-Ann, pelas inúmeras conversas na copa sobre questões científicas e da vida, e ao Chiquinho, sempre com um estoque infinito de entusiasmo e rapaduras.

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

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Os domínios sensíveis à voltagem (DSV) são estruturas moleculares que, em resposta à variações do potencial elétrico transmembrânico, controlam o mecanismo de ativação e condução de íons dos canais iônicos dependentes de voltagem em células excitáveis. Os DSV são formados por quatro hélices transmembrânicas (S1 – S4). Variações do campo elétrico transmembrânico induzem forças motrizes nos resíduos positivamente carregados da hélice S4, deslocando-a ao longo da direção transmembrânica. Este processo pode ser modulado por diversos fatores, como toxinas, mutações pontuais e composição lipídica da membrana. A estrutura cristalográfica do canal de potássio Kv1.2 permitiu a caracterização da morfologia de hidratação peculiar dos seus DSV. Moléculas de água dos meios intracelular e extracelular penetram na cavidade central do domínio, sendo separadas por uma constrição hidrofóbica. Esse lúmen parcialmente hidratado altera drasticamente a morfologia do potencial eletrostático, favorecendo a focalização do campo elétrico na altura da constrição hidrofóbica. Especificamente, o campo elétrico está relacionado à grandeza física distância elétrica, que traduz o acoplamento de cada carga pontual da proteína com a diferença de potencial transmembrânico. O crescente número de estruturas cristalográficas de canais iônicos contendo DSV permitiu que o presente estudo investigasse se as propriedades de hidratação e do campo elétrico do Kv1.2 são ubíquas aos outros membros da família de canais catiônicos dependentes de voltagem. Tais propriedades mostraram-se preservadas entre os diferentes canais iônicos estudados, evidenciando a sua robustez diante de variações estruturais e de sequência, além de levantar a hipótese de que essas propriedades sejam alvo direto de pressão seletiva. Portanto, um DSV que não apresente esse conjunto de características provavelmente terá o seu funcionamento comprometido. Essa preservação também foi traduzida do ponto de vista da energética de

ativação/desativação dos DSV. Foi mostrado que o componente elétrico da energia livre desse processo é, além de pouco alterado, pequeno, comparado com o provável custo energético do processo como um todo. Esta observação é válida tanto para diferentes canais iônicos quanto para estruturas mutantes do Kv1.2, e aumenta a relevância de novas metodologias experimentais que visam quantificar o componente químico da energia livre de ativação/desativação dos DSV.

Abstract

Voltage sensing domains (VSD) are protein structures that control the opening of voltage-gated ion channel pores in response to membrane depolarization. VSDs contain four transmembrane helices (S1 – S4) of which S4 is responsible for the voltage sensibility. During depolarization events, electrical forces act on some basic residues and induces a translocation of the S4 helix towards the extracellular bulk. This process may be modulated by the presence of toxins, single point mutations and the lipid composition of plasma membrane. The report of Kv1.2 (a voltage-gated potassium channel) structure enabled a deeper investigation on the VSD machinery, including the characterization of its hydration profile. These domains feature a pore which allows the approximation of water molecules from both intra and extracellular bulks, being separated by a hydrophobic plug. This partially hydrated lumen reshapes and focuses the transmembrane electrical field. Here, by benefiting from an increasing number of atomistic structures of distinct VSD-containing ion channels made available recently, it was possible to investigate the electric properties of Kv1.2 when conditioned to a series of mutations known to affect the VS operation. These properties were found to be preserved among distinct VSD from many voltage-gated ion channels, revealing a intra-domain dielectric that is insensitive to sequence and local structural variations. This raises the intriguing hypothesis that the reshaped electrical field is directly subject to evolutionary pressure, being more conserved than the VSD sequence itself. Therefore, it was shown that the contribution of the electrical component to the VSD activation free energy is marginal when compared to the chemical component. Hence, the observed operational diversity of sensor domains are likely to arise primarily from modifications of their chemical free energies. Particularly useful, our result enhances relevance of recently devised median-voltage methods for determination of chemical free-energy variations as

powerful strategies to estimate perturbations of VSDs.

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Excitabilidade celular	17
1.1.1. Potencial de repouso	17
1.1.2. Potencial de ação	18
1.2. Canais catiônicos dependentes de voltagem	19
1.2.1. O domínio sensível a voltagem	21
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo principal	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Metodologia	27
3.1. Simulações de dinâmica molecular	29
3.1.1. Funções de energia potencial	30
3.1.1.1. Tratamento do potencial eletrostático: interações de longo alcance	32
3.1.1.2. Condições periódicas de contorno	33
3.1.2. Integração do movimento	33
3.1.3. Ensembles	35
3.2. Medidas elétricas	37
3.2.1. Distância elétrica	37
3.2.2. Mapas de potencial eletrostático	39
3.2.3. Aplicação de potencial transmembrânico via desbalanço de cargas	39
3.3. Perfil de hidratação	41
3.4. Divergência estrutural e de sequência	42
3.5. RMSD no tempo	44

3.6. Protocolo das simulações	44
3.6.1. Ensemble NPT	45
3.6.2. Emsembles NVT com aplicação de voltagem	45
3.7. Sistemas estudados	46
3.7.1. Estruturas cristalográficas e modelos desativados	46
3.7.2. Mutações	46
3.7.3. Lipídeos modificados	46
4. Resultados e Discussão	50
4.1. Caracterização Estrutural	50
4.2. Simulações com voltagem	67
4.3. Propriedades elétricas e de hidratação	69
4.4. Excesso de gating charges	84
4.5. Domínio sensível a voltagem ideal	88
4.6. Lipídeos modificados	89
5. Conclusões	94
6. Perspectivas	96
6.1. Outros canais iônicos	96
6.2. Energética da ativação e modelos minimalistas	97
7. Referências bibliográficas	99
8. Anexo	108

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática de neurônio (verde), evidenciando canais iônicos (estruturas em 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⁺ elevam 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.19

Figura 2. Geometria e portão hidrofóbico do poro do canal Kv1.2. (A) Esquema da geometria transmembrânica de uma subunidade do canal. As hélices S1 – S4 constituem o domínio sensível a voltagem, sendo que a hélice S4 apresenta diversos resíduos positivamente carregados. As hélices S5 – S6 formam o poro de condução do canal, onde há o filtro de seletividade (FS), responsável pela discriminação entre os íons que este canal conduz. Os movimentos destes dois domínios são acoplados por meio da hélice L. (B) Estrutura tridimensional de uma subunidade do Kv1.2, ressaltando a posição de cada hélice. (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 resíduos do portão hidrofóbico (PH) desidratam o caminho de permeação dos íons, impedindo a sua difusão.20

Figura 3. Processo de ativação/desativação do domínio sensível a voltagem do

Kv1.2. No estado ativado (esquerda), as argininas (R1 – R4, azul) da hélice S4 (vermelha) estão predominantemente voltadas para o meio extracelular, e acima da F233 (amarelo). Elas são estabilizadas por pontes salinas com o grupo fosfato dos lipídeos de membrana e com os resíduos E183 e E226 (rosa). No estado desativado (direita), há um movimento da hélice S4 em direção ao meio intracelular, e as argininas passam a realizar pontes salinas com os resíduos E226 (R1), D259 (R2), E236 (R3), e com o grupo fosfato da camada inferior da membrana (R4).22

Figura 4. Detalhe atômico de um sistema típico de simulação do Kv1.2. O canal (laranja) está inserido em uma bicamada composta por 372 lipídeos (ocre) e hidratado por 46512 moléculas de água (vermelho). As esferas azuis correspondem aos íons Cl^- , e os íon K^+ estão representados em amarelo, totalizando aproximadamente 180.000 átomos. É possível notar a presença de dois íons K^+ na região do filtro de seletividade, além de moléculas de água hidratando parcialmente ambos os domínios sensíveis a voltagem e o poro de condução.24

Figura 5. Desenho experimental do projeto. Os quadros vermelhos, azuis e verdes representam, respectivamente, as etapas de preparação dos sistemas, simulações de dinâmica molecular e análises realizadas. O banco estrutural contendo estruturas cristalográficas, modelos desativados e mutantes de canais iônicos dependentes de voltagem foi sujeito a simulações de equilíbrio (I), das quais foram aferidos o RMSD e o RMSF (II) para caracterizar a estabilidade estrutural das proteínas. Em seguida, cada proteína foi sujeita a duas simulações independentes, uma com potencial transmembrânico de 0 mV, e outra a -600 mV (IV e V). Para gerar os potenciais hiperpolarizados, foi seguido um protocolo de desbalanço iônico (III). Todas as outras análises deste estudo (VI a XI) foram realizadas utilizando apenas uma ou ambas as simulações com voltagem.28

Figura 6. Esquema simplificado das etapas de uma simulação de dinâmica molecular. As partículas que compõem o sistema apresentam energia potencial proveniente da interação de umas com as outras. Desta energia potencial é derivada uma força resultante atuante em cada partícula. Após calculadas as interações entre as partículas, a simulação prossegue movendo cada uma delas de acordo com a força resultante por um intervalo de tempo pré-definido (geralmente 1 ou 2 fs).

Repetindo-se estas etapas, obtém-se a sequência de posições de cada partícula ao longo do tempo, a qual pode ser utilizada para medir propriedades médias do sistema.29

Figura 7. Esquema ilustrativo das condições periódicas de contorno. É assumido que o sistema simulado (caixa azul) seja circundado por infinitas repetições suas. Com isso, uma partícula que sai do sistema por uma das laterais é considerado como entrando pela lateral oposta (círculos pretos com setas). Na prática, este efeito é conseguido empregando a convenção de imagem mínima, que estipula que a distância entre duas partículas deva ser a menor possível, considerando as suas réplicas. Como exemplo, a distância entre as partículas circuladas em azul e vermelho é mostrada como uma linha tracejada. Há duas distâncias possíveis entre estas duas partículas, uma se considerada apenas nos limites da célula de simulação (caixa azul) e outra se as réplicas do sistema foram consideradas. Segundo a convenção da imagem mínima, esta última distância é que deve ser considerada ao calcular as interações entre estas duas partículas.34

Figura 8. Resíduos no interior do *gating pore* do Kv1.2. Detalhe de um domínio sensível a voltagem com hélices S1 – S3 em verde, hélice S4 em vermelho e resíduos internos ao *gating pore* em cinza, nas visões lateral (A), intracelular (B) e extracelular (D). (C) As propriedades elétricas e de hidratação foram medidas no interior de um cilindro (azul) com 8 Å de raio, centrado no *gating pore*. Os limites do cilindro no eixo Z corresponderam aos limites do sistema completo.38

Figura 9. Protocolos de desbalanço iônico em torno de membranas lipídicas. Ao usar um sistema contendo duas membranas (A), obtém-se dois meios aquosos não comunicantes. Dessa forma, mantém-se concentrações iônicas diferentes entre os meios ao longo de toda a simulação. No protocolo de interface vácuo/água (B), a não comunicação entre os meios que circundam a membrana é obtida estendendo o tamanho da célula de simulação (caixa com linhas pretas) ao longo do eixo Z e simulando um ensemble NVT. Dessa forma, é criada uma camada de vácuo que impede a troca de íons entre os dois meios. Os sinais positivo e negativo indicam as regiões com maior e menor potencial eletrostático, respectivamente. A linha central indica a direção do eixo Z.40

Figura 10. Alinhamento estrutural dos resíduos das hélices S1 – S4. No cálculo de divergência de sequência, foram considerados apenas os resíduos voltados para o <i>gating pore</i> (vermelho) dos domínios sensíveis a voltagem. As argininas da hélice S4 estão destacadas em azul e os resíduos substituídos dos sistemas Mut-1 – Mut-5 estão sublinhados.	43
Figura 11. Estrutura química dos lipídeos de membrana utilizados nos sistemas SPGM e POGR. R e R' correspondem às cadeias alifáticas que caracterizam cada tipo de fosfolipídeo. Note que a ceramida (POGR) é o único lipídeo que não apresenta grupos carregados eletricamente.	49
Figura 12. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Kv1.2 e Mut-1. Os pontos pretos correspondem ao RMSD dos átomos pesados do domínio sensível a voltagem, e os pontos verdes são o RMSD das matrizes de contato. O valor dos pontos é a média do RMSD obtido para cada subunidade do canal, e as barras de erro representam o desvio padrão entre subunidades. As curvas vermelha e amarela foram ajustadas sobre o RMSD dos átomos pesados e das matrizes de contato respectivamente, para facilitar a visualização das tendências.	52
Figura 13. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Mut-2 e Mut-3. Idem à figura 11.	53
Figura 14. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Mut-4 e Mut-5. Idem à figura 11.	54
Figura 15. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais KvAp e NavAb. Idem à figura 11.	55
Figura 16. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais NavRh e SPGM. Idem à figura 11.	56
Figura 17. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações do sistema POGR. Idem à figura 11.	57
Figura 18. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem dos sistemas	

Mut-1 e Mut-2 (preto) e do Kv1.2 (vermelho), nas respectivas conformações. As barras azuis marcam o início e o fim das hélices transmembrânicas do domínio. Os locais onde ocorreram as substituições estão apontados pelas setas verdes.60

Figura 19. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem dos sistemas Mut-3 e Mut-4. Idem à figura 17.61

Figura 20. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem do sistema Mut-5. Idem à figura 17.62

Figura 21. Matrizes de distância para a conformação ativada dos sistemas estudados. A cor representa a distância entre as argininas da hélice S4 (R1 – R4) e os resíduos ácidos das hélices vizinhas (B2 – B5) e o grupo fosfato dos lipídeos de membrana (B1 e B6).64

Figura 22. Matrizes de distância para a conformação desativada dos sistemas estudados. Idem à figura 20.65

Figura 23. Divergência estrutural vs. divergência de sequência. Neste gráfico, é possível avaliar a distância entre os sistemas estudados e o Kv1.2 (referência).67

Figura 24. Perfis de voltagem transmembrânica. (A) Perfil de potencial elétrico transmembrânico das simulações a -600 ± 150 mV. (B) Perfil de potencial elétrico transmembrânico das simulações a 0 mV. O eixo Z é ortogonal à superfície da membrana, cujo centro está localizado na origem das coordenadas. As cores seguem o padrão da figura 23, acrescido dos sistemas SPGM (branco) e POCR (turquesa).68

Figura 25. Propriedades elétricas e de hidratação do Kv1.2. (A) Perfil de distância elétrica ao longo do eixo Z para ambas as conformações (curvas laranja e preta) e distância elétrica do grupo carregado das argininas e da fenilalanina da constrição hidrofóbica (círculos). (B e C) Perfil de hidratação (ver tópico 3.3) ao longo do eixo Z do canal (curva preta) em comparação com o perfil de uma membrana pura (curva laranja). A quantidade de moléculas de água no intervalo de -15 \AA a 15 \AA é especificada em "H2O". A distribuição das argininas e da fenilalanina é mostrada,

respectivamente, como gaussianas azuis e vermelha. (D) Derivada dos perfis de distância elétrica em relação ao eixo Z do canal (curvas preta e laranja) e de uma membrana pura (curva roxa). O eixo Z é ortogonal à superfície da membrana, cujo centro encontra-se na origem das coordenadas.	71
Figura 26. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-1. Idem à figura 24.	72
Figura 27. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-2. Idem à figura 24.	75
Figura 28. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-3. Idem à figura 24.	76
Figura 29. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-4. Idem à figura 24.	77
Figura 30. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-5. Idem à figura 24.	80
Figura 31. Propriedades elétricas e de hidratação do KvAp. Idem à figura 24.	81
Figura 32. Propriedades elétricas e de hidratação do NavAb. Idem à figura 24.	82
Figura 33. Propriedades elétricas e de hidratação do NavRh. Idem à figura 24.	83
Figura 34. Excesso de <i>gating charges</i> , em cargas elementares, entre os canais estudados e o Kv1.2.	85
Figura 35. Propriedades elétricas e de hidratação de um domínio sensível a voltagem ideal. (A) Perfil de distância elétrica médio (curva preta) e distância elétrica do grupo carregado das argininas de todos os sistemas (círculos). (B) Perfil de hidratação médio (curva preta) em comparação com o perfil de uma membrana pura (curva laranja). A quantidade de moléculas de água no intervalo de -15 \AA a 15 \AA é especificada em "H2O". (D) Derivada em relação ao eixo Z dos perfis de distância elétrica média (curva preta) e de uma membrana pura (curva laranja).	89
Figura 36. Propriedades elétricas e de hidratação do SPGM. Idem à figura 24.	91
Figura 37. Propriedades elétricas e de hidratação do POCR. Idem à figura 24.	92

Lista de tabelas

Tabela 1. Resíduos positivamente carregados (básicos) da hélice S4 e resíduos negativamente carregados (ácidos) das hélices S1 - S3 que participam das pontes salinas no interior dos domínios sensíveis a voltagem.44

Tabela 2. Condições de simulação de cada sistema e estudos dos quais as estruturas utilizadas foram retiradas. Não há entradas no *Protein Data Bank* para os modelos dos estados desativados desses canais. Todos os sistemas foram hidratados explicitamente por uma solução contendo 150 mM de íons distribuídos de forma a neutralizar a carga líquida do sistema.47

Tabela 3. Modificações realizadas em ambas as conformações do Kv1.2 e condições de simulação. Todos os sistemas foram hidratados explicitamente por uma solução contendo 150 mM de íons distribuídos de forma a neutralizar a carga líquida do sistema.48

Abreviações

Cav: Canais iônicos dependentes de voltagem seletivos a cálcio.

DE: Divergência estrutural.

DS: Divergência de sequência.

DSV: Domínio(s) sensível(is) a voltagem.

HCN: Canais catiônicos dependentes de voltagem não seletivos.

Kv: Canais iônicos dependentes de voltagem seletivos a potássio.

NVE: *Ensemble* cujo número de partículas, volume e energia são constantes.

NPT: *Ensemble* cujo número de partículas, pressão e temperatura são constantes.

NVT: *Ensemble* cujo número de partículas, volume e temperatura são constantes.

RMSD: *Root Mean Squared Deviation.*

RMSF: *Root Mean Squared Fluctuation.*

POCR: *Ceramida.*

POPC: *Fosfatidilcolina.*

PDB: *Protein Data Bank.*

SPGM: *Esfingomielina.*

1. INTRODUÇÃO

1.1. EXCITABILIDADE CELULAR

1.1.1. POTENCIAL DE REPOUSO

Em todas as células do nosso organismo, há uma diferença de potencial elétrico entre o meio intracelular e o meio extracelular, geralmente próximo a -70 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. 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 permitem a difusão seletiva de diferentes espécies iônicas. Assumindo que este íon esteja mais concentrado no lado 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 difusão deste íon. À medida em que mais espécies carregadas atravessam a membrana, a força elétrica atuante nelas torna-se maior até se igualar à força química, quando a difusão dos íons é interrompida. Se, neste momento, forem introduzidos eletrodos nos dois meios, pode-se 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:

$$E_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[M]_e}{[M]_i} \quad [1]$$

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.

Todas as células possuem um potencial de repouso (geralmente próximo a -70 mV), ou seja, um potencial transmembrânico gerado pelo equilíbrio eletroquímico de diferentes íons (principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+}). Este potencial de repouso é regulado por diversas proteínas de membrana, que podem atuar como bombas (transportadoras de solutos contra o gradiente eletroquímico) ou como canais (permitem a livre difusão de solutos).

1.1.2. POTENCIAL DE AÇÃO

Alguns tipos celulares (como neurônios, miócitos cardíacos e células musculares) fazem uso constante dos mecanismos de regulação do potencial transmembrânico para gerar sinalizações elétricas. Quando um impulso elétrico é aplicado nessas células, observa-se um remodelamento transitório da distribuição de cargas em torno da sua membrana.^{1,2} A voltagem transmembrânica aumenta gradualmente até um limiar, a partir do qual ela cresce rapidamente, atingindo valores positivos (despolarização). A partir de um certo valor, há uma queda na voltagem (repolarização) que prossegue até valores abaixo do potencial de repouso (hiperpolarização) e retorna para o potencial original (Figura 1). Este comportamento é repetido sucessivamente ao longo da célula e é denominado potencial de ação.

Hodgikin e Huxley, utilizando a técnica de *voltage-clamp*, realizaram diversas medidas das correntes elétricas associadas ao potencial de ação em neurônios de lula gigante, tentando decifrar os fluxos iônicos que ocorrem neste processo. Eles determinaram que a fase de crescimento do potencial transmembrânico corresponde a um influxo de Na^+ , enquanto que a descida é ocasionada por um efluxo de K^+ .³⁻⁵ Estudos posteriores mostraram a existência de canais transmembrânicos que controlavam especificamente o transporte de Na^+ ou de K^+ durante o potencial de ação.⁶⁻⁹ Apenas com o advento da técnica de *patch-clamp*, que permite isolar e estudar fragmentos da membrana plasmática contendo apenas um único canal iônico, e da biologia molecular é que foi possível isolar e caracterizar um conjunto específico de proteínas de membrana responsáveis pela criação do potencial de ação. Tais proteínas permitem a passagem seletiva de íons em resposta a variações no potencial transmembrânicos e são denominadas de canais catiônicos

dependentes de voltagem (Figura 1).¹⁰⁻¹² Em potenciais de repouso ou hiperpolarizados, estes canais encontram-se preferencialmente em uma conformação não condutora (desativado e fechado). Quando a membrana é despolarizada, estes canais passam para uma conformação condutora (ativada e aberta), na qual os íons se difundem segundo a condutância permitida por cada canal.⁵

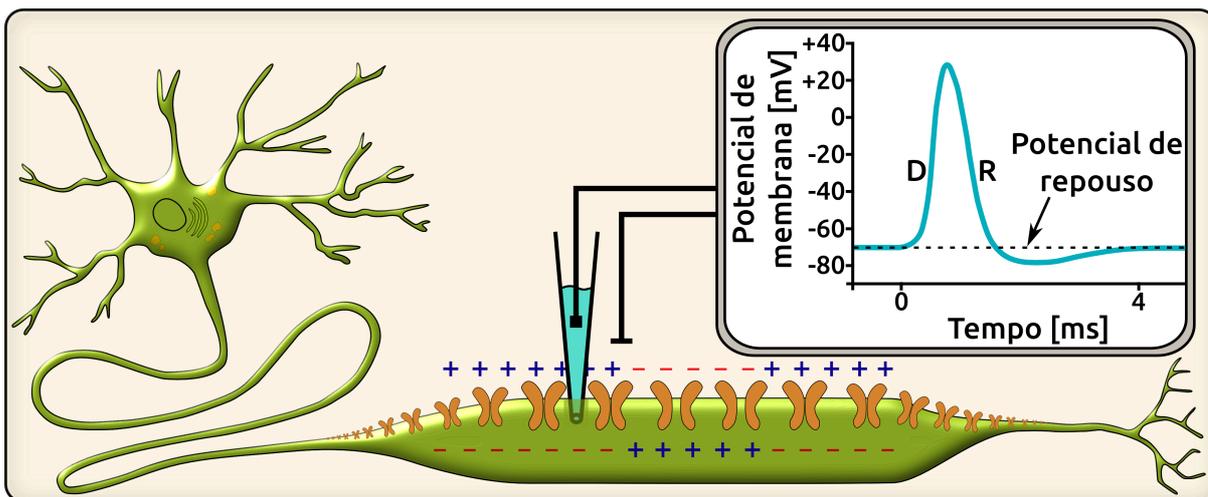


Figura 1. Representação esquemática de neurônio (verde), evidenciando canais iônicos (estruturas em laranja), potencial elétrico transmembrânico (sinais positivos e negativos) e voltímetro acoplado a eletrodos nos meios intracelular e extracelular. No potencial de repouso, o meio extracelular é mais 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^+ elevam 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.

1.2. CANAIS CATIÔNICOS DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais catiônicos dependentes de voltagem são proteínas de membrana tetraméricas (formadas por quatro cadeias polipeptídicas) ou pseudo-tetraméricas (formadas por um único polipeptídeo contendo quatro repetições). Além de cruciais na geração e propagação dos impulsos nervosos, o mal funcionamento desses canais 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.¹³⁻¹⁶

No Kv1.2 (primeiro e único canal dependente de voltagem de mamífero cuja estrutura atômica foi determinada até o momento)¹⁷, cada subunidade é composta por seis hélices transmembrânicas (S1 – S6) dispostas radialmente em torno de um

poro central (Figura 2).^{11,12,17}

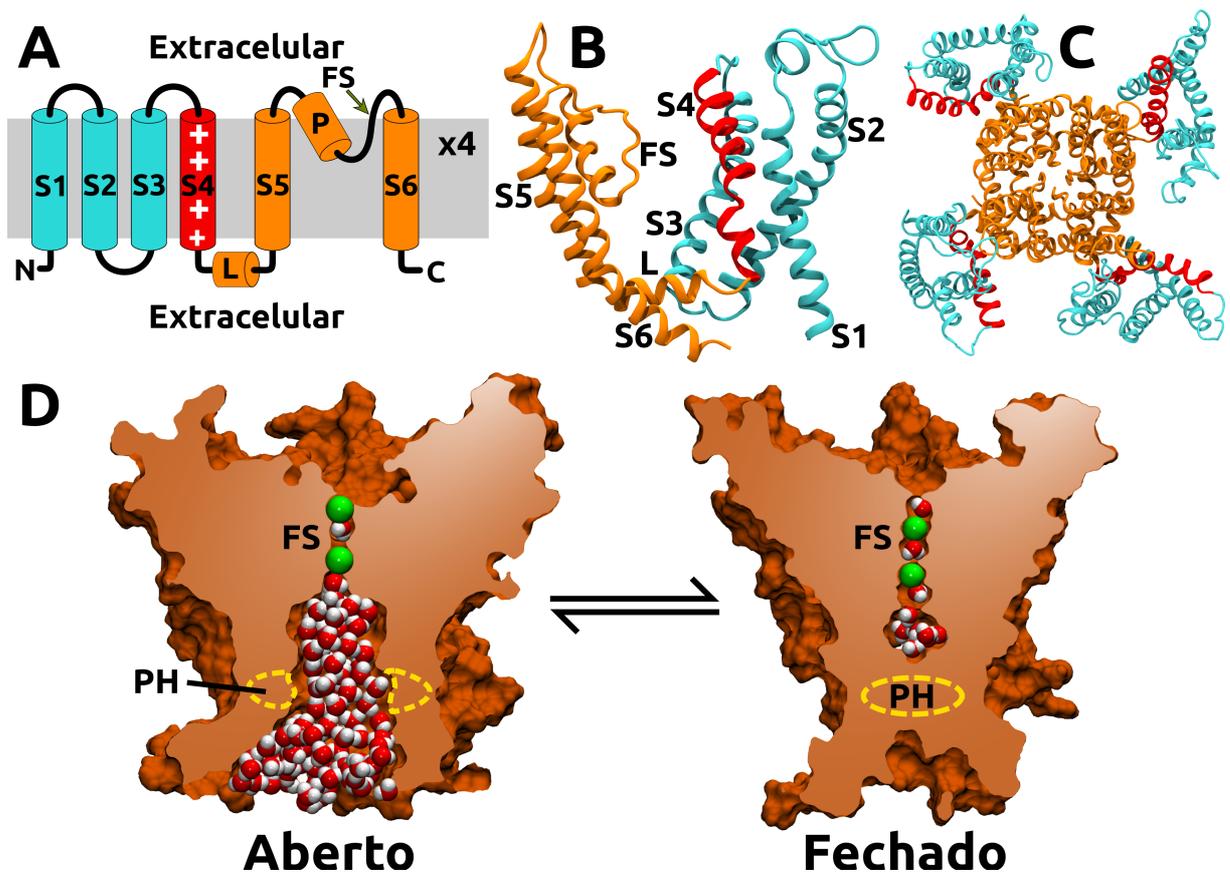


Figura 2. Geometria e portão hidrofóbico do poro do canal Kv1.2. **(A)** Esquema da geometria transmembrânica de uma subunidade do canal. As hélices S1 – S4 constituem o domínio sensível a voltagem, sendo que a hélice S4 apresenta diversos resíduos positivamente carregados. As hélices S5 – S6 formam o poro de condução do canal, onde há o filtro de seletividade (FS), responsável pela discriminação entre os íons que este canal conduz. Os movimentos destes dois domínios são acoplados por meio da hélice L. **(B)** Estrutura tridimensional de uma subunidade do Kv1.2, ressaltando a posição de cada hélice. **(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 resíduos do portão hidrofóbico (PH) desidratam o caminho de permeação dos íons, impedindo a sua difusão.

As hélices S5 e S6 constituem o domínio do poro, um canal hidratado por onde os íons são conduzidos. Neste domínio, há um motivo altamente conservado, denominado filtro de seletividade. Tal motivo é responsável pela discriminação entre as diferentes espécies químicas que podem ser conduzidas pelo canal, o que constitui um critério de subdivisão dessa família de canais. Os canais catiônicos dependentes de voltagem podem, então, pertencer a quatro classes principais: Nav, Cav, Kv e HCN, correspondendo respectivamente aos canais seletivos a Na^+ , Ca^{+2} , K^+ e os canais catiônicos não seletivos.¹⁸⁻²² 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 íons K^+ conduzidos pelo filtro de seletividade, apenas um íon 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.²³⁻²⁵ Neste domínio, há também resíduos hidrofóbicos que constituem um portão hidrofóbico, responsável pelo fechamento do poro de condução. Quando o poro está aberto, o canal é hidratado e os íons difundem-se dentro dele sem experimentar barreiras energéticas. Ao se fechar, esses resíduos hidrofóbicos desidratam o canal, impondo uma barreira de até 45 kcal/mol para a difusão iônica (Figura 2). Tal barreira é similar à de um íon atravessando sozinho uma membrana lipídica.^{17,26,27} O processo de abertura e fechamento desse poro é autônomo, no entanto, quando o domínio sensível a voltagem do canal encontra-se desativado, o poro é estabilizado na conformação fechada.²⁸

1.2.1. O DOMÍNIO SENSÍVEL A VOLTAGEM

O domínio que compreende as hélices S1 – S4 é conhecido como domínio sensível a voltagem. Este domínio é capaz de detectar variações de centésimos de Volt no potencial transmembrânico, graças à grande quantidade de resíduos carregados presentes na hélice S4. Nesta hélice, há pelo menos quatro argininas (R1 – R4), que são conservadas entre os diferentes canais catiônicos dependentes de voltagem. Mudanças no campo elétrico transmembrânico realizam trabalho sobre esses resíduos, induzindo movimentos na hélice S4 que culminam na abertura/fechamento do poro.²⁹⁻³²

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 resíduos através do potencial transmembrânico em direção ao meio intracelular, e o domínio passa a estar desativado (Figura 3).³³⁻³⁶ 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, principal responsável pela barreira energética de cada transição, e pelos resíduos E236 e D259, que ajudam a estabilizar as argininas.^{37,38}

Tanto nos estados ativado e desativado, quanto nos estados intermediários, os

resíduos 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 um campo elétrico estático, enquanto é rotacionada em aproximadamente 180°. ^{39–47}

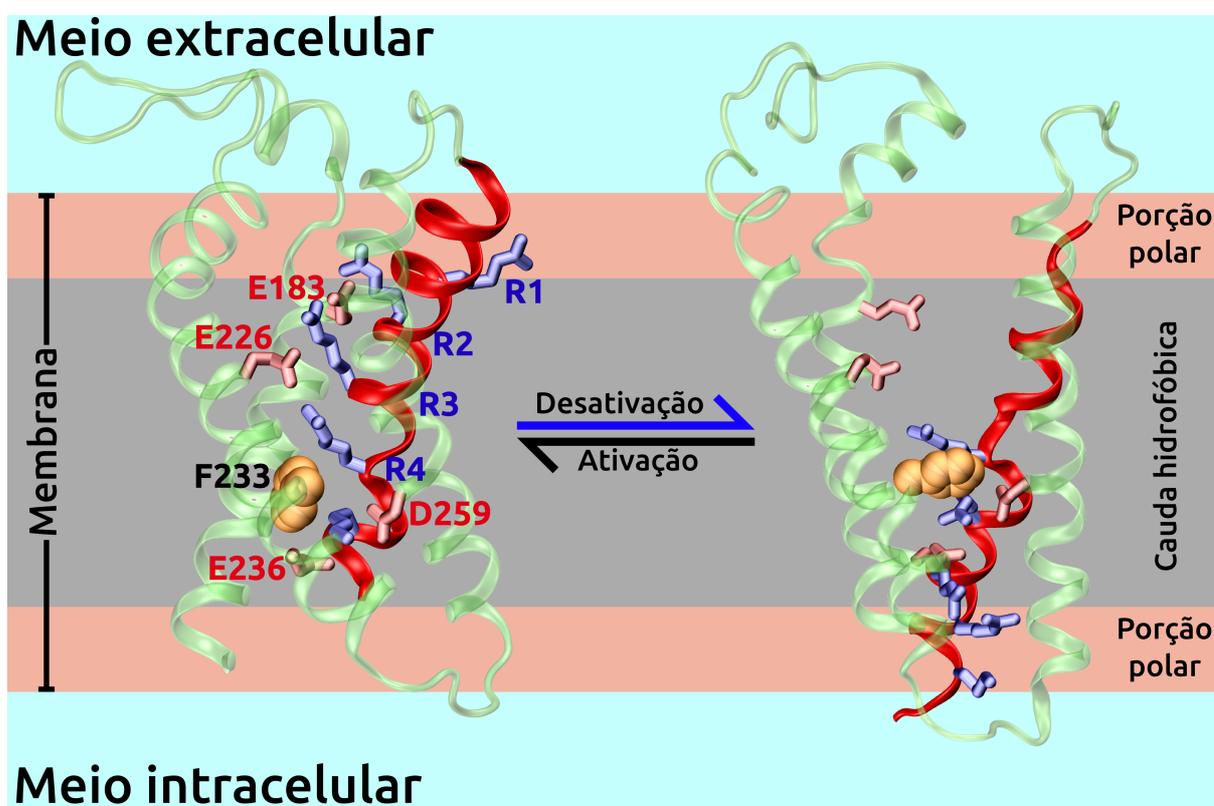


Figura 3. Processo de ativação/desativação do domínio sensível a voltagem do Kv1.2. No estado ativado (esquerda), as argininas (R1 – R4, azul) da hélice S4 (vermelha) estão predominantemente voltadas para o meio extracelular, e acima da F233 (amarelo). Elas são estabilizadas por pontes salinas com o grupo fosfato dos lipídeos de membrana e com os resíduos E183 e E226 (rosa). No estado desativado (direita), há um movimento da hélice S4 em direção ao meio intracelular, e as argininas passam a realizar pontes salinas com os resíduos E226 (R1), D259 (R2), E236 (R3), e com o grupo fosfato da camada inferior da membrana (R4).

O movimento dos resíduos 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*. ^{48–50} 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.^{30,31,51,52}

Como os domínios sensíveis a 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)⁵³ 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.^{14,54-56} 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.^{57,58}

Além das pontes salinas, uma peculiar hidratação deste domínio também estabiliza os resíduos básicos da hélice S4. A geometria das hélices dos domínios sensíveis a voltagem do Kv1.2 cria um poro hidratado aberto nas faces intracelular e extracelular, mas comprimido no centro, similar a uma ampulheta (Figura 4). Dessa forma, as cadeias laterais das argininas encontram-se em uma região hidratada, e não expostas para as caudas hidrofóbicas dos lipídeos da membrana. A porção central do domínio, onde estão presentes alguns resíduos hidrofóbicos (incluindo a F233), é chamada de constrição hidrofóbica e impede a comunicação dos meios intracelular e extracelular.^{37,46,47,55,59-62} Dessa forma, os dois banhos de eletrólitos aproximam-se além do permitido em uma membrana pura, sem que haja condução iônica. Esta peculiar morfologia de hidratação altera drasticamente o campo elétrico nas proximidades da constrição hidrofóbica, tornando-o focalizado: a maior parte da

variação do potencial eletrostático transmembrânico ocorre em uma pequena faixa (10–15 Å), em contraste com a variação quase uniforme do mesmo em uma membrana lipídica. Além disso, esta morfologia especial do campo elétrico mostrou-se conformacionalmente independente, ou seja, ela não é consideravelmente modificada durante a ativação/desativação do domínio. Devido ao acoplamento dos resíduos básicos da hélice S4 com este campo elétrico focalizado, remodelamentos, mesmo que pequenos, do potencial transmembrânico geram grandes forças motrizes na hélice S4, o que explica a grande sensibilidade dos domínios sensíveis a voltagem.^{40,46,47,63–66}

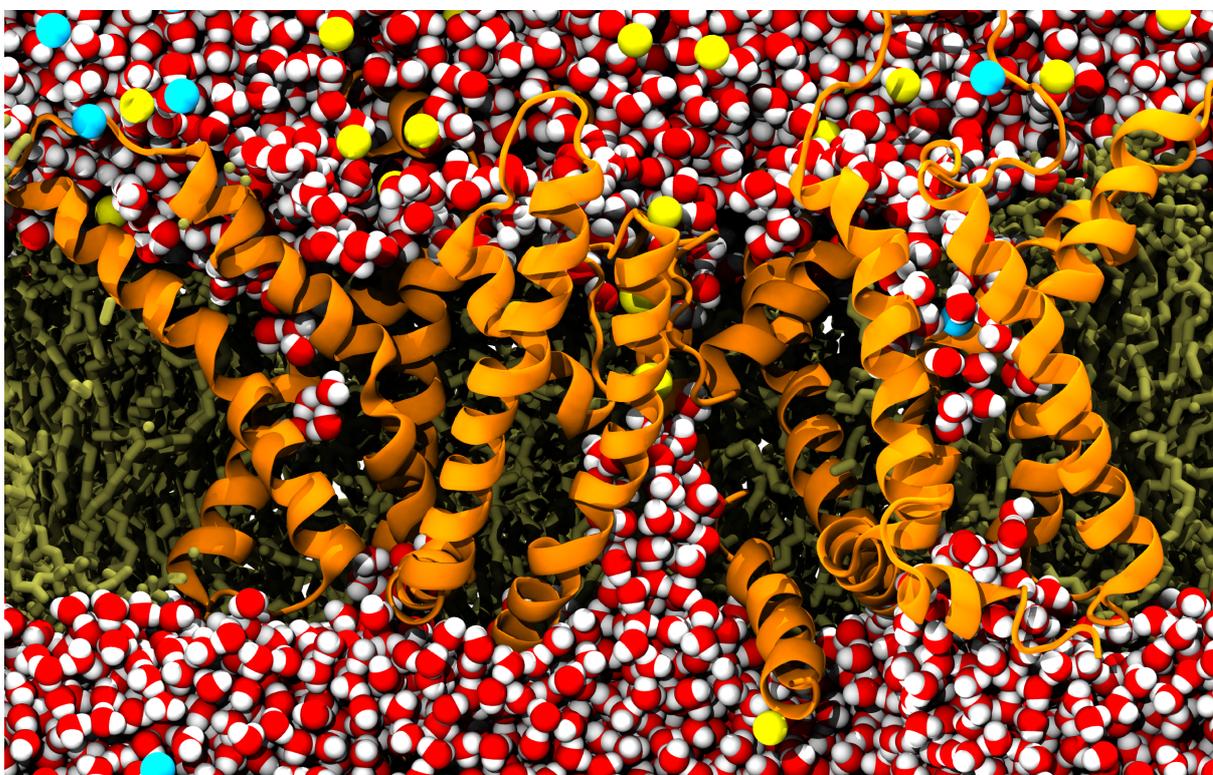


Figura 4. Detalhe atomístico de um sistema típico de simulação do Kv1.2. O canal (laranja) está inserido em uma bicamada composta por 372 lipídeos (ocre) e hidratado por 46512 moléculas de água (vermelho). As esferas azuis correspondem aos íons Cl⁻, e os íon K⁺ estão representados em amarelo, totalizando aproximadamente 180.000 átomos. É possível notar a presença de dois íons K⁺ na região do filtro de seletividade, além de moléculas de água hidratando parcialmente ambos os domínios sensíveis a voltagem e o poro de condução.

Dentre as várias questões a serem respondidas sobre os canais iônicos dependentes de voltagem, uma em especial foi o foco de estudo deste projeto: as propriedades de hidratação e o campo elétrico focalizado descritas para o Kv1.2 são características únicas dele ou elas são ubíquas a todos os canais iônicos que apresentam domínios sensíveis a voltagem? O aumento no número de estruturas

atômicas resolvidas para diversos canais que apresentam domínios sensíveis a voltagem permitiu que o presente estudo respondesse esta questão. Para isso, foram empregadas simulações de dinâmica molecular dessas estruturas atômicas, visando caracterizar a morfologia de hidratação e o campo elétrico dos seus domínios sensíveis a voltagem. Esta investigação começou com o Kv1.2, por conta da extensa descrição das suas características de hidratação e do campo elétrico, e avançou sobre pequenas perturbações (mutações pontuais) nos seus domínios sensíveis a voltagem. Em seguida, avaliou-se a influência de grandes perturbações nas propriedades elétricas e de hidratação desses domínios. Para isso, tais propriedades foram aferidas nos canais KvAp, NavAb e NavRh, que podem ser vistos como um conjunto de mutações acumuladas ao longo da evolução sobre a sequência do Kv1.2. Por fim, investigou-se se há alterações dessas propriedades quando o Kv1.2 é inserido em membranas contendo lipídeos nos quais a sua porção polar é quimicamente modificada.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

O presente estudo buscou quantificar a contribuição do acoplamento a um potencial transmembrânico para a energética de diferentes domínios sensíveis a voltagem e verificar a robustez deste acoplamento diante de variações de sequência e estrutura.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Identificação de domínios sensíveis a voltagem cuja estrutura tridimensional esteja resolvida;
- ii. Caracterização das propriedades elétricas e de hidratação associadas aos diferentes domínios sensíveis a voltagem;
- iii. Avaliação da contribuição energética do acoplamento com a voltagem transmembrânica nesses domínios.

3. METODOLOGIA

Diversas técnicas experimentais, como eletrofisiologia e dados farmacológicos, foram empregadas no estudo dos canais iônicos. Com o advento da biologia molecular foi possível elucidar detalhes estruturais e funcionais destes canais, tais como localização dos filtros de seletividade^{18,20} e das hélices carregadas dos sensores de voltagem.^{30,31} Mais recentemente, com a resolução das primeiras estruturas tridimensionais (via difração de raios X) de canais iônicos dependentes de voltagem^{17,67} e o aprimoramento de técnicas computacionais, tornou-se possível o estudo da dinâmica desses canais em nível atômico, algo inviável do ponto de vista experimental. Para isso, podemos empregar simulações de dinâmica quântica ou de dinâmica molecular. Enquanto nas simulações de dinâmica quântica leva-se em consideração a posição dos elétrons e dos núcleos ao longo do tempo, nas simulações de dinâmica molecular assume-se que cada átomo seja representado por um centro contendo carga elétrica, massa e interações bem definidas. Com ambas as técnicas, é possível investigar processos observados experimentalmente, tais como reações químicas (dinâmica quântica) ou mudanças conformacionais de uma proteína (dinâmica quântica ou molecular). Além disso, estas técnicas permitem a realização de experimentos que não podem ser executados em bancada, seja por envolverem estados não físicos (como moléculas desaparecendo), seja por limitações na resolução das metodologias existentes. O presente estudo baseia-se exclusivamente em simulações de dinâmica molecular para gerar dados sobre hidratação e potencial eletrostático dos sistemas analisados. Simulações de dinâmica quântica poderiam ser usadas para a mesma finalidade, no entanto o seu custo computacional e as escalas de tempos necessárias para amostrar as propriedades de interesse (na ordem de nanosegundos) tornariam esta abordagem inviável.

Para alcançar os objetivos deste projeto, foi elaborado um protocolo (figura 5) interligando cada etapa e estabelecendo a cronologia das tarefas.

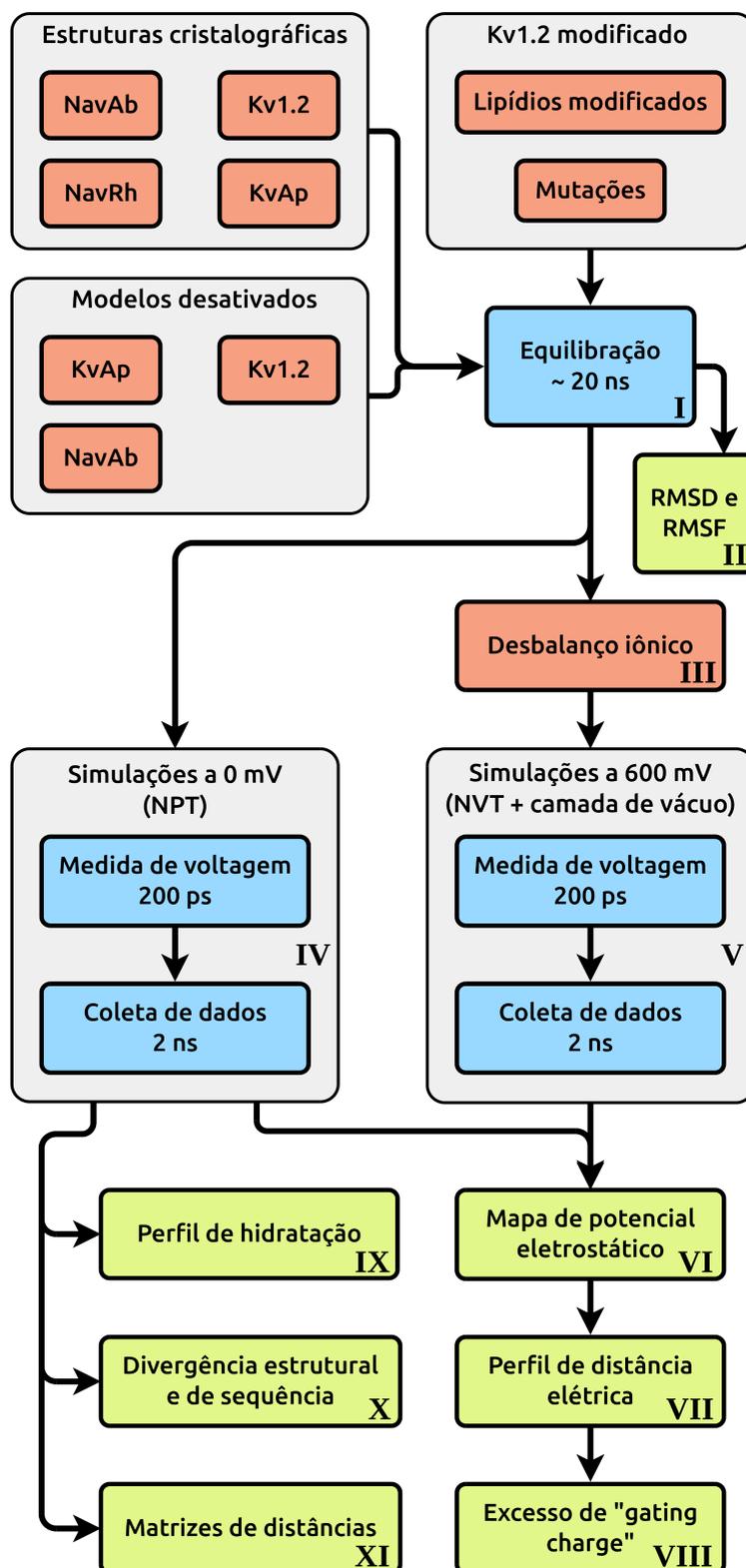


Figura 5. Desenho experimental do projeto. Os quadros vermelhos, azuis e verdes representam, respectivamente, as etapas de preparação dos sistemas, simulações de dinâmica molecular e análises realizadas. O banco estrutural contendo estruturas cristalográficas, modelos desativados e

mutantes de canais iônicos dependentes de voltagem foi sujeito a simulações de equilíbrio (I), das quais foram aferidos o RMSD e o RMSF (II) para caracterizar a estabilidade estrutural das proteínas. Em seguida, cada proteína foi sujeita a duas simulações independentes, uma com potencial transmembrânico de 0 mV, e outra a -600 mV (IV e V). Para gerar os potenciais hiperpolarizados, foi seguido um protocolo de desbalanço iônico (III). Todas as outras análises deste estudo (VI a XI) foram realizadas utilizando apenas uma ou ambas as simulações com voltagem.

3.1. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

A simulação de dinâmica molecular é uma técnica computacional que visa gerar trajetórias no espaço de fase de um sistema composto por um número finito de partículas (átomos). Para gerar tais trajetórias, calcula-se sucessivamente a força resultante das interações entre as partículas que compõem o sistema e utiliza-se esta informação para propagar o movimento de cada partícula, segundo as leis de Newton. Um esquema simplificado deste processo é ilustrado na figura 6. As forças de interação entre partículas são regidas por um conjunto de funções de energia potencial que serão descritas no tópico 3.1.1.

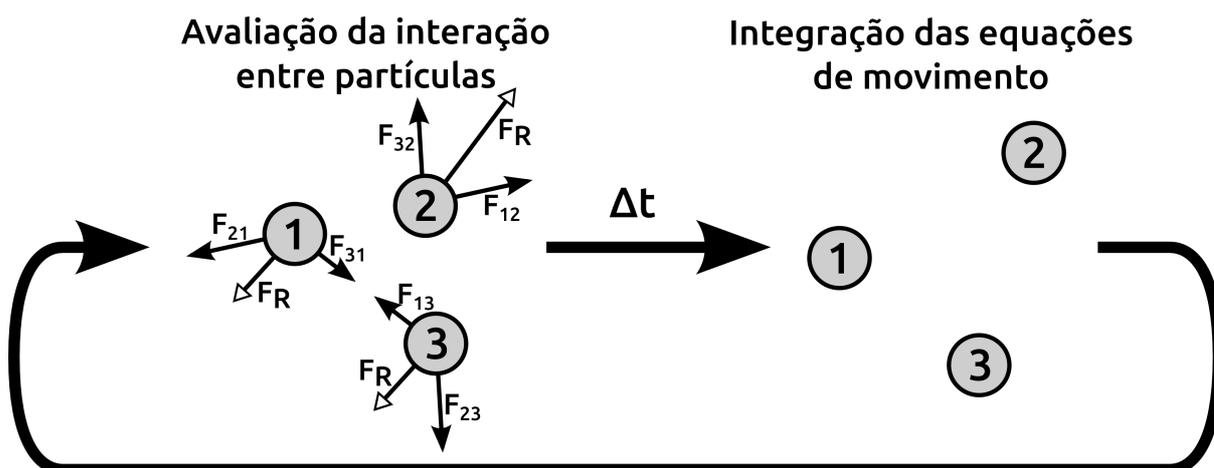


Figura 6. Esquema simplificado das etapas de uma simulação de dinâmica molecular. As partículas que compõem o sistema apresentam energia potencial proveniente da interação de umas com as outras. Desta energia potencial é derivada uma força resultante atuante em cada partícula. Após calculadas as interações entre as partículas, a simulação prossegue movendo cada uma delas de acordo com a força resultante por um intervalo de tempo pré-definido (geralmente 1 ou 2 fs). Repetindo-se estas etapas, obtém-se a sequência de posições de cada partícula ao longo do tempo, a qual pode ser utilizada para medir propriedades médias do sistema.

Em sistemas ergóticos, as trajetórias obtidas podem ser usadas para calcular propriedades médias do sistema (temperatura, pressão, propriedades elétricas,, energia livre, etc) a partir de médias temporais, como é expresso na equação:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{A}(t) = \langle A \rangle \quad [2]$$

onde A é uma propriedade do sistema, $\bar{A}(t)$ é a sua média ao longo do tempo e

$\langle A \rangle$ a sua média termodinâmica. Note que esta afirmação só é válida para simulações suficientemente longas, como denotado pelo limite $t \rightarrow \infty$.

3.1.1. FUNÇÕES DE ENERGIA POTENCIAL

A primeira etapa de cada passo de uma simulação consiste em calcular a força resultante exercida em cada partícula do sistema. Para tal, devemos considerar as funções de energia potencial que descrevem como duas partículas (i e j , separadas por uma distância r_{ij}) interagem entre si. A função de energia potencial total desta interação é $U = E_{\text{ligação}} + E_{\text{ângulo}} + E_{\text{diedro}} + E_{\text{coloumb}} + E_{\text{vdw}}$. Os termos desta função podem ser divididos em dois grupos:

- 1) Termos ligados: funções de energia potencial provenientes de interações entre átomos ligados covalentemente. Este grupo é composto pelas interações mostradas a seguir.

1.1) $E_{\text{ligação}} = \sum_{i,j} k_{ij}^l (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$: energia potencial proveniente do estiramento de

ligações covalentes entre dois átomos. Os termos k_{ij}^l e r_{ij}^0 correspondem respectivamente à constante de força e distância de equilíbrio da ligação.

1.2) $E_{\text{ângulo}} = \sum_{i,j,k} k_{ijk}^a (\alpha_{ijk} - \alpha_{ijk}^0)^2$: energia potencial proveniente da torção do

ângulo (α_{ijk}) formado entre as partículas i , j e k . α_{ijk}^0 é o valor de equilíbrio para o ângulo referido e k_{ij}^a é a constante de força desta interação.

1.3) $E_{\text{diedro}} = \sum_{i,j,k,l} k_{ijkl}^d [1 + \cos(n\omega_{ijkl} - \omega_{ijkl}^0)]$: energia potencial proveniente da

torção do ângulo diedral (ω_{ijkl}) formado entre as partículas i , j , k e l . ω_{ijkl}^0 é o valor de equilíbrio para este ângulo diedral e k_{ijkl}^d é a constante de força desta interação.

- 2) Termos não ligados: funções de energia potencial que dependem apenas da distância entre duas partículas. Este conjunto é composto por dois tipos de interações:

2.1) $E_{\text{coloumb}} = \frac{C q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}}$: energia potencial advinda da interação de Coloumb

entre duas partículas carregadas eletricamente. q_i e q_j são as cargas parciais das partículas i e j , C é a constante de Coloumb e ϵ_0 é a constante de permissividade do meio.

2.2) $E_{\text{vdw}} = \sum_{i,j} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$: energia potencial gerada pela atração

fraca entre partículas distantes e pela repulsão forte entre partículas excessivamente próximas (interação de van der Waals). Esta interação é descrita pelo potencial de Lennard-Jones e está condicionada aos parâmetros ϵ_{ij} (valor mínimo do potencial) e σ_{ij} (distância r_{ij} correspondente ao ponto de mínimo do potencial).

Há também duas funções de energia potencial especiais que são utilizadas para criar restrições geométricas nas moléculas:

1) $E_{\text{impróprio}} = \sum_{i,j,k,l} k_{ijkl}^{\psi} (\psi_{ijkl} - \psi_{ijkl}^0)^2$: energia potencial proveniente da torção de

ângulos diedrais (ψ_{ijkl}) entre partículas (i, j, k, l) que não necessariamente encontram-se ligadas covalentemente. ψ_{ijkl}^0 é o valor de equilíbrio deste ângulo e k_{ijkl}^{ψ} é a constante de força desta interação. Esta função geralmente é utilizado para manter anéis aromáticos planos.

2) $E_{\text{Urey-Bradley}} = \sum_{i,j} k_{ij}^U (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$: energia potencial proveniente do distanciamento

entre partículas separadas por duas ligações covalentes. Os termos k_{ij}^U e r_{ij}^0 correspondem respectivamente à constante de força e distância de equilíbrio entre as partículas i e j para esta interação.

O conjunto de parâmetros que descrevem a forma de cada termo da energia potencial para diversos tipos de átomos é denominado campo de força.⁶⁸ Atualmente, diversos campos de força são empregados em simulações de dinâmica molecular de sistemas biológicos, como o CHARMM⁶⁸⁻⁷¹, o GROMOS⁷² e o AMBER.⁷³ É importante ressaltar que esta é uma forma clássica de tratar a energia potencial, portanto assume-se que não haja quebra ou formação de ligações

covalentes durante a simulação.

3.1.1.1. TRATAMENTO DO POTENCIAL ELETROSTÁTICO: INTERAÇÕES DE LONGO ALCANCE

Ao tratar a energia potencial de uma partícula i , é necessário somar a contribuição de todas as partículas do sistema que interagem com ela. No caso das interações ligadas, leva-se em consideração apenas partículas próximas (distantes em até duas ligações covalentes). Já no caso das interações não ligadas, a contribuição exercida por todas as partículas presentes no sistema é considerada. Como o potencial de Lennard-Jones tende a zero rapidamente à medida em que a distância entre duas partículas aumenta, pode-se aplicar um raio de corte neste tipo de interação: se a distância entre duas partículas for maior que o raio de corte (geralmente entre 10 Å e 15 Å), a interação entre elas não é considerada. Como a avaliação das forças é a etapa limitante em simulações de dinâmica molecular, a aplicação de um raio de corte torna a simulação mais rápida, pois diminui a quantidade de interações a serem calculadas. Entretanto, se tratarmos as interações eletrostáticas com o mesmo critério, introduziremos artefatos na trajetória, pois a função que descreve esta interação decai de forma mais lenta. A fim de evitar efeitos indesejados e manter a eficiência computacional, é comum decompor a energia potencial eletrostática (ϕ) em um componente de curto alcance (ϕ_{curto}) e um componente de longo alcance (ϕ_{longo}). Para calcular ϕ_{curto} , considera-se explicitamente a interação entre partículas próximas. No caso de ϕ_{longo} , uma das alternativas é o uso de somas de Ewald, como no método PME (*Particle Mesh Ewald*). Desta forma, podemos reescrever o termo eletrostático da energia potencial como:

$$E_{coloumb} = \sum_{i,j} \phi_{curto}(r_j - r_i) + \sum_k \phi_{longo} |\tilde{\rho}(k)|^2 \quad [3]$$

onde ϕ_{longo} e $\tilde{\rho}(k)$ correspondem à transformada de Fourier para o potencial eletrostático e para a densidade de carga. Como as somas do componente de curto alcance e do componente de longo alcance convergem rapidamente nos seus respectivos espaços, a computação do potencial eletrostático torna-se mais rápida.^{74,75}

3.1.1.2. CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO

A fim de evitar possíveis efeitos de borda em sistemas pequenos, além de permitir o uso do método PME, a simulação pode ser realizada dentro de uma célula (ou caixa) que encontra-se envolta por réplicas suas em todas as direções. Como a posição relativa de cada partícula dentro da célula é a mesma em todas as réplicas, quando uma partícula sai da célula por uma lateral, a sua réplica correspondente entra pela lateral oposta (Figura 7). Na prática, apenas uma célula é simulada e é empregada a convenção de imagem mínima para tratar as interações entre partículas. Esta convenção estabelece que a distância entre duas partículas deve ser a menor possível, descontando as dimensões da caixa (Figura 7). O uso de condições periódicas de contorno permite simular um sistema como se tivesse dimensões infinitas e torna essencial o uso de raios de corte menores que metade do tamanho da célula, evitando a interação de uma partícula com a sua própria imagem.

3.1.2. INTEGRAÇÃO DO MOVIMENTO

Após o cálculo das funções potenciais de cada partícula, a próxima etapa em uma simulação é integrar numericamente as equações de movimento. O algoritmo mais usado para esse fim, por ser reversível no tempo e causar um baixo desvio da energia total do sistema em simulações longas, é o Verlet.⁷⁶ Com este algoritmo, dada a posição de uma partícula (\mathbf{r}) e a força exercida nela (\mathbf{F}) no instante atual (t), juntamente com a sua posição no instante anterior ($t-dt$), a sua posição no instante seguinte ($t+dt$) é obtida segundo a fórmula:

$$\mathbf{r}(t+dt) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t-dt) + \frac{\mathbf{F}}{m}dt^2 \quad [4]$$

$$\mathbf{F}(t) = -\frac{\partial U(\mathbf{r})}{\partial \mathbf{r}(t)} \quad [5]$$

onde $U(\mathbf{r})$ é a função de energia potencial dada a posição \mathbf{r} da partícula e m é a massa da partícula. O erro associado a este método é da ordem de $O(dt^4)$ e pode, portanto, ser desprezado sem prejuízos significativos para a simulação.

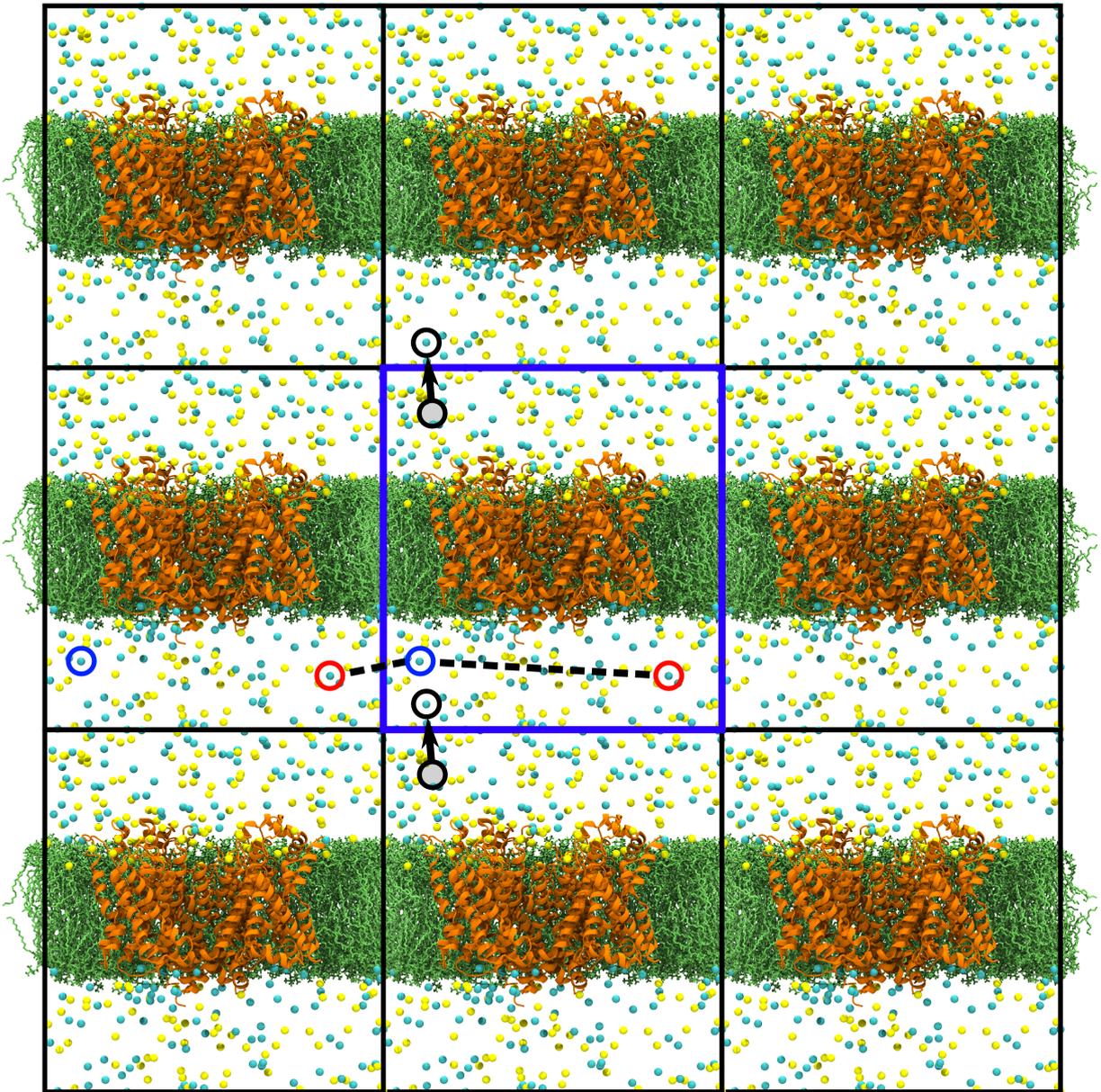


Figura 7. Esquema ilustrativo das condições periódicas de contorno. É assumido que o sistema simulado (caixa azul) seja circundado por infinitas repetições suas. Com isso, uma partícula que sai do sistema por uma das laterais é considerado como entrando pela lateral oposta (círculos pretos com setas). Na prática, este efeito é conseguido empregando a convenção de imagem mínima, que estipula que a distância entre duas partículas deva ser a menor possível, considerando as suas réplicas. Como exemplo, a distância entre as partículas circuladas em azul e vermelho é mostrada como uma linha tracejada. Há duas distâncias possíveis entre estas duas partículas, uma se considerada apenas nos limites da célula de simulação (caixa azul) e outra se as réplicas do sistema foram consideradas. Segundo a convenção da imagem mínima, esta última distância é que deve ser considerada ao calcular as interações entre estas duas partículas.

O intervalo de tempo entre dois instantes da simulação (dt , ou passo de integração) deve ser pequeno o suficiente para amostrar o evento mais rápido que pode ocorrer no seu sistema, assegurando, dessa forma, a conservação da energia do sistema.⁷⁷ No entanto, um dt muito pequeno torna a simulação

computacionalmente dispendiosa. Em sistemas biológicos, utiliza-se um dt de 2 fs (10^{-15} segundos), que corresponde ao período de vibração dos átomos da molécula de água.

Ao usar o algoritmo Verlet, as velocidades das partículas, necessárias para o cálculo da energia cinética do sistema, podem ser obtidas pela equação:

$$\mathbf{v}(t+dt) = \frac{\mathbf{r}(t+dt) - \mathbf{r}(t-dt)}{2dt} \quad [6]$$

com um erro associado de $O(dt^2)$.

3.1.3. ENSEMBLES

Uma simulação que empregue apenas os métodos descritos anteriormente é capaz de gerar um *ensemble* NVE, ou seja, o número de partículas, o volume e a energia total do sistema não variam ao longo do tempo. Deste modo, tanto a temperatura quanto a pressão oscilarão sem controle, podendo assumir valores extremos. Como os sistemas biológicos estão sujeitos a temperaturas e pressões constantes, é conveniente simularmos tais sistemas nos *ensembles* NPT (isotérmico e isobárico) e NVT (isotérmico). Para tanto, é necessário adicionar um barostato ou um termostato na etapa de avaliação das forças entre partículas ou na integração das equações de movimento.

Diversos métodos foram propostos para realizar simulações isotérmicas, como um simples reescalonamento das velocidades das partículas⁷⁸, adição de graus de liberdade nas equações de movimento das partículas^{79,80} ou adição de forças aleatórias, como na dinâmica de Langevin.⁸¹

A dinâmica de Langevin para o controle da temperatura é um método simples, mas efetivo, capaz de gerar um *ensemble* que corresponde ao espaço de fase NVT canônico para fluidos estacionários. Por este método, as equações de movimento de cada partícula i são modificadas a fim de simular o acoplamento delas a um banho térmico:

$$\ddot{\mathbf{r}}_i = \frac{\dot{\mathbf{p}}_i}{m_i} \quad [7]$$

$$\dot{\mathbf{p}}_i = \mathbf{F}_i - \gamma \mathbf{p}_i + \mathbf{R}_i \quad [8]$$

onde γ é um coeficiente de fricção que simula a viscosidade do banho térmico, enquanto \mathbf{R}_i é uma força aleatória correspondente a colisões com as partículas do banho. Dessa forma, a temperatura é controlada por um termo dissipativo ($-\gamma \mathbf{p}_i$), que retira energia cinética de cada partícula, e por uma força restauradora aleatória (\mathbf{R}_i), que fornece energia cinética às partículas. A força \mathbf{R}_i é extraída de uma distribuição gaussiana centrada em 0 com variância unitária escalonada por:

$$\sqrt{\frac{2k_B T \gamma m}{\Delta t}} \quad [9]$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura desejada, m é a massa da partícula e Δt é o passo de integração da simulação. O valor de γ gama deve ser escolhido de forma a manter um compromisso entre a eficiência da amostragem estatística e a acurácia em simulações curtas.⁸¹

Um esquema semelhante pode ser utilizado para manter a pressão do sistema constante. Para isso é adicionado um termo às equações de movimento que representa os movimentos de um pistão:

$$\ddot{\mathbf{r}}_i = \frac{\dot{\mathbf{p}}_i}{m_i} + \frac{\dot{p}_\epsilon}{W} \mathbf{r}_i \quad [10]$$

$$\dot{p}_\epsilon = dV(X - P_{ext}) + \frac{d}{N_f} \sum_i \frac{\mathbf{p}_i^2}{m_i} - \gamma_p p_\epsilon + R_p \quad [11]$$

onde V é o volume do sistema, P_{ext} é a pressão exercida pelo banho externo e X é uma medida da pressão instantânea do sistema que não pode considerar o ruído gerado pelo controle de temperatura. D e N_f são, respectivamente, o número de dimensões e o número de graus de liberdade do sistema. Este formalismo simula o acoplamento de uma espécie de pistão controlador da pressão do sistema, cujo momento linear e massa são representados respectivamente por p_ϵ e W , e que está sob a ação de uma força estocástica R_p .

A implementação dos métodos descritos acima é independente e a sua combinação pode ser usada para gerar os *ensembles* de interesse, como NPT e NVT.

3.2. MEDIDAS ELÉTRICAS

3.2.1. DISTÂNCIA ELÉTRICA

Neste estudo, a fração adimensional do campo elétrico a que uma proteína λ está acoplada em um dado estado conformacional c foi obtida a partir do perfil no eixo z (perpendicular à membrana) da distância elétrica $\delta_c^\lambda(z)$:

$$\delta_c^\lambda(z) \equiv \frac{\partial}{\partial V} \phi_c^\lambda(z, V)|_{V=0} \quad [12]$$

onde $\phi_c^\lambda(z, V)$ é o potencial eletrostático local na posição z a uma dada voltagem V . A partir da equação 12, os perfis de distância elétrica $\delta_c^\lambda(z)$ foram estimados para $dV = -600 \text{ mV}$, com $V_1 = 0 \text{ mV}$ e $V_2 = -600 \text{ mV}$ (Figura 5, item VII), segundo a equação:

$$\delta_c^\lambda(z) \equiv \frac{\phi_c^\lambda(z, V_2) - \phi_c^\lambda(z, V_1)}{V_2 - V_1} \quad . [13]$$

O potencial eletrostático local a uma dada voltagem para cada valor de z ($\phi_c^\lambda(z, V)$) derivou da média dos valores dos planos xy (de altura z , amostrados em intervalos de 1 \AA) do mapa de potencial eletrostático do sistema (ver tópico 3.2.2). Apenas as regiões que compreendiam o poro dos domínios sensíveis a voltagem (*gating pore*) foram consideradas nas análises. Mais especificamente, o perfil do potencial eletrostático foi amostrado apenas no interior de um cilindro de raio igual a 8 \AA , centro coincidente com o centro de cada *gating pore* e limites superior e inferior englobando todo o sistema (Figura 8). Dessa forma, foram gerados quatro perfis de distância elétrica para cada canal (um por domínio sensor de voltagem), dos quais calculou-se o perfil médio da proteína. O perfil de cada canal foi então transladado para que o potencial da região correspondente ao banho de eletrólitos intracelular ($z = -21$) fosse nulo (referência). Por fim, os perfis de distância elétrica foram normalizados de acordo com os valores na altura $z = +21$, onde a transição do potencial foi considerada completa.

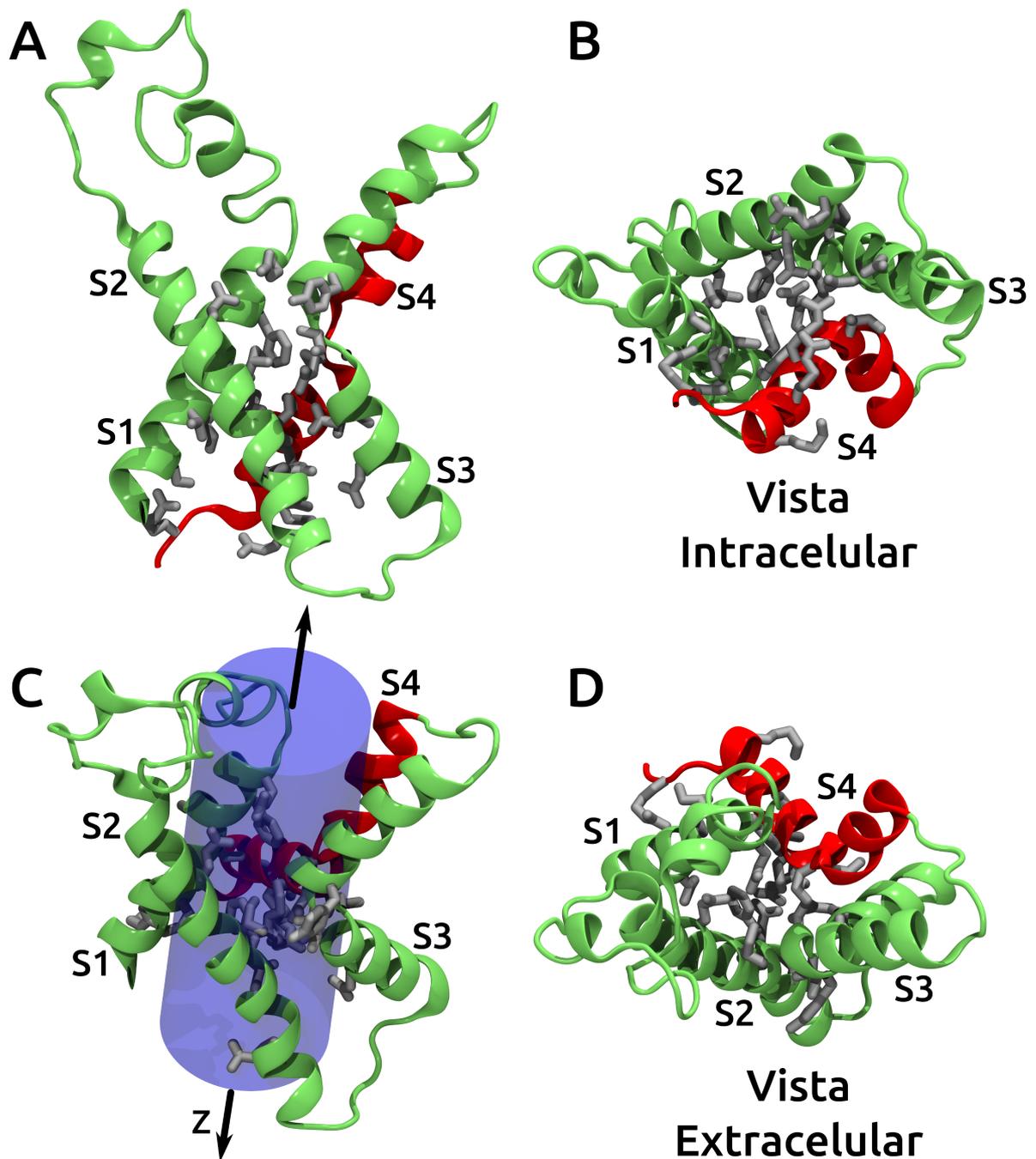


Figura 8. Resíduos no interior do *gating pore* do Kv1.2. Detalhe de um domínio sensível a voltagem com hélices S1 – S3 em verde, hélice S4 em vermelho e resíduos internos ao *gating pore* em cinza, nas visões lateral (A), intracelular (B) e extracelular (D). (C) As propriedades elétricas e de hidratação foram medidas no interior de um cilindro (azul) com 8 Å de raio, centrado no *gating pore*. Os limites do cilindro no eixo Z corresponderam aos limites do sistema completo.

Com relação ao excesso de *gating charge* (ver tópico 4.4), o valor de $\phi_c^\lambda(R, \Delta V)$ levado em consideração no cálculo da distância elétrica ($\delta_c^\lambda(R)$) de cada resíduo básico R da hélice S4 corresponde a:

$$\phi_c^\lambda(R, V) \equiv \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \phi_j(\mathbf{r}, V) \quad [14]$$

onde $\phi_j(\mathbf{r}, V)$ é o potencial eletrostático local dada a posição \mathbf{r} do átomo j do grupo carregado da cadeia lateral do resíduo em questão.

3.2.2. MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO

As simulações de dinâmica molecular nos fornecem, a cada instante, a posição das partículas que compõem o sistema. A partir das cargas parciais e das posições destas partículas, é possível calcular o mapa de potencial eletrostático de uma configuração j do sistema para cada posição \mathbf{r} de uma malha 3D através da resolução da equação de Poisson:

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

onde $\rho_i(\mathbf{r})$ é a densidade de cargas da partícula i , aproximada por uma gaussiana esférica de largura σ , e a soma ocorre sobre todas as partículas. O *plugin* PMEpot⁸², do pacote de visualização molecular VMD foi utilizado para resolver a equação de Poisson (com $\sigma = 0.25 \text{ \AA}^{-1}$) para cada configuração de uma simulação, gerando um mapa médio de potencial eletrostático. Cada sistema foi sujeito a duas simulações independentes de 2 ns (Figura 5, itens IV e V), amostradas em intervalos de 5 ps. O mapa gerado pelo PMEpot para todas as simulações consistiu em uma malha composta por células com arestas de 1 Å.

3.2.3. APLICAÇÃO DE POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO VIA DESBALANÇO DE CARGAS

Em células excitáveis, o potencial transmembrânico medido por experimentos de eletrofisiologia advêm de diferenças nas concentrações de íons entre o meio intracelular e o meio extracelular. Quando uma célula está hiperpolarizada ($\Delta V < 0$), há um excesso de cargas negativas no meio intracelular, contraposto por um excesso de cargas positivas no meio extracelular. Aplicar este potencial transmembrânico em um sistema contendo uma membrana é uma tarefa desafiante, pois as condições periódicas de contorno permitem a transferência de íons entre os banhos de eletrólitos de ambos os lados da membrana. Visando resolver este problema, há três maneiras de produzir diferenças de potencial ao longo de uma

membrana: aplicando um campo elétrico artificial, construindo um sistema com duas membranas para separar banhos de eletrólitos, ou separando-os com uma interface água/vácuo (Figura 9).

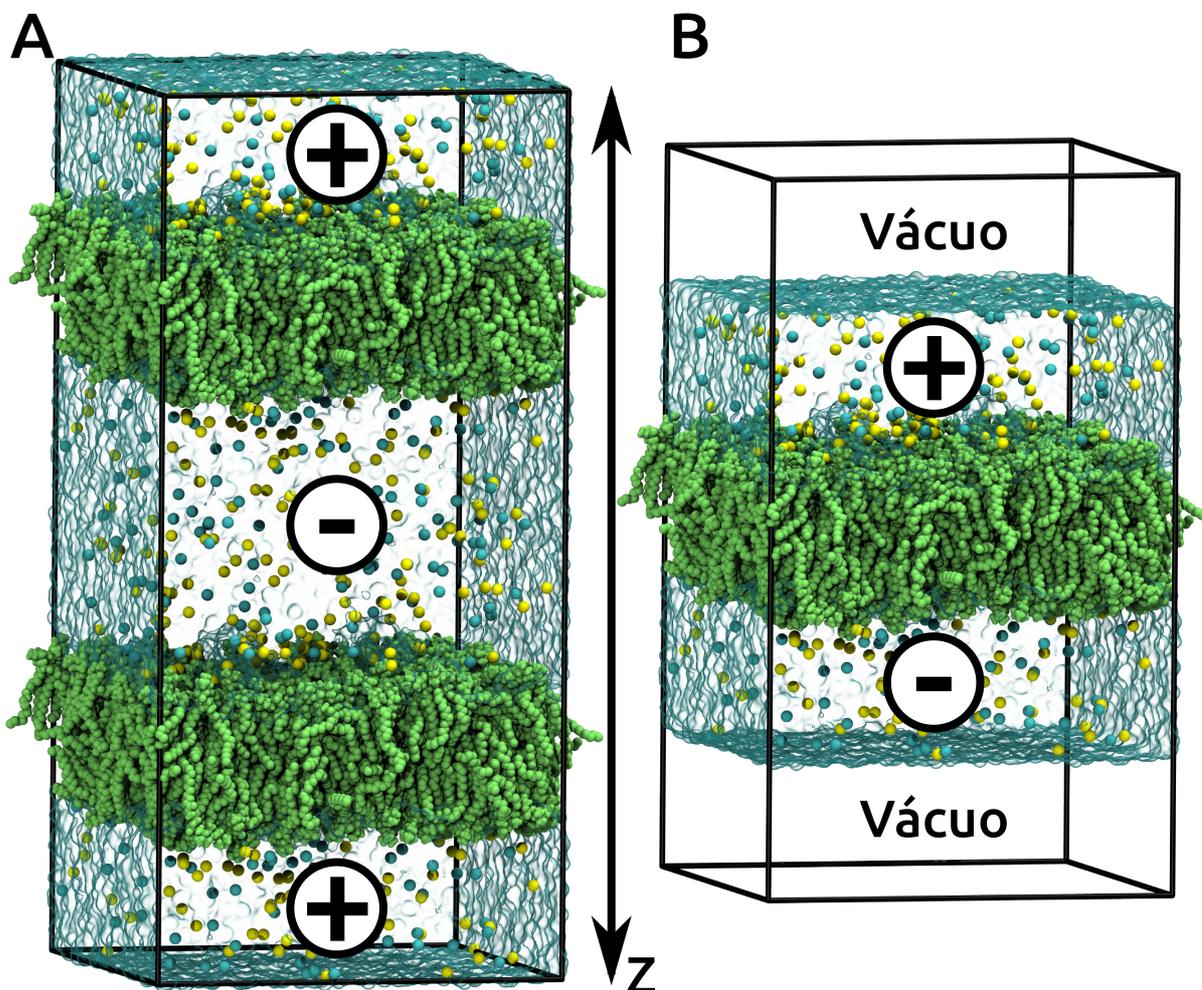


Figura 9. Protocolos de desbalanço iônico em torno de membranas lipídicas. Ao usar um sistema contendo duas membranas (A), obtém-se dois meios aquosos não comunicantes. Dessa forma, mantém-se concentrações iônicas diferentes entre os meios ao longo de toda a simulação. No protocolo de interface vácuo/água (B), a não comunicação entre os meios que circundam a membrana é obtida estendendo o tamanho da célula de simulação (caixa com linhas pretas) ao longo do eixo Z e simulando um ensemble NVT. Dessa forma, é criada uma camada de vácuo que impede a troca de íons entre os dois meios. Os sinais positivo e negativo indicam as regiões com maior e menor potencial eletrostático, respectivamente. A linha central indica a direção do eixo Z.

Para aplicar a diferença de potencial necessária para os cálculos de distância elétrica, optamos por usar o terceiro método, pois é gerado um campo transmembrânico não-uniforme realístico sem a necessidade de aumentar o número de átomos do sistema.⁸³ Primeiramente, um *ensemble* NPT é simulado, para permitir a correta equilibração do sistema (água + lipídeo + proteína). Em seguida, o

tamanho da caixa de simulação é estendido no eixo z, criando interfaces água/vácuo nas extremidades, e a simulação prossegue em um *ensemble* NVT (Figura 9). Esta última etapa permite desbalancear a quantidade de íons entre os dois banhos de eletrólitos, criando uma diferença de potencial ao longo da membrana. Para calcular esta diferença de potencial transmembrânico, basta subtrair os valores do potencial elétrico dos dois banhos ao redor da membrana. Esta operação é facilmente realizada a partir do perfil de potencial eletrostático ao longo do eixo normal à membrana, no qual observa-se dois platôs correspondentes aos dois banhos de eletrólitos do sistema.

A última configuração obtida a partir da simulação de equilibração de cada sistema estudado foi sujeita a simulações independentes com e sem voltagem (0 mV e -600 ± 150 mV). Ambas as simulações consistiram em uma etapa curta de 200 ps e uma etapa longa de 2 ns, amostradas a cada 10 ps (Figura 5, itens IV e V). A etapa curta era necessária para verificar se a diferença de potencial aplicada estava correta, antes de prosseguir com a etapa longa. As configurações do sistema amostradas durante a simulação de 2 ns foram utilizadas para gerar os mapas de potencial eletrostático. A diferença de potencial transmembrânico de -600 mV foi obtida com o protocolo de desbalanço iônico (Figura 5, item III), enquanto que um potencial transmembrânico de 0 mV é gerado pelo simples equilíbrio entre os banhos de eletrólitos em uma simulação NPT.

3.3. PERFIL DE HIDRATAÇÃO

As propriedades elétricas que regem o funcionamento dos domínios sensíveis a voltagem são uma consequência direta da sua topologia de hidratação. A estrutura destes domínios cria um poro em formato de ampulheta, permitindo que moléculas de água dos meios intra e extracelular se aproximem sem que ocorra comunicação entre estes banhos. A consequência direta desta aproximação é a focalização do campo elétrico, ou seja, a maior parte da variação do potencial eletrostático ocorre em uma pequena região, em contraste com a transição quase uniforme observada em uma membrana. Esta focalização explica a grande sensibilidade destes domínios a variações no potencial transmembrânico.^{46,47,60,63-65} Diante destes fatos, é de grande interesse não só conhecer o comportamento do campo elétrico, mas também do perfil de hidratação nos domínios sensíveis a voltagem.

O perfil de hidratação é a medida da densidade de moléculas de água (número de moléculas normalizado pelo volume) ao longo de um eixo. Assim como na distância elétrica (tópico 3.2.1), o perfil de densidade de água foi amostrado ao longo do eixo z para moléculas de água dentro de um cilindro de raio 8 Å centrado no *gating pore*. O eixo z foi dividido em intervalos de 1 Å e contou-se quantas moléculas de água haviam em cada intervalo. As contagens foram então normalizadas pelo volume de cada intervalo (201,06 Å³), para obter a densidade de moléculas de água em uma dada altura. Além dos perfis de hidratação, também foi quantificado a quantidade de moléculas de água presentes na região entre -15 Å e 15 Å.

3.4. DIVERGÊNCIA ESTRUTURAL E DE SEQUÊNCIA

É esperado que proteínas com alta similaridade de estrutura e sequência apresentem propriedades e mecanismos de funcionamento similares. Portanto, é importante que os canais estudados não sejam muito similares, caso contrário não poderíamos inferir sobre a robustez das suas propriedades elétricas e de hidratação. Para quantificar a semelhança entre os canais, utilizou-se uma medida de divergência estrutural e uma medida de divergência de sequência (Figura 5, item X).

A divergência de sequência (DS) é expressa por:

$$DS = \sum_i^n (h_i - H_i) \quad [16]$$

onde h_i e H_i são os valores normalizados de hidrofobicidade, segundo a escala de Kyte-Doolittle, para cada resíduo i dos canais estudados e do Kv1.2 (referência), respectivamente. O somatório percorreu os resíduos presentes no alinhamento estrutural do *gating pore* de todos os canais (Figura 10).

	S1	S2
Kv1.2	RIIAIVSVMVILISIVSFCLET...	FIVETLCCIWFSEFLVRFA...
Mut-1	RIIAIVSVMVILISIVSFCLET...	FIVETLCCIWFSEFLVRFA...
Mut-2	RIIAIVSVMVILISIVSFCLET...	FIVETLCCIWASFEFLVRFA...
Mut-3	RIIAIVSVMVFLISIVSFCLET...	FIVETLCCIWFSEFLVRFA...
Mut-4	RIIAIVSVMVILISIVSFCLET...	FIVETLCTIWFSEFLVRFA...
Mut-5	RIIAIVSVMAAALISIVSFCLET...	FIVETLAAAWFSEFLVRFA...
KvAp	PLVELGVSYAALLSVIVVVEY...	YLVDLILVIILWADYAYRAY...
NavAb	SFFTKFIIYLIVLNGITMGLET...	TLFNQIVITIFTIEIILRIY...
NavRh	RIFQFTVVSIIILNAVLI GATT...	HLLDYGITIFFVIEILIRFI...

	S3	S4
Kv1.2	IMNIIDIVAIIPYF...	RVIRLVRVFRIFKLSR...
Mut-1	IMNIIDIVAIIPYF...	RVIRLVRVFRIFKLSR...
Mut-2	IMNIIDIVAIIPYF...	RVIRLVRVFRIFKLSR...
Mut-3	IMNIIDIVAIIPYF...	RVIRLVRVFRIFKLSR...
Mut-4	IMNIIDIVAIIPYF...	RTIRLVRVFRIFKLSR...
Mut-5	IMNIIDIVAAIPYF...	RVIRLVRVFRIFKLSR...
KvAp	KKTLYEIPALVPAG...	RLVRLLRFLRILLIIS...
NavAb	PWSLFDFVVAISL...	RVLRLVRLFRRLVTAVP...
NavRh	GNIFDTVIVAISL...	RLLRIFRVLRLISVIP...

Figura 10. Alinhamento estrutural dos resíduos das hélices S1 – S4. No cálculo de divergência de sequência, foram considerados apenas os resíduos voltados para o *gating pore* (vermelho) dos domínios sensíveis a voltagem. As argininas da hélice S4 estão destacadas em azul e os resíduos substituídos dos sistemas Mut-1 – Mut-5 estão sublinhados.

A divergência estrutural (DE) foi quantificada a partir das diferenças nas pontes salinas formadas entre os resíduos básicos da hélice S4 e os aminoácidos carregados ácidos das hélices vizinhas, mais os grupos polares dos lipídeos (Figura 3). Na tabela 1, há a lista completa dos resíduos ácidos e básicos considerados em cada canal. O conjunto de pontes salinas de um canal c em uma dada conformação λ foi descrita por meio de uma matriz de contatos $M_{\lambda}^c = [r_{ij}]_{m \times n}$, na qual cada elemento r_{ij} corresponde à distância média (nas quatro subunidades) entre um resíduo negativo i e um resíduo positivo j . O grupo fosfato da região polar dos lipídios também foi incluído no conjunto de contatos negativos. A diferença entre duas matrizes de contato é dada pelo RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) entre elas:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad [17]$$

onde δ_i é a diferença entre elementos correspondentes de duas matrizes com um total de N elementos. Por fim, o cálculo do DE entre um canal c e o Kv1.2 (referência) foi realizado segundo a equação:

$$DE = \frac{RMSD(M_{ativado}^c, M_{ativado}^{Kv1.2}) + RMSD(M_{desativado}^c, M_{desativado}^{Kv1.2})}{2} \quad [18]$$

Ambas as medidas foram combinadas em um único gráfico, com as abcissas representando a divergência estrutural, e o eixo das ordenadas correspondendo à divergência de sequência.

Tabela 1. Resíduos positivamente carregados (básicos) da hélice S4 e resíduos negativamente carregados (ácidos) das hélices S1 - S3 que participam das pontes salinas no interior dos domínios sensíveis a voltagem.

Canal	Resíduos ácidos	Resíduos básicos
Kv1.2	E183 / E226 / E236 / D259	R294 / R297 / R300 / R303
KvAp	E45 / D62 / D72 / E93	R117 / R120 / R123 / R126
NavAb	E32 / N49 / E59 / D80	R99 / R102 / R105 / R108
NavRh	N25 / D48 / E58 / D81	R102 / R105 / R108 / R111

3.5. RMSD NO TEMPO

Para avaliar a estabilidade estrutural das proteínas, foram calculados o RMSD no tempo para os átomos pesados (exclui o hidrogênio) dos domínios sensíveis a voltagem e para as matrizes de distâncias das pontes salinas (Figura 5, item II). Após o *annealing* das simulações de equilíbrio (ver tópico 3.6.1), foi calculado o RMSD (Equação 17) entre a estrutura obtida em cada *frame* (com um intervalo de 40 ps) e a estrutura inicial de cada simulação. Foram ajustadas curvas nos dados gerados para facilitar a visualização da tendência dos valores de RMSD ao fim de cada simulação.

3.6. PROTOCOLO DAS SIMULAÇÕES

Todas as simulações foram conduzidas com o auxílio do programa NAMD

(versão 2.8).⁸⁴ Foi empregada dinâmica molecular com formalismo similar à dinâmica de Langevin (método Nosé-Hoover) para manter a temperatura e a pressão (quando necessário) constantes em 300 K e 1 atm. Utilizou-se integração em diferentes passos, com as interações eletrostáticas de longo alcance sendo computadas a cada dois passos, e todas as outras interações calculadas a cada passo. As interações eletrostáticas de longo alcance foram computadas com o método PME, e a integração do movimento foi resolvida para um passo de integração de 2 fs com o algoritmo Verlet. As ligações covalentes com átomos de hidrogênio foram consideradas rígidas. O campo de força utilizado para descrever as interações entre os átomos foi o CHARMM27⁶⁸⁻⁷⁰, sendo a água descrita pelo modelo TIP3.⁸⁵ Foi utilizada uma membrana previamente equilibrada composta por uma modificação do POPC (1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina), em que os átomos de hidrogênio das cadeias alifáticas foram fundidos aos carbonos da cadeia alifática visando reduzir o número total de átomos do sistema.

3.6.1. ENSEMBLE NPT

Nas simulações de equilíbrio e a 0 mV (Figura 5, itens I e IV), condições periódicas de contorno foram aplicadas em todas as dimensões do sistema e a pressão foi mantida constante em 1 atm.

Nas simulações iniciais de equilíbrio, seguiu-se um protocolo de *annealing* para as proteínas, ou seja, foram aplicados potenciais harmônicos de 1 kcal/mol contrários ao movimento dos átomos das proteínas para que o banho de eletrólitos e a membrana se equilibrassem em torno do canal. Em seguida, os potenciais harmônicos foram removidos sucessivamente da porção n-terminal até a porção c-terminal do canal, deixando o filtro de seletividade para o fim. Entre cada etapa de remoção do potencial harmônico, o sistema foi simulado por 200 ps.

3.6.2. EMSEMBLES NVT COM APLICAÇÃO DE VOLTAGEM

Nas simulações com voltagem (Figura 5, item V), foi empregado o método em que uma interface água/vácuo é criada nas extremidades dos banhos de eletrólitos, seguido de um desbalanço na quantidade de íons entre estes banhos. Este sistema foi simulado em um ensemble NVT, no qual o pistão de controle da pressão foi desligado. As outras configurações foram iguais às das simulações NPT. É

importante ressaltar que a coluna de água acima e abaixo dos canais era grande o suficiente para que efeitos de borda ocasionados pela interface água/vácuo não interferissem nas proteínas.

3.7. SISTEMAS ESTUDADOS

Os sistemas simulados neste estudo compreendem diversos canais iônicos dependentes de voltagem, nas conformações ativada e desativada, inseridos em membranas fosfolipídicas e hidratados explicitamente com uma solução iônica de 150 mM ajustada para manter o sistema neutro.

3.7.1. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS E MODELOS DESATIVADOS

O conjunto de canais englobam estruturas cristalográficas e modelos gerados computacionalmente (tabela 2). Com exceção do KvAp, as estruturas utilizadas são provenientes de longas simulações de equilíbrio realizadas em estudos anteriores, das quais foi reaproveitado o sistema completo (membrana e água) para evitar grandes perturbações no sistema. No caso do NavRh, apenas a sua conformação ativada foi considerada, visto que ainda não foi publicado nenhum modelo do seu estado desativado.

3.7.2. MUTAÇÕES

Há ainda cinco sistemas (Mut-1 – Mut-5) que consistem em mutações realizadas em cópias dos sistemas de ambas as conformações do canal Kv1.2 (tabela 3). As mutações foram inseridas pelo programa PSFGEN distribuído junto do NAMD.

3.7.3. LIPÍDEOS MODIFICADOS

As conformações ativada e desativada do Kv1.2 foram inseridas em dois tipos de membrana: uma composta por esfingomiéline (SPGM) e outra composta por ceramida (POCR) na camada extracelular. Ambas as membranas apresentavam apenas fosfatidilcolina (POPC) na camada intracelular. A estrutura química da região polar destes lipídeos está representada na figura 11.

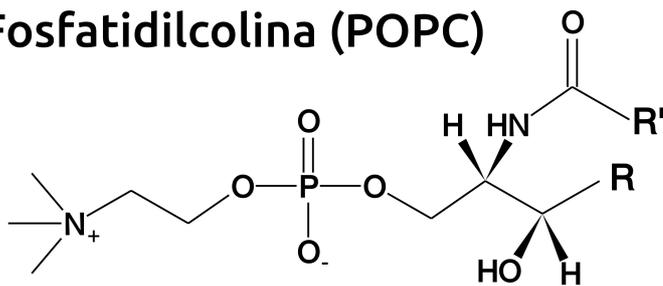
Tabela 2. Condições de simulação de cada sistema e estudos dos quais as estruturas utilizadas foram retiradas. Não há entradas no Protein Data Bank para os modelos dos estados desativados desses canais. Todos os sistemas foram hidratados explicitamente por uma solução contendo 150 mM de íons distribuídos de forma a neutralizar a carga líquida do sistema.

Sistema	Estado	Lipídeos	Íons Cl ⁻	Íons K ⁺	Íons Na ⁺	Águas	Dimensões do sistema [Å]	Tempo simulado	Código PDB	Referência
Kv1.2	Ativado	372	131	155	0	46502	127 x 119 x 131	28 ns	2A79	Delemotte <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁰
	Desativado	426	149	177	0	52644	126 x 132 x 136	11 ns	-	Delemotte <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁰
KvAp	Ativado	190	31	29	0	10298	84 x 74 x 90	24 ns	1ORQ 1ORS	Jiang <i>et al.</i> , 2003 ⁶⁷
	Desativado	195	31	29	0	10274	80 x 77 x 91	20 ns	-	Schow <i>et al.</i> , 2010 ⁸⁶
NavAb	Ativado	434	121	0	117	53076	127 x 132 x 134	19 ns	4EKW	Amaral <i>et al.</i> , 2012 ⁸⁷
	Desativado	434	120	0	116	53438	122 x 135 x 137	19 ns	-	Amaral <i>et al.</i> , 2012 ⁸⁷
NavRh	Ativado	434	145	0	154	51495	130 x 128 x 131	20 ns	4DXW	Amaral <i>et al.</i> , 2012 ⁸⁷

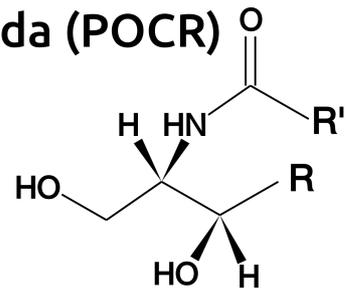
Tabela 3. Modificações realizadas em ambas as conformações do Kv1.2 e condições de simulação. Todos os sistemas foram hidratados explicitamente por uma solução contendo 150 mM de íons distribuídos de forma a neutralizar a carga líquida do sistema.

Sistema	Modificações	Estado	Lipídeos	Íons Cl ⁻	Íons K ⁺	Águas	Tempo simulado	Referência da modificação
Mut-1	Cadeia lateral da R294 neutralizada	Ativado	372	261	289	46238	13 ns	Delemotte <i>et al.</i> , 2010 ⁸⁸
		Desativado	426	297	329	52344	14 ns	
Mut-2	F233A	Ativado	372	131	155	46502	14 ns	Lacroix & Bezanilla, 2011 ³⁸
		Desativado	426	301	325	52344	18 ns	
Mut-3	I173F	Ativado	372	131	155	46502	13 ns	Lacroix & Bezanilla, 2012 ⁸⁹
		Desativado	426	301	325	52344	13 ns	
Mut-4	I230T / V295T	Ativado	372	131	155	46502	16 ns	Lacroix <i>et al.</i> , 2013 ⁹⁰
		Desativado	426	301	325	52344	18 ns	
Mut-5	V172A / I173A / C229A I230A / I231A / I263A	Ativado	372	131	155	46502	13 ns	Schwaiger <i>et al.</i> , 2013 ⁹¹
		Desativado	426	301	325	52344	12 ns	
SPGM	Membrana composta por SPGM e POPC	Ativado	536	113	137	39887	11 ns	-
		Desativado	543	106	130	37724	12 ns	
POCR	Membrana composta por POCR e POPC	Ativado	589	102	126	36272	14 ns	-
		Desativado	596	102	126	36002	16 ns	

Fosfatidilcolina (POPC)



Ceramida (POCR)



Esfingomielina (SPGM)

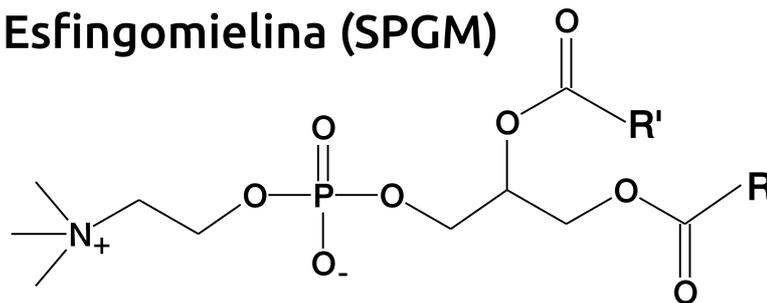


Figura 11. Estrutura química dos lipídeos de membrana utilizados nos sistemas SPGM e POCR. R e R' correspondem às cadeias alifáticas que caracterizam cada tipo de fosfolipídeo. Note que a ceramida (POCR) é o único lipídeo que não apresenta grupos carregados eletricamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Ao investigar as propriedades de uma proteína, é crucial partir de estruturas equilibradas que correspondam a conformações estáveis. Dessa forma, garante-se a existência de propriedades médias, que podem ser medidas via simulações de dinâmica molecular. As conformações ativada e desativada tanto das estruturas previamente equilibrados (Kv1.2, NavAb e NavRh) quanto dos sistemas que precisaram ser construídos desde o início (KvAp), ou que sofreram perturbações (Mut-1 – Mut-5), foram simuladas em uma membrana fosfolipídica, hidratadas explicitamente por moléculas de água (ver tópico 3.7). Estas simulações estenderam-se por 12–30 ns (Figura 5, item I), sendo interrompidas quando as proteínas mostravam-se estruturalmente estáveis. Mais especificamente, computou-se o RMSD da posição relativa dos átomos pesados da proteína e das matrizes de distância que mapeiam as pontes salinas ao longo das simulações, usando a construção inicial de cada sistema como referência (ver tópico 3.5).

Nas simulações do Kv1.2 (Figura 12), o RMSD dos átomos pesados estabilizou-se em torno de 2 Å na conformação ativada e abaixo de 2 Å na conformação desativada. Apesar da grande variabilidade entre subunidades evidenciada pelos erros obtidos, o RMSD das matrizes de distância apresentou platôs com valores inferiores a 2 Å na conformação ativada e em torno de 1 Å na conformação desativada. No sistema Mut-1 (Figura 12), os valores de RMSD atômico e RMSD das matrizes de distância ficaram próximos nas duas conformações, mantendo-se abaixo de 1,5 Å. Contrastante com os outros sistemas, o RMSD para as matrizes de distância e para os átomos pesados da conformação desativada deste sistema ficaram próximos e apresentaram erros de até ± 1 Å. Nos

outros sistemas mutantes (Figuras 13 e 14), observa-se um comportamento similar entre as duas conformações, com o RMSD dos átomos pesados variando entre 1 – 1,5 Å, e das matrizes de distância próximo a 1 Å. O sistema Mut-3 mostrou pouca variabilidade entre subunidades tanto para os átomos pesados quanto para as pontes salinas.

No KvAp (Figura 15), a conformação ativada levou mais tempo para estabilizar, alcançando valores próximos de 2,5 Å e 2 Å para o RMSD dos átomos pesados e das matrizes de distância, respectivamente. Em contraste, o estado desativado do KvAp estabilizou-se rapidamente, com a variação dos átomos pesados abaixo de 2 Å. Curiosamente, neste sistema houve uma divergência menor que 1 Å entre as matrizes de distância durante toda a simulação. Como o sistema do KvAp era composto por apenas um único domínio, não foi computado o desvio entre diferentes subunidades, implicando na ausência de erros nas medidas. No caso do NavAb (Figura 15), as curvas de ambas as conformações apresentaram comportamentos semelhantes às do Kv1.2, com o RMSD dos átomos pesados abaixo de 2 Å, e das matrizes de distância em torno de 1 Å. Também houve uma grande variabilidade com respeito às matrizes de distância. A simulação do NavRh (Figura 16) apresentou um padrão similar às simulações do NavAb, no entanto, a variabilidade entre as suas subunidades foi menor.

Nos sistemas SPGM e POGR (Figuras 16 e 17), os valores de RMSD dos átomos pesados estabilizaram-se próximos a 2 Å. Com relação às matrizes de distância, houve uma variação inferior a 1,5 Å. Curiosamente, houve uma grande variabilidade para o RMSD das matrizes de distâncias do POGR no estado desativado. Apesar disso, o RMSD estabilizou-se e manteve-se abaixo de 3 Å.

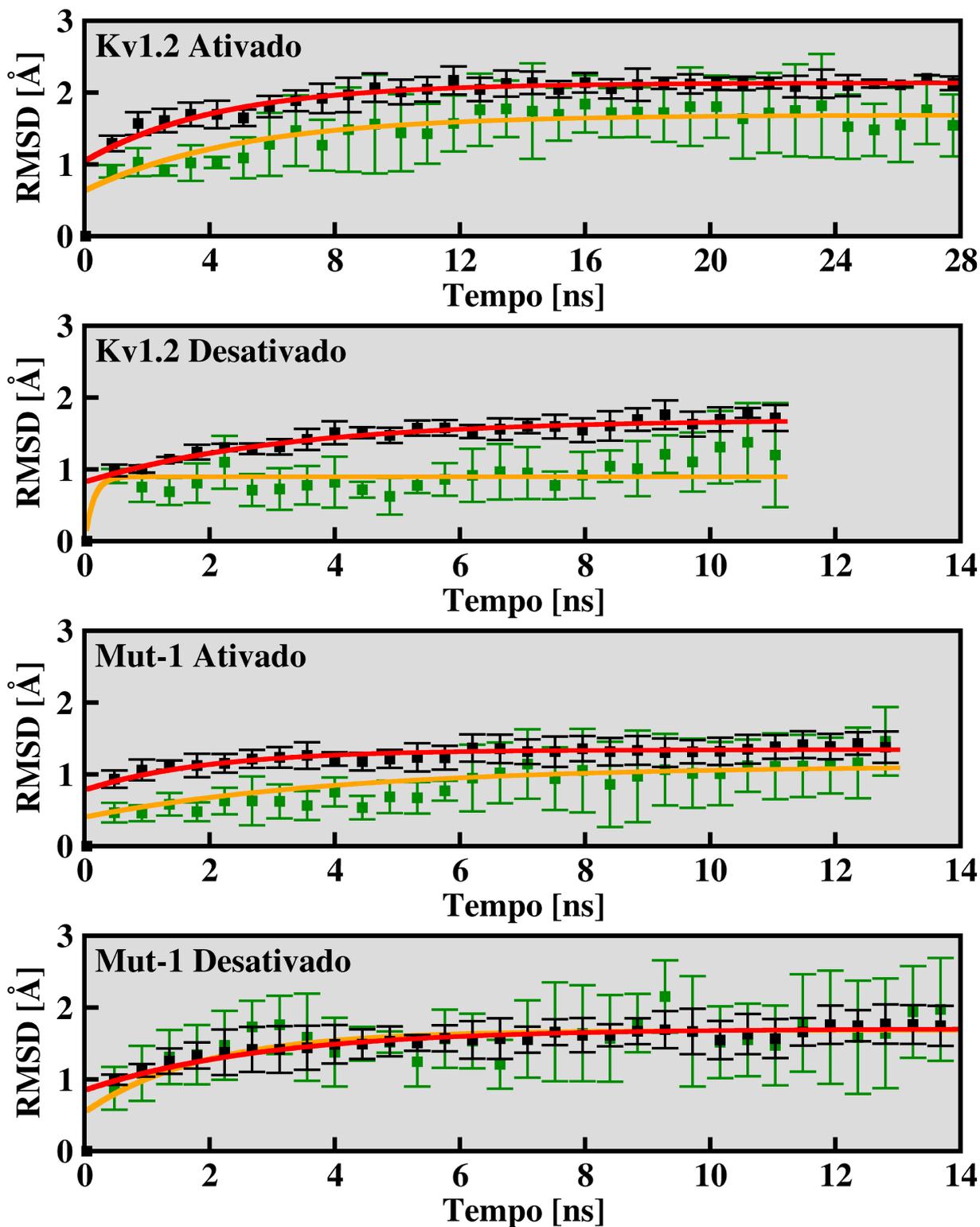


Figura 12. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Kv1.2 e Mut-1. Os pontos pretos correspondem ao RMSD dos átomos pesados do domínio sensível a voltagem, e os pontos verdes são o RMSD das matrizes de contato. O valor dos pontos é a média do RMSD obtido para cada subunidade do canal, e as barras de erro representam o desvio padrão entre subunidades. As curvas vermelha e amarela foram ajustadas sobre o RMSD dos átomos pesados e das matrizes de contato respectivamente, para facilitar a visualização das tendências.

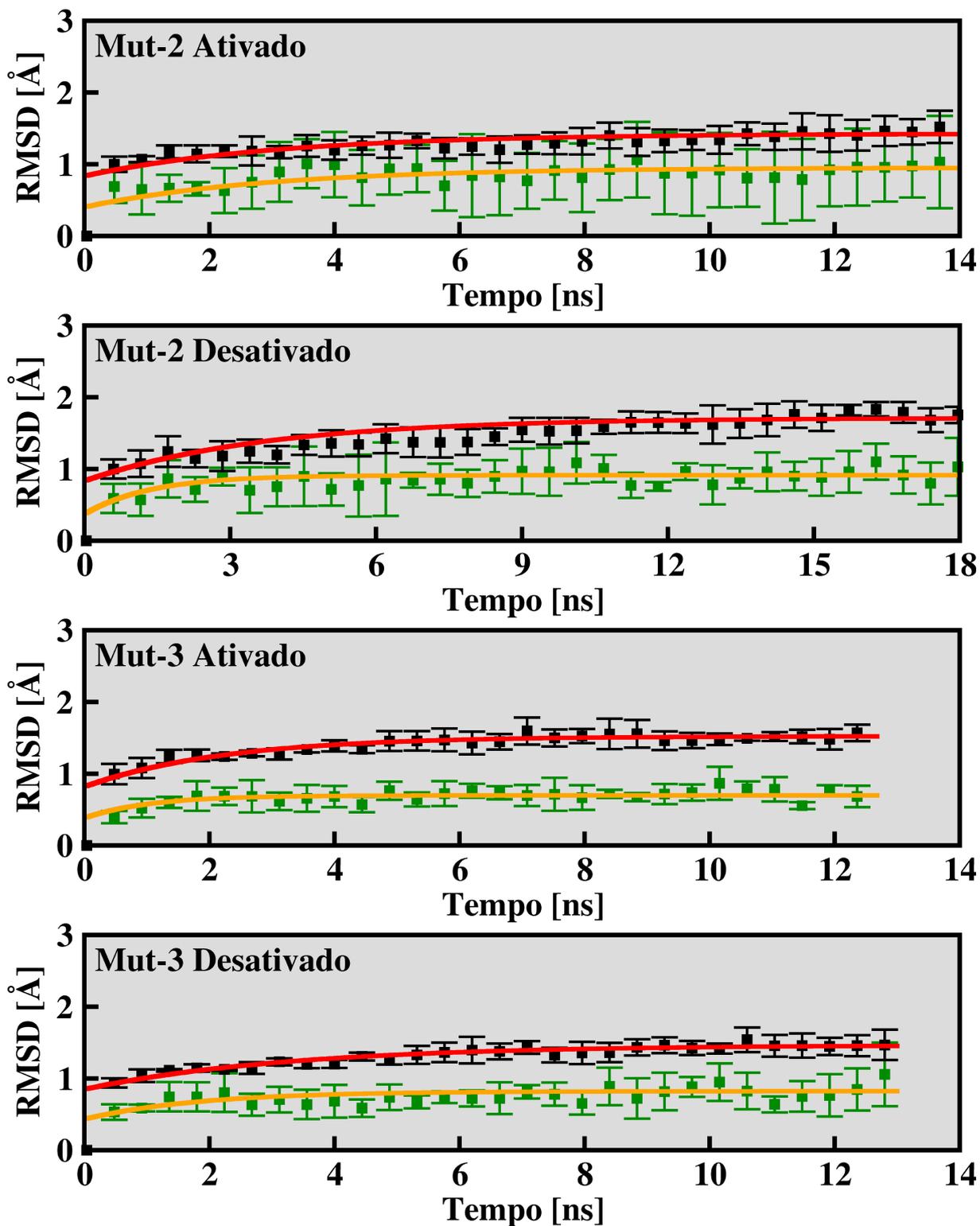


Figura 13. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Mut-2 e Mut-3. Idem à figura 11.

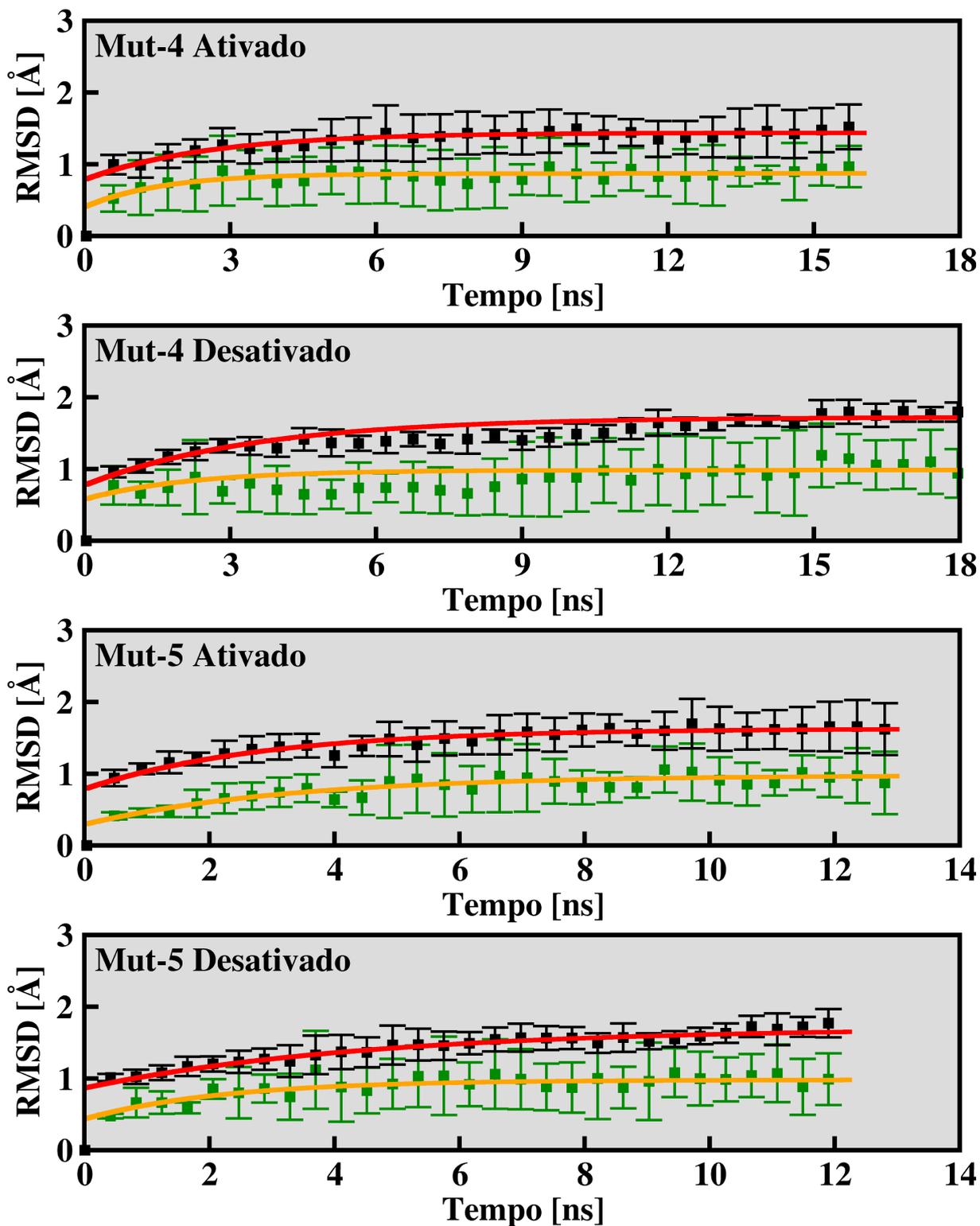


Figura 14. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais Mut-4 e Mut-5. Idem à figura 11.

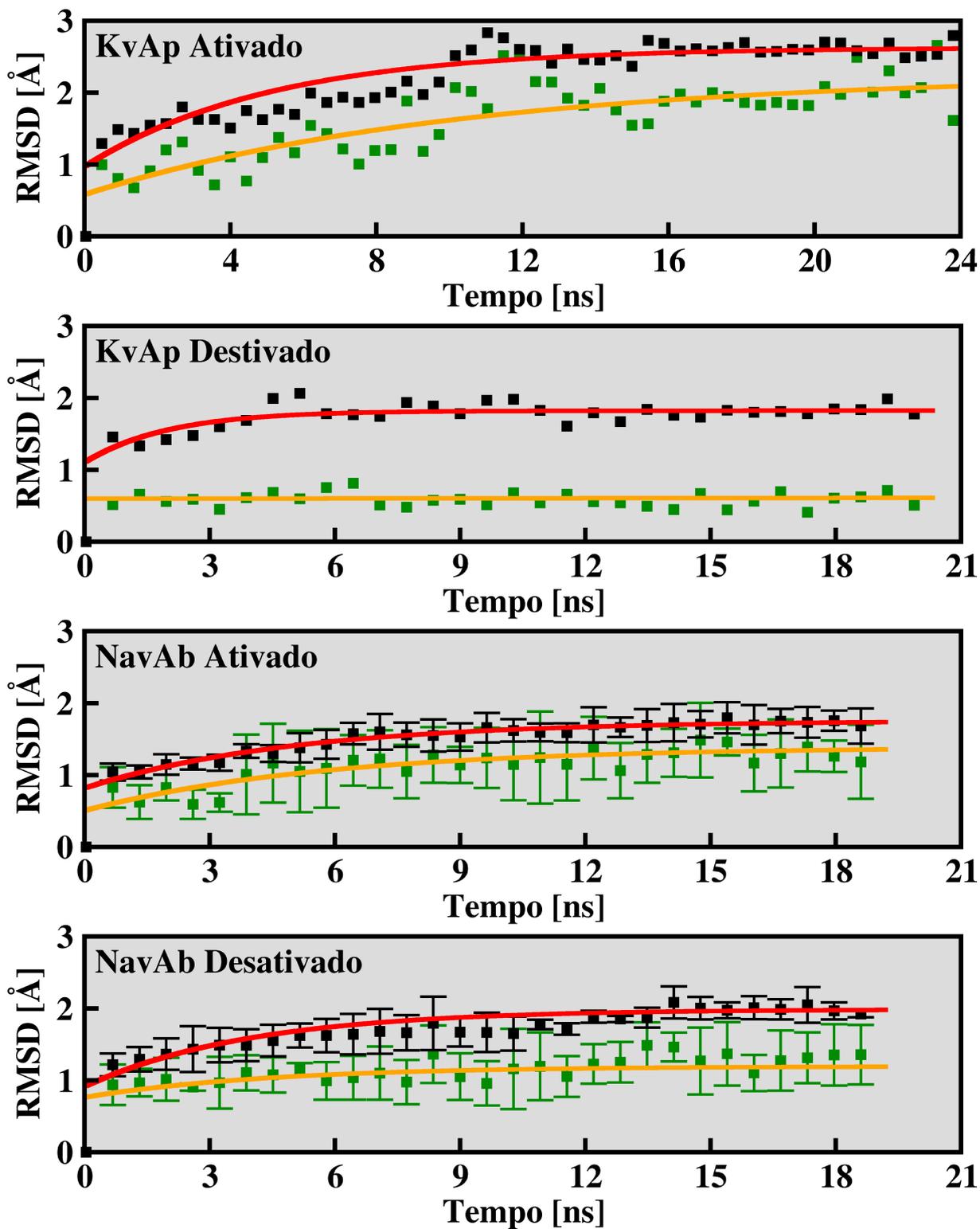


Figura 15. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais KvAp e NavAb. Idem à figura 11.

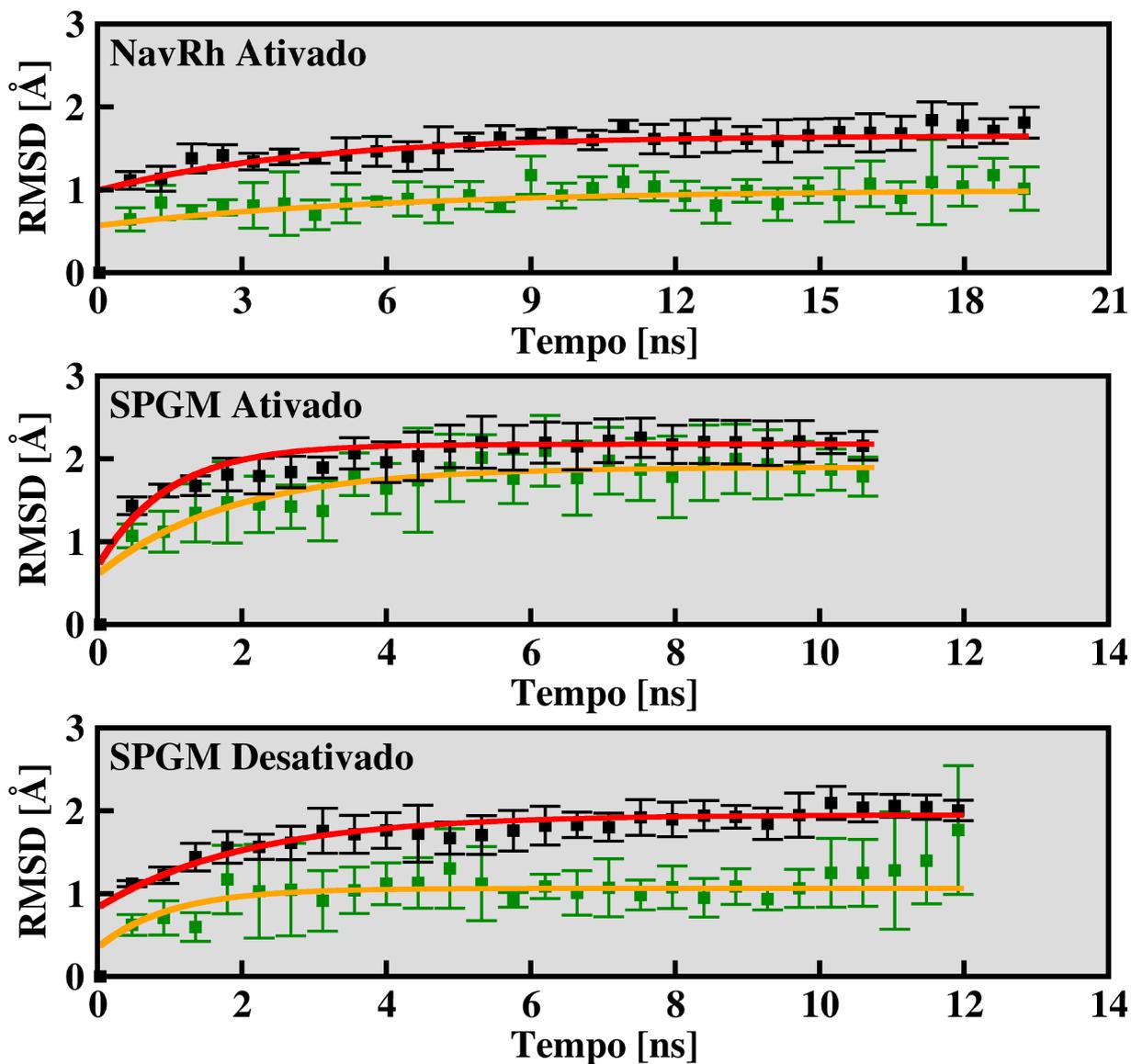


Figura 16. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações dos canais NavRh e SPGM. Idem à figura 11.

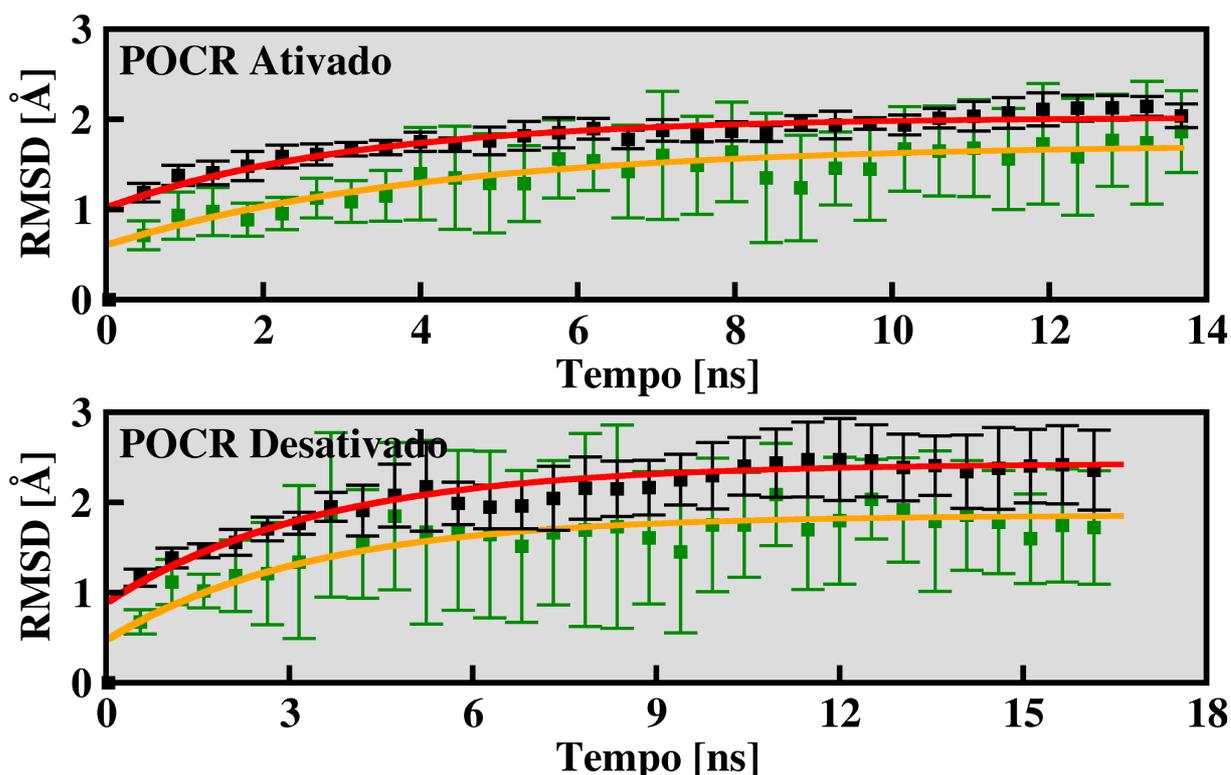


Figura 17. Variação de RMSD ao longo das simulações de equilíbrio para ambas as conformações do sistema POCR. Idem à figura 11.

O RMSD dos átomos pesados manteve-se entre 1 Å e 3 Å em todos os sistemas. Conforme observado em simulações de canais iônicos conduzidas em outros estudos, valores menores que 3,5 Å correspondem a flutuações térmicas típicas deste tipo de construção.^{40,47,92,93} Como o RMSD dos sistemas estabilizou-se em uma faixa inferior a este valor, oscilando com uma amplitude de até 1 Å por no mínimo 6 ns, conclui-se que as estruturas simuladas são conformacionalmente estáveis, ou seja, não ocorrerão mudanças conformacionais caso essas simulações sejam estendidas. Assim como ocorreu com o RMSD dos átomos pesados, as variações observadas para as matrizes de distância mantiveram-se próximas do limite inferior para flutuações térmicas. Isto indica que as pontes salinas características das conformações dos canais não foram alteradas, portanto as proteínas mantiveram-se também na mesma conformação ao longo das simulações. Diferentemente dos outros canais, a conformação desativada do sistema Mut-1 apresentou uma grande variabilidade para as matrizes de distância. Nesta conformação, a primeira arginina da hélice S4 (Arg294, R1) encontra-se no interior do *gating pore*. Como a sua carga foi neutralizada, este resíduo deixa de participar de pontes salinas que o estabilizariam nesta região. Conseqüentemente, há um

alargamento do *gating pore* e um aumento na movimentação do R1, culminando em alterações nas matrizes de distância.⁸⁸ A falta de vínculos estruturais para este resíduo também faz com que ele assuma posições independentes nas diferentes subunidades do canal, o que explica os altos valores de erro.

Visto que as construções iniciais dos sistemas vieram de exaustivas simulações de estruturas cristalográficas e de seus modelos desativados, era esperado que os sistemas estudados se equilibrassem rapidamente, mostrando uma estabilidade estrutural similar à dos modelos originais. Exceto para o sistema Mut-1, o mesmo se aplica às mutações do Kv1.2, pois foi mostrado que o seu principal efeito se dá nas interações que regem o processo de ativação/desativação do domínio sensível a voltagem, não necessariamente afetando a estrutura do canal. No sistema Mut-1, a primeira arginina (R1) foi neutralizada, causando uma quebra de pontes salinas quando a proteína está desativada. A ausência destas pontes diminui o empacotamento do domínio e gera poros hidratados permeáveis a íons. Este efeito estrutural foi observado no RMSD e no RMSF (a seguir) deste sistema.⁸⁸ A mutação F233A aplicada no Mut-2 aumenta a barreira energética apenas da passagem da arginina R4 durante a ativação ou a desativação.³⁸ Especula-se que este efeito se dá por alterações no campo elétrico local (ver tópico 4.3). No caso do Mut-3, a substituição I173F acelera a cinética de ativação e desativação, provavelmente por uma interação direta com as argininas da hélice S4.⁸⁹ No sistema Mut-4, a mutação dupla I230/V295T também acelera a cinética do canal, mas os autores acreditam que este efeito seja devido a alterações na região da constrição hidrofóbica do domínio (ver tópico 4.3).⁹⁰ Por fim, no sistema Mut-5, todos os resíduos que interagem com a F233 foram substituídos por Alanina, que é menos hidrofóbica. Estes resíduos formam um cinturão que participa da formação da constrição hidrofóbica e estabilizam a F233.⁹¹

Visando confirmar a hipótese de que as mutações no Kv1.2 causaram baixas perturbações estruturais, prosseguiu-se com o cálculo do RMSF (do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) de cada resíduo do domínio sensível a voltagem. A partir de medidas de RMSF, pode-se inferir se houveram ou não modificações estruturais na proteína, visto que o RMSF expressa o grau de movimentação de cada resíduo. Em ambas as conformações dos sistemas mutantes (Figuras 18, 19 e 20), o RMSF

das hélices transmembrânicas (S1 – S4) manteve-se na mesma faixa de variação dos resíduos correspondentes no Kv1.2 selvagem. Este comportamento inclui as regiões próximas às mutações (Figuras 18, 19 e 20, setas). Houve pouca variação também entre as hélices transmembrânicas de diferentes conformações. As regiões nas quais o RMSF do sistema mutante e do sistema selvagem mais se distanciaram correspondem às alças que conectam as hélices transmembrânicas. Apenas na conformação desativada do sistema Mut-1 ficou aparente uma grande divergência entre o RMSF do resíduo mutante e do resíduo selvagem.

O cálculo de RMSF deixou claro o aumento na movimentação do resíduo R1 do sistema Mut-1 na conformação desativada (Figura 18). Isto evidencia o importante papel dos resíduos ácidos na estabilização das argininas da hélice S4 nas proximidades do centro catalítico dos domínios sensíveis a voltagem.⁸⁸

Geometrias nas quais várias hélices transmembrânicas estão intimamente em contato tendem a ser mais estáticas que segmentos envoltos apenas por água. Isto se deve principalmente ao alto grau de estruturação de membranas fosfolipídicas associado aos efeitos hidrofóbicos que agem no dobramento de proteínas. Nos domínios estudados, este contraste fica evidente ao se comparar os valores de RMSF das hélices transmembrânicas dos canais (S1 – S4) com os segmentos pouco estruturados que as unem. Enquanto as hélices transmembrânicas estão em contato íntimo com os lipídios da membrana, estes últimos não formam estruturas terciárias e estão livres no banho de eletrólitos. Com isso, observa-se flutuações modestas para as hélices transmembrânicas, enquanto que os outros segmentos possuem mais liberdade para explorarem o espaço.

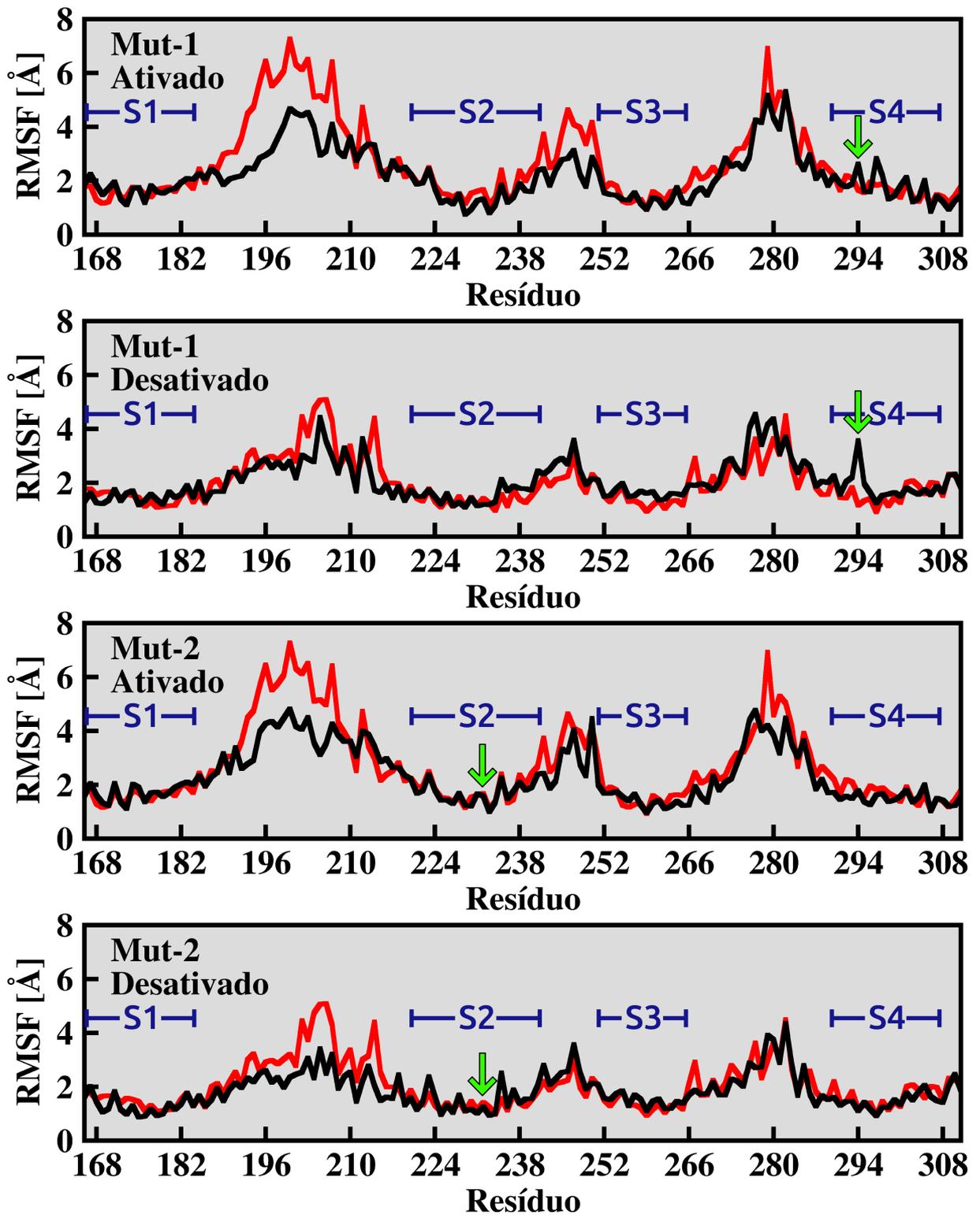


Figura 18. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem dos sistemas Mut-1 e Mut-2 (preto) e do Kv1.2 (vermelho), nas respectivas conformações. As barras azuis marcam o início e o fim das hélices transmembrânicas do domínio. Os locais onde ocorreram as substituições estão apontados pelas setas verdes.

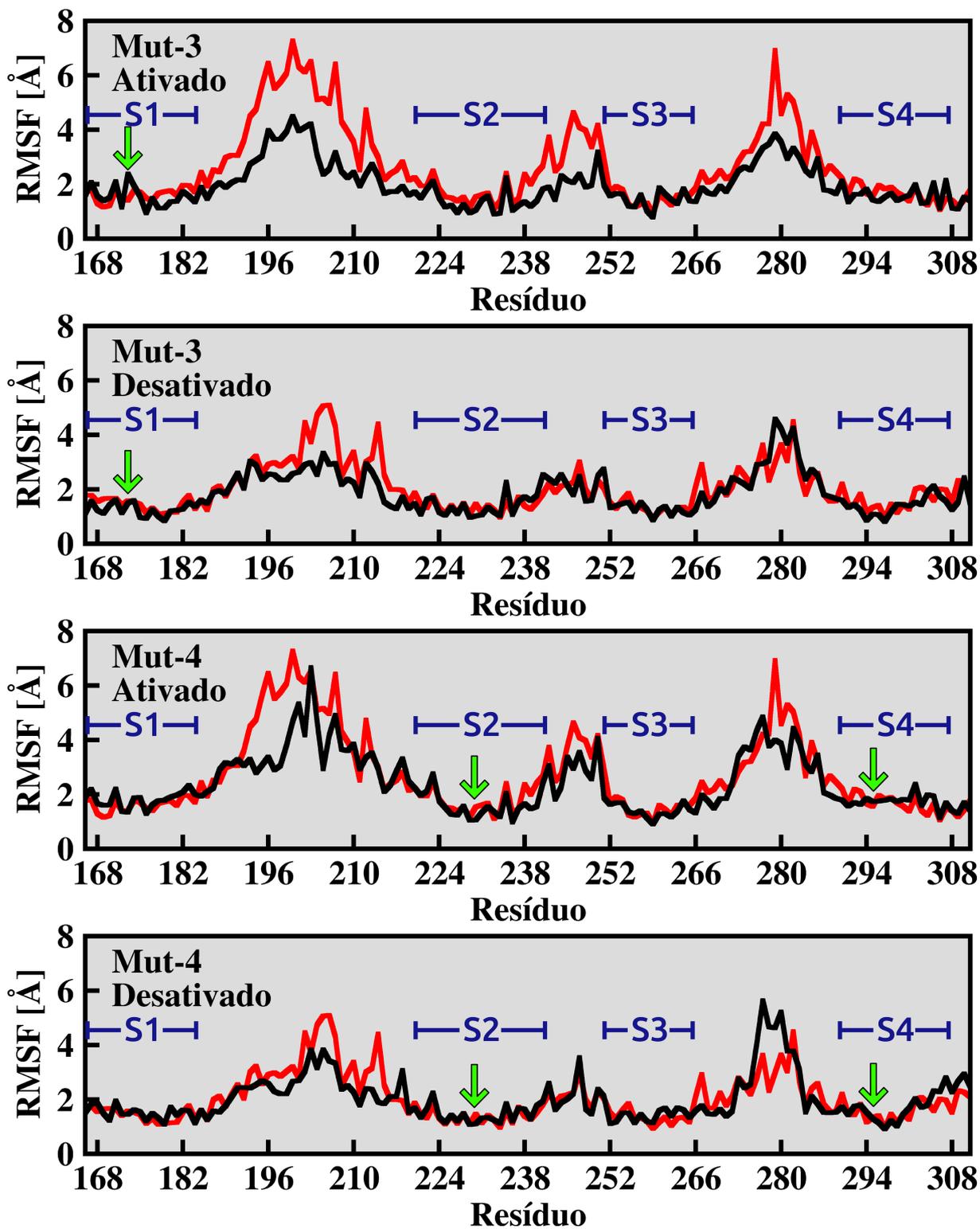


Figura 19. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem dos sistemas Mut-3 e Mut-4. Idem à figura 17.

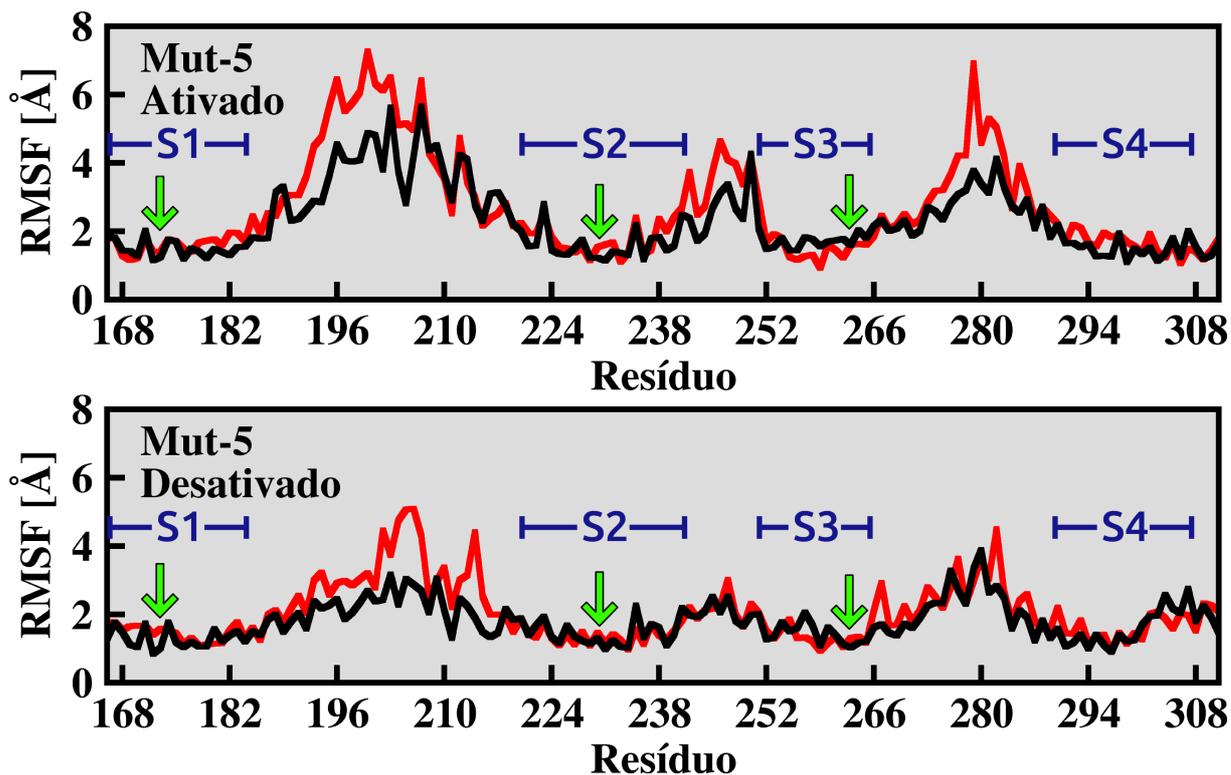


Figura 20. RMSF dos resíduos dos domínios sensíveis a voltagem do sistema Mut-5. Idem à figura 17.

Visto que as análises energéticas deste estudo baseiam-se no excesso de *gating charge* entre canais (ver tópico 4.4), é importante verificar se esses canais encontram-se de fato nas conformações ativada e desativada. Para isso, foram calculadas matrizes que mapeavam as distâncias médias entre os resíduos básicos da hélice S4 (R1 – R4) e os sítios ácidos das hélices vizinhas (B2 – B5) mais os grupos polares dos lipídios (B1 e B6) durante as simulações a 0 mV (ver tópico 3.4). Delemotte e colaboradores mostraram que estes mapas são suficientes para distinguir entre as diferentes conformações dos canais iônicos dependentes de voltagem.^{40,87}

No estado ativado do Kv1.2, os resíduos R1 e R2 estão voltados para a região polar da camada superior da membrana (B1), o R3 está próximo do sítio B1 e o R4 está entre os sítios B2, B3 e B4.^{40,46,47} A matriz de distância calculada para a conformação ativa (Figura 21) do Kv1.2 apresentou um padrão similar ao descrito na literatura, apenas diferindo nas distâncias entre a R3 e o sítio B3 e entre a R4 e o sítio B2. A distribuição de pontes salinas dos sistemas mutantes mostrou-se muito parecida à do Kv1.2. Ao analisar os outros canais, é possível perceber variações nesse padrão. No KvAp, apenas o resíduo R3 apresentou um comportamento

diferente do observado no Kv1.2, estando mais voltado para os lipídios (B1). As matrizes do NavAb e do NavRh são similares entre si e apresentam peculiaridades, como os resíduos R2 e R3 transitando entre os sítios B2 e B3. As distribuições de distâncias dos sistemas SPGM e POOCR mantiveram-se iguais ao padrão do Kv1.2. Como é esperado para conformações ativas, as argininas de todos os sistemas estavam predominantemente acima do sítio B4.

Quando o Kv1.2 encontra-se desativado, o resíduo R1 fica entre os sítios B3 e B4, os resíduos R2 e R3 ficam entre os sítios B4 e B5, e o R4 está voltado para a camada inferior da membrana (B6).⁴⁰ O padrão descrito na literatura foi mantido ao fim da simulação do Kv1.2 (Figura 22). A configuração das matrizes de distância para os sistemas mutantes continuou similar à matriz do canal selvagem. Apenas o resíduo R1 do sistema Mut-1 comportou-se de forma diferente, apresentando uma distribuição mais difusa entre os sítios B3, B4 e B5. A disposição das argininas no KvAp e no NavAb foi dispersa e diferente do observado para o Kv1.2. Na conformação desativada do KvAp, o resíduo R1 esteve entre os sítios B2 e B3, e o resíduo R2 aproximou-se do sítio B3. Já os resíduos R3 e R4 estavam na altura do sítio B4. No caso do NavAb, as argininas estavam em posições mais baixas, com o R1 próximo ao sítio B4, o R2 na altura do sítio B5, e os resíduos R3 e R4 voltados para a região polar da camada inferior da membrana (B6). Não houveram variações significativas para as matrizes de distância dos sistemas SPGM e POOCR em comparação com o Kv1.2. As argininas desses sistemas estavam predominantemente abaixo do sítio B3, condizente com a conformação desativada do Kv1.2.

Excetuando o modelo desativado do KvAp, todos os sistemas enquadraram-se corretamente em um estado ativado ou em um estado desativado. O modelo da conformação desativada do KvAp de fato não corresponde a um estado completamente desativado do Kv1.2, e sim a um estado intermediário no qual as duas primeiras argininas da hélice S4 ainda apontam para a face extracelular. Isto é confirmado também pela transferência de aproximadamente 10 cargas elementares durante a desativação do cristal do KvAp.⁸⁶ Este mesmo processo ocasiona um transferência de 12 cargas elementares no Kv1.2.^{30,31,40,94} Como a desativação do KvAp foi conduzida impondo restrições que reproduziam dados estruturais medidos

experimentalmente, é esperado que o modelo proposto para o KvAp corresponda ao seu estado desativado. Esta hipótese é reforçada por um remodelamento da membrana, induzido pelo canal na conformação desativada, que é capaz de estabilizar a hélice S4 do KvAp nesse estado.⁸⁶

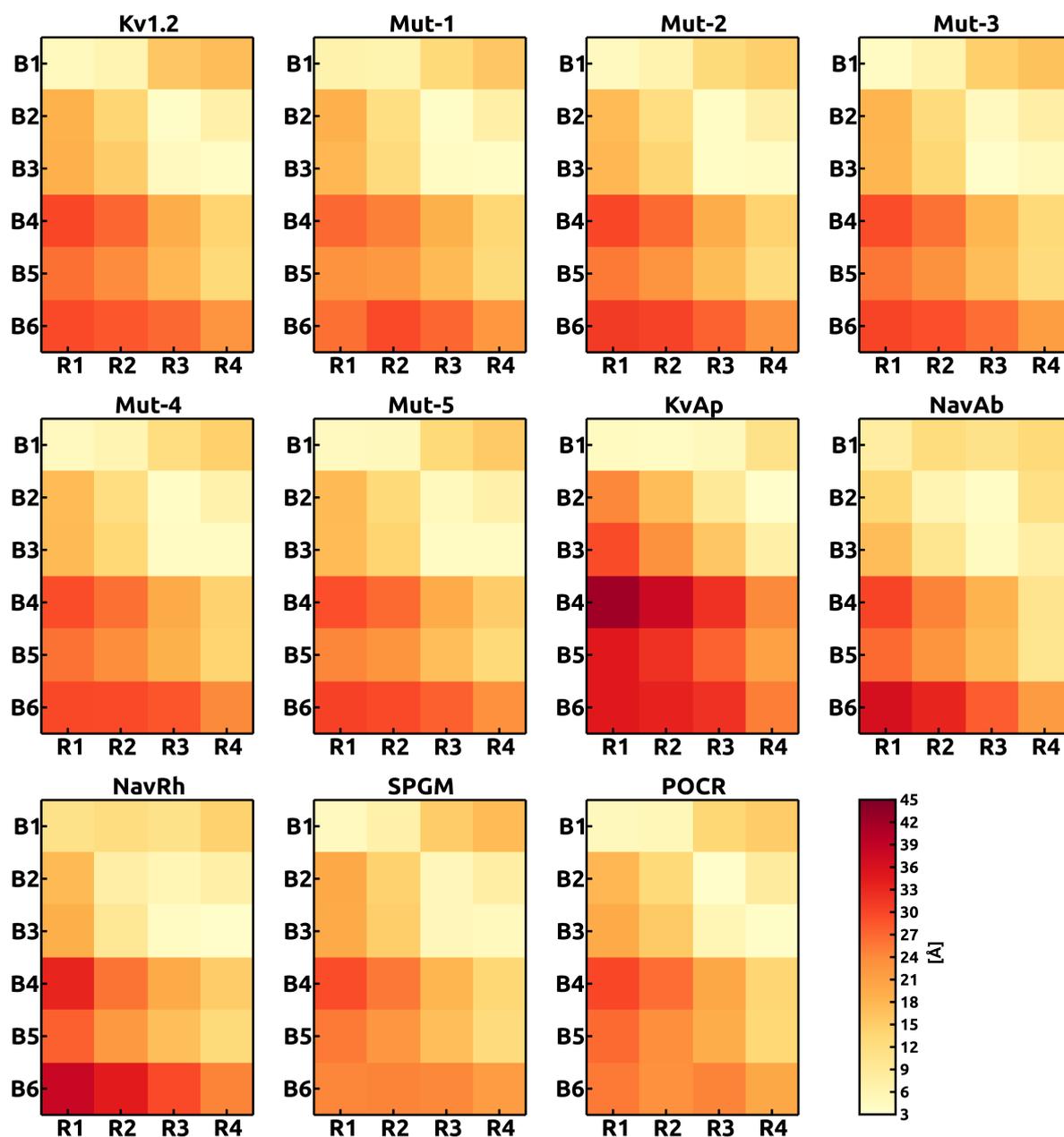


Figura 21. Matrizes de distância para a conformação ativada dos sistemas estudados. A cor representa a distância entre as argininas da hélice S4 (R1 – R4) e os resíduos ácidos das hélices vizinhas (B2 – B5) e o grupo fosfato dos lipídeos de membrana (B1 e B6).

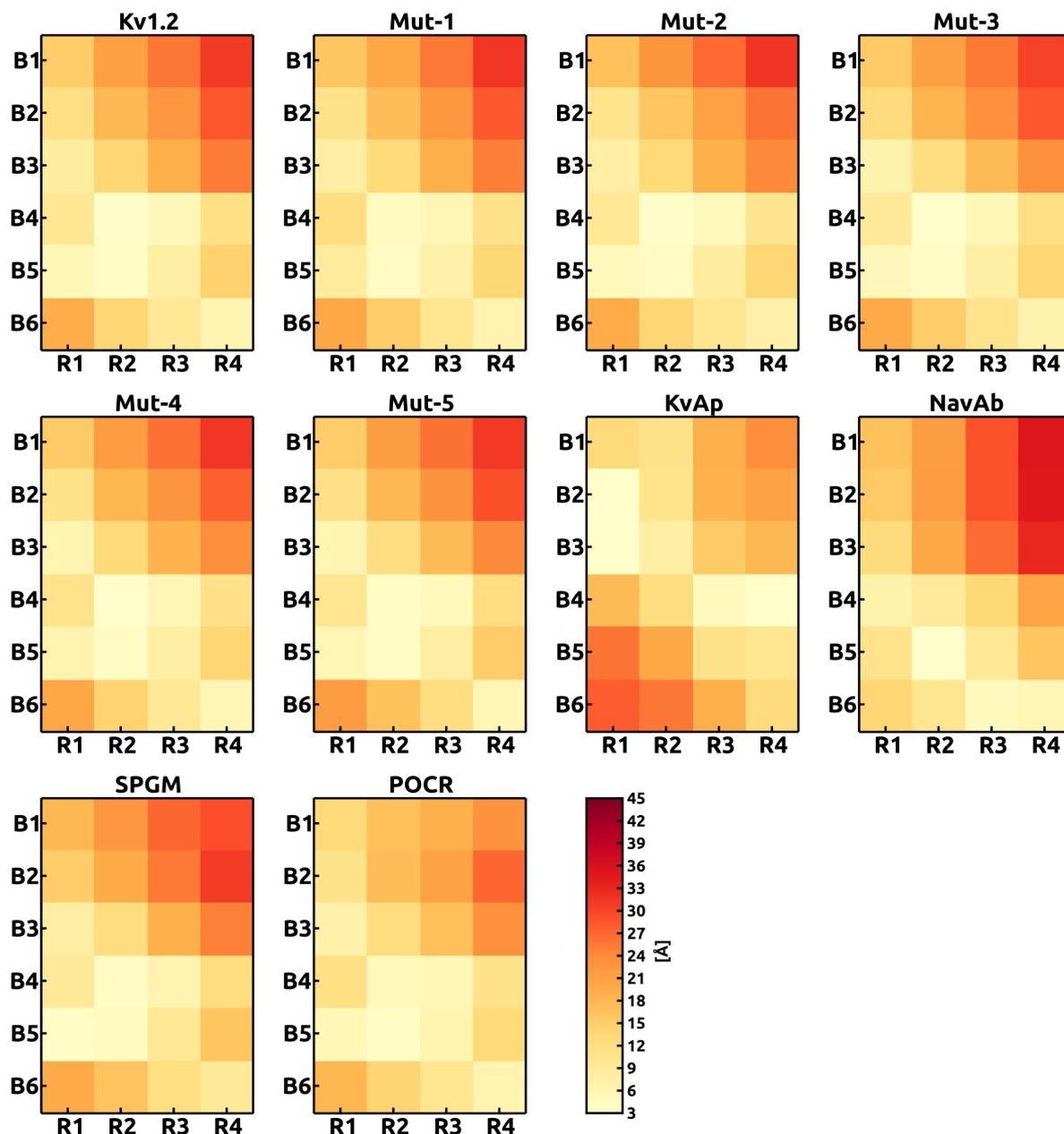


Figura 22. Matrizes de distância para a conformação desativada dos sistemas estudados. Idem à figura 20.

Assim como ocorreu nos cálculos de RMSD, era esperado que os sistemas mutantes permanecessem no mesmo estado dos canais selvagens. A única modificação que ocorreu foi a dispersão de distâncias para o resíduo R1 do sistema Mut-1. Este comportamento é condizente com a grande mobilidade da cadeia lateral deste resíduo causada pela ausência de pontes salinas que a estabilizem, conforme evidenciado pelo RMSF (Figura 18), e com a instabilidade estrutural do domínio sensível a voltagem deste mutante.⁸⁸

Por fim, verificou-se a completude da amostragem do espaço de estrutura e

sequência investigado (Figura 5, item X). Para inferir sobre a existência de propriedades gerais e robustas nos domínios sensíveis a voltagem, é importante que tais propriedades sejam medidas em um grupo heterogêneo de canais, com muita e pouca similaridade estrutural e de sequência. O canal Kv1.2 foi usado como referência nesta comparação por ter sido extensivamente caracterizado na literatura. Nas medidas de divergência estrutural (DE) e de sequência (DS) levou-se em consideração respectivamente o RMSD entre as matrizes médias de distância eletrostática e o somatório das diferenças de hidrofobicidade entre resíduos correspondentes no *gating pore* (ver tópico 3.4).

Em concordância com as análises realizadas até então, os sistemas mutantes apresentaram um baixo valor de DE, ficando próximos ao Kv1.2 (Figura 23). O sistema Mut-1 distanciou-se ligeiramente do Kv1.2, o que é explicado pelas alterações no resíduo R1 da sua conformação desativada. Como a medida de DE leva em consideração as diferenças em ambas as conformações, a divergência entre o Mut-1 e o Kv1.2 foi amenizada pela similaridade das matrizes de distância para a conformação ativada de ambos os canais. Visto que os sistemas Mut-2 e Mut-3 consistem em mutações pontuais, eles agruparam-se ao Kv1.2 do ponto de vista de sequência e de estrutura. Houve um distanciamento dos sistemas Mut-4 e Mut-5 com relação a sequência, entretanto o desvio estrutural deles manteve-se na mesma faixa dos outros mutantes. O alto desvio de sequência do Mut-5 é devido às 6 substituições de aminoácidos hidrofóbicos por outros menos hidrofóbicos na região do *gating pore*.⁹¹ Os canais KvAp, NavAb e NavRh distanciaram-se do Kv1.2 com relação tanto à sequência quanto à estrutura. No caso do KvAp, o seu distanciamento estrutural é devido ao seu estado parcialmente desativado. Os canais NavAb e NavRh ficaram próximos um do outro com relação às duas medidas, o que era esperado tendo em vista a sua proximidade evolutiva. Os sistemas contendo lipídeos modificados não foram considerados nesta análise por consistirem no próprio Kv1.2 inserido em diferentes membranas. Dessa forma, o DS destes sistemas é zero e o DE é muito próximo a zero.

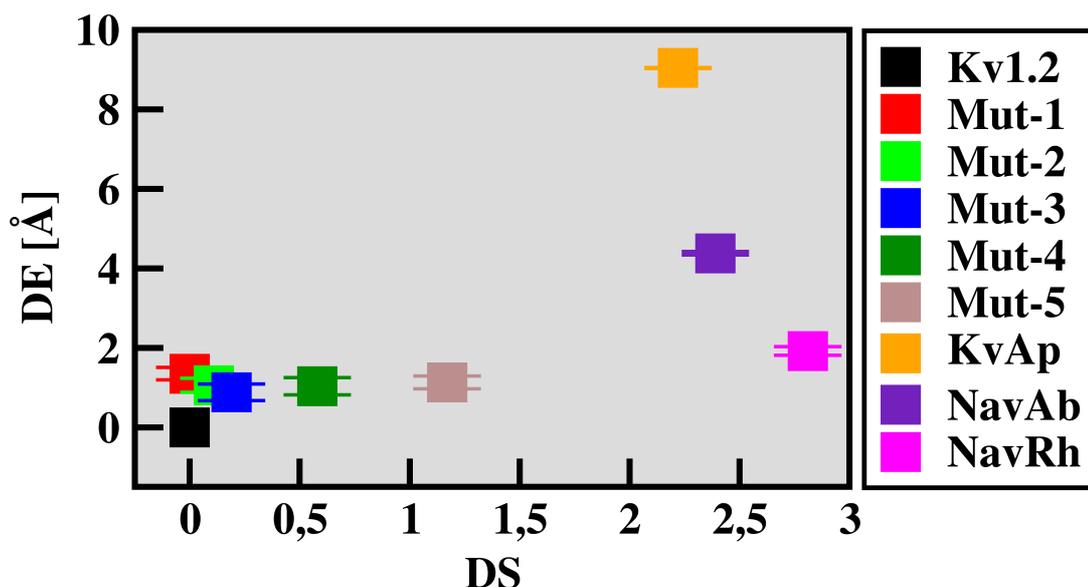


Figura 23. Divergência estrutural vs. divergência de sequência. Neste gráfico, é possível avaliar a distância entre os sistemas estudados e o Kv1.2 (referência).

O conjunto de canais utilizados neste estudo mostrou-se, portanto, diverso tanto do ponto de vista estrutural quanto de sequência. Ele é, então, propício para fazer generalizações acerca das propriedades elétricas e de hidratação medidas nos domínios sensíveis a voltagem, visto que as medidas de DE e DS levam em consideração os componentes que definem tais propriedades (estabilidade estrutural do *gating pore* e a natureza dos resíduos que o compõem). Para preencher todo o espaço disponível de variações, precisaria-se de canais altamente similares ao Kv1.2, mas com matrizes de distância distintas. Isto só é possível se estados intermediários do Kv1.2 fossem utilizados, o que fugiria do escopo do trabalho.

4.2. SIMULAÇÕES COM VOLTAGEM

Partindo da configuração final de cada simulação de equilíbrio, prosseguiu-se com duas simulações independentes, uma com o sistema a 0 mV e outra com o sistema a -600 mV (Figura 5, itens IV e V). Em seguida, os dados sobre a morfologia de hidratação e do campo elétrico foram coletados nessas duas simulações. Para manter os sistemas neutros (0 mV), bastou que eles fossem simulados com condições periódicas de contorno, mantendo a comunicação dos banhos de eletrólitos em ambas as faces da membrana. Para aplicar um potencial transmembrânico hiperpolarizante de -600 mV, foi necessário usar um protocolo de desbalanço iônico no qual uma camada de vácuo não permitia a comunicação dos banhos de eletrólitos dos dois lados da membrana. Foram mantidas, então,

quantidades diferentes de íons entre estes dois banhos, de forma a gerar diferenças de potencial transmembrânico próximos a -600 mV (ver tópico 3.2.3).

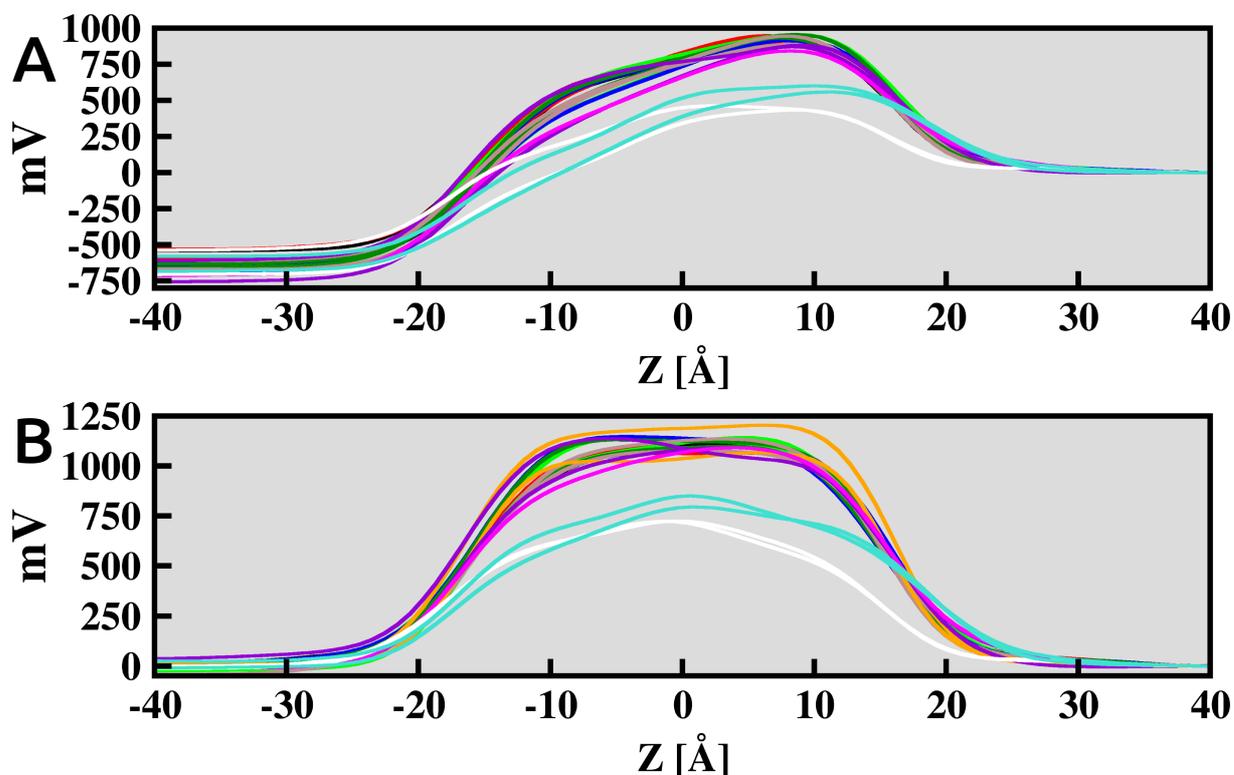


Figura 24. Perfis de voltagem transmembrânica. (A) Perfil de potencial elétrico transmembrânico das simulações a -600 ± 150 mV. (B) Perfil de potencial elétrico transmembrânico das simulações a 0 mV. O eixo Z é ortogonal à superfície da membrana, cujo centro está localizado na origem das coordenadas. As cores seguem o padrão da figura 23, acrescido dos sistemas SPGM (branco) e POCR (turquesa).

Em todos os sistemas em que voltagem foi aplicada, o potencial eletrostático do meio intracelular ($z < 0$ Å) foi mais negativo que o do meio extracelular ($z > 0$ Å). A diferença de potencial transmembrânico de cada sistema esteve na faixa de -500 mV a -750 mV, mantendo-se constante durante os 2 ns de simulação (Figura 24, A). Nos sistemas neutros, o potencial eletrostático de ambos os meios manteve-se próximo a 0 mV (Figura 24, B).

As interfaces vácuo/água utilizadas nas simulações hiperpolarizadas podem causar efeitos de borda no sistema e alterar a dinâmica das proteínas. Visando minimizar tais efeitos, os sistemas foram montados de forma que houvesse uma camada de água de no mínimo 40 Å de espessura (20 Å para o KvAp e sistemas com lipídeos modificados) entre as proteínas e a interface com vácuo. Além disso, para observar alterações na tensão de superfície da água, seriam necessárias escalas de tempo muito superiores aos 2 ns simulados. Portanto, neste estudo, as

interfaces água/vácuo não provocaram alterações significativas na dinâmica dos sistemas.

4.3. PROPRIEDADES ELÉTRICAS E DE HIDRATAÇÃO

Os domínios sensíveis a voltagem são capazes de responder a variações muito pequenas do potencial elétrico transmembrânico. Mudanças de centésimos de Volt já são suficientes para iniciar uma série de movimentos moleculares nestes domínios, culminando na regulação da abertura do poro dos canais iônicos dependentes de voltagem. Esta grande sensibilidade advém da presença de uma hélice transmembrânica (S4) rica em resíduos positivamente carregados (principalmente argininas) que estão acoplados ao campo elétrico transmembrânico.^{29-31,94} Foi demonstrado para o canal Kv1.2 que moléculas de água hidratam a cavidade central (*gating pore*) dos seus domínios sensíveis a voltagem tanto do lado extracelular quanto do intracelular. Há uma constrição hidrofóbica nesta cavidade que impede a comunicação direta entre os dois meios aquosos, gerando um perfil de hidratação com a forma de uma ampulheta.^{46,47,55,59-62} Uma consequência direta desse perfil de hidratação é a focalização do campo elétrico em torno da constrição hidrofóbica, o que explica a alta sensibilidade dos resíduos básicos da hélice S4 a pequenas variações do potencial transmembrânico.^{40,46,47,63-66}

Embora esperado que este perfil de hidratação e sua consequente focalização do campo elétrico estejam presentes em toda a família de canais iônicos dependentes de voltagem, essas propriedades ainda não foram investigadas nos outros membros da família. Os perfis de hidratação foram amostrados nas simulações a 0 mV de cada sistema, e para o cálculo dos perfis de distância elétrica também foram utilizadas simulações a 600 mV (ver tópicos 3.2.1 e 3.3).

Nas simulações para o Kv1.2, o perfil de distância elétrica foi similar em ambas as conformações e deixa claro o forte acoplamento das argininas ao campo elétrico (Figura 25, A). Este perfil torna-se mais íngreme em torno da F233 (constrição hidrofóbica), indicando que o campo elétrico encontra-se focalizado, em comparação com o campo elétrico de uma membrana pura (Figura 25, D). Esta é a região mais seca do domínio (densidade de águas < 0,005), em torno da qual moléculas de água intracelulares e extracelulares aproximam-se, mas não entram em contato (Figura 25, B e C). Em ambas as conformações, há um aumento na quantidade de

moléculas de água logo abaixo da F233. Nesta altura estão presentes os aminoácidos hidrofílicos E236 e D259, que, juntamente com a F233, formam o centro catalítico do domínio.³⁷ Também é possível notar um aumento na quantidade de águas nas redondezas das argininas (entre 8 Å e 17 Å na conformação ativada, e entre -4 Å e -15 Å na conformação desativada), o que ajuda a estabilizá-las neste ambiente altamente hidrofóbico.

Os dados obtidos para o Kv1.2 são condizentes com o exposto na literatura. O perfil de hidratação tem o formato de ampulheta e permite uma maior aproximação dos banhos de eletrólitos, em comparação com uma membrana pura. Nota-se também a solvatação dos resíduos carregados da hélice S4. Além disso, essa hidratação remodela o campo elétrico, tornando-o mais focalizado nas redondezas da F233. É importante ressaltar a independência conformacional do perfil de distância elétrica.

No Mut-1, os perfis de distância elétrica das duas conformações foi similar, diferindo apenas na região logo acima de R1 na conformação desativada (Figura 26, A). Nesta região (entre 10 Å e 18 Å), houve uma variação quase linear do campo elétrico (Figura 26, D). Apesar de ainda focalizado em relação à membrana, o perfil de distância elétrica apresentou uma menor inclinação na altura da F233, quando comparado com o Kv1.2 (Figura 25, D). Nota-se também para as duas conformações uma demora maior para alcançar o potencial máximo, comparando-se tanto com o Kv1.2 quanto com a membrana. Os perfis de hidratação (Figura 26, B e C) apresentaram as mesmas características vistas no Kv1.2, no entanto haviam menos moléculas de água no *gating pore* do sistema mutado (37 e 50 águas no Mut-1 contra 44 e 52 águas para o Kv1.2, nas conformações ativada e desativada respectivamente). O aumento na quantidade de moléculas de água circundando as argininas não foi observado para a R1 na conformação desativada.

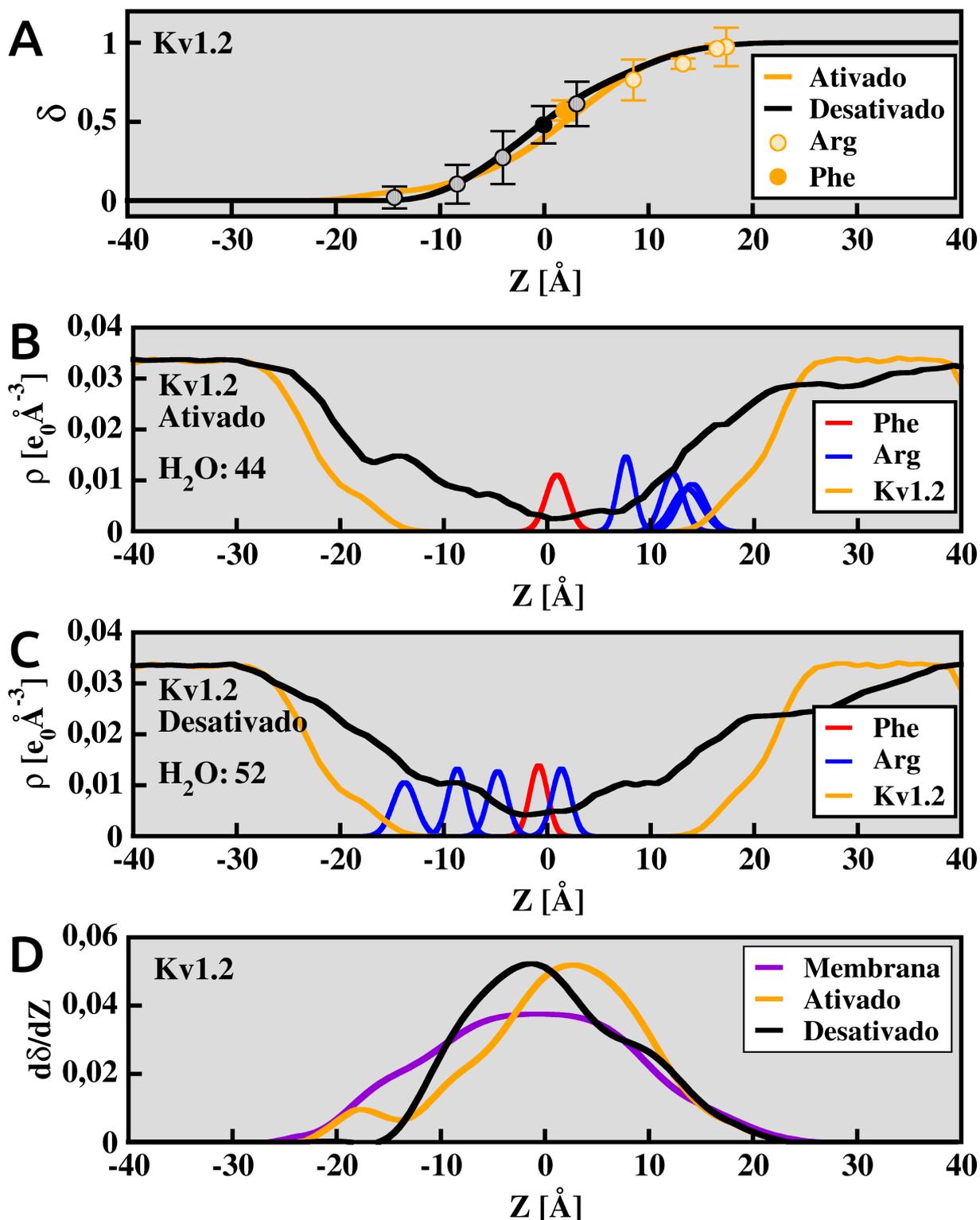


Figura 25. Propriedades elétricas e de hidratação do Kv1.2. **(A)** Perfil de distância elétrica ao longo do eixo Z para ambas as conformações (curvas laranja e preta) e distância elétrica do grupo carregado das argininas e da fenilalanina da constrição hidrofóbica (círculos). **(B e C)** Perfil de hidratação (ver tópico 3.3) ao longo do eixo Z do canal (curva preta) em comparação com o perfil de uma membrana pura (curva laranja). A quantidade de moléculas de água no intervalo de -15 Å a 15 Å é especificada em "H₂O". A distribuição das argininas e da fenilalanina é mostrada, respectivamente, como gaussianas azuis e vermelha. **(D)** Derivada dos perfis de distância elétrica em relação ao eixo Z do canal (curvas preta e laranja) e de uma membrana pura (curva roxa). O eixo Z é ortogonal à superfície da membrana, cujo centro encontra-se na origem das coordenadas.

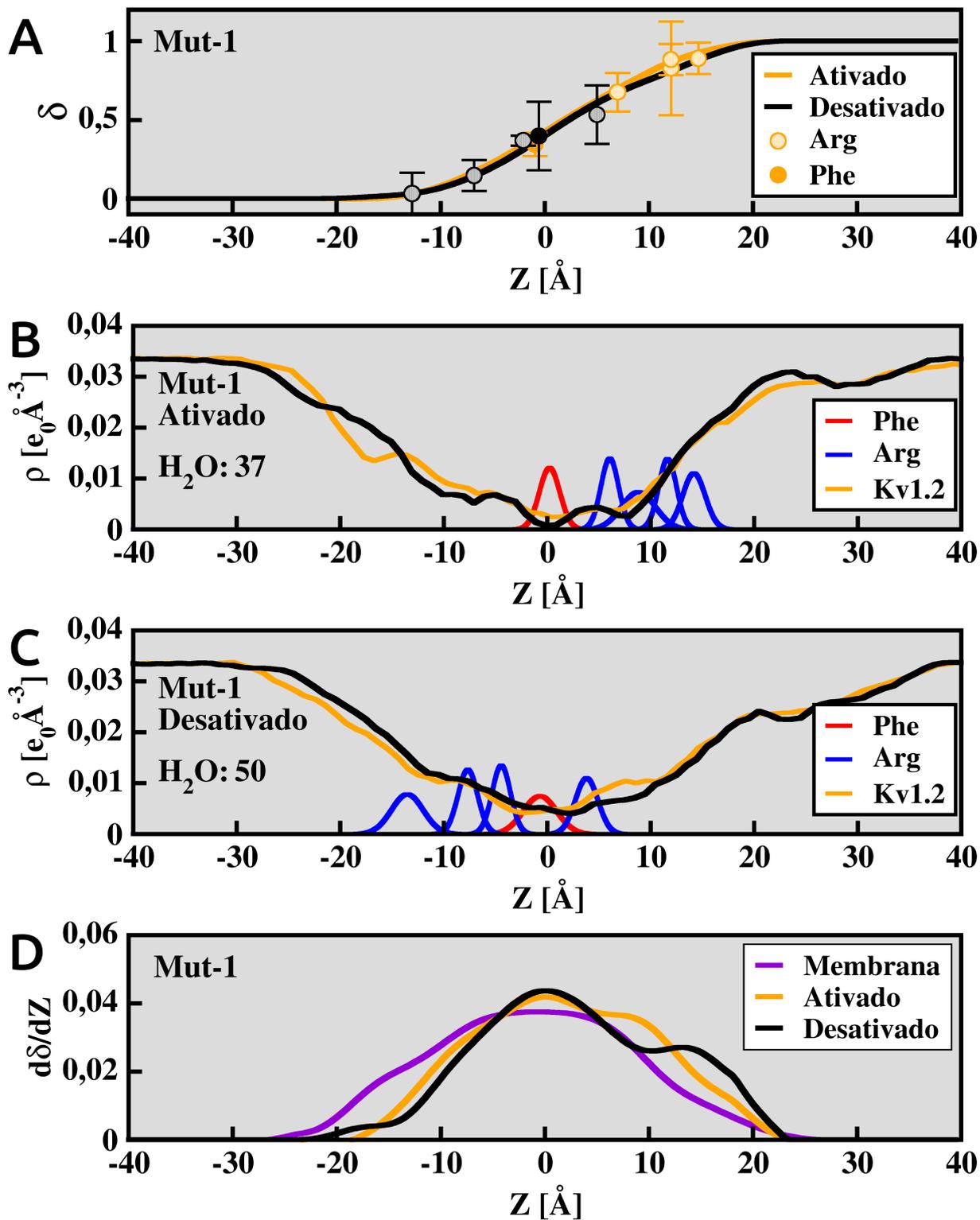


Figura 26. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-1. Idem à figura 24.

As alterações no perfil de distância elétrica são explicadas pelas variações ocorridas na quantidade de moléculas de água presentes no *gating pore*. Uma redução de 2 moléculas de água nesta região foi suficiente para alterar a focalização do potencial eletrostático local. Um efeito similar foi observado no canal CRAC, no qual 3 moléculas de água causam um remodelamento do campo elétrico suficiente para impedir a condução iônica neste canal.⁹⁵ As implicações no campo elétrico causadas por alterações na hidratação também explicam o comportamento linear da distância elétrica acima da R1 do canal desativado. A ausência de carga neste resíduo, associado com a sua alta mobilidade (ver tópico 4.1) e as rupturas nas pontes salinas do domínio foram responsáveis por uma desidratação local em torno deste resíduo. A consequência direta desta desidratação é a linearização da variação do campo elétrico, como observado na figura 26 item A. Se a simulação da conformação desativada desse canal fosse estendida, esta desestruturação culminaria na formação de um poro de água no interior do domínio e uma completa linearização da distância elétrica.⁸⁸

No sistema Mut-2, há um grande remodelamento dos perfis de distância elétrica (Figura 27, A). Na conformação ativada, o campo elétrico apresenta um comportamento linear ao redor da mutação F233A e cresce rapidamente na porção superior desta região, alcançando o seu máximo de focalização. Já a conformação desativada apresenta um comportamento inverso: imediatamente abaixo da mutação, o campo elétrico é maximamente focalizado, e na região superior ele varia linearmente. Esses padrões são refletidos nos perfis de hidratação (Figura 27, B e C). As regiões onde o campo elétrico é focalizado são vizinhas a uma região com grande aumento na quantidade de água. Já nas porções com crescimento linear do potencial eletrostático a quantidade de moléculas de água tende a ser constante. O número de moléculas de água no interior do *gating pore* foi menor comparado com o Kv1.2, mas muito próximo ao sistema Mut-1.

Medidas experimentais mostraram que a mutação F233A altera a cinética da transição de quarta arginina da hélice S4. Mais especificamente, esta mutação acelera a desativação e retarda a ativação.³⁸ Isto pode ser explicado pelas deformações encontradas no campo elétrico deste sistema. Durante a ativação, a região de focalização do campo elétrico encontra-se abaixo da constrição

hidrofóbica do domínio. Desta forma, grandes forças são exercidas nos resíduos básicos forçando-os a atravessarem esta constrição. Durante este processo, o potencial eletrostático é remodelado e a região de focalização encontra-se acima da constrição hidrofóbica. Isto dificultaria a passagem do último resíduo básico, desacelerando este processo. No caso da desativação, este fenômeno ocorreria no sentido oposto. Como para o canal estar desativado não é necessário que a R1 atravesse o centro catalítico, a transferência da focalização do campo para a porção inferior do domínio exerceria menos influência neste processo, pois não é necessário que hajam forças atuando na R1. Esta explicação é reforçada pela ausência de interação direta entre o resíduo F233 e as argininas do canal, o que direciona a causa dos efeitos observados para alterações no campo elétrico.³⁸

A mutação I173F (Mut-3) não causou alterações no perfil de distância elétrica e na hidratação do domínio (Figura 28). Todas as características do Kv1.2, como focalização do campo elétrico na altura da F233, hidratação das argininas, perfil de distância elétrica conformacionalmente independente e número de águas presentes no domínio, mantiveram-se similares no sistema mutado. No estudo em que esta mutação foi realizada, observou-se uma aceleração da cinética do canal.⁸⁹ A hipótese principal para este efeito é uma interação direta entre o resíduo substituído e as argininas da hélice S4, não influenciando nas propriedades elétricas do domínio.

No sistema Mut-4 também foram observadas poucas mudanças com relação ao Kv1.2. A quantidade de moléculas de água no interior do domínio foi similar ao encontrado na maioria dos mutantes, sendo inferior ao Kv1.2, e, como consequência, acarretou em uma inclinação menos acentuada do perfil de distância elétrica (Figura 29). As outras características observadas no Kv1.2 foram preservadas, com os resíduos básicos da hélice S4 fortemente acoplados a um campo elétrico conformacionalmente independente. Mesmo com a mutação interferindo diretamente na região da constrição hidrofóbica,⁹⁰ não houve um remodelamento considerável do potencial eletrostático local. Dessa forma, as alterações na termodinâmica do domínio observadas no estudo se devem a interações químicas entre os resíduos substituídos e as argininas da hélice S4.

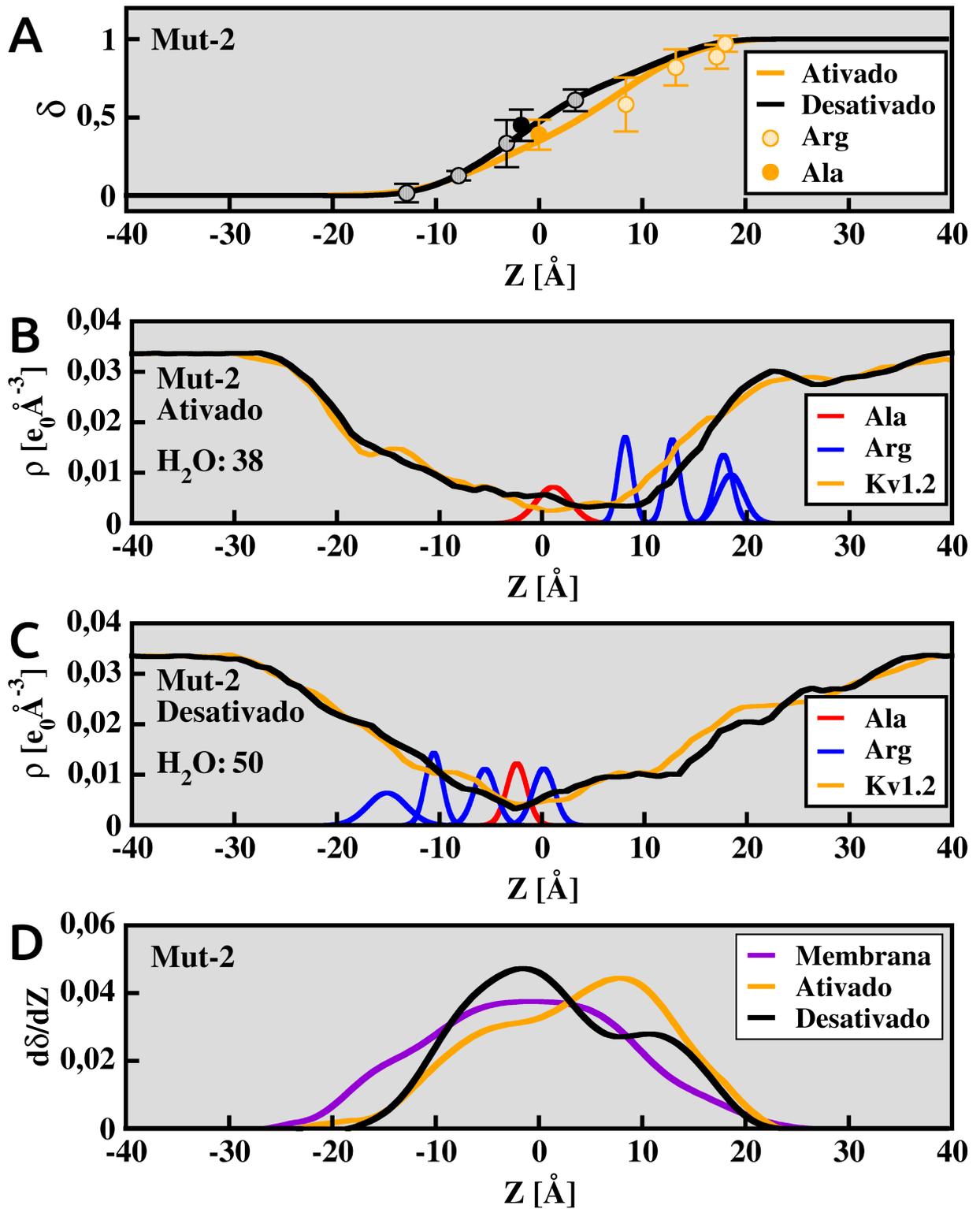


Figura 27. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-2. Idem à figura 24.

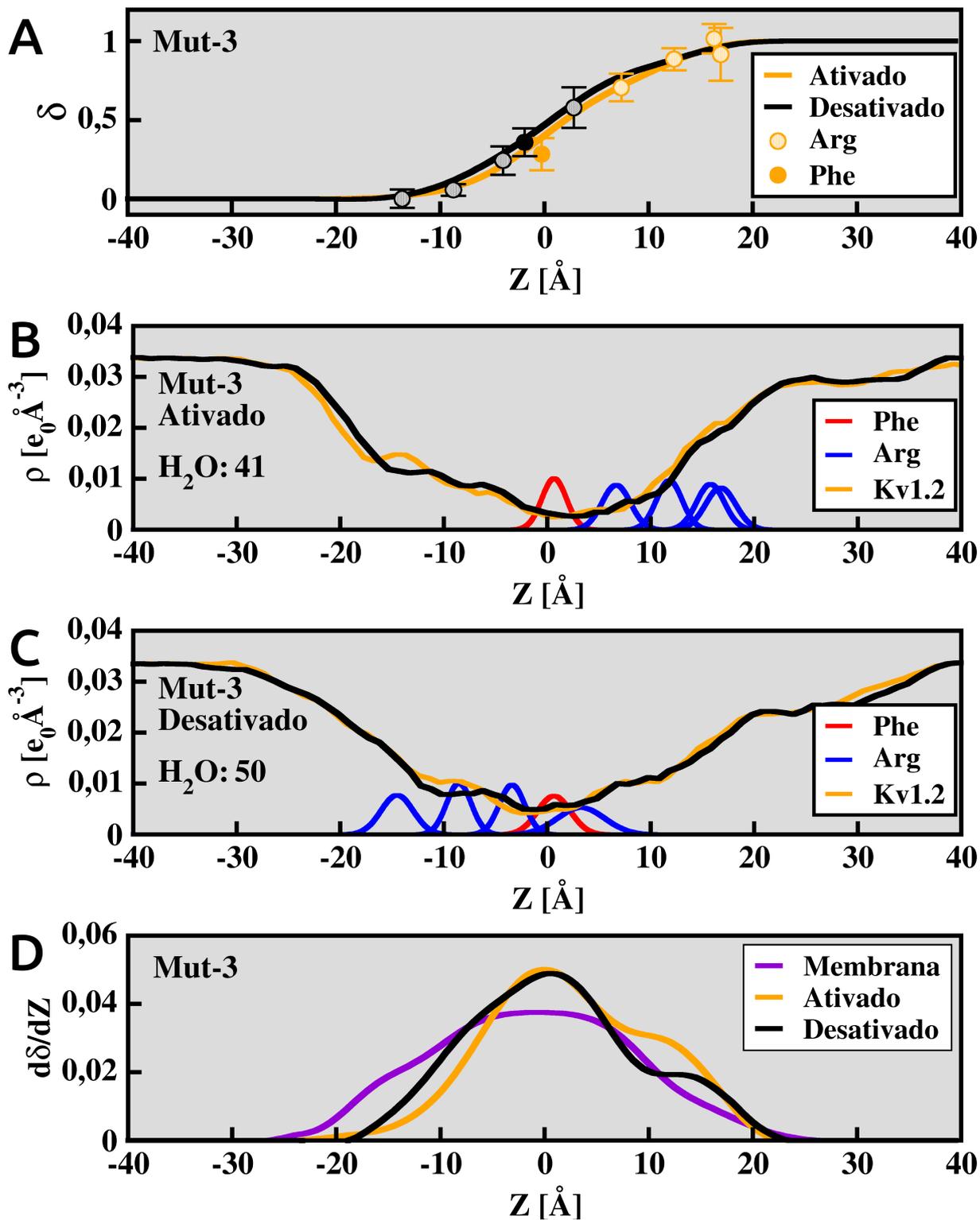


Figura 28. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-3. Idem à figura 24.

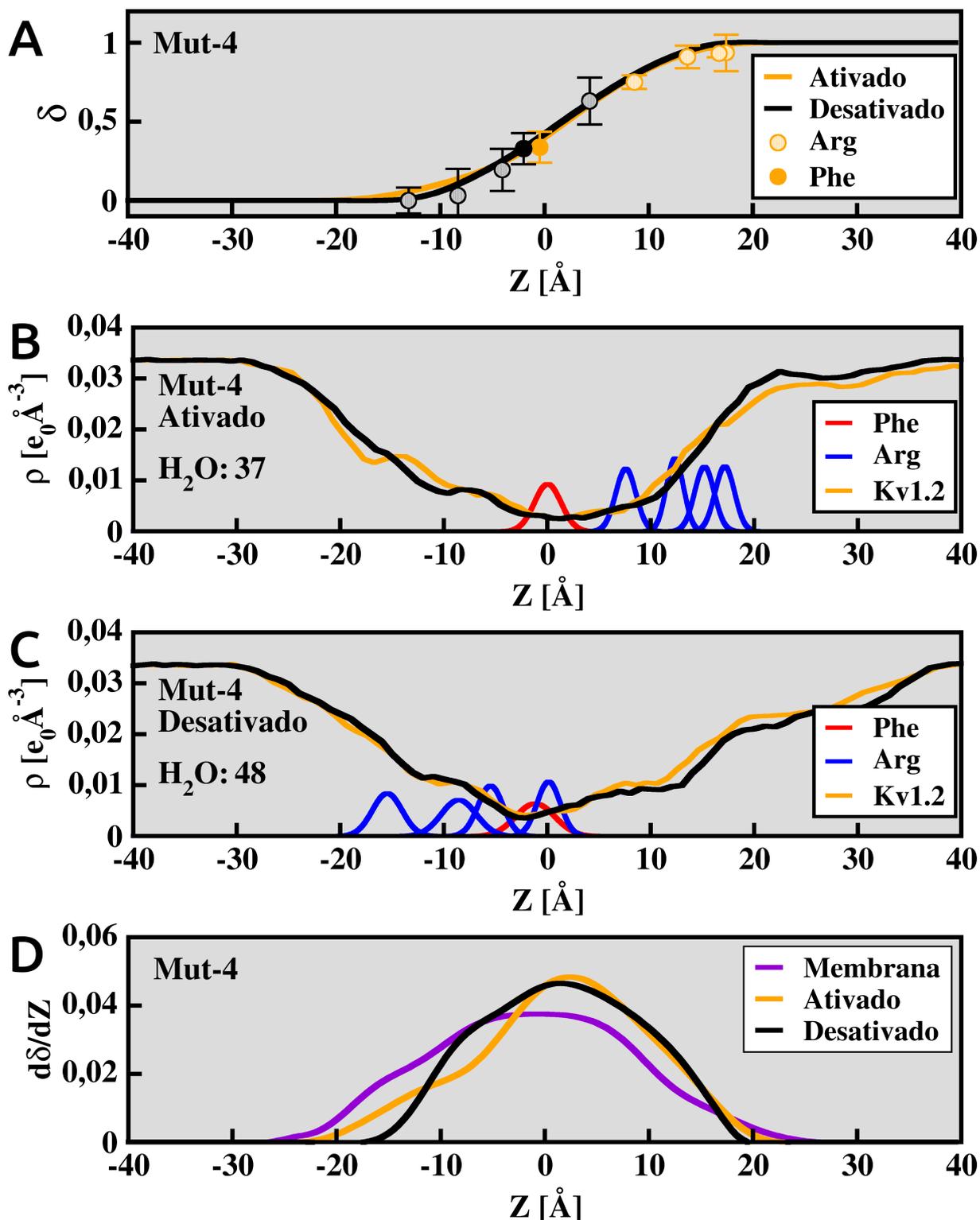


Figura 29. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-4. Idem à figura 24.

Diferentemente dos outros canais mutantes, no sistema Mut-5 houve um aumento na quantidade de moléculas de água no interior do *gating pore*. Na conformação ativada, houve um excesso de apenas uma molécula de água em relação ao Kv1.2, enquanto o aumento na conformação desativada foi mais

considerável, com um excedente de 4 moléculas de água (Figura 30, B e C). Em ambas as conformações pode-se notar que há mais águas nas imediações da F233, sendo que na conformação desativada, a região de constrição hidrofóbica fica menos definida. Como consequência direta desse acúmulo de água, o campo elétrico tornou-se menos focalizado na altura da F233 (Figura 30, D). Apesar dessas diferenças, as outras características presentes no Kv1.2 também estavam presentes nos perfis desse sistema, principalmente a independência conformacional da distância elétrica (Figura 30, A).

O sistema Mut-5 consistiu na substituição de todos os resíduos que interagem diretamente com a F233 por alaninas. Dessa forma, a região correspondente à constrição hidrofóbica ficou mais hidrofílica, permitindo o acesso de mais moléculas de água (Figura 30, B e C). Cálculos de energia livre mostraram que essas alterações diminuíram a barreira energética da passagem da R4 em 3,6 kcal/mol (6,1 kT).⁹¹ Os autores explicam que essa queda na barreira energética é devido a uma menor estabilização da cadeia lateral da F233, que atua como uma “tampa” para a passagem das argininas, portanto há pouca contribuição do componente elétrico da energia livre. Conforme dito anteriormente, a presença de algumas moléculas de água podem alterar consideravelmente perfis de energia livre.⁹⁵

As propriedades elétricas e de hidratação também foram investigadas em outros membros da família de canais iônicos dependentes de voltagem: KvAp, NavAb e NavRh. Há poucos estudos de dinâmica molecular envolvendo estes canais, sendo que as características elétricas e de hidratação foram pouco exploradas.^{86,87,96,97}

Dentre todas as estruturas analisadas, o KvAp foi a que apresentou os padrões mais discrepantes. Principalmente no estado ativado, o seu domínio sensível a voltagem mostrou-se pouco hidratado na região que compreende a L69 e as argininas (Figura 31, B e C). Entretanto, no estado ativado, há um rápido crescimento na densidade de águas nas imediações dessa região desidratada (Figura 31, B), levando a uma rápida variação do potencial eletrostático (Figura 31, D). Este comportamento também torna esse estado mais hidratado que o correspondente no Kv1.2 (51 águas no KvAp e 44 no Kv1.2). Já no estado desativado, este padrão não é mantido, havendo um lento aumento da densidade de

águas ao redor da região desidratada. Como há poucas moléculas de água no *gating pore* desta conformação (0,156 águas), o campo elétrico variou mais uniformemente, assemelhando-se à variação observada em uma membrana pura (Figura 31, D).

Embora diferente de todos os outros canais, os perfis de hidratação são condizentes com os obtidos para o KvAp em outro estudo.⁹⁶ Além disso, estimativas do potencial eletrostático nos domínios sensíveis a voltagem do KvAp também apontaram para remodelamentos do campo elétrico entre as duas conformações.⁸⁶ A falta de um centro catalítico como o do Kv1.2,^{37,96} o remodelamento da membrana ao redor do domínio sensível a voltagem⁸⁶ e a perda de focalização do campo elétrico observada na conformação desativada podem explicar a transição não completa das argininas neste estado. Dessa forma, é esperado que o estado desativado do KvAp seja de fato diferente dos estados desativados dos outros canais iônicos dependentes de voltagem.

No NavAb, embora apresentando diferenças, as curvas de distância elétrica de ambas as conformações apresentaram um comportamento similar: formato sigmoidal com a região mais íngreme (focalização do campo elétrico) ocorrendo na constrição hidrofóbica (Figura 32, A e D). Ao comparar os perfis de hidratação (Figura 32, B e C) com os do Kv1.2, observa-se um maior acúmulo de água no *gating pore* do NavAb. Embora acomodando mais água, o formato de ampulheta é mantido, com a região mais seca estando em torno da F56 (constrição hidrofóbica). Assim como no Kv1.2, também há um maior acúmulo de águas hidratando a região das argininas e a região logo abaixo da F56 (centro catalítico).

No caso do NavRh, o perfil de distância elétrica (Figura 33, A) também apresenta um formato sigmoidal, com a região de maior variação do potencial eletrostático coincidindo com a porção mais seca do domínio (Figura 33, B). Assim como no Kv1.2 e no NavAb, há uma constrição hidrofóbica nas proximidades da fenil (F55, neste caso) que impede a comunicação entre moléculas de água intracelulares e extracelulares. Logo abaixo da F55 (centro catalítico) e na região ocupada pelas argininas, também há um aumento na quantidade de águas. No intervalo de -15 Å a 15 Å, o domínio sensível a voltagem é mais hidratado que o do Kv1.2. Isto se dá pelo rápido aumento na quantidade de moléculas de água logo abaixo da F55, o que

contribui para a focalização do campo elétrico (Figura 33, D).

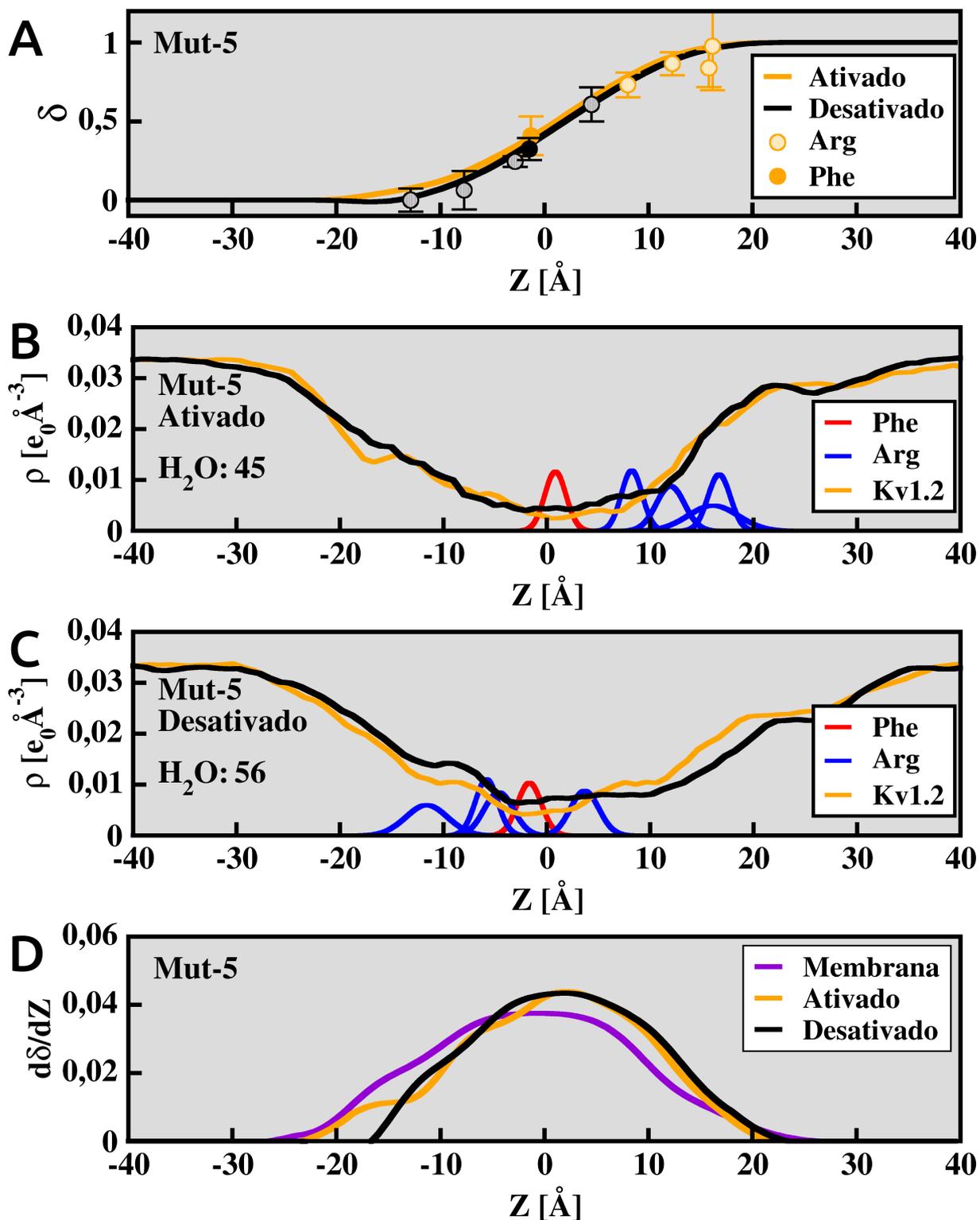


Figura 30. Propriedades elétricas e de hidratação do Mut-5. Idem à figura 24.

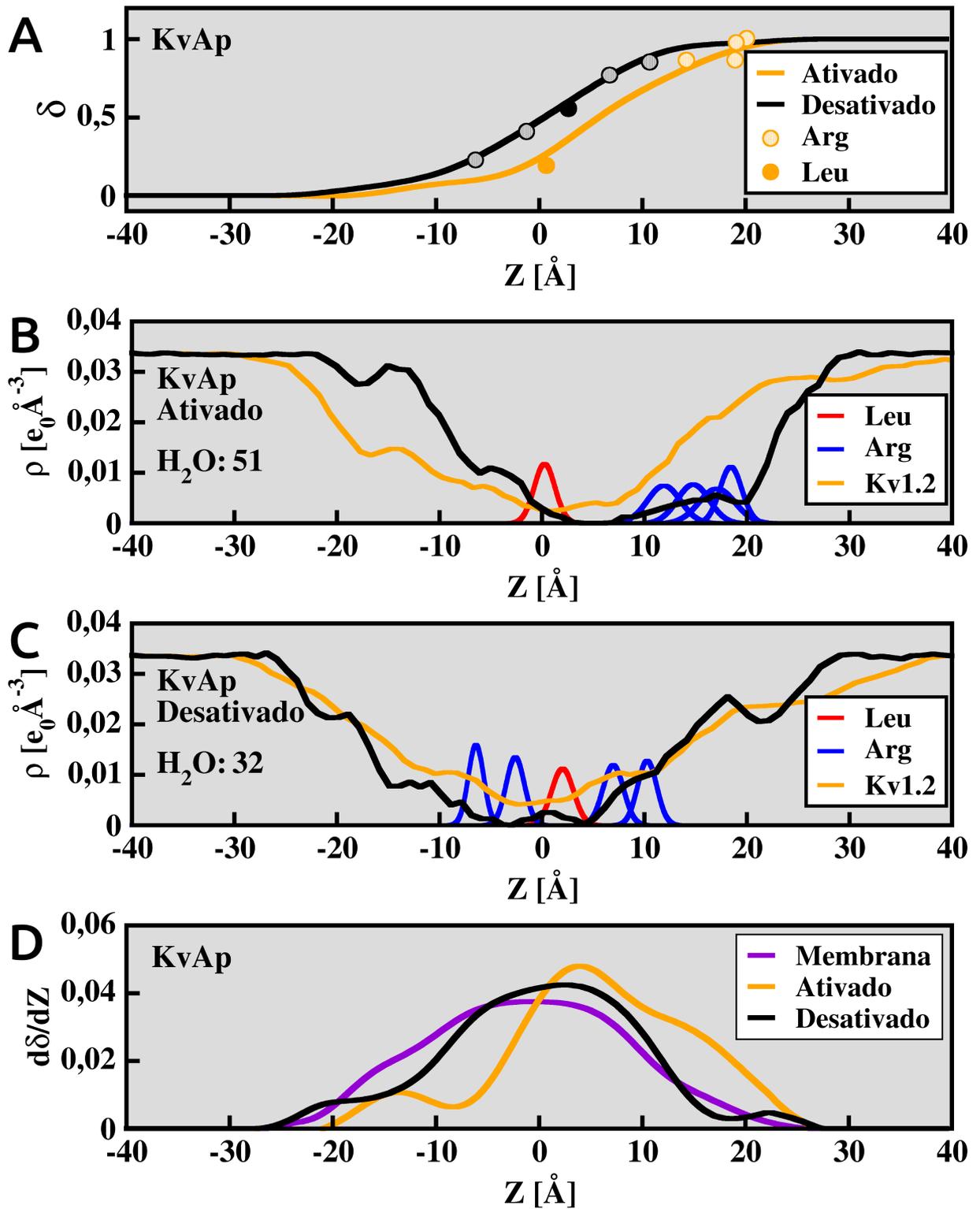


Figura 31. Propriedades elétricas e de hidratação do KvAp. Idem à figura 24.

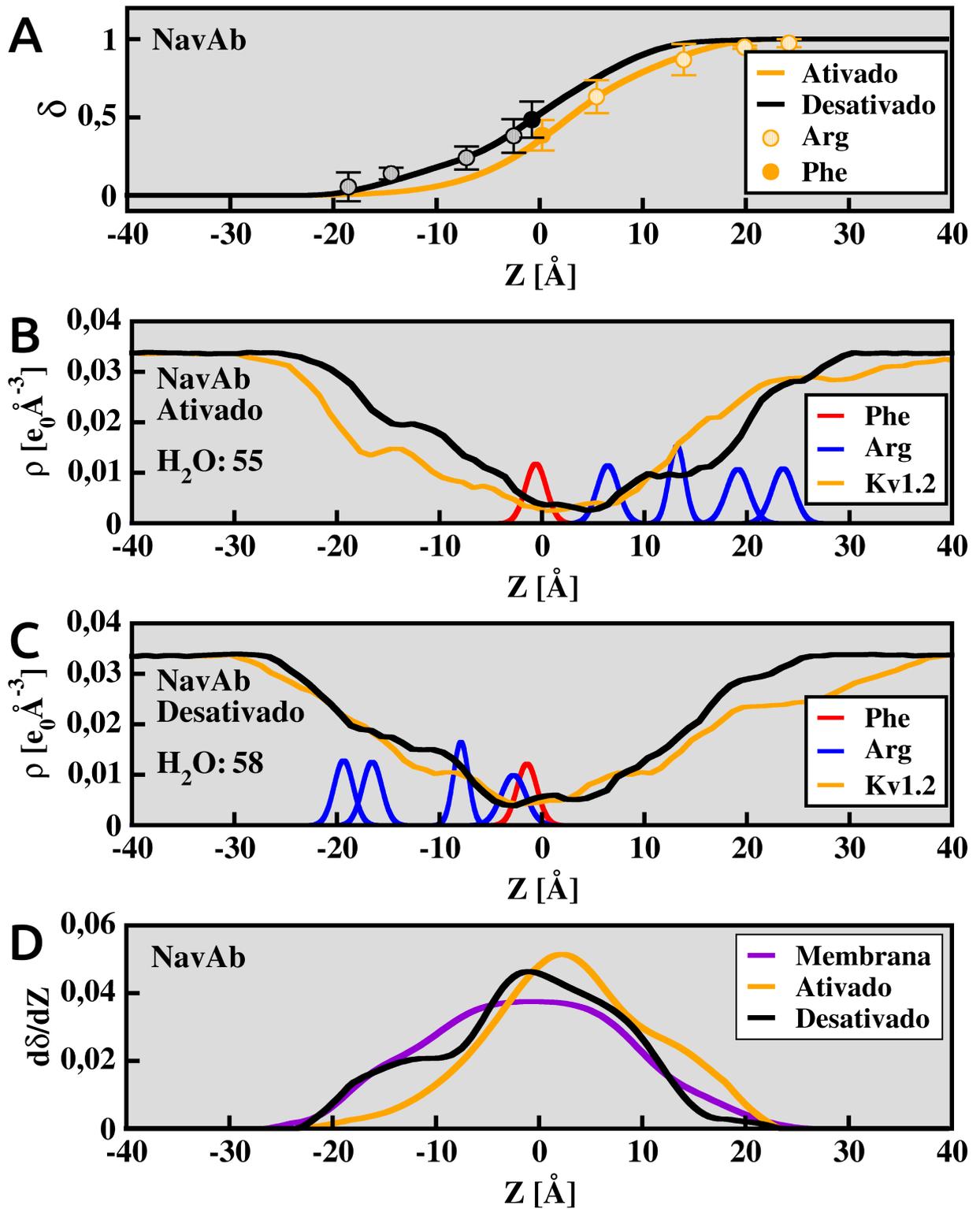


Figura 32. Propriedades elétricas e de hidratação do NavAb. Idem à figura 24.

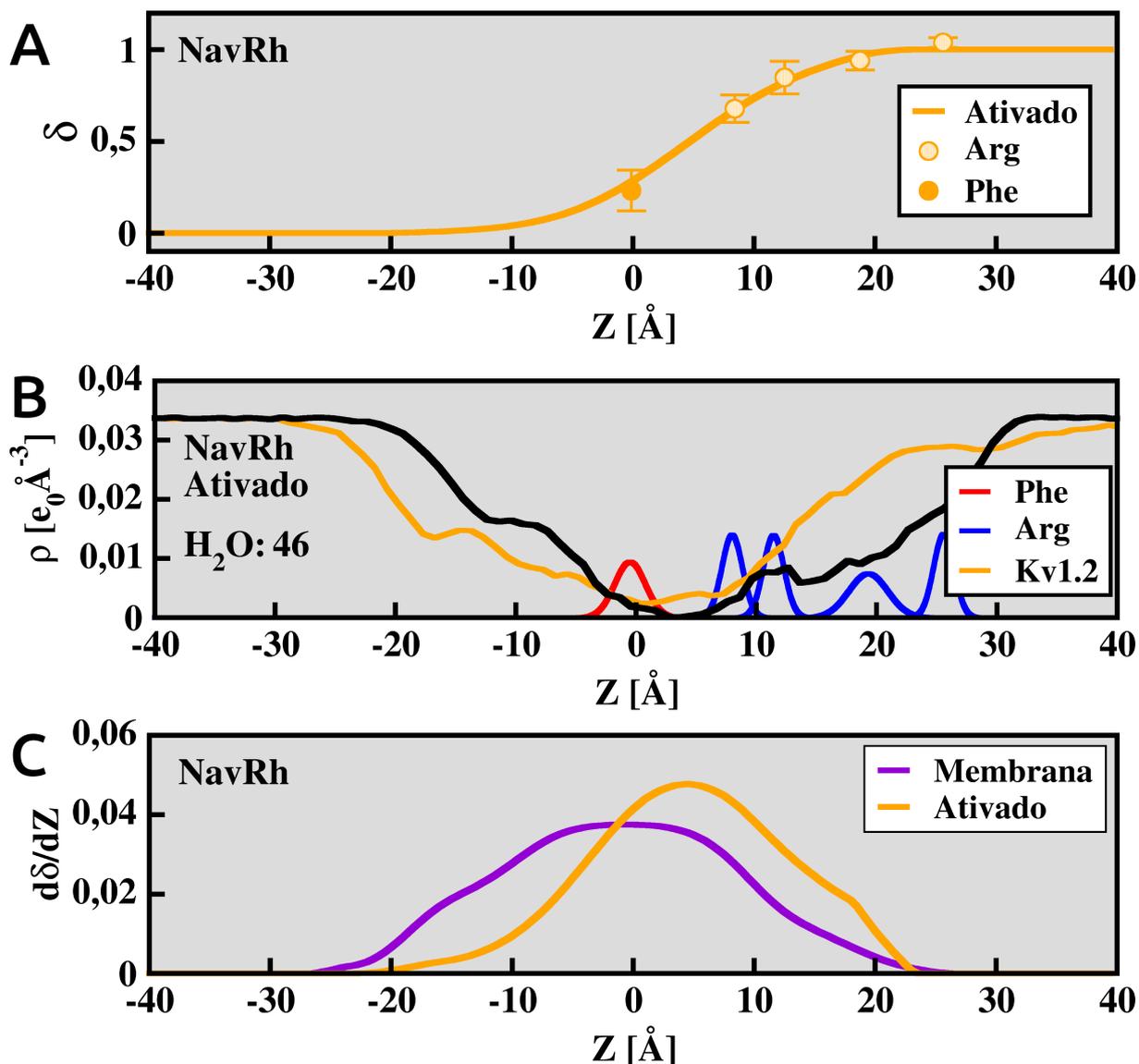


Figura 33. Propriedades elétricas e de hidratação do NavRh. Idem à figura 24.

Salvo pequenas diferenças, os padrões observados tanto para a hidratação quanto para o potencial eletrostático no *gating pore* dos domínios sensíveis a voltagem do NavAb e do NavRh são similares aos obtidos no Kv1.2. No KvAp, a hidratação e o campo elétrico mostram significativas diferenças com o Kv1.2. Apesar disso, uma propriedade essencial para a maquinaria do Kv1.2 está presente: os resíduos básicos da hélice S4 estão fortemente acoplados a um campo elétrico focalizado. Portanto, pode-se inferir que haja uma pressão seletiva obrigando proteínas altamente sensíveis a voltagem a criarem, de alguma forma, um campo elétrico focalizado. Dessa forma, o caminho “escolhido” para os canais iônicos dependentes de voltagem foi aproximar dois banhos de eletrólitos (sob diferentes potenciais elétricos) ao redor de uma região altamente hidrofóbica de forma que haja

um rápido crescimento na quantidade de moléculas de água em pelo menos um dos lados dessa região. Apesar de apresentarem variações, todos os canais estudados são funcionais e mantém essas duas características essenciais.

4.4. EXCESSO DE GATING CHARGES

Se de fato houver uma pressão seletiva atuando na focalização do campo elétrico, é esperado que as variações observadas nos sistemas estudados causem perturbações muito pequenas na energética da ativação/desativação dos domínios sensíveis a voltagem. Mais especificamente, o componente elétrico da energia livre desse processo deve ser desprezível quando comparado ao componente químico. No caso dos canais iônicos dependentes de voltagem, o componente elétrico da energia livre de ativação/desativação é traduzido pelo movimento dos resíduos carregados dos domínios sensíveis a voltagem ao longo da membrana, ou melhor, ou longo do campo elétrico transmembrânico.^{32,47} Este evento, que é medido experimentalmente, é conhecido como *gating current*. Dele podemos extrair a quantidade total de cargas deslocadas, chamada de *gating charge* (Q).^{51,52}

A diferença de energia livre ΔG associada à transição do estado desativado para o estado ativado na presença de um potencial de membrana (V) pode ser expressa por:

$$\Delta G(V) = G_{ativado}(V) - G_{desativado}(V) \quad [19], \text{ ou}$$

$$\Delta G(V) = \Delta G(0) + VQ \quad [20]$$

onde $\Delta G(0) = G_{ativado}(0) - G_{desativado}(0)$ é o componente químico da energia livre (independente de V) do domínio sensor de voltagem. VQ é a energia decorrente do transporte dos resíduos carregados deste domínio ao longo de V . Como cada resíduo carregado não necessariamente atravessa completamente o potencial de membrana, a *gating charge* depende apenas da fração do potencial elétrico local ($\phi_{(i)}$) a que cada carga (q_i) está acoplada:³²

$$Q = \sum_i q_i [\phi_{ativado}(i) - \phi_{desativado}(i)] \quad [21].$$

No cálculo de Q , apenas os resíduos carregados da hélice S4 são considerados, visto que a contribuição de outros resíduos é muito pequena. A

diferença de energia livre $\Delta\Delta G$ advinda de perturbações provocadas por uma ou mais mutações é então expressa como:

$$\Delta\Delta G(V) = \Delta G^*(V) - \Delta G(V) = \Delta\Delta G(0)^* + V \Delta Q^* \quad [22]$$

sendo $\Delta\Delta G^*(0) = \Delta G^*(0) - \Delta G(0)$ e $\Delta Q^* = Q^* - Q$, respectivamente, as variações da energia livre química e dos valores de *gating charge* entre o sistema selvagem e o sistema perturbado. Finalmente, o “excesso de *gating charge*” é definido como:

$$\Delta Q^* = \sum_i q_i^* \Delta \phi^*(i) - q_i \Delta \phi(i) \quad [23]$$

com $\Delta \phi^* = \phi_{ativado}^* - \phi_{desativado}^*$ e $\Delta \phi = \phi_{ativado} - \phi_{desativado}$ descrevendo, respectivamente, as variações do acoplamento ao campo elétrico durante a ativação nas estruturas perturbadas e não perturbadas. A distância elétrica (ver tópico 3.2.1) foi utilizada como medida do acoplamento de cada resíduo carregado do domínio ao campo elétrico. Este formalismo permite avaliar as diferenças na energética de diferentes domínios sensíveis a voltagem sob a ótica das suas propriedades elétricas (Figura 5, item VIII). Neste estudo, o canal Kv1.2¹⁷ foi utilizado como referência por suas propriedades elétricas terem sido extensivamente estudadas.^{29-31,40,46,47,47,55,59-66,94} Os outros canais foram considerados como perturbações do Kv1.2 (as diferenças entre canais podem ser vistas como uma conjunto de mutações acumuladas ao longo da evolução).

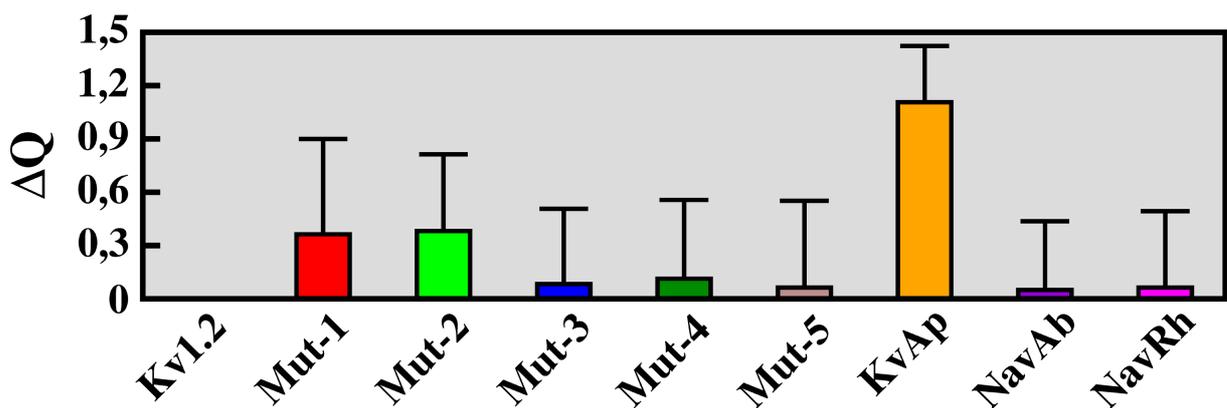


Figura 34. Excesso de *gating charges* (ΔQ), em cargas elementares, entre os canais estudados e o Kv1.2.

Os sistemas que apresentaram os maiores valores de excesso de *gating charge* (Figura 34) foram o Mut-1, o Mut-2 e o KvAp (0,36, 0,38 e 1,1 cargas elementares respectivamente). Estes correspondem aos sistemas nos quais foram

observados as maiores variações dos perfis de distância elétrica e de hidratação. No caso do KvAp, este excesso de uma carga elementar é devido à sua transição não completa no estado desativado, no qual a R2 não transferiu a sua carga completamente através do potencial transmembrânico.⁸⁶ Nos outros dois sistemas, este excesso de *gating charge* foi ocasionado por remodelamentos do campo elétrico dirigidos pelas mutações aplicadas (ver tópico 4.3). O excesso de *gating charge* medido para os outros sistemas mutantes (Mut-3, Mut-4, Mut-5) e para os canais seletivos a sódio (NavAb e NavRh) manteve-se abaixo de 0,11 cargas elementares, condizente com a preservação das características elétricas e de hidratação do Kv1.2 nestes canais.

Os valores de *gating charge* para os canais de potássio dependentes de voltagem está bem estabelecido e varia de 12 a 14 cargas elementares.^{30,31,94} Isto representa de 3 a 3,5 cargas elementares atravessando o potencial transmembrânico em cada domínio sensível a voltagem durante um ciclo completo de ativação/desativação. Nos mutantes que mais sofreram alterações no seu campo elétrico (Mut-1 e Mut-2), essas perturbações representam menos de 13% do total de *gating charge* que um domínio pode transferir. Já nos outros mutantes e canais de sódio, essa fração cai para menos de 4% do total de *gating charge*. O excesso de *gating charge* do KvAp corresponde a aproximadamente 36% desse total. Caso a R2 deste canal realizasse uma transição completa, este excesso seria menor, provavelmente igualando-se ao obtido para os sistemas Mut-1 e Mut-2. As variações dos sistemas Mut-1 e Mut-2 equivalem a 70% da *gating charge* da primeira transição (de um total de quatro) do processo de desativação do Kv1.2, enquanto nos outros sistemas as variações equivalem a menos de 20%. Esta transição é a que menos contribui para o *gating charge* total do domínio, transportando apenas 0,52 cargas elementares.⁴⁰

Considerando uma diferença de potencial típica de 100 mV, o componente elétrico da energia livre de ativação/desativação dos sistemas Mut-1 e Mut-2 diferiu menos de 0,88 kcal/mol (1,48 kT) em relação ao Kv1.2. Nos outros mutantes e canais de sódio, esta diferença foi inferior a 0,25 kcal/mol (0,43 kT), enquanto que o excesso de energia livre do KvAp foi de 2,53 kcal/mol (4,28 kT). A menos do KvAp, estes valores se enquadram na faixa energética de oscilações térmicas (< 1,2

kcal/mol).

Schwaiger e colaboradores avaliaram o custo energético da primeira etapa (de um total de quatro) da desativação de um canal quimérico que consistia no Kv1.2 com a sequência da primeira porção da hélice S4 substituída pela sequência equivalente do canal homólogo Kv2.1.⁹¹ A diferença de energia livre encontrada foi de 3,34 kcal/mol, quase quatro vezes superior ao excesso de energia livre proveniente das mutações nos sistemas Mut-1 e Mut-2, e cerca 13 vezes maior que os valores obtidos para os outros sistemas (excetuando o KvAp). Neste estudo, também foi calculada a energia livre desta transição no equivalente ao sistema Mut-5. Neste caso, o valor foi de 7,16 kcal/mol, mais de 50 vezes maior que o excesso de energia livre devido ao acoplamento com o campo elétrico entre o Mut-5 e o Kv1.2. Mesmo considerando o limite superior do erro na medida do excesso de gating charge, estes valores continuam consideravelmente inferiores ao componente químico da energia livre do processo. É importante ressaltar que os valores obtidos por Schwaiger e colaboradores são apenas para a primeira etapa da desativação, e não para o processo completo. Já o excesso de *gating charge* medido neste estudo diz respeito a uma transição completa de ativação/desativação.

Diante do exposto, é possível inferir que as propriedades elétricas desses canais são robustas: elas dependem de arquiteturas proteicas específicas para existirem, mas são pouco sensíveis a variações de sequência e variações estruturais locais. Esta robustez também está relacionada com a integridade estrutural do domínio. Para modificar tais propriedades, é necessário que estes domínios sofram mudanças estruturais que inviabilizariam o seu funcionamento, como no caso das mutações que causam a formação de poros condutores de íons no interior dos domínios sensíveis a voltagem.^{55,98} Além disso, foi mostrado que a contribuição do componente elétrico para a energética de ativação/desativação dos canais é marginal, comparado com o componente químico. Consequentemente, toda a diversidade operacional dos diferentes domínios sensíveis voltagem^{90,99,100} é proveniente de modificações no componente químico da energia livre. Este resultado aumenta a relevância de estudos recentes que buscam quantificar variações de energia livre química nesses domínios a partir de curvas de ativação dos canais iônicos dependentes de voltagem.¹⁰¹

4.5. DOMÍNIO SENSÍVEL A VOLTAGEM IDEAL

Dado que domínios sensíveis a voltagem de espécies muito distantes evolutivamente (o Kv1.2 é um canal de rato, enquanto os canais NavAb e NavRh são bacterianos e o KvAp é de archea) apresentam propriedades elétricas e de hidratação semelhantes, pode-se assumir que tais propriedades sejam alvo de uma pressão seletiva. Dessa forma, os diferentes canais “buscam” geometrias que os aproximem de um conjunto de características ideais, que representam como um domínio sensível a voltagem maximamente eficiente deve ser. Os diferentes canais podem ser vistos como variações distribuídas em torno desse conjunto ideal, portanto, é esperado que a média das propriedades elétricas e de hidratação reflitam o perfil de um domínio sensível a voltagem maximamente eficiente.

Ao calcular a curva média do perfil de distância elétrica, a hipótese acima parece ser confirmada. A fração do potencial elétrico a que todos os resíduos básicos das hélices S4 de todos os canais estão acoplados parece ser muito bem descrita por uma curva mestra (Figura 35, A). Esta curva tem um máximo de crescimento no coordenada Z igual a zero, representando, portanto, um campo elétrico focalizado em relação à uma membrana pura (Figura 35, C). O perfil de hidratação (Figura 35, B) mostra as características chave para a formação deste campo elétrico. A hidratação deve ter a forma de uma ampulheta, ou seja, deve haver uma região desidratada (coordenada 0, neste caso) envolta por regiões de rápido aumento na quantidade de moléculas de água. Na faixa de -15 \AA a 15 \AA , há 50 moléculas de água neste perfil ideal.

Como a maquinaria elétrica dos membros da família de canais iônicos dependentes de voltagem são altamente eficientes, espera-se que os seus domínios sensíveis a voltagem tenham um comportamento semelhante ao da figura 35, diferindo apenas com relação às interações químicas entre os resíduos que os constituem. Neste estudo, esta hipótese foi validada para os canais cujas estruturas estão disponíveis até o momento. É importante que, à medida em que a estrutura tridimensional de novos canais forem resolvidas, a extensão desta hipótese seja testada, verificando a sua validade e extensão.

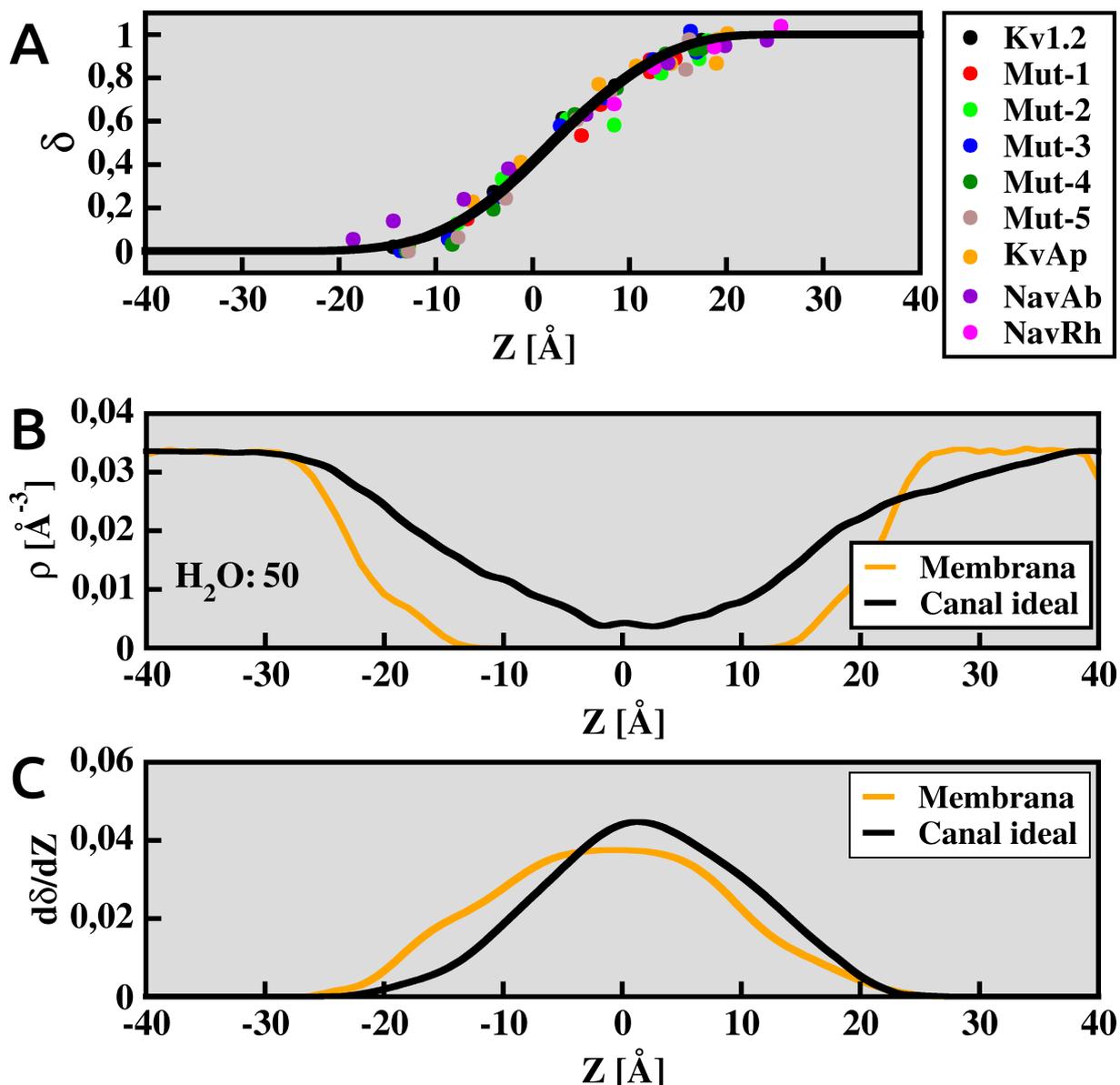


Figura 35. Propriedades elétricas e de hidratação de um domínio sensível a voltagem ideal. **(A)** Perfil de distância elétrica médio (curva preta) e distância elétrica do grupo carregado das argininas de todos os sistemas (círculos). **(B)** Perfil de hidratação médio (curva preta) em comparação com o perfil de uma membrana pura (curva laranja). A quantidade de moléculas de água no intervalo de -15 \AA a 15 \AA é especificada em "H₂O". **(D)** Derivada em relação ao eixo Z dos perfis de distância elétrica média (curva preta) e de uma membrana pura (curva laranja).

4.6. LIPÍDEOS MODIFICADOS

As membranas plasmáticas são compostas por diversos fosfolipídeos, os quais encontram-se distribuídos de forma desigual entre as suas duas camadas. Nos neurônios do sistema nervoso central, os fosfolipídeos mais abundantes são a fosfatidilcolina (POPC) e a esfingomiéline (SPGM), esta última predominando na camada extracelular da membrana. Tal composição/distribuição dos lipídeos na membrana é crucial para o correto funcionamento dos domínios sensíveis a

voltagem. Por exemplo, no veneno da aranha marrom *Loxosceles reclusa* há uma enzima (esfingomielinase C) que cliva a ligação química entre o grupo fosfato e a cauda hidrofóbica da esfingomielina, resultando em uma molécula sem o grupo negativo, importante na estabilização das argininas da hélice S4. Como este lipídeo encontra-se predominantemente na camada extracelular da membrana, a hélice S4 perde o seu ancoramento quando encontra-se no estado ativado. Dessa forma, o estado desativado é estabilizado e o canal tende a ficar fechado.^{58,102-104}

O formalismo do excesso de *gating charge* (ver tópico 4.4) permite avaliar a contribuição do componente elétrico para a energética de ativação/desativação não apenas entre canais mutantes, mas sim de quaisquer perturbações, como no caso dos canais embebidos em uma membrana quimicamente modificada. Assim, no presente estudo também foram avaliadas as diferenças no acoplamento com a voltagem para o Kv1.2 inserido em uma membrana contendo fosfatidilcolina na camada intracelular e esfingomielina na camada extracelular (sistema SPGM). O kv1.2 também foi inserido em uma membrana que seria o equivalente à primeira após as modificações da esfingomielinase C, ou seja, a camada extracelular é composta por ceramida (sistema POOCR).

Os perfis de distância elétrica e de hidratação do SPGM (Figura 36, A, B e C) ficaram muito semelhantes ao perfis do Kv1.2 (Figura 25). Há uma focalização do campo elétrico, traduzida na forma de um rápido crescimento da distância elétrica na altura da F233, que também corresponde ao ponto mais desidratado do domínio. A quantidade de águas entre -15 \AA e 15 \AA e a distribuição das argininas também ficaram muito próximas ao obtido para o Kv1.2. A independência conformacional do campo elétrico ficou mais evidente no SPGM (Figura 36, A), visto que os perfis de distância elétrica de ambas as conformações são praticamente os mesmos.

Assim como no SPGM, os dados obtidos para o POOCR (Figura 37) mantiveram-se próximos ao comportamento observado no Kv1.2. Os perfis de distância elétrica mostraram-se conformacionalmente independentes, a menos de um comportamento levemente linear entre 8 \AA e 15 \AA na conformação ativada (Figura 37, A). Esta linearização provavelmente decorreu da ausência do grupo altamente polar dos fosfolipídeos. Apesar disso, ainda foi possível observar um rápido crescimento do potencial na altura da F233, que mais uma vez correspondeu

ao ponto mais desidratado do domínio.

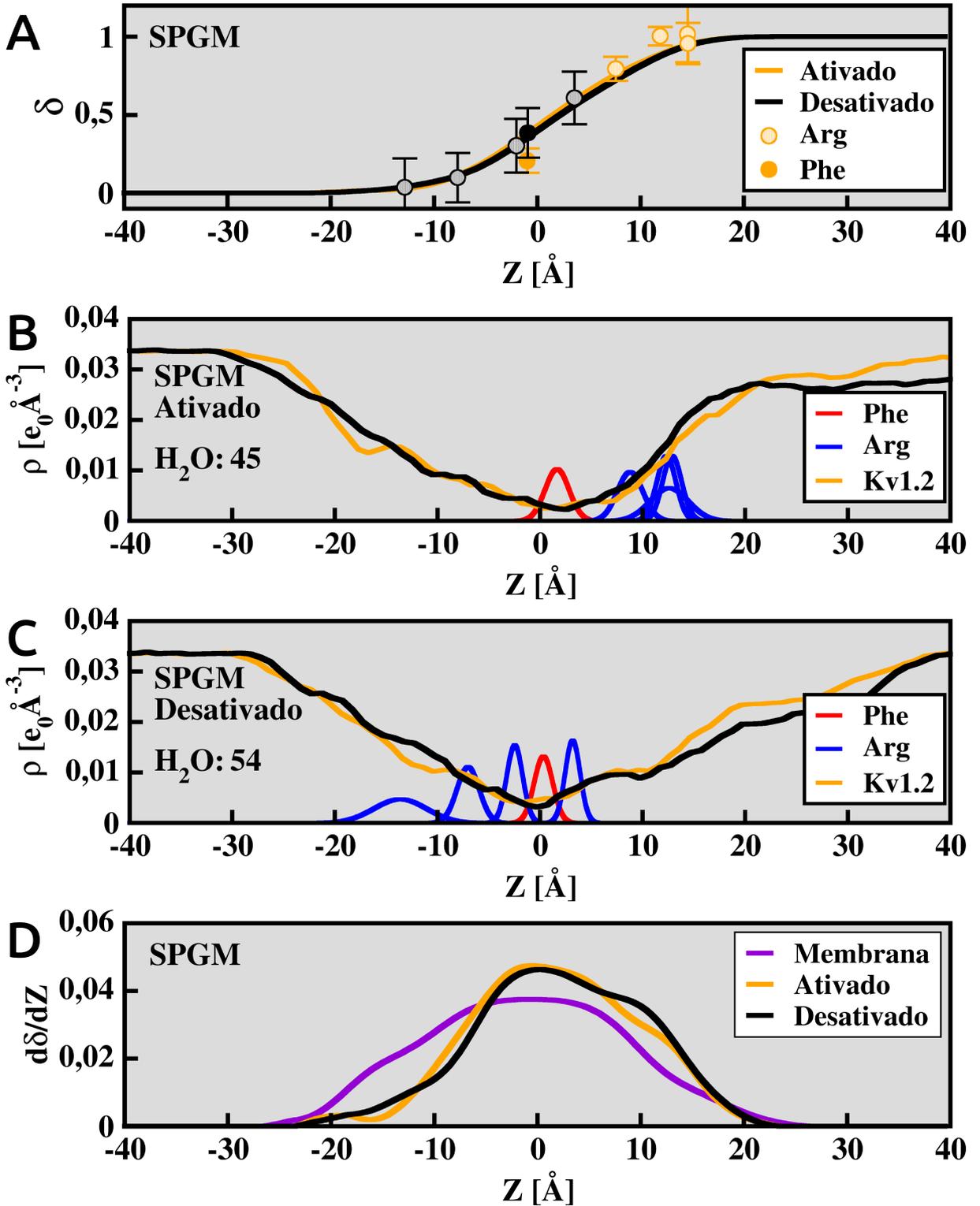


Figura 36. Propriedades elétricas e de hidratação do SPGM. Idem à figura 24.

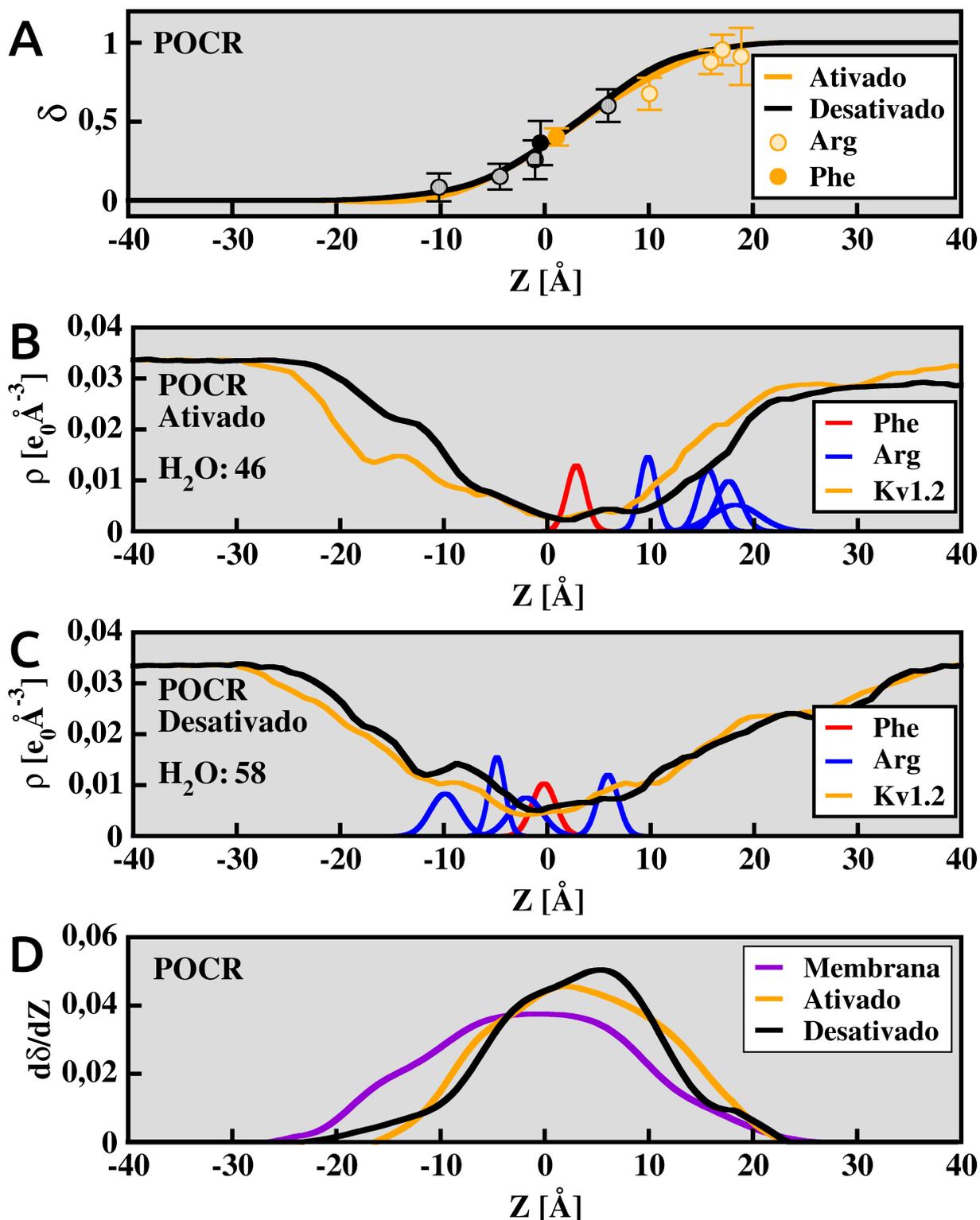


Figura 37. Propriedades elétricas e de hidratação do POOCR. Idem à figura 24.

Do ponto de vista da energética dos canais, as variações no acoplamento com a voltagem do SPGM e o POOCR resultaram em um excesso de energia livre de $0,38 \pm 1,20$ kcal/mol ($0,64 \pm 2,01$ kT) e $0,53 \pm 1,03$ kcal/mol ($0,89 \pm 1,74$ kT), respectivamente. Estes valores continuam muito abaixo dos obtidos para o

componente químico da energia livre de apenas uma das quatro transições dos processo de desativação, além de serem compatíveis que a faixa energética de oscilações térmicas ($< 1,2$ kcal/mol). Portanto, as alterações no funcionamento dos domínios sensíveis a voltagem quando estes encontram-se em lipídeos quimicamente modificados (como o POCR) são explicadas principalmente pelas interações químicas entre os resíduos dos domínios e o lipídeos que os circundam, e não por alterações no acoplamento do domínio com o campo elétrico transmembrânico.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou as propriedades de hidratação e do campo elétrico no *gating pore* de domínios sensíveis a voltagem. Foram empregadas simulações de dinâmica molecular em um conjunto abrangente de proteínas, contendo canais iônicos dependentes de voltagem seletivos a potássio e a sódio, além de canais mutantes extraídos da literatura.

As características do campo elétrico no interior do *gating pore* dos domínios sensíveis a voltagem mostrou-se preservada entre diferentes canais iônicos, como resultado da robustez de suas propriedades de hidratação diante de variações de sequência e estrutura. Isto levanta a hipótese de que a geometria da hidratação e o campo elétrico consequente dela estão sujeitos a uma pressão seletiva direta, sendo mais conservados que a própria sequência do domínio. Esta hipótese é evidenciada pela relação direta entre o campo elétrico do domínio e sua integridade estrutural. Para que mutações sejam capazes de remodelar consideravelmente este campo elétrico, é necessário alterar drasticamente a estrutura dos domínios, tornando-os defeituosos. Dessa forma, tais mutações estão comumente associadas a patologias genéticas, como é o caso das correntes ômega.

A robustez dessas propriedades também é traduzida na energética de ativação/desativação. O componente dependente de voltagem da energia livre desse processo é pouco alterado por pequenas (mutações) e grandes (canais de sódio) perturbações na sequência dos domínios sensíveis a voltagem, ou por perturbações no meio em que o domínio sensível a voltagem está inserido (lipídeos modificados). Assim, as alterações que essas perturbações causam no funcionamento destes domínios é devido a mudanças nas interações químicas entre os resíduos que o compõem, e não a alterações do campo elétrico ou acoplamento

dos resíduos e ele. Este dado aumenta a relevância de novos métodos experimentais que visam quantificar, baseados apenas em curvas de ativação dos canais, especificamente o componente químico da energética desses domínios. Como a contribuição do componente elétrico é pequeno, as medidas de excesso de energia livre realizadas por esses métodos são, de fato, uma boa aproximação do componente químico do excesso de energia livre.

6. PERSPECTIVAS

6.1. OUTROS CANAIS IÔNICOS

Recentemente diversos grupos tem se dedicado a elucidar a estrutura tridimensional de novas proteínas transmembrânicas, como os canais iônicos. Conseqüentemente, nos últimos anos observou-se um aumento do número de trabalhos que elucidaram a estrutura atômica de diferentes canais iônicos. Dentre essas novas estruturas, podemos citar um canal receptor de capsaicina (pimenta) de mamíferos sensível a temperatura (TRPV1).¹⁰⁵ Ele é interessante, pois é capaz de responder a diversos estímulos (como mudança de pH, temperatura e alterações mecânicas da membrana),^{106,107} mas apresenta uma geometria muito similar aos canais iônicos dependentes de voltagem. Mais especificamente, o seu domínio transmembrânico é um tetrâmero com cada subunidade contendo seis hélices distribuídas em um domínio do poro e em um domínio muito similar aos domínios sensíveis a voltagem. Em ambos os domínios, a disposição das hélices é a mesma encontrada nos canais dependentes de voltagem. Mas, diferentemente destes, o domínio conectado ao poro não apresenta uma grande quantidade de resíduos carregados no que seria o equivalente ao seu *gating pore*. Na verdade, esta região parece ser altamente hidrofóbica, contendo vários resíduos aromáticos. Curiosamente, na ausência de outros estímulos, este canal é modulado por variações no potencial transmembrânico.¹⁰⁸ Estes dados levantam uma série de questões: essa sensibilidade a voltagem é conferida pelo domínio composto pelas hélices S1 – S4? Como um domínio com um poro hidrofóbico seria capaz de perceber variações do campo elétrico? Assim como a arquitetura geral deste canal é similar a dos canais dependentes de voltagem, haveriam as mesmas características de hidratação e do campo elétrico neste domínio?

Uma série de novos estudos irão tentar responder estas perguntas, resultando, provavelmente, em um consenso sobre um mecanismo mais geral de sensibilidade a voltagem. Esta investigação necessariamente passará pela determinação das características do campo elétrico envolvido nessa maquinaria, e mostrará o quão abrangente são as propriedades observadas nos canais iônicos dependentes de voltagem. É esperado que as análises dessas propriedades nas novas estruturas de canais iônicos trarão novas perspectivas para o entendimento da sensibilidade a voltagem e evidenciarão a generalidade das conclusões aqui propostas.

6.2. ENERGÉTICA DA ATIVAÇÃO E MODELOS MINIMALISTAS

Uma boa compreensão da energética dos processos de ativação/desativação dos domínios sensíveis a voltagem permite a criação de modelos minimalistas capazes de prever a cinética de funcionamento desses domínios. Estes modelos podem ser usados tanto como guias para o desenho de novos experimentos quanto como ajuda na interpretação dos resultados obtidos. Com eles, também é possível diminuir a quantidade de experimentos necessários para compreender um problema.

O passo fundamental para a concepção de modelos minimalistas é a elucidação da energética do processo que eles descrevem. Isto pode ser obtido com o uso de simulações de dinâmica molecular aliadas a metodologias para cálculos de energia livre. Assim, é possível conhecer em nível atômico as barreiras energéticas presentes nesses processos e também as suas causas.

No caso da ativação/desativação de canais iônicos dependentes de voltagem, há dois componentes principais nesta energética: um elétrico e um químico. O presente estudo abordou a influência do componente elétrico e a sua pouca suscetibilidade a modificações tanto na sequência quanto na estrutura dos domínios sensíveis a voltagem.

O principal obstáculo, portanto, para a elaboração de modelos minimalistas está na quantificação do componente químico. Como mostrado aqui, a diversidade operacional de diferentes domínios sensíveis a voltagem está intimamente relacionada com o termo químico da energia livre desses domínios, ou seja, este componente é mais sensível a perturbações na sequência e na estrutura. Portanto, visando a criação de modelos minimalistas, é importante que os próximos estudos

foquem na quantificação da energia livre das etapas envolvidas na ativação/desativação e nas contribuições de cada resíduo para este processo, assim como realizado por Schwaiger e colaboradores.⁹¹ É também de grande relevância que tanto a energética quanto os mecanismos associados aos efeitos das mutações aqui estudadas sejam profundamente estudados, permitindo a racionalização de mutações capazes de modular os domínios sensíveis a voltagem.

De posse dessas informações e dos modelos minimalistas gerados com elas, será possível realizar avanços rápidos nesta área, permitindo, inclusive, a melhor compreensão de doenças genéticas relacionadas com canais iônicos dependentes de voltagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144, 710–711 (1939).
2. Curtis, H. J. & Cole, K. S. Membrane action potentials from the squid giant axon. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 15, 147–157 (1940).
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. *et al.* 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. Kullmann, D. M. & Hanna, M. G. Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. *The Lancet Neurology* 1, 157–166 (2002).
14. Sokolov, S., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 446, 76–78 (2007).
15. Goldin, A. L. Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 38–50 (1999).
16. Napolitano, C., Rivolta, I. & Priori, S. G. Cardiac Sodium Channel Diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41, (2003).
17. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* 309, 897–903 (2005).
18. Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 258, 1152–1155 (1992).
19. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66, 1061–1067 (1994).
20. MacKinnon, R. Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* 14, 889–892 (1995).
21. Treptow, W. & Klein, M. L. The Membrane-Bound State of K2P Potassium Channels. *Journal of the American Chemical Society* 132, 8145–8151 (2010).
22. Treptow, W., Maigret, B., Chipot, C. & Tarek, M. Coupled Motions between Pore and Voltage-Sensor Domains: A Model for Shaker B, a Voltage-Gated Potassium Channel. *Biophysical Journal* 87, 2365–2379 (2004).
23. LeMasurier, M., Heginbotham, L. & Miller, C. Kcsa It's a Potassium Channel. *The Journal of General Physiology* 118, 303–314 (2001).
24. Neyton, J. & Miller, C. Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *The Journal of General Physiology* 92, 549–567 (1988).
25. Nimigean, C. M. & Miller, C. Na⁺ block and permeation in a K⁺ channel of

- known structure. *The Journal of general physiology* 120, 323–335 (2002).
26. Treptow, W. & Tarek, M. Molecular Restraints in the Permeation Pathway of Ion Channels. *Biophysical Journal* 91, L26–L28 (2006).
 27. 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).
 28. Jensen, M. Ø. *et al.* Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* 336, 229–233 (2012).
 29. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. (Sinauer, 2001).
 30. 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).
 31. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* 16, 1169–1177 (1996).
 32. 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).
 33. Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* 31, 239–295 (1998).
 34. Catterall, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13–25 (2000).
 35. Liu, J. & Siegelbaum, S. A. Change of Pore Helix Conformational State upon Opening of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Neuron* 28, 899–909 (2000).
 36. 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).
 37. Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A. & MacKinnon, R. A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors. *Science* 328, 67–73 (2010).
 38. 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).
 39. Vargas, E. *et al.* An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *The Journal of*

- General Physiology* 140, 587–594 (2012).
40. 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).
 41. Catterall, W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67, 915–928 (2010).
 42. 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).
 43. 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).
 44. 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).
 45. Yarov-Yarovoy, V. *et al.* 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).
 46. Treptow, W. & Tarek, M. Environment of the Gating Charges in the Kv1.2 Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* 90, L64–L66 (2006).
 47. Jogini, V. & Roux, B. Dynamics of the Kv1.2 Voltage-Gated K⁺ Channel in a Membrane Environment. *Biophysical Journal* 93, 3070–3082 (2007).
 48. Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. Currents Related to Movement of the Gating Particles of the Sodium Channels. *Nature* 242, 459–461 (1973).
 49. 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).
 50. 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).
 51. Bezanilla, F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels.

- Physiological Reviews* 80, 555–592 (2000).
52. Horn, R. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. *Biochemistry* 39, 15653–15658 (2000).
 53. 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).
 54. Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiological Reviews* 79, 1317–1372 (1999).
 55. 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).
 56. 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).
 57. Ramu, Y., Xu, Y. & Lu, Z. Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* 442, 696–699 (2006).
 58. 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).
 59. Krepkiy, D. *et al.* Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* 462, 473–479 (2009).
 60. Bezanilla, F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 166–168 (2005).
 61. 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).
 62. Schwaiger, C. S. *et al.* The Free Energy Barrier for Arginine Gating Charge Translation Is Altered by Mutations in the Voltage Sensor Domain. *PLoS ONE* 7, e45880 (2012).
 63. Ahern, C. A. & Horn, R. Focused Electric Field across the Voltage Sensor of Potassium Channels. *Neuron* 48, 25–29 (2005).
 64. Starace, D. M. & Bezanilla, F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548–553 (2004).
 65. Asamoah, O. K., Wuskell, J. P., Loew, L. M. & Bezanilla, F. A Fluorometric Approach to Local Electric Field Measurements in a Voltage-Gated Ion Channel.

- Neuron* 37, 85–98 (2003).
66. Islas, L. D. & Sigworth, F. J. Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels. *The Journal of general physiology* 117, 69–89 (2001).
 67. Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33–41 (2003).
 68. Feller, S. E. & MacKerell, A. D. An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 7510–7515 (2000).
 69. MacKerell, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 3586–3616 (1998).
 70. Foloppe, N. & MacKerell, Jr., A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *Journal of Computational Chemistry* 21, 86–104 (2000).
 71. Vanommeslaeghe, K. *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* 31, 671–690 (2010).
 72. Schuler, L. D., Daura, X. & van Gunsteren, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry* 22, 1205–1218 (2001).
 73. Ponder, J. W. & Case, D. A. in *Advances in Protein Chemistry* (Valerie Daggett) Volume 66, 27–85 (Academic Press, 2003).
 74. Toukmaji, A. Y. & Board Jr., J. A. Ewald summation techniques in perspective: a survey. *Computer Physics Communications* 95, 73–92 (1996).
 75. Batcho, P. F., Case, D. A. & Schlick, T. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics* 115, 4003–4018 (2001).
 76. Verlet, L. Computer ‘Experiments’ on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* 159, 98–103 (1967).
 77. Frenkel, D. & Smit, B. *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. (Academic Press, 2001).
 78. Woodcock, L. V. Isothermal molecular dynamics calculations for liquid salts.

- Chemical Physics Letters* 10, 257–261 (1971).
79. Nosé, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics* 52, 255–268 (1984).
 80. Hoover, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A* 31, 1695–1697 (1985).
 81. Quigley, D. & Probert, M. I. J. Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *The Journal of Chemical Physics* 120, 11432–11441 (2004).
 82. 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).
 83. Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W. & Tarek, M. Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 5547–5550 (2008).
 84. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1781–1802 (2005).
 85. 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).
 86. Schow, E. V., Freites, J. A., Gogna, K., White, S. H. & Tobias, D. J. Down-State Model of the Voltage-Sensing Domain of a Potassium Channel. *Biophysical Journal* 98, 2857–2866 (2010).
 87. Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L. & Treptow, W. Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 21336–21341 (2012).
 88. Delemotte, L., Treptow, W., Klein, M. L. & Tarek, M. Effect of Sensor Domain Mutations on the Properties of Voltage-Gated Ion Channels: Molecular Dynamics Studies of the Potassium Channel Kv1.2. *Biophysical Journal* 99, L72–L74 (2010).
 89. Lacroix, J. J. & Bezanilla, F. Tuning the Voltage-Sensor Motion with a Single Residue. *Biophysical Journal* 103, L23–L25 (2012).
 90. Lacroix, J. J., Campos, F. V., Frezza, L. & Bezanilla, F. Molecular Bases for the Asynchronous Activation of Sodium and Potassium Channels Required for

Nerve Impulse Generation. *Neuron* 79, 651–657 (2013).

91. Schwaiger, C. S., Liin, S. I., Elinder, F. & Lindahl, E. The Conserved Phenylalanine in the K⁺ Channel Voltage-Sensor Domain Creates a Barrier with Unidirectional Effects. *Biophysical Journal* 104, 75–84 (2013).
92. Bernèche, S. & Roux, B. Molecular Dynamics of the KcsA K⁺ Channel in a Bilayer Membrane. *Biophysical Journal* 78, 2900–2917 (2000).
93. 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).
94. Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A. & Sigworth, F. J. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 255, 1712–1715 (1992).
95. Dong, H., Fiorin, G., Carnevale, V., Treptow, W. & Klein, M. L. Pore waters regulate ion permeation in a calcium release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17332–17337 (2013).
96. Schow, E. V., Freites, J. A., Nizkorodov, A., White, S. H. & Tobias, D. J. Coupling between the voltage-sensing and pore domains in a voltage-gated potassium channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 1726–1736 (2012).
97. Carnevale, V., Treptow, W. & Klein, M. L. Sodium Ion Binding Sites and Hydration in the Lumen of a Bacterial Ion Channel from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2, 2504–2508 (2011).
98. Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y. Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores. *Neuron* 45, 379–388 (2005).
99. Chanda, B. & Bezanilla, F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *The Journal of general physiology* 120, 629–645 (2002).
100. Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M. & Chanda, B. Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications* 4, 1350 (2013).
101. Chowdhury, S. & Chanda, B. Estimating the voltage-dependent free energy change of ion channels using the median voltage for activation. *The Journal of*

General Physiology 139, 3–17 (2012).

102. Schmidt, D., Jiang, Q.-X. & MacKinnon, R. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444, 775–779 (2006).
103. Koval, M. & Pagano, R. E. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1082, 113–125 (1991).
104. Zheng, H., Liu, W., Anderson, L. Y. & Jiang, Q.-X. Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nature Communications* 2, 250 (2011).
105. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112 (2013).
106. Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. An Introduction to Trp Channels. *Annual Review of Physiology* 68, 619–647 (2006).
107. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* 76, 387–417 (2007).
108. Nilius, B. *et al.* Gating of TRP channels: a voltage connection? *The Journal of Physiology* 567, 35–44 (2005).

8. ANEXO

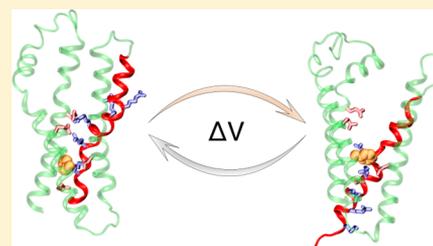
Artigo de revisão publicado durante o mestrado sobre as bases estruturais da ativação de canais catiônicos dependentes de voltagem elucidadas via simulações de dinâmica molecular.

Structural Basis for Activation of Voltage-Gated Cation Channels

Leticia Stock, Caio Souza, and Werner Treptow*

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

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



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

VGCCs make up a protein superfamily encompassing channels selective for Na⁺, Ca²⁺, and K⁺, namely, Nav, Cav, and Kv, respectively, and those that discriminate only the cationic nature (HCN). Given their relevance in essential physiological processes, these channels are encoded by a substantial number of genes in higher organisms. Mutations in these channel genes are implicated in several human diseases, termed channelopathies.² Examples of channelopathies include hyperexcitability disorders and inheritable diseases such as epilepsy, cardiac long-QT syndrome, and neuromuscular diseases. The comprehension of the structure–function interplay of VGCCs promises the development of new approaches for the treatment of channelopathies, particularly by targeting malfunctioning channels.³

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

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

FUNCTIONAL STUDIES AND ACTIVATION MODELS OF VGCCS

Ingenious patch–clamp experiments¹⁰ were critical in revealing the activation (opening) of VGCCs as the key voltage-dependent process by which the channel controls ionic conduction (Figure 1). At hyperpolarized potentials ($V < 0$), VGCCs are preferentially nonconductive resting (closed) structures. In response to membrane depolarization ($V > 0$), VGCCs switch on their active (open) state, exhibiting various levels of ionic conductance.¹¹ The molecular transition from the resting (closed) state to the active (open) state is known as the activation gating process of the channel. Although they are approximately 2 orders of magnitude smaller than ionic currents (G), the so-called “gating currents” were found to correspond to a fundamental observable of channel activation, given their strong voltage dependence and coupling to ionic currents. Since the pioneering work of Hodgkin and Huxley, gating currents and, more specifically, gating charges (Q), corresponding to the time integral of the gating current at a given voltage, have been measured for a variety of channels, as discussed extensively in refs 4 and 5. Typically, the activation process gives rise to a total Q of ~ 12 – 14 e.^{12–14}

Received: September 24, 2012

Revised: January 14, 2013

Published: January 14, 2013

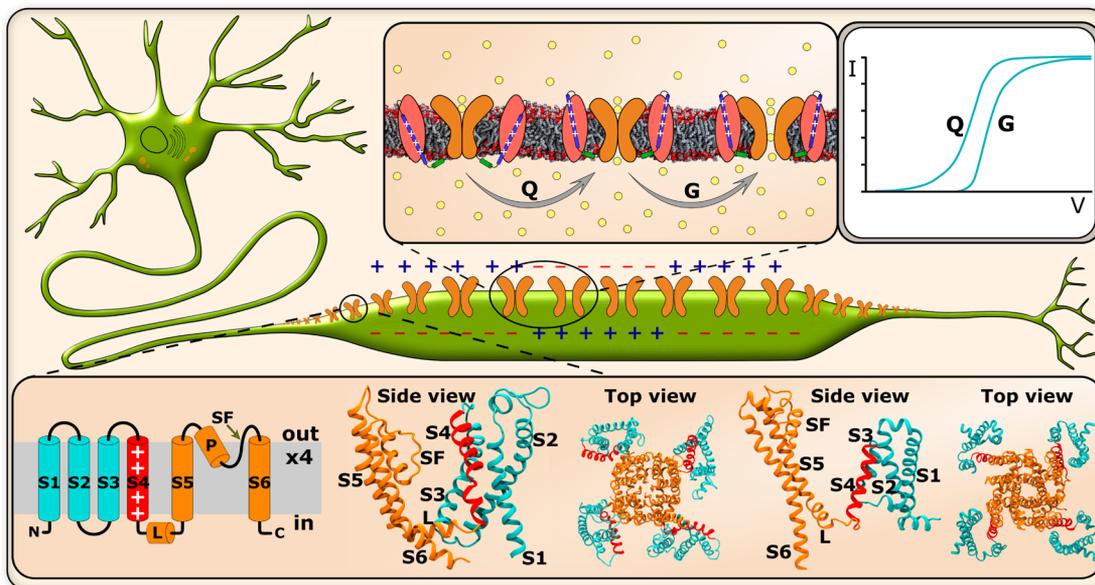


Figure 1. From macroscopic observables to atomistically detailed structures. Excitable cell, represented here by a neuron, with highlighted membrane-embedded VGCCs and their normalized measured gating (*Q*) and ionic (*G*) currents, which originated from reorganization of membrane-bound charged particles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

As revealed by cloning and sequencing experiments^{15,16} and also by recently determined X-ray crystallography structures (see below), VGCCs are either tetrameric or pseudotetrameric (Figure 1). The central pore forms from the arrangement of four transmembrane (TM) domains. Each subunit is composed of six TM helices, labeled S1–S6. Segments S5 and S6 constitute the central pore domain (PD) and delineate the pathway for the ionic current. A conserved motif between these segments forms the selectivity filter (SF), responsible for ion selectivity. Segments S1–S4, identified as the voltage sensor domain (VSD), connect to PD via an S4–S5 linker. In this helical bundle, S4 contains at least four highly conserved positively charged arginine amino acids, called hereafter R₁–R₄.

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

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

low-dielectric membrane.²⁸ The first mechanism termed the sliding-helix or helical-screw activation model was originally proposed by Guy and Seerharamulu²⁹ and Catterall³⁰ and later adapted by other groups.^{31,32} In the model, the S4 charged residues form sequential ion pairs with acidic residues on the neighboring S2 and S3 segments. Upon activation, the S4 helix goes through a large axial pistonlike motion (10–15 Å perpendicular to the membrane plane) crossing a focused, motionless electric field, while rotating ~180° to the left. In contrast, the mechanism described by the transporter model of Bezanilla proposes that hydration of S4 focuses the electric field within the VSD and activation involves reshaping this intensely focused field around S4 rather than extensively displacing the segment across the membrane.^{33–35} Under modifications of the local dielectric environment of S4, a relatively small TM movement of the S4 charges, accompanied by a rotation and a possible helical tilt, would suffice to account for the total gating charges.

In 2003, following the publication of the crystallographic structure of a Kv channel from the archaeon *Aeropyrum pernix*, KvAP,³⁶ another model for the activation of VGCCs was proposed. This model states that S4 and the C-terminal region of S3, designated S3b, form a “voltage-sensor paddle” that neighbors the intracellular surface when the channel is closed. Upon activation, this paddle would move a large distance of ~20 Å within the membrane. However, the model was refuted by many years of contradicting evidence, and it has now been admitted that the channel may have been crystallized in a non-native conformation. A revised version of the paddle model, based on the X-ray crystal of the “paddle chimera” Kv1.2–Kv2.1 channel,³⁷ proposes that the paddle moves ~15 Å relative to helices S1 and S2, rather than tilting to a horizontal position. Moreover, a concertina-like transition of S4 from α- to 3₁₀-helix as it passes through the narrowest region of the VSD is thought to prevent S4 charges from being exposed to the lipid membrane, discarding the need for helix twist.

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

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

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

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

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

where k_r and r_0 correspond to bond strength and chemical equilibrium position, respectively; k_θ and θ_0 are the angle force constant and its equilibrium value, respectively; $1/2 U_n$, n , and γ are the torsional barrier, its frequency and its phase, respectively; q_i is the partial electric charge of atom i ; ϵ is the dielectric constant; and, finally, R_{ij}^* and ε_{ij} match the parameters and van der Waals forces for the atomic pairs $\{ij\}$, respectively. In eq 1, bonded interactions are explicitly described by bond, angle, and dihedral terms.

Briefly, in the method, integration of Newton's equations is accomplished for every atom i with an infinitesimal time step δt on the order of 2 fs. Different schemes for controlling temperature and pressure can be applied to sample an NPT ensemble, as a way of simulating experimental conditions. An infinitesimal δt is required to ensure energy E conservation throughout the simulation and comes with the expense of a substantial computational time. As such, MD simulations are usually conducted with open source codes^{46,47} that scale to hundreds of processors on high-end parallel platforms for systems of any size, making it feasible to complete continuous calculations in a short time. At present, it is possible to perform hundreds of nanosecond time scale MD simulations for >200000-atom systems. Nonetheless, a special purpose machine, named "Anton", capable of simulating equally large systems on the millisecond time scale,⁴⁸ has been recently designed, expanding the range of issues potentially tackled by MD simulations.

MD Simulations of the Membrane-Bound Activated Structure of Kv1.2. One of the first contributions of MD applied to the study of Kv1.2 activation has derived from simulations intended for the investigation of the structure of the open activated state of the channel embedded in the membrane (Figure 2).^{49,50} In these studies, the simulation setup consisted of Kv1.2 embedded in a fully hydrated phospholipid bilayer. The protein was simulated either with or without the N-terminal tetramerization (T1) domain, to simplify the study system.⁵¹ In these simulations, the VSD was described as an hourglass-like structure in which water penetrates from the extra- and intracellular sides exposing S4 charges to the solvent, consistent with the earlier accessibility and histidine scanning measurements. MD simulations of the VSD alone⁵² in the membrane and NMR experiments further corroborated these results.⁵³ Specific salt bridge interactions between S4 arginines and neighboring VSD acidic residues and membrane–lipid heads were shown to stabilize the domain conformation.^{49,50} In detail, R₁–R₄ are exposed to the externally accessible extracellular milieu, forming salt bridges with the following binding sites: PO₄[−] outer membrane layer lipid headgroup and E¹⁸³, E²²⁶, and E²³⁶, respectively; the residues are located in segments S1, S2, and S2, respectively (Figure 3, top).

Electrostatic Calculations of Kv1.2 Embedded in the Membrane. The exquisite electric sensitivity of Kv1.2 relies on a number of intrinsic electrostatic properties related to the transport of gating charges during activation. In the context of MD simulations, investigation of such properties has relied primarily on the accurate computation of the electrostatic potential arising from the channel charges, ions, and dielectric properties of the environment. The initial efforts to electrostatically describe Kv1.2 and related channels⁵⁴ considered a continuum mean-field approximation based on the Poisson–Boltzmann (PB) equation, which assumes that the distribution of charges in the system is related to the electrostatic potential according to Boltzmann statistics

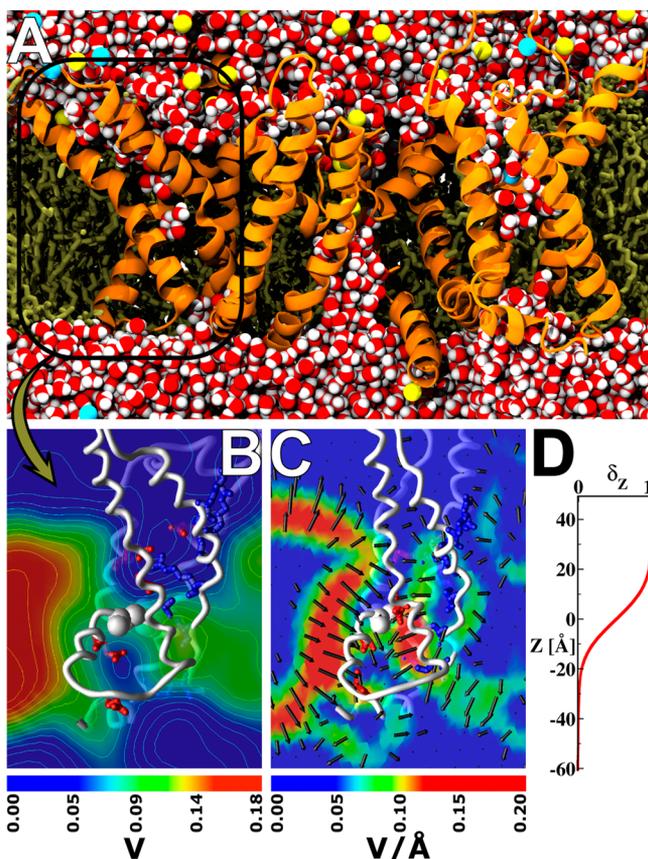


Figure 2. Structural details and electrostatic properties of Kv1.2 embedded in the membrane. (A) Typical atomistic MD simulation system of Kv1.2 embedded in a fully hydrated phospholipid bilayer. The system contains the channel (orange) with two K⁺ ions (yellow) in the selectivity filter, 390 lipid molecules (ochre), 36280 solvent water (red) molecules, and salt in solution (a total of ~150000 atoms). A black frame highlights the VSD and its hydration structure. (B) Two-dimensional electrostatic potential map depicting the VSD environment when no TM potential is applied to the system. Note that the aqueous (blue) environment of the gating charges (blue licorice) and acidic residues (red licorice) carried by the VSD (white ribbons) collapses the electrostatic potential around F²³³ (white spheres). (C) Two-dimensional map of the electric field within the activated VSD structure under a hyperpolarized TM potential. (D) Electrical distance profile (δ_z) through the VSD as a function of Z, the normal to the bilayer.

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

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

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

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

with a typical value of 0.25 \AA^{-1} , which improves efficiency for computation of eq 3.⁵⁵

In Kv1.2, the “catalytic center” comprises the amino acid triad of F²³³ (S2), E²³⁶ (S2), and D²⁵⁹ (S3) that appears to “catalyze” the transfer of each S4 basic residue across the membrane field, as indicated by recent mutations with natural and unnatural amino acids, electrophysiological recordings, and X-ray crystallography experiments.⁵⁶ In the activated VSD, F²³³ “plugs” the most constricted hydrophobic region of the construct and disconnects the internally and externally accessible water crevices. From calculations based on eqs 2 and 3, and applied to Kv1.2, it was demonstrated that a fundamental consequence of the morphology of these high-dielectric regions is to collapse the EP within the VSD, favoring the existence of a focused electric field around the S4 gating charges (Figure 2). Continuum electrostatic computations were initially applied to determine the dimensionless fraction of the membrane voltage V at position r (ϕ_{mp}), according to a modified Poisson–Boltzmann (PB-V) equation that accounts for the effect of transmembrane potential⁵⁰

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

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

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

that accounts for the degree of coupling between the local electrostatic potential ϕ_i at position r of the i th protein charge and the TM voltage difference V . ϕ_i was calculated as an average over an ensemble of n MD-generated system configurations; i.e., $\phi_i \equiv (1/n) \sum_{j=1}^n \Phi_j(r)$, where $\Phi_j(r)$ is the electrostatic potential, computed according to eq 3. Taken together, both types of calculations were required to show consistently that the membrane voltage profile across the VSD, $\phi_{mp}(z)$, is a sigmoidlike function with its steepest part spanning a narrow TM region (~ 10 – 15 \AA) in the vicinity of the phenyl center F²³³ (Figure 2). This major finding confirmed the existence of a focused electric field within the activated voltage sensor conformation of Kv1.2.

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

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

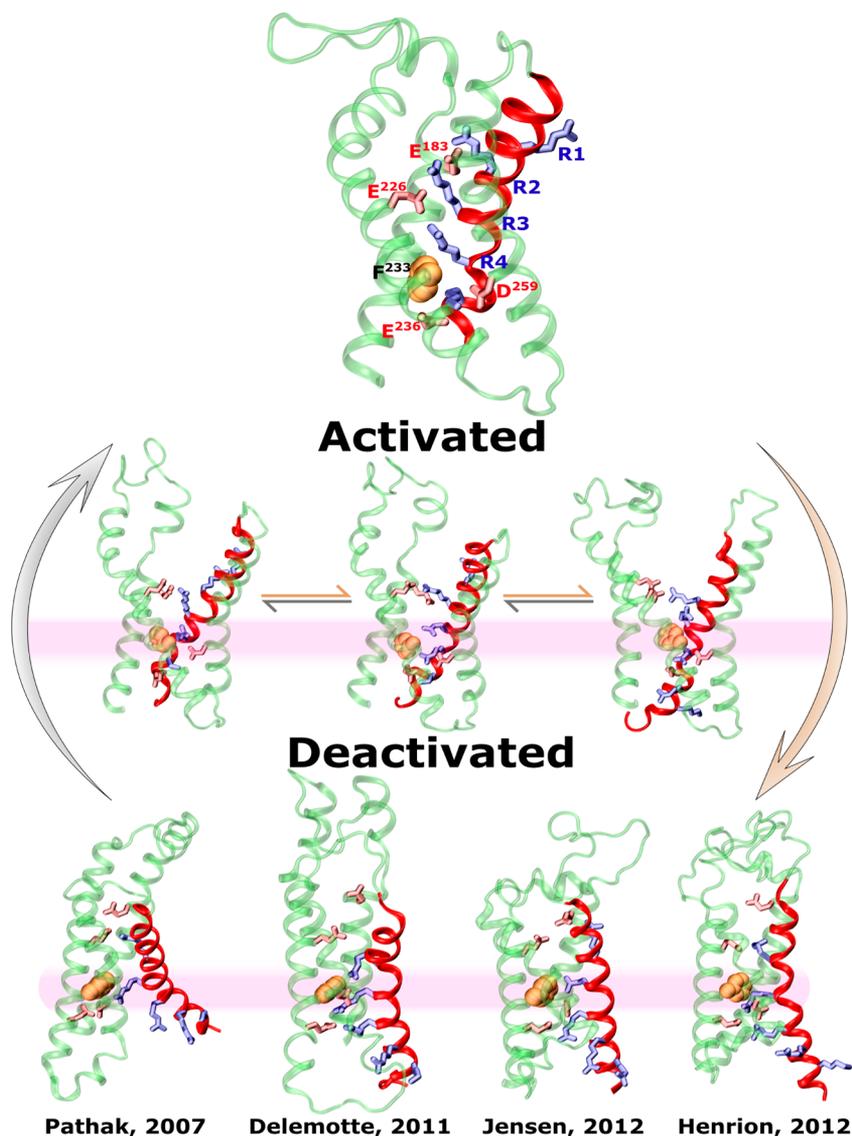


Figure 3. Molecular views of the activated and deactivated VSD structures. S1–S3 are shown as green helices, and S4 is shown as a red helix. The top structure is the activated VSD conformation from the membrane-equilibrated crystal structure shown in ref 38. The bottom structures are proposed models for the deactivated state. From left to right, the assessed S4 displacement throughout deactivation was of approximately 8, 15, 15, and 12 Å, respectively. Despite these differences, the measured gating charges for the models agree with the values of 12–14 e estimated for *Shaker*-like channels (see refs 12–14). The middle structures are three possible VSD intermediates along the activation pathway as described in ref 58. Notice the sliding motion involved in the process and the gradual crossing of arginines past F²³³.

applied constraints derived from fluorescence scans.⁶⁴ More recently, in another study employing Rosetta, Henrion et al. proposed a “C3” resting state model reached via constraints based on experimentally probed metal ion bridges (Cys–Cd²⁺–Cys and Cys–Cd²⁺–Glu/Asp) between VSD forming helices of the *Shaker* K⁺ channel.⁶⁵

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

biasing potential of the form $h[\zeta(t)] = 0.5 \times k[\lambda(x,t) - \zeta(t)]^2$ was used to pull down the S4 charge R₁ along the reaction coordinate $\lambda(x,t)$, corresponding to the TM direction. The biasing potential was coupled to the system with a force constant k of 5 kcal mol⁻¹ Å⁻², moving according to $\zeta(t) = \zeta(0) - vt$ with constant velocity $v = 0.5$ Å/ns. Note that in SMD one simulates a system with a perturbed Hamiltonian $H(x,t) = H_0(x) + h[\zeta(t)]$ in which $x = x(r,p)$ specifies the position r and momentum p of the system and $H_0(x)$ is the original unperturbed Hamiltonian. This formulation has proven to be very useful for exploring system dynamics along any given reaction coordinate, as considered in refs 67 and 68.

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

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

In these MD studies, two fundamentally different approaches, based on an applied external electric field or charge imbalance protocol, have been employed to reach physiologically relevant ranges of V . In a system composed of a membrane of thickness d and bathed by two disconnected bulk solutions, the experimentally applied voltage results in (i) an effective zero field in the bulk and (ii) a constant electrical field $E = V/d$ across the bilayer. For computer simulations, the electric field E , which will induce the desired range of V , is generated by applying a force F on every charged atom q_i of the system, in such a way that $F = q_i E$. The effectiveness of this method has been demonstrated in pioneering simulations of Kv channels.⁷³ It is noteworthy that, because of the use of periodic boundary conditions (PBC) in MD simulations, the applied field is rather a function of L_Z , the box size along Z ; i.e., $E = V/L_Z$.^{74,75} More recently, alternative approaches based on charge imbalance between two disconnected aqueous baths of explicit electrolytes have also been considered in simulation studies.^{76,77} In these schemes, the channel–membrane system is bathed with explicit Nernst–Planck ion concentrations and V is imposed on the system by displacing ions from one aqueous compartment to the other, while keeping the overall concentration of the bulk phases constant. Because the system behaves as a condenser, the generated net charge imbalance q_0 , between the upper and lower electrolytes, creates V according to the equation $V = q_0/AC$, in which A and C are the membrane area and capacitance, respectively. Because of the use of PBC, special simulation setups based on a twin lipid bilayer system with two bulk phases⁷⁶ or on a reduced system with a single bilayer and air–water interfaces on both sides of the membrane have been proposed to impose V via explicit charge imbalance.⁷⁷

In response to an applied voltage, MD simulations limited to time scales of 1 μs succeeded in providing insights into early transition events of the Kv1.2 voltage sensor.^{57,69,70,72} The applied voltages were scaled up to 6 times larger than physiological values (~ 100 mV) to promote a faster response of the system within accessible simulation time scales. Only recently, in one specific simulation, reaching extraordinarily long time scales⁷¹ within the range of hundreds of microseconds, the membrane-equilibrated structure of the Kv1.2–Kv2.1 paddle chimera³⁷ was shown to be fully deactivated spontaneously in the presence of an applied electric field. The authors of this study benefited from the special-purpose machine designed for high-speed MD simulations (see Molecular Dynamics Simulations). The deactivation process uncovered by this study followed a complex mechanism encompassing many VSD transitions occurring on characteristic time scales, as devised by previous kinetic models describing the time course of gating currents (Figure 3).^{78–82} As formerly found in another independent study,⁵⁸ in which the VSD deactivation was fully uncovered in a voltage-driven MD simulation combined with SMD, the mechanism was shown to proceed via a downward motion of the S4 basic residues

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

Atomistic Models of the VSD Resting State. There are at present several proposed molecular models for the physiologically relevant deactivated or resting closed state of Kv channels (Figure 3). In the model by Pathak et al.,⁶⁴ S4 is ~ 8 Å inwardly positioned relative to its up state; moreover, salt bridge interactions are thought to be formed between R_1 and E^{226} and between R_2 and E^{226} and D^{259} , and R_3 would be slightly below D^{259} while being exposed to intracellular water. The models of Delemotte et al.⁵⁸ and Jensen et al.⁷¹ show a larger vertical inward displacement of S4 relative to the up state, i.e., ~ 15 Å. In these models, R_1 is more deeply embedded within the VSD, satisfying very recent experiments showing its proximity to the catalytic center F^{233} (F^{290} in the Kv1.2–Kv2.1 chimera),⁸³ and arginines R_2 – R_4 are positioned beneath the phenyl center. The model of Delemotte et al. shows further the interaction of R_4 with the lipid PO_4^- headgroups. Finally, in the model by Henrion et al. (C3),⁶⁵ the up–down S4 displacement is ~ 12 Å, and the salt bridge pairs of R_1 and E^{283} (E^{226} in Kv1.2) and R_2 and E^{293} (E^{236} in Kv1.2) above and below the phenyl center, respectively, are said to be formed in the resting state. In the same study, another VSD conformation (C4) thought to be reached solely under enduring hyperpolarized pulses was further considered to match experimental data. In C4, S4 is more deeply located within the domain (~ 17 Å), favoring interactions between R_1 and E^{293} , all inward to F^{290} (F^{233} in Kv1.2). Importantly, the structures account for much of the experimental data as suggested by a recent analysis investigating the consensual nature of some of the available resting state models.⁸⁴

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

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

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

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

where q_0^{protein} and q_0^{ion} are the contributions of protein charges and ions, respectively, to the total charge imbalance $q_0(t) = q_0^{\text{protein}}(t) + q_0^{\text{ion}}(t)$, A is the membrane area, and C is the membrane capacitance, which is constant for the channel–membrane system⁸⁶ and amounts to $\sim 0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, as measured from MD simulations.⁵⁷ Accordingly, Q associated with two conformations of the channel, λ_1 and λ_2 , can be thus obtained as

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

where $q_0^{\text{protein}}(\lambda_1)$ and $q_0^{\text{protein}}(\lambda_2)$ are the charge imbalance due to protein charges in λ_1 and λ_2 , respectively. Finally, a more general and free energy-based approach, the “G-route”,⁸⁵ was also used in different publications to make concrete connections between the models and experiments.^{50,57,58,61,62,66,71,87,88} In this calculation, Q is linked to the microscopic state of the channel through

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

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

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

which represents the coupling of the i th channel charge q_i to the transmembrane potential. In practice, for a given conformation of the channel, $\phi_{\text{mp}}^\lambda(i)$ has been estimated following different strategies: (i) by means of a continuum electrostatic approximation based on the Poisson–Boltzmann equation modified to account for the effect of the transmembrane voltage (eq 4),^{50,61} (ii) by means of perturbation MD simulations as the charging free energy of q_i at two different voltages,^{66,71,85} and (iii) alternatively in the so-called “energetic formalism” approach,⁵⁷ a less time-costly computation of $\phi_{\text{mp}}^\lambda(i)$ that can also be obtained in the form of the “electrical distance” (eq 5).^{61,62} It is noteworthy that within the framework of the Ramo–Schokley theorem, Q could also be expressed as a function of starting and ending locations of all particles bearing charges q_i and $\phi_i^\lambda(r)$, which is another formulation identical to that following eqs 9 and 10.⁸⁹

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

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

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

Pore Opening and Coupling with the VSD. The structural studies of Kv channels indicate so far that pore opening involves transient hydration of the ionic conduction pathway, allowing the diffusion of ions throughout a hydrophilic environment, such as that encountered in the open gate of Kv1.2.³⁸ Here, sophisticated free energy calculations were integral to the study of the energetics of ion conduction through the channel. These calculations were made with the free energy profile or potential of mean force (PMF). The PMF along any given reaction coordinate λ is related to the equilibrium probability density $P(\lambda)$:

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

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

In one of the first approaches, Beckstein et al. have used umbrella sampling with the weighted histogram analysis method (WHAM) to estimate the $G(\lambda)$ profile for ion permeation through nanopore models with various radii.⁹⁷ In their approach, an external potential of the form $U(\lambda) = k/2(\lambda - \lambda_i)^2$, typically used in the method, was employed to efficiently bias the equilibrium distribution of the ion along the permeation pathway λ . In practice, this was done following a stratification approach by performing several independent simulations with the ion initially positioned at different λ_i values. From each of these simulations, the WHAM method was then used to reconstruct the unbiased density $P_i(\lambda)$ from the biased one, with the main goal of combining all $P_i(\lambda)$ values into the equilibrium probability density $P(\lambda)$, from which the PMF was computed according to eq 11. Later, using MD simulations and the adaptive-biasing-force (ABF) method,^{98,99} Treptow and Tarek estimated the PMF of ion conduction through the more complex activation gate of Kv1.2.¹⁰⁰ The method corresponds to the usual thermodynamic integration (TI) scheme (eq 12), except for the explicit dependence on the volume element in generalized coordinates.

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

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

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

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

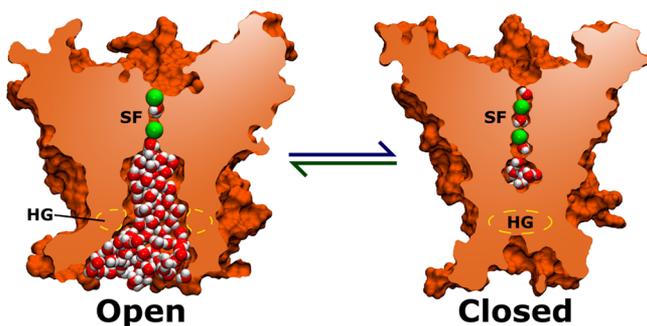


Figure 4. Pore narrowing and dehydration at the hydrophobic gate stop the ionic flow. The intrinsic pore gating mechanism acts via constriction of the hydrophobic gate and leads to dehydration of the ionic permeation pathway. Abbreviations: HG, hydrophobic gate; SF, selectivity filter.

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

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

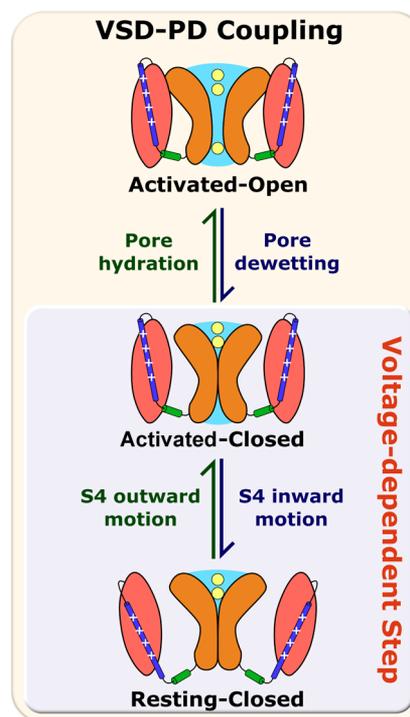


Figure 5. Schematic representation of the voltage sensor–pore coupling during K^+ channel gating, as revealed by the extremely long molecular dynamics simulation of ref 71.

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

■ FUTURE DIRECTIONS

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

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

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

On the basis of the analysis of disulfide locking of Cys double mutants, Catterall and co-workers have described an extensive set of state-dependent interactions between S4 charges and their countercharged residues in neighboring VSD segments for the orthologous NaChBac channel. By using the Rosetta method, authors have combined the set of interactions with structural data available for related channels, including the Kv1.2–Kv2.1 chimera and NavAb, to construct structural models of resting, intermediate, and activated states of NaChBac.²⁷ In another recent study, Amaral et al. considered two specific structures of Kv1.2, in the activated open⁴⁹ and resting closed⁵⁸ conformations, as guide templates to drive a series of biased and equilibrium MD simulations that aimed to explore the activation open pathway of NavAb.¹¹⁴ The biasing simulations were accomplished by means of target molecular dynamics (TMD),¹¹⁵ in which a selection of *N* atoms of the channel was guided to the reference structures by an applied potential $U_{\text{TMD}} = \frac{1}{2}(k/N)[\text{rmsd}(t) - \text{rmsd}^*(t)]^2$, with root-mean-square deviations $\text{rmsd}(t)$ and $\text{rmsd}^*(t)$ corresponding to instantaneous and target deviations between structures, respectively. Specifically, by using a force constant *k* of 4.5 kcal mol⁻¹ Å⁻² and a velocity of 0.25 Å/ns for the target deviation $\text{rmsd}^*(t)$, authors have sampled channel conformations potentially related to the resting closed and activated open states, a result strongly consistent with the recently published X-ray crystal structures of the orthologous channels NavRh⁸ and NavMs.⁹

In many instances, acquisition of structural data for different members of the superfamily of K⁺ and Na⁺ channels is highly desirable and actually required to extend our knowledge on other appealing topics. In this context, the X-ray structures and atomistic models available for distinct conformations of Kv1.2, NavAb, and other channels provide a valuable set of templates that can be further aided by comparative protein modeling to built-up models of structurally unknown channels. Consistent with this notion, homology models for the TM domain of K-Shaw¹¹⁶ and the VSD of the mammalian Nav1.4 channel¹¹⁷ have been successfully built and recently considered in studying the regulation and dysfunction of VGCCs (see below). The success of these approaches templated on Kv1.2 and NavAb relied on the significant level of sequence similarity shared by channels within the TM segments.

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

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

In this regard, much is still unanswered when it comes to structural details of the inactivation mechanisms of sodium channels. For the mammalian Nav channels, the fast inactivation has been shown to occur via a “hinged lid” mechanism performed by an intracellular inactivation gate that binds to the mouth of the pore, whereas the slow inactivation is much more poorly characterized.¹²¹ For bacterial Nav channels, which do not present the mammalian relative inactivation machinery, a variant inactivation is likely to derive from closure of the intracellular gate of the main pore,^{122–126} which seems to be similar to the hydrophobic gating mechanism described for Kv1.2. Indeed, the X-ray structures of NavAb⁷ and NavRh,⁸ featuring a closed PD, have recently been described as potentially inactivated structures of the channel. As previously highlighted, a detailed characterization of fully activated–inactivated structures, and even the pathway by which the transition is accomplished, are significant in terms of a more profound understanding of other fundamental topics such as conduction and channel modulation by ligands.

Channel Modulation. Another fascinating topic relates to the modulation of voltage-gated channels (VGCCs). This subject concerns the possibility of investigating how ligands such as divalent cations, peptides, free sulfhydryl modifiers, general and local anesthetics, and toxins may alter VGCC function. Indeed, a series of studies have already been, and are still being, conducted in this regard. For instance, in a recent study, alanine scanning experiments along with MD docking calculations succeeded in identifying binding sites for inhaled anesthetics both at the S4–S5 linker and at the activation gate of K-Shaw.¹¹⁶ Moreover, other structural studies were also conducted to investigate the functional and structural effects engendered by pore-blocking toxins¹²⁷ and gating modifier peptides¹²⁸ binding to VGCCs. In light of this scenario and the just released sodium channel structures, studies with these template structures are thought to be of great value for further investigations of binding of the ligand to VGCCs. In fact, the anesthetic sensitivity of NavAb-related channels, such as NaChBac,¹²⁹ suggests that NavAb is a useful model for studies of the action of general anesthetics. Furthermore, given the key role of Nav channels in generating the upstroke of the action potential, toxins act at six or more distinct receptor sites on these channels compared to only two sites on Kv.¹³⁰

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

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

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

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

Author Contributions

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

Funding

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

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Yang, N., George, A. L. J., and Horn, R. (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 19, 1319–1327.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (34) Starace, D. M., and Bezanilla, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548–553.
- (35) Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F., and Selvin, P. R. (2005) Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature* 436, 848–851.
- (36) Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33–41.
- (37) Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- (38) Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- (39) Ingólfsson, H. I., Li, Y., Vostrikov, V. V., Gu, H., Hinton, J. F., Koeppel, R. E., Roux, B., and Andersen, O. S. (2011) Gramicidin A backbone and side chain dynamics evaluated by molecular dynamics simulations and nuclear magnetic resonance experiments. I: Molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 115, 7417–7426.
- (40) Frenkel, D., and Smit, B. (2001) *Understanding Molecular Simulation, Second Edition: From Algorithms to Applications*, Academic Press, San Diego.
- (41) MacKerell, A. D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Jr., Evanseck, J., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., III, Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., and Karplus, M. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102, 3586–3616.
- (42) MacKerell, A. D., Jr., Feig, M., and Brooks, C. L., III (2004) Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 698–699.
- (43) Cornell, W., Cieplak, P., Bayly, C., Gould, L., Merz, K., Ferguson, D., Spellmeyer, D., Fox, T., Caldwell, J., and Kollman, P. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.
- (44) Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., and Van Gunsteren, W. F. (2011) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* 40, 843–856.
- (45) Ponder, J. W., and Case, D. A. (2003) Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* 66, 27–85.
- (46) Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
- (47) Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26, 1701–1718.
- (48) Shaw, D., Deneroff, M., Dror, R., Kuskin, J., Larson, R., Salmon, J., Young, C., Batson, B., Bowers, K., Chao, J., Eastwood, M., Gagliardo, J., Grossman, J., Ho, R., Ierardi, D., Kolossváry, I., Klepeis, J., Layman, T., McLeavey, C., Moraes, M., Mueller, R., Priest, E., Shan, Y., Spengler, J., Theobald, M., Towles, B., and Wang, S. (2007) Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation. *Proceedings of the 34th Annual International Symposium on Computer Architecture*, 1–12.
- (49) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 90, L64–L66.
- (50) Jogini, V., and Roux, B. (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys. J.* 93, 3070–3082.
- (51) Kobertz, W. R., and Miler, C. (1999) K⁺ channels lacking the “tetramerization” domain: Implications for pore structure. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1122–1125.
- (52) Sands, Z. A., and Sansom, M. S. (2007) How does a voltage sensor interact with a lipid bilayer? Simulations of a potassium channel domain. *Structure* 15, 235–244.
- (53) Krepiy, D., Mihailescu, M., Freites, J. A., Schow, E. V., Worcester, D. L., Gawrisch, K., Tobias, D. J., White, S. H., and Swartz, K. J. (2009) Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* 462, 473–479.
- (54) Jogini, V., and Roux, B. (2005) Electrostatics of the intracellular vestibule of K⁺ channels. *J. Mol. Biol.* 354, 272–288.
- (55) Aksimentiev, A., and Schulten, K. (2005) Imaging α -hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys. J.* 88, 3745–3761.
- (56) Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A., and MacKinnon, R. (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science* 328, 67–73.
- (57) Treptow, W., Tarek, M., and Klein, M. L. (2009) Initial response of the potassium channel voltage sensor to a transmembrane potential. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2107–2109.
- (58) Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6109–6114.
- (59) Stevens, C. F. (1978) Interactions between intrinsic membrane protein and electric field. An approach to studying nerve excitability. *Biophys. J.* 22, 295–306.
- (60) Sigworth, F. J. (1994) Voltage gating of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 27, 1–40.
- (61) Roux, B. (1997) Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophys. J.* 73, 2980–2989.
- (62) Islas, L. D., and Sigworth, F. J. (2001) Electrostatic and the gating pore of Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 117, 69–89.
- (63) Yarov-Yarovsky, V., Schonbrun, J., and Baker, D. (2006) Multipass membrane protein structure prediction using Rosetta. *Proteins* 62, 1010–1025.
- (64) Pathak, M. M., Yarov-Yarovsky, V., Agarwal, G., Roux, B., Barth, P., Kohout, S., Tombola, F., and Isacoff, E. Y. (2007) Closing in on the resting state of the shaker K⁺ channel. *Neuron* 56, 124–140.
- (65) Henrion, U., Renhorn, J., Börjesson, S. I., Nelson, E. M., Schwaiger, C. S., Bjelkmar, P., Wallner, B., Lindahl, E., and Elinder, F. (2012) Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, DOI:10.1073/pnas.1116938109.
- (66) Khalili-Araghi, F., Jogini, V., Yarov-Yarovsky, V., Tajkhorshid, E., Roux, B., and Schulten, K. (2010) Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel. *Biophys. J.* 98, 2189–2198.
- (67) Jensen, M. U., Park, S., Tajkhorshid, E., and Schulten, K. (2002) Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6731–6736.
- (68) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) K⁺ conduction in the selectivity filter of potassium channels is monitored by the charge distribution along their sequence. *Biophys. J.* 91, L81–L83.
- (69) Nishizawa, M., and Nishizawa, K. (2008) Molecular dynamics simulation of Kv channel voltage sensor helix in a lipid membrane with applied electric field. *Biophys. J.* 95, 1729–1744.
- (70) Bjelkmar, P., Niemelä, P. S., Vattulainen, I., and Lindahl, E. (2009) Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000289.
- (71) Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012) Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science* 336, 229–233.
- (72) Denning, E. J., Crozier, P. S., Sachs, J. N., and Woolf, T. B. (2009) From the gating charge response to pore domain movement: Initial motions of Kv1.2 dynamics under physiological voltage changes. *Mol. Membr. Biol.* 26, 397–421.
- (73) Treptow, W., Maigret, B., Chipot, C., and Tarek, M. (2004) Coupled motions between pore and voltage-sensor domains: A model for Shaker B, a voltage-gated potassium channel. *Biophys. J.* 87, 2365–2379.

- (74) Tarek, M. (2005) Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. J.* 88, 4045–4053.
- (75) Gumbart, J., Khalili-Araghi, F., Sotomayor, M., and Roux, B. (2012) Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 294–302.
- (76) Sachs, J. N., Crozier, P. S., and Woolf, T. B. (2004) Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. *J. Chem. Phys. B* 121, 10847–10851.
- (77) Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., and Tarek, M. (2008) Modeling membranes under a transmembrane potential. *J. Chem. Phys. B* 112, 5547–5550.
- (78) Fedida, D., and Hesketh, J. C. (2001) Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 75, 165–199.
- (79) Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103, 3121–362.
- (80) Schoppa, N. E., and Sigworth, F. J. (1998) Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channel. *J. Gen. Physiol.* 111, 313–342.
- (81) Loboda, A., and Armstrong, C. M. (2001) Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation. *Biophys. J.* 81, 905–916.
- (82) Sigg, D., Bezanilla, F., and Stefani, E. (2003) Fast gating in the Shaker K⁺ channel and the energy landscape of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7611–7615.
- (83) Lin, M. A., Hsieh, J.-Y., Mock, A. F., and Papazian, D. M. (2011) R1 in the Shaker S4 occupies the gating charge transfer center in the resting state. *J. Gen. Physiol.* 138, 155–163.
- (84) Vargas, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2011) In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron* 72, 713–720.
- (85) Roux, B. (2008) The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys. J.* 95, 4205–4216.
- (86) Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994) Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66, 996–1010.
- (87) Lecar, H., Larsson, H. P., and Grabe, M. (2003) Electrostatic model of S4 motion in voltage-gated ion channels. *Biophys. J.* 85, 2854–2864.
- (88) Grabe, M., Lecar, H., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2004) A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17640–17645.
- (89) Nonner, W., Peyser, A., Giles, D., and Eisenberg, B. (2004) Relating microscopic charge movement to macroscopic currents: The Ramo-Schockley Theorem applied to ion channels. *Biophys. J.* 87, 3716–3722.
- (90) Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349, 305–310.
- (91) Baker, O. S., Larsson, H. P., Mannuzzu, L. M., and Isacoff, E. Y. (1998) Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of S4 domain in K channels gating. *Neuron* 20, 1283–1294.
- (92) Tiwari-Woodruff, S. K., Lin, M. A., Schulteis, C. T., and Papazian, D. M. (2000) Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 115, 123–138.
- (93) Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. V., Patten, C. D., and Montal, M. (1995) Mutation of conserved negatively charged residues in the S2 and S3 transmembrane segments of a mammalian K⁺ channel selectively modulates channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9422–9426.
- (94) Vargas, E., Yarov-Yarovoy, V., Khalili-Araghi, F., Catterall, W. A., Klein, M. L., Tarek, M., Lindahl, E., Schulten, K., Perozo, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2012) An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* 140, 587–594.
- (95) Chipot, C., and Pohorille, A., Eds. (2007) *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*, Springer, Berlin.
- (96) Pohorille, A., Jarzynski, C., and Chipot, C. (2010) Good practices in free-energy calculations. *J. Phys. Chem. B* 114, 10235–10253.
- (97) Beckstein, O., Tai, K., and Sansom, M. S. (2004) Not ions alone: Barriers to ion permeation in nanopores and channels. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14694–14695.
- (98) Darve, E., and Pohorille, A. (2001) Calculating free energies using average force. *J. Chem. Phys.* 115, 9169–9183.
- (99) Hénin, J., and Chipot, C. (2004) Overcoming free energy barriers using unconstrained molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 121, 2904–2914.
- (100) Treptow, W., and Tarek, M. (2006) Molecular restraints in the permeation pathway of ion channels. *Biophys. J.* 91, L26–L28.
- (101) Nury, H., Poitevin, F., Renterghem, C. V., Changeux, J. P., Corringer, P. J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010) One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6275–6280.
- (102) Sotomayor, M., and Schulten, K. (2004) Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance MscS. *Biophys. J.* 87, 3050–3065.
- (103) Treptow, W., and Klein, M. L. (2010) The membrane-bound state of K2P potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8145–8151.
- (104) Barber, A. F., Carnevale, V., Raju, S. G., Amaral, C., Treptow, W., and Klein, M. L. (2012) Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2120–2125.
- (105) Jensen, M. U., Borhani, D. W., Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Jogini, V., Eastwood, M. P., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2010) Principles of conduction and hydrophobic gating in K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5833–5838.
- (106) Beckstein, O., and Sansom, M. S. P. (2004) The influence of geometry, surface character, and flexibility on the permeation of ions and water through biological pores. *Phys. Biol.* 1, 42–52.
- (107) Yifrach, O., and MacKinnon, R. (2002) Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K⁺ Channel. *Cell* 111, 231–239.
- (108) Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- (109) Van Slyke, A. C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C. R., and Claydon, T. W. (2010) Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K⁺ channels. *Biophys. J.* 99, 2841–2852.
- (110) Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011) Mode shift of the voltage sensors in Shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.
- (111) Meisel, E., Dvir, M., Haitin, Y., Giladi, M., Peretz, A., and Attali, B. (2012) KCNQ1 channels do not undergo concerted but sequential gating transitions in both the absence and the presence of KCNE1 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 34212–34224.
- (112) Kwan, D. C. H., Prole, D. L., and Yellen, G. (2012) Structural changes during HCN channel gating defined by high affinity metal bridges. *J. Gen. Physiol.* 140, 279–291.
- (113) Chakrapani, S., Sompornpisut, P., Intharathep, P., Roux, B., and Perozo, E. (2010) The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5435–5440.
- (114) Amaral, C., Carnevale, V., Klein, M. L., and Treptow, W. (2012) Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 21336–21341.
- (115) Schlitter, J., Engels, M., and Krüger, P. (1994) Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *J. Mol. Graphics* 12, 84–89.

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

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

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

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

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

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

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

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

(124) Zhao, Y., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2004) Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17873–17878.

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

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

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

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

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

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

(131) Delemotte, L., Treptow, W., Klein, M. L., and Tarek, M. (2010) Effect of sensor domain mutations on the properties of voltage-gated ion channels: Molecular dynamics studies of the potassium channel Kv1.2. *Biophys. J.* 99, L72–L74.

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

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

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