



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

โมเดลเชิงโครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักดิ์ไฟฟ้าของ
ช่องโซเดียมในแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอีพี
อาร์และการติดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะต่าง ๆ บนโปรตีน

โดย

พรเทพ สมพรพิสุทธิ์

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยหลักของโครงการวิจัยนี้ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ขอบคุณ ดร. สุกดา ชากราพานี ศาสตราจารย์เบนันัว รุทธ์ ศาสตราจารย์เอดูอาร์โด เปโรโซ นักวิจัยและลูกศิษย์ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ รวมทั้งภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ทำให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย โมเดลเชิงโครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของช่องโซเดียมในแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอีมพีอาร์และการติดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีน

ชื่อผู้วิจัย พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ ปทุมวดี อินทราเทพ สุดา ชากราพานี
เบนันว์ รุฐ และเอตุอาร์โต เปโรโซ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2553

บทคัดย่อ

กระบวนการการส่งสัญญาณเชิงกระแสไฟฟ้าของระบบประสาทหรือการตอบสนองสิ่งเร้าอาศัยการเปิดและปิดโพรงของโซเดียมและโพแทสเซียมแชนแนลซึ่งเป็นเมมเบรนโปรตีนเพื่อลำเลียงไอออนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ การลำเลียงไอออนด้วยโซเดียมแชนแนลชนิดทำงานตามความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างท่อนทรานสเมมเบรนในโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้ากับในโดเมนโพรง รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าที่แยกอิสระสามารถทำงานได้โดยไม่มีส่วนของโดเมนโพรง และยังพบในโปรตีนอื่นๆอีกที่ไม่ใช่ไอออนแชนแนล การศึกษาพื้นฐานทางโครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้ากลายเป็นหัวข้อวิจัยที่ได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวาง และที่สำคัญยังไม่มีรายงานโครงสร้างสามมิติของโซเดียมแชนแนลใดๆ เลย ในงานวิจัยนี้อาศัยกระบวนการออกแบบเชิงโมเลกุลและวิธี PaDSAR (Pseudoatom Driven Solvent Accessibility Refinement) เพื่อสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของช่องโซเดียมใน *Bacillus halodurans* โดยอาศัยข้อมูลทางโครงสร้างที่วัดด้วยเทคนิคอิเล็กตรอนพาราแมกเนติกส์เรโซแนนซ์และการติดสปีนที่ตำแหน่งต่างๆบนโซเดียมแชนแนลจำนวน 118 ตำแหน่ง ผลการเปรียบเทียบโครงสร้างที่ไต่กับโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของ KvAP และ Kv1.2-2.1 chimera แสดงให้เห็นความคล้ายคลึงทางโครงสร้างเทอร์เชียรี และอธิบายถึงสมบัติขั้นพื้นฐานของการทำงานที่อนุรักษ์ไว้ในโปรตีนตระกูลโซเดียมและโพแทสเซียมแชนแนล ข้อมูลทางพลวัตเชิงโมเลกุลพบว่าภายในโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้ามีร่องทางที่โมเลกุลน้ำสามารถเข้าไปได้ และพบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง D60-R119 ซึ่งสอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลการทดลองที่ระบุว่าการสร้างดังกล่าวเป็นโซเดียมแชนแนลที่อยู่ในสภาวะแอคติเวชัน

คำสำคัญ โดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า, โซเดียมแชนแนล, อีมพีอาร์, การติดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title	Structure models of voltage sensor domain of bacterial Na channel using accessibility data derived from EPR and site-directed spin labeling techniques
Name of the Investigators...	Pornthep Sompornpisut, Pathumwadee Intharathep, Sudha Chakrapani, Benoît Roux, and Eduardo Perozo
Year	September 2010

Abstracts

The transmission of electric signal in neurons or signal transduction in response to external stimuli require the open and closed of the conducting pore of sodium (Na^+) and potassium (K^+) channels, which are membrane proteins responsible for permeating ion across cell membrane. Ion permeation through voltage-gated Na^+ channels relies on the functional coupling between transmembrane segments in the voltage-sensor domain (VSD) and the pore domain (PD). It has been found that the isolated-VSD is structural independence and maintains function without PD. Moreover, VSDs are also discovered in non-ion channel proteins. The study of VSDs structural principles has become an intense research interest. Importantly, the three-dimension structure of Na^+ channels is not yet solved. In this study, molecular modeling and the PaDSAR approaches are employed to develop a structural model of a Na^+ channel from *Bacillus halodurans* (NaChBac) based on 118 structural data obtained from site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance techniques. Structure comparison of the obtained model revealed the tertiary fold of the NaChBac-VSD is similar to the x-ray structure of VSD in KvAP and Kv1.2-2.1 chimera. The model demonstrates that K^+ and Na^+ channels conserved the basic functional properties of VSD. The molecular dynamics results showed that the sensor domain forms a water crevice and hydrogen bonding between D60-R119. This is in good agreement with experimental data indicating the channel is in activated state.

Keywords: Voltage Sensing Domain, sodium channel, EPR, Site-Directed Spin Labeling,

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
รายการภาพประกอบ	vii
รายการสัญลักษณ์	ix
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ไอออนแชนแนล	1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา	3
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	7
2.1 ลำดับกรดอะมิโนและก่อนทรานสเมมเบรนของ NaChBac-VSD	7
2.2 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง	7
2.3 งานด้านการคำนวณและจำลองโมเดลเชิงโครงสร้าง	8
บทที่ 3 ผลการวิจัย	10
3.1 Sequence alignment และการวิเคราะห์ก่อนทรานสเมมเบรนของ NaChBac-VSD	10
3. 2 Assignment of pseudospin จากข้อมูล EPR ที่ได้จากการทดลอง	11
3.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR	13
3.4 การประเมินโครงสร้างด้วยวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล	14

บทที่ 4 การอภิปรายผล	16
บทที่ 5 ข้อสรุป	19
ข้อเสนอแนะ: งานวิจัยที่จะดำเนินต่อไป	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	22

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โดเมนทั้งสี่ ส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าและส่วนโพรงของโมเลกุลของ voltage-gated Na _v channels	2
รูปที่ 2 ปฏิกิริยาการติดสปีนระหว่างสาร Methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับโปรตีนที่มีกรดอะมิโนหมู่ -SH (cysteine)	3
รูปที่ 3 กระบวนการคำนวณโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธี PaDSAR	5
รูปที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโซเดียมแชนแนลบริเวณโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้า	10
รูปที่ 5 Multiplesequence alignment บริเวณ VSD ของโปแตสเซียมแชนแนล (MlotiK, KvAP, Kv1.2) กับโซเดียมแชนแนล (NaChBac)	10
รูปที่ 6 hydropathy plot และท่อนทรานสมเมมเบรนของ VSD ใน NaChbac	11
รูปที่ 7 ค่า mobility (ΔH_0^{-1}), O ₂ accessibility (ΠO_2) และ NiEDDA accessibility ($\Pi NiEDDA$) ของกรดอะมิโนที่บริเวณ VSD ของ NaChbac	12
รูปที่ 8 Molecular surface เปรียบเทียบกับเจดสีแสดงระดับค่า ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ $\Pi \square NiEDDA$ ที่ได้จากการทดลอง	13
รูปที่ 9 เปรียบเทียบโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChBac กับ Kv1.2-2.1 และ KvAP	14
รูปที่ 10 (ก) ค่า RMSD บริเวณ VSD ของ NaChbac เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น trajectory ของระบบได้จาก 10ns MD simulation ของระบบที่มีโปรตีน POPC และ TIP3P waters (ข) โครงสร้างของระบบที่ได้จาก MD snapshot	15

รูปที่ 11 กราฟระยะห่างแสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่าง R119-D60 ที่ได้จาก MD simulation	17
รูปที่ 12 แบบเสนอการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันในสถานะแอกติเวชัน และสถานะพักของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าในโซเดียมแชนแนล	18

รายการสัญลักษณ์

คำย่อ และสัญลักษณ์

TM	Transmembrane	ทรานสมเมมเบรน
VSD	Voltage-sensing domain	โดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า
PD	Pore domain	โดเมนโพรง
SDSL	Site-directed spin labeling	
EPR	Electron paramagnetic resonance	
ΔH_0^{-1}	mobility	
Π_{O_2}	Oxygen accessibility	
Π_{NiEDDA}	NiEDDA accessibility	
NiEDDA	nickel(II) ethylenediamine-N,N'-diacetate	
K _v channels	Voltage-gated potassium channels	
Na _v channels	Voltage-gated sodium channels	
NaChBac	Sodium channel from <i>Bacillus halodurans</i>	
KvAP	Potassium channel from <i>Aeropyrum pernix</i>	
Kv1.2-2.1	Chimeric potassium channel from <i>Rattus norvegicus</i>	
POPC	2-oleoyl-1-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	
POPG	2-oleoyl-1-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-glycerol	
PaDSAR	Pseudoatom Driven Solvent Accessibility Refinement	

บทที่ 1

บทนำ

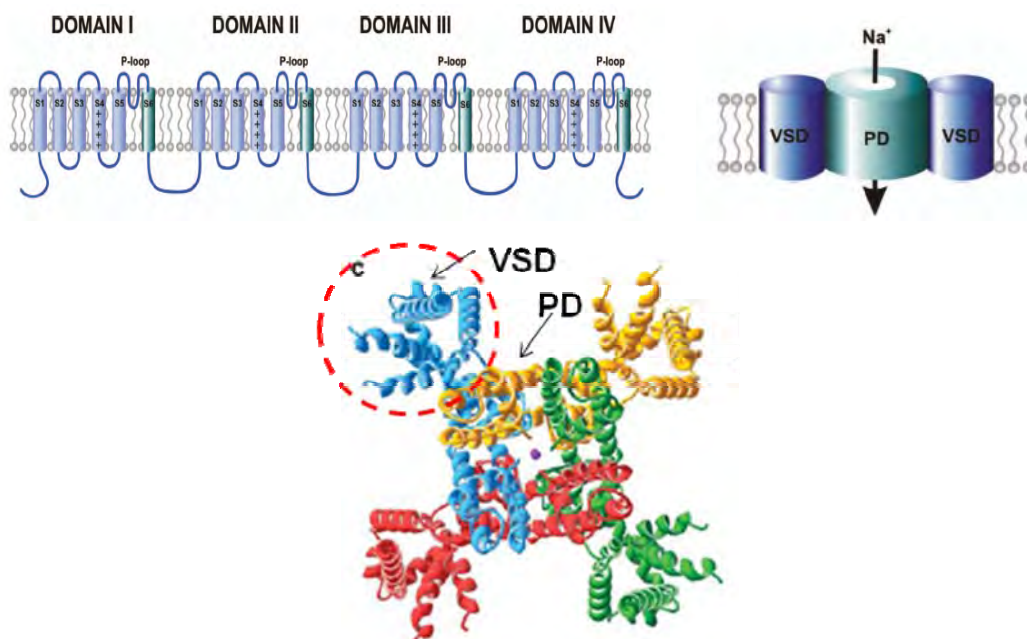
1.1 ไอออนแชนแนล

ไอออนแชนแนลเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ฝังอยู่ในพลาสมาเมมเบรนหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาท และยังพบในส่วนต่างๆ ของร่างกายและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ มีหน้าที่ที่สำคัญในการควบคุมปริมาณไอออนระหว่างนอกและในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลให้เหมาะสมต่อกระบวนการการทำงานของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในระบบประสาท (nervous system) ในการตอบสนองสิ่งเร้า เป็นต้น ไอออนแชนแนล เช่น โปแทสเซียมและโซเดียมแชนแนลทำหน้าที่สร้างความต่างศักย์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) เพื่อการกระจายสัญญาณทางไฟฟ้า (propagation of electric transmission) ของเซลล์ประสาทที่ถูกเร้า (excitable cell) การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไอออนแชนแนลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ การทำงานที่ผิดปกติของไอออนแชนแนลเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น Alzheimer, Parkinson, long QT syndrome ดังนั้น ไอออนแชนแนลบางชนิดจึงเป็นโมเลกุลเป้าหมายของยาที่ใช้ในปัจจุบัน ในด้านสาธารณสุขและด้านเกษตรกรรมไอออนแชนแนล เช่น โซเดียมแชนแนลเป็นเป้าหมายของยากำจัดแมลง นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอม (proteome) ของเชื้อโรคบางชนิด มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาชนิดใหม่แบบมุ่งเป้าไปที่ไอออนแชนแนล ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานในระดับโมเลกุลของไอออนแชนแนลจะนำไปสู่ข้อมูลทางประสาทวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่สำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว

ไอออนแชนแนลเป็นเมมเบรนโปรตีนที่ทำงานโดยการเปิด-ปิดทางผ่านของไอออนที่บริเวณเซลล์เมมเบรน โปรตีนตระกูลไอออนแชนแนลที่ทำงานโดยการรับรู้ศักย์ไฟฟ้า (voltage-gated ion channels) เช่น K_v และ Na_v channels เป็นโปรตีนเตตระเมอร์ โดยมีท่อนทรานสเมมเบรน transmembrane (TM) segments ที่ก่อโครงสร้างเป็นเกลียวอัลฟา (α -helix) ฝังอยู่ในชั้นเมมเบรน โพรงทางผ่านของไอออนเรียกว่า pore เกิดจากท่อนทรานสเมมเบรนของทั้งสี่มอนอเมอร์ประกอบรวมอยู่ด้วยกัน (รูปที่ 1)

ช่องโซเดียมหรือโซเดียมแชนแนลเป็นเมมเบรนโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ลำเลียงไอออนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์¹⁻² โซเดียมแชนแนลเป็นโปรตีนที่พบทั้งเซลล์โพแคริโอตและยูแคริโอต โครงสร้างของโซเดียมแชนแนลชนิดทำงานโดยศักย์ไฟฟ้า หรือ voltage-gated sodium (Na_v) channels ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรนจำนวน 6 ท่อนต่อหนึ่งมอนอเมอร์ โดยกำหนดชื่อแต่ละท่อนทรานสเมมเบรนว่า S1, S2, S3, S4, S5 และ S6 การลำเลียงไอออน

ด้วยโซเดียมแชนแนลชนิดทำงานตามความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างท่อนทรานสเมมเบรนในโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า (voltage sensor domain, VSD) กับในโดเมนโพรง (pore domain, PD) จากงานวิจัยที่ผ่านมาเป็นที่ทราบกันดีว่าท่อนทรานสเมมเบรนสี่ท่อนแรกคือ S1-S4 เป็นโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า โดยเฉพาะท่อนที่สี่ (S4) มีเอกลักษณ์พิเศษ กล่าวคือ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนประจุบวกคือ อาร์จินีน (arginine) อยู่หนาแน่นและวางตัวในตำแหน่งทุกๆ 3-4 เรสซิดิวซ์ เพื่อให้สอดคล้องกับลักษณะ periodicity ของโครงสร้างเกลียวอัลฟา S4 จึงเป็นท่อนทรานสเมมเบรนหลักในการรับรู้ความต่างศักย์ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (voltage sensor) สำหรับท่อนทรานสเมมเบรนที่ 5 และ 6 (S5-S6) เป็นโดเมนโพรง โดยเฉพาะท่อนที่ 6 ทั้งสี่ท่อน (ของแต่ละมอโนเมอร์) ประกอบด้วยกันเป็นโพรงทางผ่านของไอออน



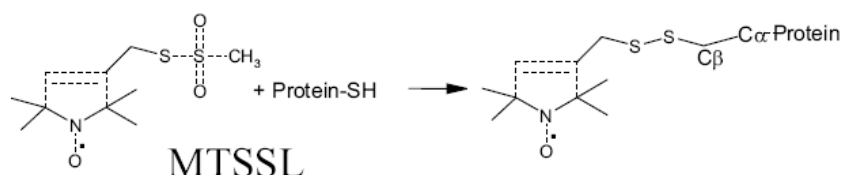
รูปที่ 1 โดเมนทั้งสี่ ส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าและส่วนโพรงของโมเลกุลของ **voltage-gated Na⁺ channels**

งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของไอออนแชนแนลเป็นงานที่มีนักวิจัยให้ความสนใจกันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้โครงสร้างจะนำไปสู่คำอธิบายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานระดับโมเลกุล อาทิเช่น เหตุใดที่ทำให้ไอออนแชนแนลมีความจำเพาะต่อชนิดของไอออน ส่วนโพรงและ gate มีลักษณะอย่างไรจึงสามารถเป็นทางผ่านของไอออนได้ ไอออนแชนแนลสภาวะปิดและเปิดมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างไร การทำงานของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าเกี่ยวข้องกับการทำงานของส่วนโพรงอย่างไร เป็นต้น คำตอบที่ได้จะนำไปสู่ความรู้พื้นฐานที่สำคัญทางประสาทวิทยาศาสตร์ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในวงการแพทย์

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครงสร้างสามมิติของโซเดียมแซนแนลทั้งบริเวณที่เป็น VSD และ PD ในรายงานวิจัยนี้ ได้สร้างโมเดลเชิงโครงสร้างของบริเวณโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโมเลกุลของโซเดียมแซนแนลจาก *Bacillus halodurans* (NaChBac) โดยใช้โครงสร้างของโพแทสเซียมแซนแนล ได้แก่ KvAP และ Kv1.2-2.1 เป็นต้นแบบ โมเดลที่ได้ถูกปรับให้สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคอีพีอาร์และการติดสปินที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีน (Site-directed spin labeling/Electron paramagnetic resonance, SDSL/EPR) โดยอาศัยการคำนวณด้วยวิธีที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นเรียกว่า PaDSAR และการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulations)

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา

เทคนิค SDSL/EPR ใช้หลักการการติดอนุมูลอิสระ (free radical) หรือเรียกสั้นๆ ว่า สปิน ให้กับโมเลกุลเป้าหมาย เช่น โปรตีน โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสปินรีเอเจนต์หรือสารที่มีอนุมูลอิสระที่เสถียร (รูปที่ 2) เช่น methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับโปรตีนที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl, -SH) นั่นคือ side chain ของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) แล้วได้โปรตีนที่มีสปินติดอยู่บริเวณตำแหน่งซิสเทอีนนั้น เมื่อนำไปบันทึกด้วยเทคนิค EPR จะได้พีคของสปินนั้น โดยสปินจะทำหน้าที่เป็นโพรบ (probe) หรือตัวรายงานสภาพแวดล้อม (environmental reporter) นักวิจัยคนสำคัญในลำดับแรกๆ ของการนำเทคนิค SDSL/EPR สำหรับใช้ศึกษาโครงสร้างของโปรตีน คือ W. Hubbell³⁻⁴



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาการติดสปินระหว่างสาร Methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับโปรตีนที่มีกรดอะมิโนหมู่ -SH (cysteine)

เทคนิค SDSL/EPR สามารถให้ข้อมูลทางโครงสร้าง 3 ประเภท คือ 1) ข้อมูลแสดงระดับพลวัตของ side chain ที่มีสปินติดอยู่ โดยคำนวณส่วนกลับของความกว้างของพีคกลางที่ได้จากการอนุพันธ์ของสเปกตรัมดูดกลืนของเทคนิค EPR โดยเรียกว่าค่า mobility (ΔH_0^{-1}) 2) ค่าความสามารถของสปินที่จะเกิดอันตรกิริยากับ paramagnetic reagent เรียกว่าค่า accessibility กระบวนการนี้มีการเติม paramagnetic reagent 2 ชนิด คือโมเลกุลออกซิเจน

(O₂) และสารละลายเชิงซ้อนของ nickel(II) ethylenediamine-N,N'-diacetate (NiEDDA) แล้ววัดค่า relaxation time ของสปินที่เปลี่ยนแปลงไป ค่า accessibility ที่ได้จากการเติม O₂ เรียกว่า oxygen accessibility (ΠO_2) และค่า accessibility ที่ได้จากการเติม NiEDDA เรียกว่า NiEDDA accessibility ΠO_2 ใช้เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งสปินที่อยู่ภายในเมมเบรน (lipid-exposed indicator) เนื่องจาก O₂ ซึมแพร่กระจายในเมมเบรนได้ ในขณะที่ $\Pi NiEDDA$ ใช้เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งสปินที่อยู่ภายนอกเมมเบรน เนื่องจาก NiEDDA ซึมผ่านเมมเบรนไม่ได้ ดังนั้นค่า ΠO_2 และ $\Pi NiEDDA$ เป็นข้อมูลที่บอกสภาพแวดล้อมของกรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ (ที่ติดสปินไว้) ว่าอยู่ในชั้นเมมเบรนหรือไม่ นอกจากนี้ ยังใช้บอกโครงสร้าง α -helix หรือ β -sheet และ 3) ค่าระยะทางระหว่างสปินที่ติดบนกรดอะมิโนไว้อย่างน้อยสองตำแหน่ง และเกิด spin-spin coupling

อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดหลายประการที่ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลทั้งสามชนิดมาใช้หาโครงสร้างโดยตรงเหมือนกับเทคนิคผลึกศาสตร์รังสีเอกซ์ (x-ray crystallography) หรือ นิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์ (NMR) ปัญหาที่สำคัญ คือ ความไม่แน่นอนของตำแหน่งสปิน ให้ความละเอียดระดับปานกลางจนถึงต่ำ และจำนวนข้อมูลที่จะนำมาใช้เป็น structure restraints มีน้อยกว่าจำนวนข้อมูลที่จะได้จากเทคนิค NMR อยู่หลายเท่า การที่มีจำนวน restraint ไม่เพียงพอจะทำให้การคำนวณโครงสร้างของโปรตีนมีความคลาดเคลื่อนมาก

นอกจาก W. Hubbell แล้ว ยังมีนักวิจัยอีกหลายคนที่น่าเทคนิค SDSL/EPR ไปใช้ศึกษาโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีน นักวิจัยที่สำคัญในการได้แก่ H. Mchaourab, Altenbach C, D. Cafiso และ E. Perozo โดยเฉพาะ E. Perozo ให้ความสนใจเมมเบรนโปรตีนในกลุ่มโพแทสเซียมแชนแนล ในปี ค.ศ. 1998 E. Perozo ใช้เทคนิค SDSL/EPR เสนอ structure architecture ของ K channel จาก *Streptomyces lividans* (KcsA) ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้าง x-ray ของ KcsA ที่รายงานไว้ในปีเดียวกัน⁵⁻⁶ ต่อมา Perozo มีความพยายามในการพัฒนากระบวนการในการคำนวณโครงสร้างของไอออนแชนแนลจากข้อมูล SDSL/EPR ในปี ค.ศ. 2001 Perozo และคณะใช้วิธี ReDCAT⁷ โดยนำคำนวณโครงสร้างของ inner transmembrane segments ใน open state⁸ ของ KcsA โดยอาศัยโครงสร้าง x-ray ใน close state ของ KcsA⁶ เป็นโครงสร้างเริ่มต้นและ distance restraints จาก spin-spin dipolar coupling ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Perozo และคณะใช้วิธี ReDCAT ที่ปรับปรุงโดยเพิ่มการคำนวณค่า solvent accessible surface area เป็น structure restraint อีกชนิดเพื่อหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ mechanosensitive ion channels of large conductance (MscL) จากสภาวะปิด ไปสู่สภาวะอินเทอร์มีเดียตและสภาวะปิดอย่างสมบูรณ์⁹

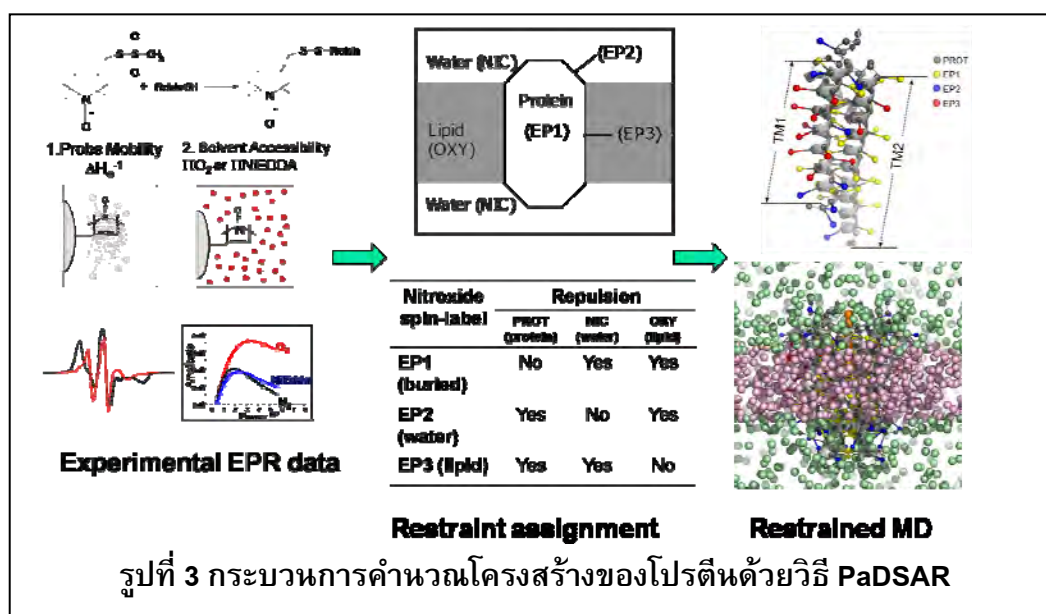
อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญของการคำนวณด้วยวิธี ReDCAT คือ 1) ข้อมูลโครงสร้างถูกสร้างตามระบบกริดหรือ grid search system หากระบบมี degree of freedom มาก จะทำ

ให้ไม่สามารถตรวจหาได้ทุกโครงสร้าง ซึ่งปัญหานี้เรียกว่า combinatorial explosion problem และ 2) การเคลื่อนโมเลกุลจะเป็นแบบแข็งเกร็ง (rigid-body transformation) ดังนั้นไม่สามารถใช้ได้กับโมเลกุลไอออนแซนแนลที่เปลี่ยนแปลงแบบยืดหยุ่นจาก close state ไปสู่ open state

ดังนั้นในปี ค.ศ. 2008 Perozo และคณะได้เสนอวิธีใหม่เรียกว่า PaDSAR (Pseudoatom Driven Solvent Accessibility Refinement)¹⁰ วิธีนี้สร้างอะตอมเสมือน (pseudoatom) 2 ชนิด คือ pseudospin และ pseudoatom environment และใช้อันตรกิริยาระหว่างอะตอมเสมือนทั้งสองชนิดเป็นตัวแปรหรือ restraint ชนิดหนึ่งในการคำนวณหาโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธีพลวัตเชิงโมเลกุล

Pseudospin จะติดอยู่บนโครงสร้างของโปรตีน ในขณะที่ pseudoatom environment จะใช้แทนสภาพแวดล้อมของโปรตีน pseudospin มี 3 ชนิด คือ ชนิด water-exposed (EP2), lipid-exposed (EP3) และ buried pseudospin (EP1) ดังรูปที่ 3 การระบุชนิดของ pseudospin พิจารณาจากค่า ΠO_2 และ $\Pi NIEDDA$ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งของกรดอะมิโนว่าควรจะอยู่ในเมมเบรน หรือนอกเมมเบรน หรือฝังอยู่ในโปรตีน ส่วน pseudoatom environment มี 3 ชนิด เช่นกัน คือ 1) OXY ใช้แทนโมเลกุล O_2 ในบริเวณลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) 2) NIC ใช้แทน NIEDDA อยู่นอก bilayer และ 3) PROT ในแทนส่วน backbone ของโปรตีน

การคำนวณหาโครงสร้างใช้วิธี molecular dynamics (MD) simulation ในระหว่าง simulation พลังงานอันตรกิริยาระหว่าง pseudospin และ pseudoatom environment เป็นเสมือน restraint ที่ใช้ในการคำนวณโครงสร้าง



วิธี PaDSAR นำไปทดสอบโดยการคำนวณโครงสร้างในสภาพ unfolded structure ของ KcsA และถูกนำไปใช้เพื่อแก้ไขโครงสร้างรังสีเอ็กซ์บริเวณ N-terminal domain ของ mechanosensitive channels of small conductance¹¹

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครงสร้างสามมิติของโซเดียมแชนแนลใดๆ เลย ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างบริเวณโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโซเดียมแชนแนล แต่มีงานวิจัยนำเสนอโมเดลเชิงโครงสร้างของโซเดียมแชนแนลด้วยวิธี molecular modeling โดยอาศัยข้อมูลโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ K_v channel ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น KvAP¹⁵, Kv1.2-2.1 chimera¹⁶ จากรายงานการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโพแทสเซียมแชนแนลโดย Perozo และคณะ พบว่าบริเวณ VSD สามารถทำงานได้โดยปราศจากส่วนของ pore domain¹² และพบในโปรตีนอื่นๆ ด้วย จึงเสนอว่าส่วน VSD น่าจะเป็นชิ้นส่วนพื้นฐานของการทำงานของโปรตีน ในปี 2009 Guy และคณะวิจัยที่ National Institutes of Health เสนอ homology model ที่บริเวณโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโซเดียมแชนแนลจาก *Bacillus halodurans* (NaChBac) ในสภาวะปิดและเปิดโดยอาศัยเทคนิค sequence alignment กับ KvAP และ Kv1.2/2.1 chimera แม้ว่าโมเดลดังกล่าวจะสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิค LRET (Luminescence resonance energy transfer)¹³ แต่พบว่ามีจุดบกพร่องอยู่ และบางส่วนขัดแย้งกับผลของ

SDSL/EPR

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 ลำดับกรดอะมิโนและท่อนทรานสเมมเบรนของ NaChBac-VSD

การศึกษานี้เลือกโซเดียมแซนแนลชนิดรับรู้ศักย์ไฟฟ้าจาก *Bacillus halodurans* (NaChBac) เป็นตัวอย่าง เพราะพิจารณาจากความซับซ้อนและความเป็นไปได้ในการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ และเป็นโปรตีนตัวเลือกหลักของกลุ่มโซเดียมแซนแนลที่นักวิจัยมักใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงาน NaChbac เป็นโปรตีนโฮมอเตตระเมอร์ (homotetramer) โดยแต่ละมอนอเมอร์ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรนจำนวน 6 ท่อน คือ S1, S2, S3, S4, S5 และ S6 โดยได้เลือกศึกษาบริเวณ S1-S4 ซึ่งเป็นโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของ NaChbac

ลำดับกรดอะมิโนของ NaChbac สามารถโหลดได้จากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) การระบุโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า (S1-S4) และส่วนท่อนทรานสเมมเบรนของ NaChbac อาศัยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโพแทสเซียมแซนแนล KvAP และ Kv1.2-2.1 ด้วยวิธี sequence alignment การวิเคราะห์ hydrophathy และจากรายงานเกี่ยวกับ NaChBac ที่ผ่านมา

2.2 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง

กระบวนการเตรียมโปรตีน ทำให้บริสุทธิ์และการติดสปีนให้กับโปรตีนดำเนินการตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้ว¹⁴ การเตรียมโปรตีน NaChBac บริเวณ VSD (ครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ Q17-S145) โดยการแสดงออกใน E.Coli SG-13 cells โปรตีนถูกแยกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาทอกราฟีโดยใช้ decylmaltoside เป็น stationary phase การติดสปีนโดยเติม methanethiosulfonate แล้วโปรตีนที่ติดสปีนจะผ่านกระบวนการ refolding ในลิพิดผสมระหว่าง POPC:POPG

ในกระบวนการการติดสปีน โปรตีนตัวอย่าง 1 ชนิดจะถูกติดสปีนได้เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น กล่าวคือ โปรตีนตัวอย่าง NaChBac จะถูกแต่งพันธกรรมให้เป็นโปรตีนมิวแทนท์โดยแทนที่ด้วยซิสเทอีน ในการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยเตรียมกลุ่มโปรตีนมิวแทนท์ เช่น Q17C, K18C, I19C จนถึง S145C และสามารถติดสปีนให้กับโปรตีนได้เป็นผลสำเร็จเป็นจำนวนทั้งหมด 118 ตำแหน่ง หรือใช้มิวแทนท์จำนวนทั้งหมด 118 มิวแทนท์ การวิเคราะห์และ

ตรวจสอบโปรตีนใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี light scattering และ fluorescence resonance energy transfer

การบันทึกสเปกตรัมอีพ็อร์ของโปรตีนตัวอย่างใช้ Bruker EMX spectrometer ที่ติดตั้งอุปกรณ์ loop-gap resonator กำหนดความถี่ X-band continuous wave ช่วงไมโครเวฟโดยใช้ 2 mW incident power ในการหาค่า accessibility มีการเติม paramagnetic relaxing agents โดยเติมสารละลายเชิงซ้อนของ nickel(II) ethylenediamine diacetate (NiEDDA) หรือก๊าซออกซิเจนลงในหลอดบรรจุโปรตีนตัวอย่าง และใช้เทคนิค power saturation สเปกตรัมที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาค่า mobility (ΔH_0^{-1}), NiEDDA accessibility (Π_{NiEDDA}) และ O_2 accessibility (Π_{O_2}) งานด้านการทดลองข้างต้นดำเนินการโดย Prof. Eduardo Perozo และคณะนักวิจัยที่มหาวิทยาลัยชิคาโก

2.3 งานด้านการคำนวณและจำลองโมเดลเชิงโครงสร้าง

การคำนวณอาศัยวิธี PaDSAR ในกระบวนการสร้างโมเดลด้วยวิธี PaDSAR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- 2.3.1 สร้างและวิเคราะห์กราฟของข้อมูลค่า mobility, O_2 และ NiEDDA accessibility บริเวณ VSD ของ NaChBac แล้วทำการ
 - ก. ระบุว่ากรดอะมิโนใดในลำดับเป็นส่วนหนึ่งของ S1, S2, S3 และ S4 โดยใช้ผลการทดลองในข้อ 2.1
 - ข. ระบุนิคมของ pseudospin ได้แก่ buried (EP1), water (EP2) และ lipid-exposed (EP3) และ interfacial (EP4) residues โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ ΔH_0^{-1} , Π_{NiEDDA} , Π_{O_2} ของ NaChBac-VSD จำนวน 118 มิวแตนท์
- 2.3.2 สร้างโครงสร้างเริ่มต้นโดยใช้โครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ Voltage-sensor domain ของ KvAP (PDB: 1ORS) และ Kv1.2/2.1 (PDB: 2R9R) เป็นแม่แบบเพื่อสร้าง NaChBac-VSD ด้วยวิธี homology modeling และ sequence alignment และทดลองปรับโครงสร้างเกลียวอัลฟาของ S1-S4 ให้ใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในข้อ 2.3.1 และผลของ sequence alignment และโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ KvAP และ Kv1.2/2.1 ให้มากที่สุด
- 2.3.3 Structure refinement ด้วยวิธี PaDSAR (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นการจำลองระบบเพื่อทำการปรับโครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.3.2 การคำนวณใช้เทคนิคการจำลองทางพลวัตเชิงโมเลกุล ระเบียบวิธีของการคำนวณในขั้นตอนนี้มีรายละเอียดดังนี้: สร้างระบบเพื่อทำการจำลองด้วยวิธีพลวัตเชิงโมเลกุล ระบบประกอบด้วยอะตอมของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของ NaChBac (โครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.3.2) และชุด pseudoatom ที่

แทนโมเลกุล O_2 , NiEDDA และ nitroxide spin label ที่ติดไว้ที่กรดอะมิโนต่างๆ ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า และประเภทของ pseudoatom ที่แทน nitroxide spin label เป็นไปตามสมบัติ buried, water และ lipid-exposed residue ซึ่งกำหนดไว้ตามข้อ 2.3.1x การปรับโครงสร้างอาศัยฟังก์ชันพลังงานศักย์ที่พัฒนาขึ้น เป็นปัจจัยควบคุมอันตรกิริยาระหว่าง pseudoatom ต่างๆ ในระบบ ข้อมูลผลการคำนวณที่สนใจในขั้นนี้ คือ โครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าที่ถูกปรับตามข้อมูล mobility, O_2 และ NiEDDA accessibility

2.3.4 ตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างที่คำนวณได้และทำการปรับปรุงแก้ไข เลือกโครงสร้างที่สอดคล้องกับค่า O_2 และ NiEDDA accessibility มากที่สุดโดยใช้เทคนิคการเทียบสีสเปกตรัมกับ molecular surface หากโครงสร้างที่ได้ยังไม่เป็นที่พอใจ จะย้อนกลับไปทำขั้นตอน 2.3.2 ใหม่

2.3.5 นำโครงสร้าง Voltage-sensor domain ที่ได้ในข้อ 2.3.4 ไปทดสอบความน่าเชื่อถือของโมเดล เกณฑ์สำคัญในการพิจารณาความน่าเชื่อถือ คือโมเดลสามารถแสดงพันธะไฮโดรเจนที่สำคัญระหว่าง R119 และ D60 และโมเลกุลน้ำสามารถสอดแทรกเข้าไปในโดเมนนี้ได้หรือไม่ วิธีการทดสอบมีดังนี้ : สร้างระบบจำลองเพื่อคำนวณพลวัตของโมเลกุลหรือ Molecular Dynamics Simulations (MD) ระบบจำลองนี้จะประกอบด้วย โปรตีน โพสฟอไลปิด น้ำโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน ดำเนินการจำลองทางพลวัตที่อุณหภูมิ 300K เก็บข้อมูลทราเจกทอรี (trajectory) เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล (สมบัติของระบบคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เช่น ความดัน ปริมาตร อุณหภูมิ พลังงานจลน์ พลังงานศักย์ พลังงานรวม RMSD) เพื่อวิเคราะห์ดำเนินการจำลองทางพลวัตเป็นเวลา 20 ns

งานด้านการคำนวณและสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ NaChBac-VSD ดำเนินโดยผู้วิจัยหลักของโครงการฯ ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยใช้โปรแกรม CHARMM version 32a2 ในการคำนวณด้วยวิธี MD simulation และวิธี PaDSAR โดยประมวลผลบนเครื่องคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง (ปักษา) ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ (Computational Chemistry Unit Cell) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และใช้โปรแกรม VMD, Pymol, Rasmol, Discovery studio ในการวิเคราะห์ผล ข้อมูล MD และแสดงภาพโมเลกุลโดยปฏิบัติบนเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 Sequence alignment และการวิเคราะห์ที่อันทราบสเมมเบรนของ NaChBac-VSD

ลำดับกรดอะมิโนของ NaChBac บริเวณ VSD (รูปที่ 4) ถูกนำมาเปรียบเทียบกับ โปแตสเซียมแชนแนลที่มีรายงานโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ได้แก่ Kv1.2-2.1, Kv1.2, KvAP ผลของ sequence alignment ที่บริเวณ VSD และส่วนที่อันทราบสเมมเบรน S1-S4 ของ NaChBac ที่ใช้ในการศึกษานี้ แสดงดังรูปที่ 5

```

1  MKMEARQKQNSFTSKMQKIVNHRRAFTFTVIALILFNALIVGIETYPRIYADHKWLFYRIDLVLLWIFTIE
71  IAMRFLASNPKSAFFRSSWNWDFDLIVAAGHIFAGAQFVTVLRILRVLRLRAISVVP SLRRLVDALVMT
141 IGSR
    
```

รูปที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโซเดียมแชนแนลบริเวณโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้า

	S1	
Kv1.2-2.1	YIKKEERPLPENEFQRQVILLFEYPSSSGPARTIAIVSVNVILLISIVSFCLETLPIFRDEMEDMHGGGVTFHTY	224
Kv1.2	YIKKEERPLPENEFQRQVILLFEYPSSSGPARTIAIVSVNVILLISIVSFCLETLPIFRDEMEDMHGGGVTFHTY	205
KvAP	-----DVMKRPIVRIKGVSYAATLSVIVVVVET-----	28
NaChBac	-----MKMEARQKQNSFTSKMQKIVNHRRAFTFTVIALILFNALIVGIETYP-----	46
	S2	S3
Kv1.2-2.1	SQSTIGYQQSTSFTDFFIVETLCLINFSFEFLVRFACPSKAGFTINIMIIDIVALIPYYVTI-----FLTESNRSV	298
Kv1.2	SNSTIGYQQSTSFTDFFIVETLCLINFSFEFLVRFACPSKAGFTINIMIIDIVALIPYYVTI-----FLTESNRSV	281
KvAP	-----MQLSCEYLVRILYLDLILWITLADYAYRAYKSGDPAGYVK-----KTLYEIPALVPAGLLA-----LDEGHLAG	93
NaChBac	-----RIYADHKWLFYRIDLVLLWIFTIETIAMRFLASNPKSAFFRSSWNWDFDLIVAAGHIFAGA-----GAQ-----	107
	S4	
Kv1.2-2.1	LQFQVVR-----RVVQIFRIMRILRIKILSRBSKGLQLLQTLKASMRKLG	344
Kv1.2	QQGQAMSL-----AILRVILRVRVFRIFKILSRBSKGLQLLQTLKASMRKLG	329
KvAP	LGLFR-----LVRLLRFLRILLIISRG-----	115
NaChBac	-----FVTVLRILRVLRLRAIS-----	125
Kv1.2-2.1	LLIFFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDSQFPSIPDAFHWAVVSMITTVGYGD	394
Kv1.2	LLIFFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDSQFPSIPDAFHWAVVSMITTVGYGD	379
KvAP	-----SKFLSATADAADKLVPR-----	132
NaChBac	-----VVP SLRRLVDALVMTIGSR-----	145

รูปที่ 5 Multiple sequence alignment บริเวณ VSD ของโปแตสเซียมแชนแนล (MlotiK, KvAP, Kv1.2) กับโซเดียมแชนแนล (NaChBac)

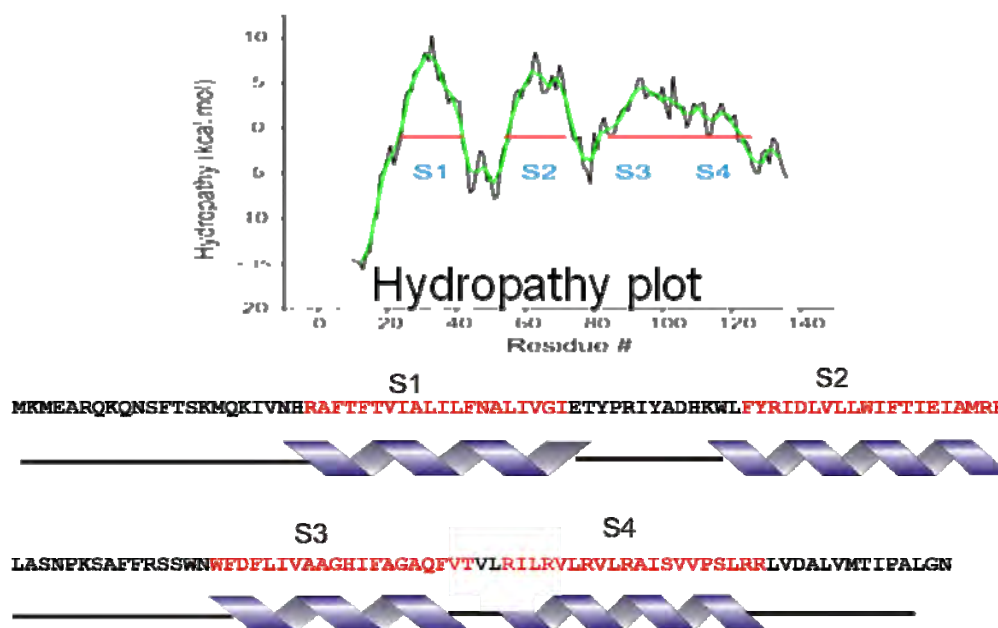
จากผลของ sequence alignment และการวิเคราะห์ hydrophathy (รูปที่ 6) นำไปสู่การระบุท่อนทรานสเมมเบรน S1-S4 ใน NaChBac ดังนี้

S1 ประกอบด้วยช่วงลำดับกรดอะมิโนจาก R23 ถึง I42

S2 ประกอบด้วยช่วงลำดับกรดอะมิโนจาก F56 ถึง F757

S3 ประกอบด้วยช่วงลำดับกรดอะมิโนจาก A83 ถึง T110

S4 ประกอบด้วยช่วงลำดับกรดอะมิโนจาก R113 ถึง R132

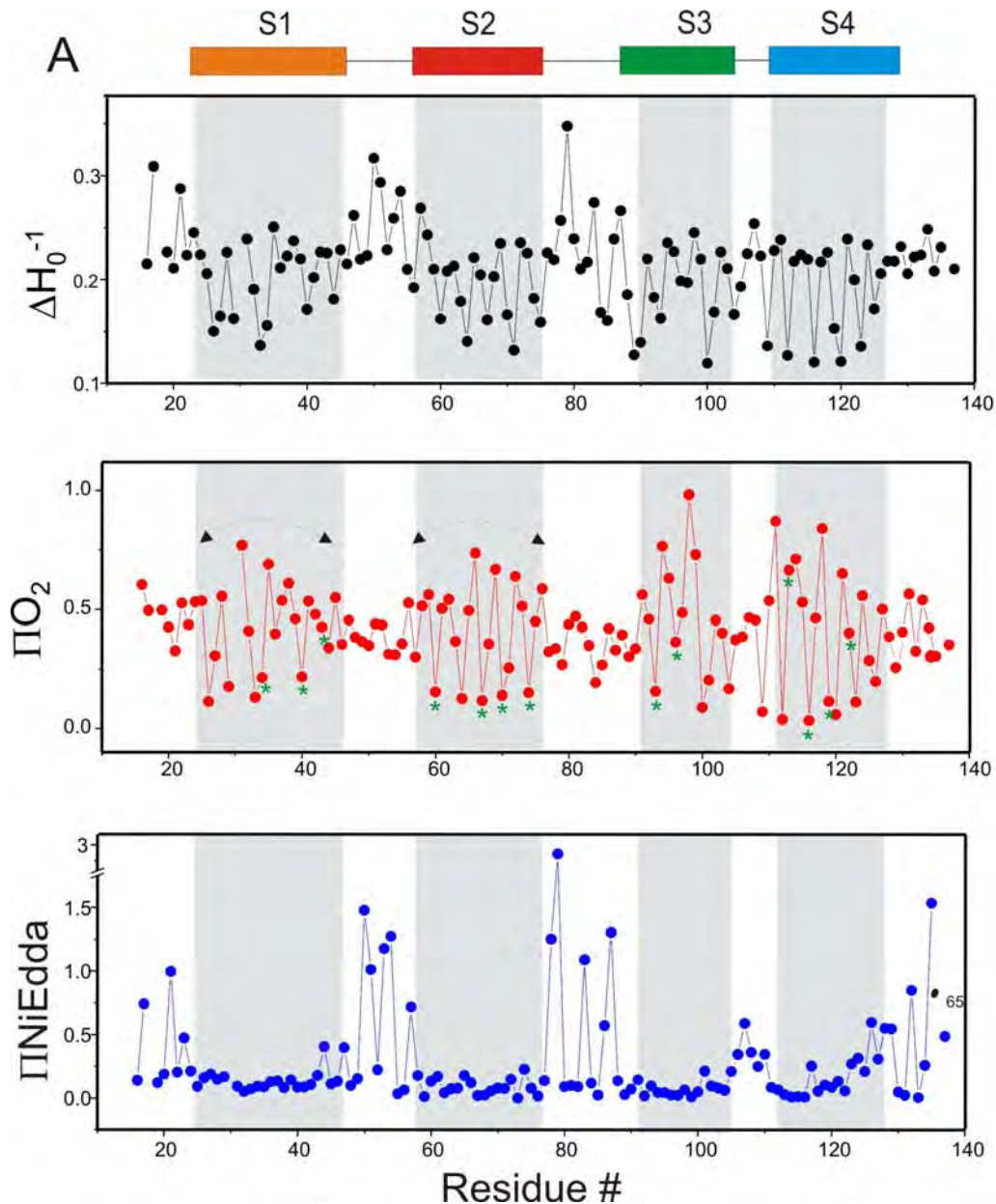


รูปที่ 6 hydropathy plot และท่อนทรานสเมมเบรนของ VSD ใน NaChbac

3,2 Assignment of pseudospin จากข้อมูล EPR ที่ได้จากการทดลอง

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ท่อนทรานสเมมเบรนทั้งสี่ท่อน ที่ได้ข้างต้นมาเปรียบเทียบกับค่า ΔH_0^{-1} , Π NIEDDA และ ΠO_2 ของแต่ละเรสซิเดิลซ์บริเวณ VSD ของ NaChBac จำนวนทั้งหมด 118 ตำแหน่ง (รูปที่ 7) พบว่าที่บริเวณ S1-S4 ซึ่งเป็นท่อนทรานสเมมเบรนสามารถใช้ข้อมูล ΠO_2 สูงและค่า Π NIEDDA ต่ำ ยืนยันส่วนที่อยู่ในเมมเบรนได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้กราฟของ ΔH_0^{-1} และ ΠO_2 แสดงความเป็น periodicity โดยเฉพาะ S1 และ S2 ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นโครงสร้างเกลียวอัลฟา ในทางตรงกันข้าม ความเป็น periodicity ของข้อมูล EPR บริเวณ S3 และ S4 มีความไม่ต่อเนื่อง ดังนั้น โครงสร้างของ S3 helix อาจมีลักษณะหักหรือโค้งงอ และ S4 helix ถูกสร้างให้มีลักษณะผสมระหว่าง regular helix กับ helix 3-10 โดยเฉพาะโครงสร้าง helix 3-10 ที่บริเวณ S4 นี้เคยมีรายงานไว้ในโครงสร้างของ KvAP และ

Kv1.2/2.1 channels ส่วนเรสิดิวส์ที่อยู่ในตำแหน่งช่วงระหว่างท่อนทรานสเมมเบรน เช่น กรดอะมิโนที่บริเวณลูประหว่าง S1 และ S2 และลูประหว่าง S2 และ S3 รวมทั้ง C- และ N-termini มีค่า Π NiEDDA สูงกว่าบริเวณ S1, S2, S3 และ S4 อย่างชัดเจน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเรสิดิวส์เหล่านี้ควรอยู่ด้านนอกของชั้นเมมเบรน



รูปที่ 7 ค่า mobility (ΔH_0^{-1}), O_2 accessibility (ΠO_2) และ NiEDDA accessibility ($\Pi NiEdda$) ของกรดอะมิโนที่บริเวณ VSD ของ NaChbac

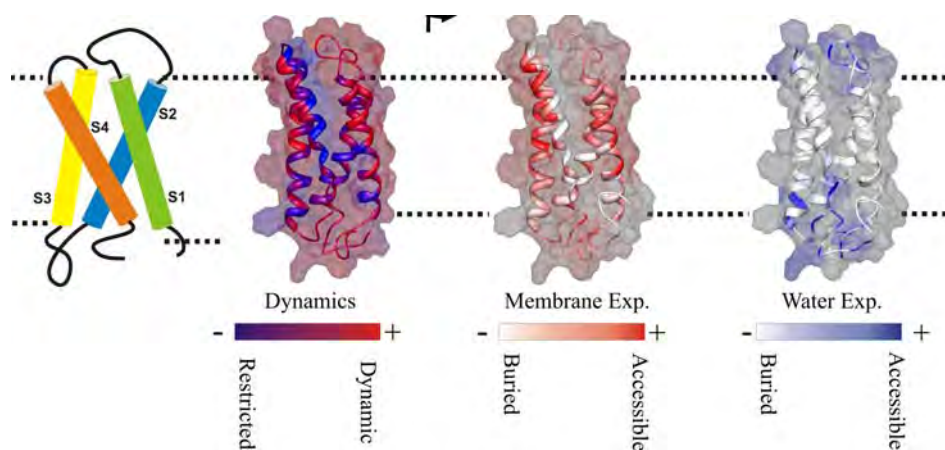
จากการวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบท่อนทรานสมเมเมเรนกับค่า ΔH_0^{-1} , Π NIEDDA และ ΠO_2 ทำให้สามารถระบุชนิดของ pseudospin ได้แก่ EP1, EP2 , EP3 และ EP4 ไปติดบนตำแหน่งของกรดอะมิโนบนโครงสร้างของ NaChBac-VSD ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Assignment of pseudospin types for the spin labeled residues in NaChBac-VSD domain

Type	Residue assignment
EP1	26 27 29 33 34 40 60 63 64 67 68 70 71 74 89 90 93 96 97 100 101 104 105 109 112 116 119 120 123 125
EP2	21 23 47 50 51 53 54 57 78 79 83 86 87 126 129 132 134 135 137
EP3	22 24 25 28 31 35 37 38 39 41 42 43 45 58 59 61 62 65 66 69 72 73 75 76 91 92 94 95 98 99 102 103 111 113 114 115 117 118 121 122 124 127 133
EP4	19 20 44 48 49 52 55 56 77 81 82 84 85 88 106 107 108 110

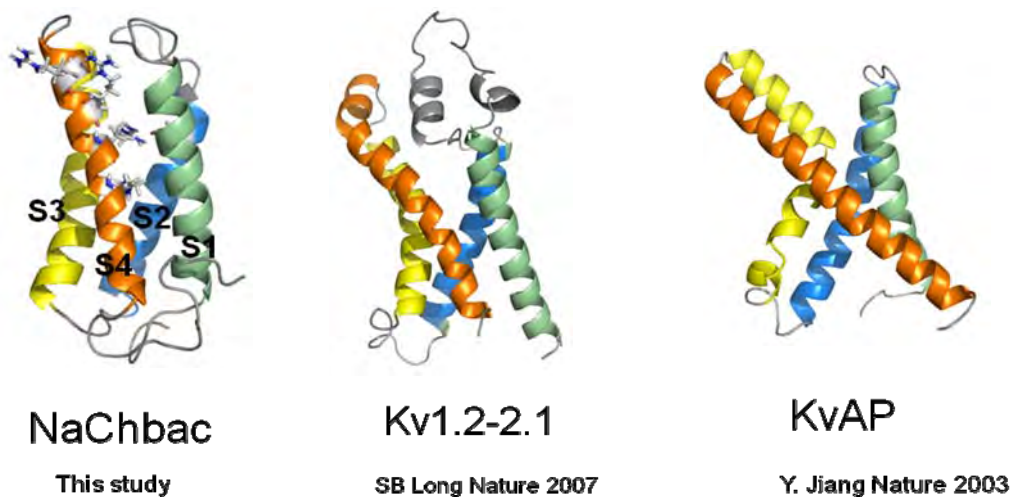
3.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR

โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จากวิธี PaDSAR ถูกประเมินเพื่อพิจารณาความสอดคล้องกับค่าการทดลอง และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของโครงสร้างดังกล่าวใช้ molecular surface ของโมเดลเทียบกับค่า ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ Π NIEDDA ของเทคนิค SDLS/EPR โดยให้เจดสีแทนระดับของค่าที่ได้จากการทดลอง (รูปที่ 8) ผลการเปรียบเทียบพบว่าโมเดลเชิงโครงสร้างสอดคล้องกับผลการทดลองเป็นอย่างดี



รูปที่ 8 Molecular surface เปรียบเทียบกับเจดสีแสดงระดับค่า ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ Π NIEDDA ที่ได้จากการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChBac กับ Kv1.2-2.1 และ KvAP พบว่าโครงสร้างเทอร์เซียร์และการวางตำแหน่งของ S1-S4 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่ S1-S4 ของ NaChBac อยู่ใกล้กันมากกว่าของ Kv1.2-2.1 และ KvAP (รูปที่ 9)

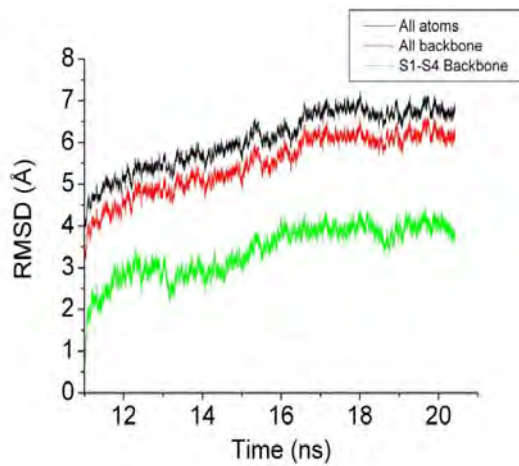


รูปที่ 9 เปรียบเทียบโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChBac กับ Kv1.2-2.1 และ KvAP

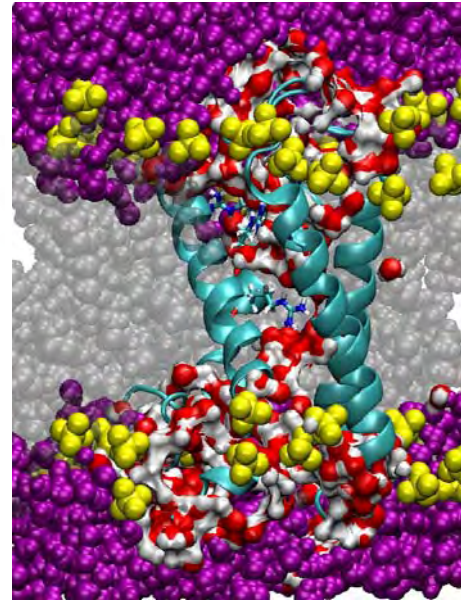
3.4 การประเมินโครงสร้างด้วยวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

โมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChbac ที่ได้จากวิธี PaDSAR ถูกนำไปประเมินและตรวจสอบด้วยวิธีการแบบจำลองพลวัตเสมือนจริงของระบบที่ประกอบด้วยโมเลกุลโซเดียมแชนแนล NaChBac-VSD ใน POPC ลิพิดไบเลเยอร์และน้ำ พลวัตของระบบ (MD simulation) ถูกสร้างและจำลองเป็นเวลา 20 นาโนวินาที (ns) รูปที่ 10 แสดงค่า RMSD (root mean square deviation) ของทุกอะตอมของโปรตีนและส่วน backbone ของโปรตีนแสดงให้เห็นว่าระบบเริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุลทางโครงสร้างหลังจากคำนวณพลวัตของระบบไปประมาณช่วงนาโนวินาทีที่ 17 โดยมีค่าการแกว่งของค่า RMSD ในส่วนโครงสร้าง backbone ของ S1, S2, S3 และ S4 ที่ประมาณ 3-4 Å

จากการวิเคราะห์โครงสร้างและติดตามพฤติกรรมของ NaChBac-VSD ในระบบการจำลองพลวัตโดยอาศัย trajectory ที่เก็บหลังช่วงนาโนวินาทีที่ 17 พบโมเลกุลน้ำจำนวนหนึ่งอยู่ภายใน VSD (รูปที่ 10ข) แสดงให้เห็นว่า VSD มีรอยแยกที่ลึกซึ่งน้ำ (water filled crevice) สามารถเข้าไปเกือบถึงแกนกลางของส่วน VSD ได้ ผลของ MD simulation นี้สอดคล้องกับการทดลองที่ระบุ NaChBac อยู่ในสภาวะแอคติเวชันหรือสภาวะที่ส่วนโพรงเปิดให้ออกซิเจนผ่านและสามารถบันทึกกระแสไฟฟ้าของ VSD นี้ได้



(ก)



(ข)

รูปที่ 10 (ก) ค่า RMSD บริเวณ VSD ของ NaChbac เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น trajectory ของระบบได้จาก 10ns MD simulation ของระบบที่มีโปรตีน POPC และ TIP3P waters (ข) โครงสร้างของระบบที่ได้จาก MD snapshot

บทที่ 4

การอภิปรายผล

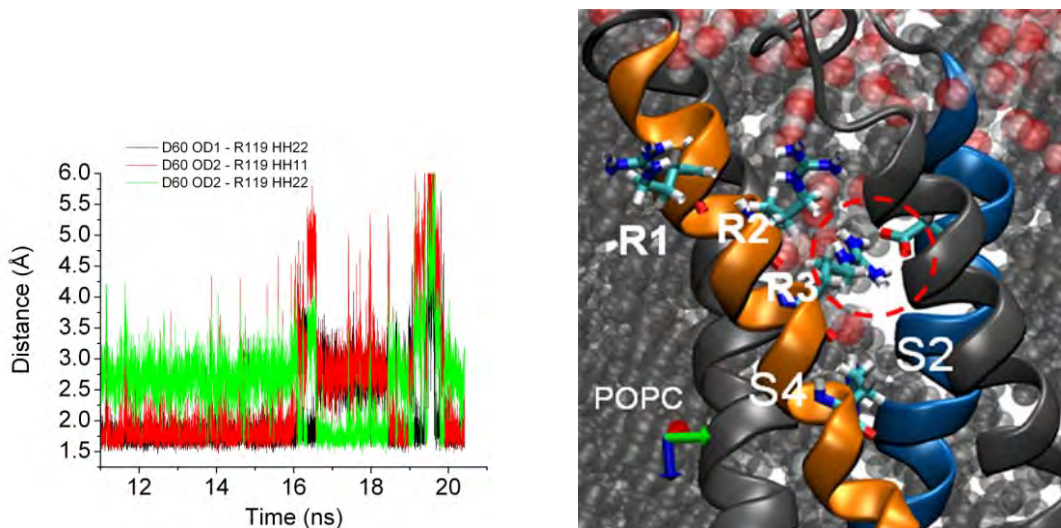
โมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChbac ที่คำนวณด้วยระเบียบวิธี PaDSAR โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอีพีอาร์และการติดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีนซึ่งได้แก่ ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ $\Pi NiEDDA$ ที่วัดจากโปรตีนตัวอย่างจำนวน 118 มิวแดนที่ครอบคลุมส่วน VSD โครงสร้างที่ได้ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรน S1 และ S2 มีโครงสร้างเกลียวอัลฟา ส่วนโครงสร้างของ S3 helix มีลักษณะโค้งงอ และ S4 helix มีลักษณะผสมระหว่าง regular helix กับ helix 3-10 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้าง S4 ของ KvAP และ Kv1.2/2.1 channel

โครงสร้างโดยรวมบริเวณ VSD ของ NaChbac นี้มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างบริเวณ VSD ของ voltage-gated K channels อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางโครงสร้างของ VSD ที่เกิดจากการอยู่รวมกัน (assembly) ของ S1-S4 ใน NaChbac ค่อนข้างบิบบแน่น มากกว่า K channel ข้อสังเกตดังกล่าวสามารถยืนยันด้วยข้อมูล mobility (ΔH_0^{-1}) ที่มีค่าค่อนข้างต่ำแสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง VSD มีไดนามิกส์น้อย

S4 helix เป็นใจกลางของกลไกการรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของโซเดียมแชนแนล ที่บริเวณนี้ประกอบด้วยอาร์จินีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดประจุบวก (positively charged residue) อยู่ 4-6 ตำแหน่ง กระจายตลอดช่วงท่อนทรานสเมมเบรน ไอออนแชนแนลในตระกูล K_v และ Na_v channels จะมีอาร์จินีนบน S4 ที่สำคัญ 4 ตำแหน่ง และกำหนดการเรียกชื่ออาร์จินีนในแต่ละตำแหน่งนี้เป็น R1, R2, R3 และ R4 (เพื่อใช้เป็นระบบทั่วไปและไม่ให้สับสนในการเรียกลำดับของอาร์จินีนในโปรตีนต่างชนิด) สำหรับ อาร์จินีนบน S4 ใน NaChBac ได้แก่ R113, R116, R119, R122 มีรายงานความเป็นไปได้ของอาร์จินีนเหล่านี้ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ D60, E70 และ D93 ที่อยู่บน S2 และ S3 จากการประเมินโครงสร้างรวมทั้งวิเคราะห์สภาวะที่ใช้ในการทดลองบ่งบอกว่า NaChBac ควรจะอยู่ในสภาวะแอคติเวชัน ที่สภาวะนี้ พันธะไฮโดรเจนหรือ salt bridge ที่สำคัญอยู่บน S4 และ S2 และน่าจะเป็นพันธะไฮโดรเจนระหว่าง R119-D60 หรือ R122-D60 การวิเคราะห์นี้อยู่บนพื้นฐานการวิเคราะห์พันธะไฮโดรเจนของคู่กรดอะมิโนที่คล้ายกันคือ R133-D62 ในสภาวะแอคติเวชันของ KvAP และ R303-E226 ในสภาวะแอคติเวชันของ Kv1.2 shaker potassium channel

การวิเคราะห์โครงสร้างและพลวัตบริเวณ VSD ของ NaChbac ที่ได้จากข้อมูลทราเจคทอรีของการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเป็นเวลา 20 นาโนวินาที สามารถตรวจพบระยะห่างของคู่ Hydrogen bond donor-acceptor ระหว่าง R119-D60 ที่เข้าช่วยการเกิดพันธะไฮโดรเจน (รูปที่

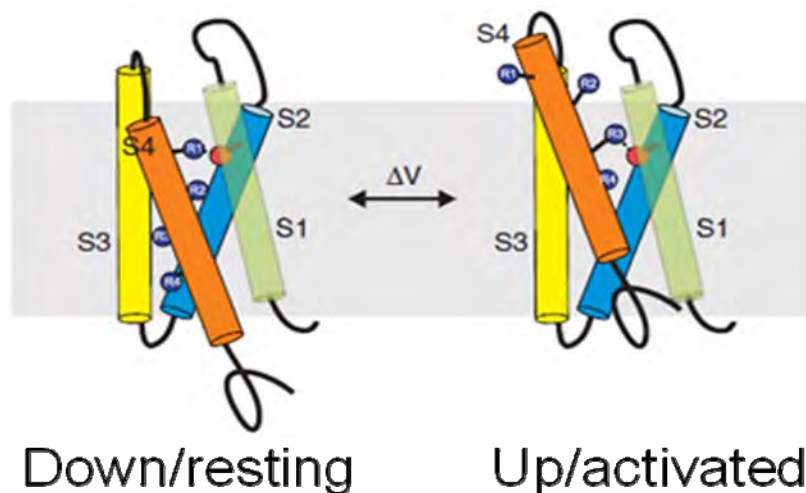
11) และยังมีพบโมเลกุลน้ำจำนวนหนึ่งอยู่ภายใน VSD (รูปที่ 10ข) แสดงให้เห็นว่า VSD มีรอยแยกที่ลึกซึ่งน้ำสามารถเข้าไปเกือบถึงแกนกลางของส่วน VSD ได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาและแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ NaChBac-VSD อยู่ในสถานะแอกติเวชัน



รูปที่ 11 กราฟระยะห่างแสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่าง R119-D60 ที่ได้จาก MD simulation

มีรายงานการศึกษาโครงสร้างและนำเสนอโมเดลการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของ VSD ระหว่างสถานะแอกติเวชันกับสถานะพัก เนื่องจากกระบวนการเปิดหรือปิดของโพรงไอออนแชนแนลอาศัยการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันและอันตรกิริยาระหว่าง VSD และ PD ในสถานะแอกติเวชัน PD อยู่ในสถานะปิด คอนฟอร์เมชันของ VSD โดยเฉพาะที่ S4 ตำแหน่ง arginine ที่สำคัญจำนวน 4 ตำแหน่ง (R1, R2, R3 และ R4) ส่วนใหญ่ก่อนไปทางเมมเบรนที่อยู่ด้านในของเซลล์ (intracellular side) ดังนั้นที่ molecular configuration นี้จึงเรียกว่า “Down” state หรือ Down conformation เมื่อมีการเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณเมมเบรน ทำให้ PD เปลี่ยนไปอยู่ในสภาพแอกติเวชันเปิดโพรงให้ไอออนผ่าน การเปลี่ยนสถานะของ PD นี้เกิดจากการเคลื่อนที่ของส่วน VSD โดยเฉพาะที่ S4 เกิดการเลื่อนตำแหน่งประจุของ arginine ในทิศที่ออกนอกเซลล์ กล่าวคือ ตำแหน่ง arginine ส่วนใหญ่ก่อนไปทางเมมเบรนที่อยู่ด้านนอกเซลล์ (extracellular side) ที่สถานะนี้จึงเรียกว่า “Up” state หรือ conformation ดังนั้นโครงสร้าง NaChBac-VSD ที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับ “Up” conformation

โครงสร้าง NaChBac-VSD ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อสร้างโครงสร้างในสถานะ Down conformation ต่อไป รูปแบบการนำเสนอการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันในสถานะแอกติเวชันและสถานะพักของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าในโซเดียมแชนแนลแสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แบบเสนอการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันในสภาวะแอกติเวชันและสภาวะพักของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าในโซเดียมแชนแนล

มีรายงานการศึกษา VSD ในสภาวะ down conformation ซึ่งประมาณการเลื่อนของอาร์จินีนที่เกิดจากการสไลด์ของ S4 เข้าไปในฝั่งด้านในของเมมเบรนถึง $10-26\text{\AA}$ ¹⁷ รวมทั้งระบุว่าอาร์จินีนยังคงเกิด salt bridge กับ acidic residues, น้ำ และส่วน phosphate ของลิพิด จากข้อมูล biological assay ของ NaChBac-VSD mutants พบว่า R1 (R113) และ R2 (R116) มีความสำคัญในการอยู่รอดของเซลล์ที่สภาวะพัก มากกว่า R3 (R119) ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่า VSD ของ NaChBac ที่สภาวะพัก คู่กรดอะมิโนที่สร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง S4 กับ S2 จะเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร การศึกษาดังกล่าวจะทำให้เข้าใจการทำงานของ VSD ได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 5

ข้อสรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการคำนวณหาโมเดลเชิงโครงสร้างของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของช่องโซเดียมในแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลจากการทดลองเทคนิคอีพียาร์และการดัดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีน การคำนวณใช้ข้อมูล ΠO_2 และ $\Pi NiEDDA$ มาประเมินและแปลงให้เป็นข้อมูลที่สามารถใช้ได้ด้วยเทคนิค restrained molecular dynamic simulations เพื่อโมเดลโครงสร้างของ NaChBac-VSD โครงสร้างที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของ KvAP และ Kv1.2-2.1 chimera และแสดงให้เห็นความคล้ายคลึงทางโครงสร้างเทอร์เชียรีของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า และอธิบายถึงสมบัติขั้นพื้นฐานของการทำงานที่อนุรักษ์ไว้ในโปรตีนตระกูลโซเดียมและโพแทสเซียมแซนแนล

ข้อเสนอแนะ: งานวิจัยที่จะดำเนินต่อไป

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครงสร้างของโซเดียมแซนแนล มีแต่โครงสร้าง x-ray ของ K_v channel เช่น KvAP, Kv1.2-2.1 chimera, Kv1.2 และเป็นโครงสร้างที่ PD อยู่ในสถานะแอคทีเวชัน แต่ไม่มีรายงานโครงสร้างของ VSD ของ K_v channel ในสถานะ down state อย่างไรก็ตาม มีผู้รายงานการศึกษาโครงสร้างของ VSD ใน KvAP ที่สถานะพัก¹⁸ โดยอาศัยข้อมูล biotin-avidin accessibility กับวิธี molecular dynamics (MD) simulation นอกจากนี้รูปแบบกลไกการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของ VSD จากสถานะพักไปสู่สถานะแอคทีเวชัน มีผู้เสนอไว้ได้แก่ transporter model, helical screw model และ paddle model เพื่อให้เข้าใจการทำงานของ VSD ได้อย่างลึกซึ้ง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษารายละเอียดเชิงโครงสร้างระดับโมเลกุลในสถานะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงาน ในที่นี้ โครงสร้างของโซเดียมแซนแนลในสถานะ down/resting conformation จึงเป็นโจทย์ที่น่าสนใจสำหรับงานวิจัยในลำดับถัดไป

เอกสารอ้างอิง

1. B. Hille "Ion Channels of Excitable Membranes", 2nd Edition, University of Washington, Sinauer Associates Inc. 1992. 607 pages.
2. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์, เคมีชีวอนินทรีย์เบื้องต้น, พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552, 249 หน้า
3. Altenbach C, Flitsch SL, Khorana HG, Hubbell WL. "Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines." *Biochem.* 1989;28:7806–7812
4. Hubbell WL, Altenbach C. "Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling." *Curr Opin Struct Biol.* 1994;4:566–573.
5. Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. "Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K_v channel studied by EPR spectroscopy", *Nat. Struct. Biol.* 1998;5:459-469.
6. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo AL, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. "The structure of the potassium channel: Molecular basis of K_v conduction and selectivity." *Science.* 1998;280:69-77.
7. Sompornpisut P, Liu YS, Perozo E "Calculation of rigid-body conformational changes using restraint-driven Cartesian transformations" *Biophysical J.* 2001;81:2530-2546.
8. Liu YS, Sompornpisut P, Perozo E. "Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state." *Nat. Struct. Biol.* 2001 8:883-887.
9. Perozo E, Cortes DM, Sompornpisut P, Kloda A, Martinac B. "Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels." *Nature* 2002, 418:942-948.
10. Sompornpisut P, Roux B, Perozo E. "Structural refinement of membrane proteins by restrained molecular dynamics and solvent accessibility data." *Biophysical J.* 2008, 95:5349-5361.

11. Vasquez V, Sotomayor M, Cordero-Morales J, Schulten K, Perozo E. "A structural mechanism for MscS gating in lipid bilayers." *Science*. 2008, 321:1210-1214.
12. Chakrapani S, Cuello LG, Cortes DM, Perozo E. "Structural dynamics of an isolated voltage-sensor domain in a lipid bilayer." *Structure*. 2008, 3: 398-409.
13. Shafrir Y, Durell SR, Guy HR. "Models of voltage-dependent conformational changes in NaChBac channels." *Biophys. J*. 2008, 95: 3663-3676.
14. Cuello LG, Cortes DM, Perozo E "Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel in a lipid bilayer." *Science* 2004, 306:491–495.
15. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* 2003, 423:33-41.
16. Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R. "Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment." *Nature*. 2007, 450:376-82.
17. Broomand A, Elinder F. 'Large-scale movement within the voltage-sensor paddle of a potassium channel-support for a helical-screw motion." *Neuron* 2008;59:770-7.
18. Schow EV, Freitas JA, Gogna K, White SH, Tobias DJ. "Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel." *Biophys J*. 2010 16;98:2857-66.

ภาคผนวก

การเผยแพร่ผลงานการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนโดยทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชทั้งเต็มจำนวน และบางส่วน ได้เผยแพร่ตีพิมพ์เป็นบทความวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ บทความย่อ และโปสเตอร์ในงานประชุมทางวิชาการดังต่อไปนี้

1. S. Chakrapani, P. Sompornpisut, P. Intharathep, B. Roux, E. Perozo. "The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:5435-40 (ISSN: 0027-8424, Impact Factor =9.432). (เอกสารแนบ: บทความวิจัย)
2. การนำเสนอแบบโปสเตอร์ เรื่อง "Structure Models of Voltage Sensor Domain of Bacterial Na Channel using Accessibility Data derived from EPR and Site-Directed Spin Labeling Techniques" ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 15-17 ตุลาคม 2552 ชลบุรี (เอกสารแนบ: ปก+บทความย่อ)
3. การนำเสนอแบบบรรยาย เรื่อง "Computational approach for membrane protein structure refinement using limited EPR data" ในโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเคมีคำนวณครั้งที่ 6 19-22 ตุลาคม 2552 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (เอกสารแนบ: ปก+บทความย่อ)
4. การนำเสนอแบบบรรยาย เรื่อง "Structure model of cockroach sodium channel for insecticide development" ในการประชุมวิชาการครั้งที่ 18 11-12 มีนาคม 2553 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เอกสารแนบ: ปก+บทความย่อ)