



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ทุนวิจัย  
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

โมเดลเชิงโครงสร้างเพื่อสำรวจกลไกการผ่านของไอออนในเมมเบรนโปรตีน  
แขนงนี้จากข้อมูลอีพีอาร์สปีนเลเบลลิงและการจำลองในระดับโมเลกุล

โดย

พรเทพ สมพรพิสุทธิ์

กันยายน ๒๕๕๘

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยหลักของโครงการวิจัยนี้ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้  
ขอบคุณ Dr. Olivier Damas, Dr. Quifei Li, Professor Eduardo Perozo, สุนันท์ กิจจาวรวัฒนกุล,  
ปณิศักดิ์ บุญอำนาจ, สุนิตย์ พุกกลาง, จิระยุทธ สุปัญญาบุตร คณน สุจารี รวมทั้ง นักวิจัยและลูกศิษย์ใน  
หน่วยวิจัย CCUC และต้องขอภัยที่ไม่สามารถระบุชื่อผู้เกี่ยวข้องอีกหลายคน

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัย CCUC และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนสถานที่ สาธารณูปโภค และเครื่องมือวิจัย โดยเฉพาะเครื่องคอมพิวเตอร์คลัส  
เตอร์สมรรถนะสูง ที่ทำให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย กองทุน  
วิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

## บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย	โมเดลเชิงโครงสร้างเพื่อสำรวจกลไกการผ่านของไอออนในเมมเบรนโปรตีนแชนแนลจากข้อมูลอีพ็อดาร์สปินเลเบลลิงและการจำลองในระดับโมเลกุล
ชื่อผู้วิจัย	พรเทพ สมพรพิสุทธิ์
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	กันยายน ๒๕๕๘

## บทคัดย่อ

เมมเบรนโปรตีนมีหน้าที่สำคัญในการคัดกรองและลำเลียงสารเข้า-ออกเซลล์ผ่านชั้นเมมเบรนฟอสโฟลิพิด การศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วยวิธีผลึกศาสตร์รังสีเอ็กซ์หรือนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์เป็นวิธีที่ให้รายละเอียดทางโครงสร้างที่มีความถูกต้องสูง แต่ด้วยข้อจำกัดทางเทคนิคและความยากในการศึกษา การใช้เทคนิคสเปกโทรสโคปีอื่นๆ แม้ว่าจะให้ความละเอียดของข้อมูลเชิงโครงสร้างที่น้อยกว่า แต่เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคการออกแบบเชิงโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาทางโครงสร้าง รายงานวิจัยนี้เสนอผลงานวิจัยจำนวนสองเรื่อง เรื่องที่หนึ่งนำเสนอผลงานวิจัยของการสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะพัก ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโวกเทจเกตโพแทสเซียมแชนแนล (KvAP-VSD) กับเรื่องที่สองนำเสนอผลงานวิจัยของการสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะเปิดของแมกนีเซียมแชนแนล การสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างนี้ใช้ข้อมูลจากเทคนิคอีพ็อดาร์และการติดสปินที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีนร่วมกับเทคนิคการออกแบบเชิงโมเลกุลด้วยวิธี PaDSAR ผลการศึกษาได้โครงสร้างที่สามารถอธิบายรูปแบบการเคลื่อนตัวของส่วนท่อนทรานสมเมมเบรน S4 ของ KvAP-VSD และการเคลื่อนที่ประจุบวกของอาร์จินีนตำแหน่ง R120, R123, R126 และ R133 ผ่านบริเวณลิพิดไบเลเยอร์ในช่วงเกิดเมมเบรนดีโพลารไรเซชัน รวมทั้งพบการเปลี่ยนขนาดรอยแยกของ KvAP-VSD ที่น้ำแทรกเข้าไปอยู่ และการแลกเปลี่ยนคู่พันธะไฮโดรเจนของอาร์จินีนกับกรดอะมิโนประจุลบบนท่อนทรานสมเมมเบรน S1, S2 และ S3 สำหรับผลการศึกษาโครงสร้างที่สภาวะเปิดของ CorA Mg<sup>2+</sup> channel พบว่าปลายด้านสทอลล์เฮลิคส์ห้าเคลื่อนเข้าหาแกนสมมาตรและทำให้เกิดการขยายของโพรงและปากทางเข้าโพรงเปิดกว้างขึ้น การคำนวณแรงระหว่างประจุด้วยทฤษฎีปัวซอง-โบลทซ์มานแสดงให้เห็นถึงกำแพงพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ Mg<sup>2+</sup> บริเวณทางผ่านของไอออนในสภาวะคอนฟอร์เมชันปิดลดลงอย่างชัดเจนในสภาวะเปิด

**คำสำคัญ** โดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้า, โพแทสเซียมแชนแนล, แมกนีเซียมแชนแนล, อีพ็อดาร์, การติดสปินที่ตำแหน่งจำเพาะ

### บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title                                Structure model for exploring the ion permeation mechanism in membrane protein channel based on EPR spin labeling data and molecular simulations

Name of the Investigators...    Pornthep Sompornpisut

Year    September 2015

### Abstract

Membrane proteins play an important role for screening and transporting molecules or ions across phospholipid membrane. Structure determination by x-ray crystallography or nuclear magnetic resonance is the method that provides detailed structure with high-resolution and accuracy. However, it has technical difficulty and limitation. Other lower resolution spectroscopic techniques combined with molecular modeling techniques are therefore powerful and alternative for the study. To gain further insight into the gating mechanisms, this report presents structure models of two proteins: voltage sensor domain of voltage-gated potassium channel (KvAP-VSD) at resting state and open conformation of magnesium channel. These structure models were built using a special molecular modeling tool called PaDSAR designed for using information from site-directed spin labeling and EPR techniques: The results illustrated the transmembrane motion of S4 of KvaP-VSD and the displacement of positively charged arginines including: R120, R123, R126 and R133 within lipid bilayer during membrane depolarization. This results in changes in water-filled crevice within voltage sensor core and changes in salt-bridge hydrogen bonding between S4 arginines and negatively charge residues on S1, S2 and S3. The structure model of an open conformation of CorA Mg<sup>2+</sup> channel demonstrated the tips of the stalk helices come together towards the axis of symmetry and translate into an expansion of the cavity and the mouth of the pore. Poisson-Boltzmann electrostatic calculation shows that a large energy barriers impedes the movement of Mg<sup>2+</sup> through the permeation pathway in the closed conformation are alleviated in the open conformation.

**Keywords:** Voltage Sensing Domain, Potassium Channel, Magnesium 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	4
1.2.1 เทคนิค SDSL/EPR	4
1.2.2 Magnesium channel	7
1.2.2.1 โครงสร้างสามมิติของ Magnesium channel	8
1.2.2.2 Divalent cation sensor ที่ M1 และ M2 กับการเปิด-ปิดโพรง	10
1.2.3 KvAP-voltage-gated potassium channel	11
1.2.4 การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันที่เชื่อมโยงกับสภาวะเปิดและปิดของไอออนแชนแนล	13
1.2.5 ข้อมูล $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ของ CorA และ KvAP	14
1.2.6 วัตถุประสงค์ของโครงการ	17

บทที่ 2 วิธีการวิจัย	18
2.1 KvAP voltage sensor	18
2.1.1 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง	18
2.1.2 สร้างโมเดลเชิงโครงสร้าง KvAP-VSD channel	19
2.2 CorA magnesium channel	23
2.2.1 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง	23
2.2.2 สร้างโมเดลเชิงโครงสร้าง CorA magnesium channel	23
บทที่ 3 โมเดลเชิงโครงสร้างของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของโพแทสเซียมแชนแนลใน	
KvAP-VSD	26
3.1 Sequence alignment และการวิเคราะห์ข้อมูล EPR ที่ได้จากการ	
ทดลอง	26
3.2 EPR constraints สำหรับโมเดลโครงสร้างของ KvAP-VSD ใน Down-	
state	29
3.2.1 PaDSAR pseudospin	29
3.2.2 Distances ระหว่าง Bifunctional spin label	30
3.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR	31
3.4 โครงสร้าง KvAP-VSD ใน Down-state ที่ได้จาก PaDSAR	32
3.5 โครงสร้างและพลวัตของ KvAP-VSD	33
3.6 Down conformation กับการปรับขนาดของช่อง water crevice ใน	
VSD	33
3.7 การเปลี่ยนคู่อันตรกิริยา salt-bridge	35

3.8 บทสรุป	36
บทที่ 4 โมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะเปิดของ CorA Mg <sup>2+</sup> Channel	38
4.1 การวิเคราะห์ข้อมูล EPR ที่ได้จากการทดลอง	38
4.2 EPR constraints สำหรับโมเดลโครงสร้างของ CorA Mg <sup>2+</sup> channel	
ในสภาวะเปิด	39
4.2.1 PaDSAR pseudospin	39
4.2.2 Distance constraints ระหว่างซับยูนิต	39
4.2.3 Proximity ( $\Omega$ ) หรือ interaction parameters	40
4.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR	41
4.3.1 การคัดกรองเพื่อหาโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่เหมาะสม	41
4.3.2 ผลการประเมินโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่ได้	43
4.3.3 ขนาดบริเวณโพรงที่กว้างขึ้น	44
4.3.4 การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันสำหรับการเกต	45
4.3.5 บริเวณภายในของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป	46
4.4 บทสรุป	47
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	49
5.1 Down-state model ของ KvAP-VSD	49
5.2 Open state model ของ Mg <sup>2+</sup> channel	50
5.3 ข้อเสนอแนะ: งานวิจัยที่จะดำเนินต่อไป	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	55

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ปฏิกิริยาการติดสปินระหว่าง Methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับหมู่ -SH (cysteine) ของโปรตีน	5
รูปที่ 1.2 กระบวนการคำนวณโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธี PaDSAR	7
รูปที่ 1.3 โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ CorA (2uib) แสดง Homopentamer และบริเวณ metal binding site (MBS)	9
รูปที่ 1.4 $Mg^{2+}$ สองไอออนในบริเวณ MBS กับ Asp89 และ Asp253 ที่เชื่อว่าเป็น divalent cation sensor	10
รูปที่ 1.5 Structural architecture ของ Kv channels (A) Transmembrane topology ของหนึ่งซับยูนิต และ (B) โครงสร้างเตตระเมอร์ของ Kv1.2 (PDB code: 2A79) มองจาก Top view	12
รูปที่ 1.6 โมเดลจำลองแสดงไอออนแชนแนลในสภาวะปิดและสภาวะเปิด	13
รูปที่ 1.7 กราฟ $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ที่สภาวะพัก (DoTAP) และสภาวะกระตุ้น (PCPG) ของ KvAP ของเรสซิทีวซ์ 17-148 (เครื่องหมายลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ)	15
รูปที่ 1.8 กราฟ $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิดของ CorA ของเรสซิทีวซ์ 246-313 (TM1 อยู่ในบริเวณแรงแงาสี่เทา)	16
รูปที่ 2.1 (A) Bifunctional spin label (B) quadruple-cysteine mutant (39/43 118/121) attached with bifunctional spin label allowing for distance	18



determination

รูปที่ 2.2 (A) โครงสร้างของ KvAP-VSD (1ORS), (B) แผนภาพอย่างง่ายแสดงสภาพแวดล้อมของเรสซิทีวซีในโปรตีนเพื่อกำหนดชนิดของ pseudoatom, (C) KvAP-VSD ที่ติด pseudo-atoms (EP1, EP2, EP3 และ EP4) แสดงในรูปแบบ stick model ทรงกลมสีแดงและสีน้ำเงินใช้แทน pseudoatom ของ oxygen และ NiEDDA และ (D) KvAP-VSD ที่ติด pseudoatom ชนิดใหม่ที่ใช้สำหรับกำหนด distance constraints เพื่อใช้ในการคำนวณโครงสร้าง	20
รูปที่ 2.3 ขั้นตอนในกระบวนการสร้างโมเดล KvAP-VSD ที่สภาวะพักด้วยวิธี PaDSAR	21
รูปที่ 2.3 ขั้นตอนแสดงแผนการดำเนินการวิจัย	23
รูปที่ 3.1 Multiple sequence alignment บริเวณ VSD ของโปแตสเซียมแชนแนล (KvAP, Kv1.2 และ MlotiK)	26
รูปที่ 3.2 กราฟ $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ที่ Down-state (DoTAP) และที่ Up-state (PCPG) ของ KvAP-VSD ของเรสซิทีวซี 17-147 (A) S1, (B) S2, (C) S3 และ (D) S4	28
รูปที่ 3.3 Molecular surface เปรียบเทียบกับเฉดสีแสดงระดับค่า $\Delta \Pi Ni$ ที่ได้จากการทดลอง KvAP sensor in DoTAP (โดยที่ $\Delta \Pi Ni = \Pi Ni(DoTAP) - \Pi Ni(PCPG)$ ) และใช้เฉดสี “Blue to White to Red” แสดงค่า “negative to 0 to positive”	29
รูปที่ 3.4 โมเดลที่ดีที่สุดลำดับแรกของ KvAP-VSD ที่สภาวะพัก (สีแดง) เปรียบเทียบกับคอนฟอร์เมชันที่สภาวะกระตุ้น (สีฟ้า)	31
รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบระหว่างโมเดลที่ใช้เป็นตัวแทนของคอนฟอร์เมชันของ KvAP-	32

VSD สภาวะกระตุ้นและที่สภาวะพักแสดงการย้ายที่ของ S4	
รูปที่ 3.6 Backbone RMSD เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นตลอดช่วงเวลา 100 ns MD simulation ของ Up-state, Down-state ใน POPC และ Down-state ใน DOTAP	33
รูป 3.7 โมเลกุลของน้ำที่แทรกอยู่ใน extracellular และ intracellular water crevices ของ KvAP-VSD ซึ่งเปรียบเทียบกันระหว่างโครงสร้างที่ Up-state และ Down-state (A) MD snapshots เปรียบเทียบลักษณะของช่อง water crevice ของทั้งสามระบบ (B) จำนวนโมเลกุลของน้ำที่พบใน extracellular (black line) และ intracellular (red line) water crevices ที่พบในช่วงเวลาซิมูเลชัน	34
รูปที่ 3.8 แสดงผลการวิเคราะห์คู่อันตรกิริยา salt-bridge ของ arginines จากซิมูเลชันโดยการวัดระยะห่างของคู่อะตอม H-donor และ H-acceptor ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่ R133-D62, R133-E93, R126-E45, R126-E107, R123-E45, R123-E107 และ R120-E107	36
รูปที่ 4.1 EPR spectra, $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ โครงสร้างของ CorA $Mg^{2+}$ channel สืบค้นพื้นผิวโครงสร้างแสดงการเปรียบเทียบค่า $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิด	38
รูปที่ 4.2 ผลต่างของค่า interaction parameters ( $\Delta\Omega$ ) ในตำแหน่ง 245 - 315 ของ CorA $Mg^{2+}$ channel ในสภาวะเปิดและสภาวะปิด ถ้า $\Delta\Omega$ ของกรดอะมิโนใดมีเครื่องหมายบวกแสดงว่าคู่กรดอะมิโนนั้นของ CorA ในสภาวะเปิดอยู่ห่างออกไป แต่หาก $\Delta\Omega$ ของกรดอะมิโนใดมีเครื่องหมายลบ แสดงว่าคู่กรดอะมิโนนั้นของ CorA ในสภาวะเปิดอยู่ใกล้เข้ามา	41

- รูปที่ 4.3 การประเมินโมเดล CorA ที่สภาวะเปิด จากการคำนวณด้วยวิธี PaDSAR  
พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ restraint penalty (a) พลังงานอันตร  
กิริยาของ pseudoatom กับ %consistency ของ sign of  $\Omega$  กับ  $\Delta r_{C\beta}$  (b)  
พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ MD time ของ 25 โมเดล (c) กราฟคอน  
ทัวร์แสดง Pairwise RMSD ระหว่างโมเดล (d)  $C\alpha$ -RMSD จาก MD simulation  
(d) และ  $C\alpha$ -RMSD บริเวณ stalk-TM1 ของแต่ละซับยูนิต จำนวน 5 ซับยูนิต (f). 43
- รูปที่ 4.4 โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดทั้ง 10 โมเดลที่วางซ้อนทับกัน  
มุมมองจากด้านนอกเซลล์ (a) และมุมมองจากด้านข้างของเซลล์ (b) ระยะห่าง  $C\beta$ -  
 $C\beta$  ระหว่างซับยูนิตบริเวณ stalk และ TM1 จากโครงสร้างที่สภาวะปิด และสภาวะ  
เปิด (c) และเปรียบเทียบระหว่าง ระยะห่าง  $C\beta$ - $C\beta$  กับ  $\Delta\Omega$  แสดงแนวโน้มกัน  
เปลี่ยนแปลงคอนฟอร์มเมชันบริเวณ stalk และ TM1 44
- รูปที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโพรงตามแนวแกนของแซนแนล (a) โดยคำนวณ  
จากโครงสร้างที่สภาวะปิด (เส้นสีแดง) และเปิด (เส้นสีดำ และเขียวสำหรับค่าเฉลี่ย)  
กราฟแสดงขนาดของโพรง และพลังงานโซเวชันของ  $Mg^{2+}$  ในตำแหน่งต่างๆ ตาม  
แนวแกนของแซนแนลที่สภาวะปิด (b) และที่สภาวะเปิด (c) 45
- รูปที่ 4.6 โครงสร้าง CorA ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิด (a) โครงสร้างซ้อนทับที่บริเวณ  
stalk และ TM1 แสดงกลไกการเปิด-ปิดแบบกรรไกร หรือรูกลิ้ง (b) และขนาดของ  
โพรงที่กว้างขึ้น (c) 46
- รูปที่ 4.7 กราฟคอนทัวร์ของระยะห่างระหว่างโดเมนต่างๆ ระหว่างซับยูนิต (a) และ  
ภายในซับยูนิต (b) 47

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ไอออนแชนแนลบางชนิดที่บกพร่องในการทำงานซึ่งเป็นสาเหตุของโรค	2
ตารางที่ 1.2 ยาบางชนิดกับโมเลกุลเป้าหมายที่เป็นไอออนแชนแนล	3
ตารางที่ 1.3 เป็นสรุปเพื่อความชัดเจนของแบบจำลองที่จะสร้างขึ้นใหม่ ข้อมูลที่จะนำมาใช้ รวมถึงประเด็นที่สนใจในงานวิจัย	17
ตารางที่ 2.1 สรุปข้อมูลที่ใช้สำหรับ MD simulations ใน Up- และ Down-State Conformation	22
ตารางที่ 3.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนของโดเมน KvAP-VSD ที่กำหนดชนิดของ pseudospin	29
ตารางที่ 3.2 ระยะห่างระหว่างสปินที่วัดได้จาก KvAP-VSD ในสภาวะ PC:PG, DOTAP และในโครงสร้างเฮ็กซ์เรย์ ผลต่างของระยะห่างนี้นำมาใช้ในการคำนวณโครงสร้างของสภาวะพัก	30
ตารางที่ 3.3 จำนวนเฉลี่ยของโมเลกุลน้ำที่วัดได้จาก extracellular และ intracellular water crevices ของ KvAP-VSD จากซีมิเลชันทั้งสามระบบ	35
ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนของโดเมน TmCorA ที่กำหนดชนิดของ pseudospin	39
ตารางที่ 4.2 CB-CB distance constraints ระหว่างซับยูนิตสำหรับใช้ในการคำนวณ	40

## รายการสัญลักษณ์

### คำย่อ และสัญลักษณ์

TM	Transmembrane
VSD	Voltage-sensing domain
PD	Pore domain
SDSL	Site-directed spin labeling
EPR	Electron paramagnetic resonance
$\Delta H_0^{-1}$	mobility
$\Pi_{O_2}$	Oxygen accessibility
$\Pi_{NiEDDA}$	NiEDDA accessibility
NiEDDA	nickel(II) ethylenediamine-N,N'-diacetate
K <sub>v</sub> channels	Voltage-gated potassium channels
Mg <sup>2+</sup> channels	Magnesium channels
KvAP	Potassium channel from <i>Aeropyrum pernix</i>
CorA	Cobalt-resistant phenotype of magnesium channel From <i>Thermotoga maritima</i>
Kv1.2-2.1	Chimeric potassium channel from <i>Rattus norvegicus</i>
POPC	2-oleoyl-1-pamlitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPG	2-oleoyl-1-pamlitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-glycerol
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
PaDSAR	Pseudoatom Driven Solvent Accessibility Refinement

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ไอออนแชนแนล

ไอออนโลหะ เช่น  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  เป็นอนุภาคที่มีประจุและมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากความเข้มข้นและประจุของไอออนเหล่านี้ไม่เท่ากันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ไอออนจะเคลื่อนที่เข้าและออกเซลล์โดยผ่านชั้นเมมเบรนอาศัยกระบวนการการแพร่ที่สำคัญสองชนิด คือ การแพร่แบบแพสซีฟ (passive diffusion) หรือตามเกรเดียนท์ของเคมีไฟฟ้า (electrochemical gradient) กับการแพร่แบบแอกทีฟ (active diffusion) หรือสวนทางกับเกรเดียนท์ของเคมีไฟฟ้า การแพร่ในแบบหลังต้องใช้พลังงานจากปฏิกิริยาสลาย ATP (adenosine triphosphate) เนื่องจากการเคลื่อนที่ของไอออนเข้าและออกเซลล์ต้องผ่านชั้นเมมเบรนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ (phospholipid bilayer) ด้วยองค์ประกอบทางเคมีของฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นสายโซ่ยาวของไฮโดรคาร์บอน ภายในเมมเบรนจึงมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง (hydrophobicity) ทำให้กระบวนการที่ไอออนเคลื่อนที่ผ่านชั้นเมมเบรนโดยตรงไม่สามารถเกิดขึ้นภายในเซลล์ได้เอง (non-spontaneous process) เพราะเซลล์ต้องใช้พลังงานแรงขับเคลื่อนสูงมาก อย่างไรก็ตาม ธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตจะต้องมีการแลกเปลี่ยนสารระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมภายนอกเพื่อการดำรงชีวิต ดังนั้น สิ่งมีชีวิตจึงมีระบบเพื่อให้กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้ หนึ่งในระบบสนับสนุนการทำงานของเซลล์คือการอาศัยโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ฝังตัวอยู่ในชั้นเมมเบรนที่สามารถสร้างช่องไฮโดรฟิลิกทางผ่านของไอออน (hydrophilic pore) เพื่อลดพลังงานที่ต้องใช้ในการขับเคลื่อนที่ของไอออน โปรตีนที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไอออนแชนแนล<sup>1</sup>

ไอออนแชนแนลเป็นอินทิกรัลเมมเบรนโปรตีน (Integral membrane protein) ที่สร้างช่องทางผ่านในเมมเบรนเพื่อให้ไอออนหรือสารสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์หรือออกนอกเซลล์ ไอออนแชนแนลมีบทบาทสำคัญและเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการทำงานในระบบสรีรวิทยาของระบบประสาท การทำงานที่สำคัญของไอออนแชนแนลได้แก่ การขนส่ง (Transport) การรักษาสมดุลของสาร (Homeostasis) การตอบสนองสิ่งเร้า การแปลงและการถ่ายทอดสัญญาณเพื่อติดต่อสื่อสารกันในเซลล์ประสาท (Signal regulation and transduction) แคมไอออนบางชนิด เช่น  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  มีบทบาทในการถ่ายทอดสัญญาณทางไฟฟ้าของเซลล์ประสาท ปริมาณของ  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  ระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ต้องสัมพันธ์กันเพื่อสร้างและปรับศักย์ไฟฟ้าเมมเบรน (membrane potential) ของเซลล์ประสาทให้สอดคล้องและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แคมไอออนเหล่านี้ถูก

ลำเลียงเข้าและออกเซลล์โดยอาศัยไอออนแชนนัลในกลุ่มโซเดียมแชนนัลและโปแตสเซียมแชนนัลเป็นสำคัญ ไอออนแชนนัลในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามชนิดสิ่งเร้าที่กระตุ้นให้โปรตีนเปิดหรือปิดช่อง ที่สำคัญเช่น ligand-gated ion channels และ voltage-gated ion channels นอกจากนี้ ไอออนแชนนัลบางชนิดที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท แต่ทำหน้าที่เป็นเปิดช่องทางให้สารเคลื่อนที่ผ่านเพื่อนำไปจะใช้เป็นวัตถุดิบหรือมีส่วนช่วยในปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ กระบวนการเมตาบอลิซึม และการควบคุมการทำงานของโปรตีน เป็นต้น เนื่องจากไอออนแชนนัลเชื่อมโยงกับกระบวนการพื้นฐานทางสรีรวิทยาของระบบประสาทที่หลากหลาย การทำงานที่ผิดปกติของไอออนแชนนัล เช่น การกลายพันธุ์ของ voltage-gated potassium channel ( $K_v$ ) และ voltage-gated sodium channel ( $Na_v$ ) ก่อให้เกิดโรคและปัญหาสุขภาพได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม<sup>2</sup> เช่น โรคความผิดปกติของหัวใจ โรคความผิดปกติทางประสาทวิทยา ไตวาย อาการที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวดและความรู้สึก (ตารางที่ 1.1) เป็นต้น จึงทำให้โปรตีนในกลุ่มนี้จึงมีศักยภาพในการเป็นโมเลกุลเป้าหมายสำหรับการรักษา รวมถึงการค้นคว้าและพัฒนา ยา เป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ตารางที่ 1.1 ไอออนแชนนัลบางชนิดที่บกพร่องในการทำงานซึ่งเป็นสาเหตุของโรค<sup>2</sup>

ion channel family	channel	disease
$K_{ir}$	$K_{ir}1.1$	Bartter's syndrome
	$K_{ir}2.1$	Andersen's Syndrome
$K_v$	$K_v1.1$	episodic ataxia type 1
	KCNQ1	short or long QT syndrome
	KCNQ2	benign neonatal febrile convulsions
	KCNQ4	nonsyndromic deafness
	hERG	short or long QT syndrome
TRP	TRPP2	polycystic kidney disease
$K_{Ca}$	BK	Epilepsy
$Na_v$	$Na_v1.1$	Epilepsy
	$Na_v1.5$	long QT syndrome
	$Na_v1.6$	cerebellar ataxia
	$Na_v2.1$	benign familial neonatal seizures
$Ca_v$	$Ca_v1.2$	timothy syndrome
GABA	GABA <sub>A</sub>	juvenile myoclonic epilepsy

AChR	CHRNA <sub>4</sub>	autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy
------	--------------------	--

ปัจจุบัน ไอออนแชนแนลเป็นโปรตีนเป้าหมายของยาหลายชนิด (ตารางที่ 1.2) เช่น ยาที่มุ่งเป้าในกลุ่ม G-protein-coupled receptors, voltage-gated calcium channel (Ca<sub>v</sub>), Na<sub>v</sub> นอกจากนี้ในด้านเกษตรกรรม เช่น Na<sub>v</sub> เป็นเป้าหมายของยาฆ่าแมลงประเภทดีดีทีและในกลุ่มไพริทรอยด์ (pyrethroids)<sup>3</sup> จากการวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีโอม (proteome) ของเชื้อโรคบางชนิด มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนายาชนิดใหม่แบบมุ่งเป้าไปที่ไอออนแชนแนลชนิดอื่นอีกหลายชนิด<sup>4-6</sup> ความรู้ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งเกี่ยวกับโครงสร้างและกลไกการทำงานในระดับโมเลกุลของไอออนแชนแนลจะเป็นประโยชน์ในต่อมนุษย์ในหลายๆด้าน

ตารางที่ 1.2 ยาบางชนิดกับโมเลกุลเป้าหมายที่เป็นไอออนแชนแนล

Drug	Target channel	Disease target	year of first clinical usage
Verapamil	L-type Ca <sub>v</sub>	hypertension	1982
Diltiazem	L-type Ca <sub>v</sub>	hypertension	1982
amlodipine	L-type Ca <sub>v</sub>	hypertension	1990
nifedipine	L-type Ca <sub>v</sub>	hypertension	1977
gabapentin	Ca <sub>v</sub> (α2δ)	pain	1994
pregabalin	Ca <sub>v</sub> (α2δ)	pain	2004
sotalol	hERG	arrhythmia	1992
flecainide	Na <sub>v</sub> 1.5	arrhythmia	1982
ziconotide	Ca <sub>v</sub> 2.2	severe pain	2004
lidocaine	Na <sub>v</sub>	local anesthetic	1949
bupivacaine	Na <sub>v</sub>	local anesthetic	1987
lamotrigine	Na <sub>v</sub>	epilepsy, bipolar	1994
riluzole	Na <sub>v</sub>	amyotrophic lateral sclerosis	1995
phenytoin	Na <sub>v</sub>	epilepsy	1953
lacosamide	Na <sub>v</sub>	seizures and pain	2008



carbamazepine	Na <sub>v</sub>	epilepsy	1963
varenicline	nAChR	smoking cessation	2006
flupirtine	KCNQ2/3	epilepsy	1984
retigabine	KCNQ2/3	epilepsy	2011
diazepam	GABA <sub>A</sub>	depression	1963

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างแบบจำลองโมเลกุลและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสามมิติและกลไกการทำงานของโปรตีนโดยใช้เทคนิค molecular modeling และ molecular dynamics simulations โดยมุ่งเป้าไปที่ K<sub>v</sub> channel และ Mg<sup>2+</sup> channel รายงานวิจัยนำเสนอสองส่วน คือ 1) การสร้างโมเดลและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้า (voltage-sensor domain) ของ K<sub>v</sub> channel ที่สภาวะพัก (resting state) และสภาวะกระตุ้น (activated state) และ 2) การสร้างโมเดลและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของ Mg<sup>2+</sup> channel ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิด ทั้งนี้การศึกษาเอกลักษณ์เชิงโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีนชั้นไขมันก็เพื่อตอบปัญหาที่สำคัญของกลไกการขนส่งไอออนข้ามเซลล์เมมเบรน เช่น กรดอะมิโนใดในโปรตีนตอบสนองหรือรับรู้ (Sensing) สิ่งเร้าอย่างไร ความจำเพาะต่อไอออน (Ion specificity) การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันกับกลไกของการเกต (Gating mechanism) งานวิจัยใช้กระบวนการการสร้างแบบจำลองเชิงโครงสร้างจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีเทคนิค Site-directed spin labeling และ Electron paramagnetic resonance (SDSL-EPR) การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลและการคำนวณพลังงานเสรี (Molecular dynamic simulation and free energy calculations)

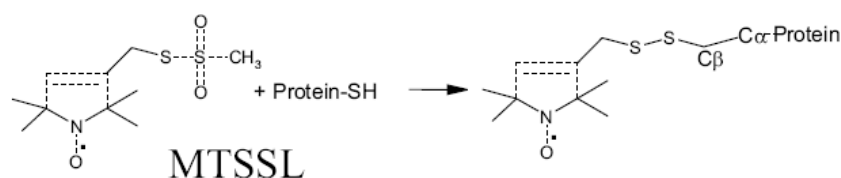
## 1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา

### 1.2.1 เทคนิค SDSL/EPR

โครงสร้างโมเลกุลของไอออนแชนแนลให้ข้อมูลที่ช่วยนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการขนส่งไอออนข้ามชั้นเมมเบรน เทคนิคผลึกศาสตร์รังสีเอ็กซ์ (X-ray crystallography) และนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์ (NMR) เป็นเทคนิคสำคัญในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน อย่างไรก็ตาม ไอออนแชนแนลเป็นเมมเบรนโปรตีนฝังอยู่ในชั้นฟอสโฟลิพิด การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลภายใต้สภาพแวดล้อมดังกล่าวด้วยเทคนิคทั้งสองมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะปัญหาการใช้ Detergent เป็นตัวทำลายกับความเสถียรทางโครงสร้างของโปรตีน เทคนิค SDSL-EPR ถูกนำมาใช้

เป็นเทคนิคทางเลือกเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเอกลักษณ์เชิงโครงสร้างและการทำงานของเมมเบรนโปรตีน

โดยทั่วไป เทคนิค SDSL เป็นกระบวนการการติดอนุมูลอิสระ (Free radical) เรียกว่า Nitroxide spin ที่ตำแหน่งจำเพาะบนโปรตีนที่ผ่านกระบวนการ Site-directed cysteine mutagenesis โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างหมู่ -SH ของกรดอะมิโน cysteine กับรีเอเจนต์ Methanethiosulfonate spin label (MTSSL) (รูปที่ 1.1) แล้วได้โปรตีนที่มีสปินติดอยู่บริเวณตำแหน่งซิสเทอีนนั้น เมื่อนำไปบันทึกด้วยเทคนิค EPR จะได้พิกัดสัญญาณอีพ็อร์ของสปินนั้น โดยสปินจะทำหน้าที่เป็นโพรบ (probe) หรือตัวรายงานสภาพแวดล้อม (environmental reporter) SDSL-EPR ถูกนำมาใช้ศึกษาโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีนหลายชนิด เพราะมี sensitivity สูงและ ศึกษาในตัวทำละลายที่เป็น biological membrane ได้ดีกว่า<sup>7-8</sup>



รูปที่ 1.1 ปฏิกิริยาการติดสปินระหว่าง Methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับหมู่ -SH (cysteine) ของโปรตีน

เทคนิค SDSL/EPR สามารถให้ข้อมูลทางโครงสร้าง 3 ประเภท คือ 1) ข้อมูลแสดงระดับพลวัตของ side chain ที่มีสปินติดอยู่ โดยคำนวณส่วนกลับของความกว้างของพีกกลางที่ได้จากการอนุพันธ์ของสเปกตรัมดูดกลืนของเทคนิค EPR โดยเรียกว่าค่า mobility ( $\Delta H_0^{-1}$ ) 2) ค่าความสามารถของสปินที่จะเกิดอันตรกิริยากับ paramagnetic reagent เรียกว่าค่า accessibility กระบวนการนี้มีการเติม paramagnetic reagent 2 ชนิด คือโมเลกุลออกซิเจน ( $O_2$ ) และสารละลายเชิงซ้อนของ nickel(II) ethylenediamine-N,N'-diacetate (NiEDDA) แล้ววัดค่า relaxation time ของสปินที่เปลี่ยนแปลงไป ค่า accessibility ที่ได้จากการเติม  $O_2$  เรียกว่า oxygen accessibility ( $\Pi O_2$ ) และค่า accessibility ที่ได้จากการเติม NiEDDA เรียกว่า NiEDDA accessibility  $\Pi O_2$  ใช้เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งสปินที่อยู่ภายในเมมเบรน (lipid-exposed indicator) เนื่องจาก  $O_2$  ซึมแพร่กระจายในเมมเบรนได้ ในขณะที่  $\Pi NiEDDA$  ใช้เป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งสปินที่อยู่ภายนอกเมมเบรน เนื่องจาก NiEDDA ซึมผ่านเมมเบรนไม่ได้ ดังนั้นค่า  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NiEDDA$  เป็นข้อมูลที่บอกสภาพแวดล้อมของกรดอะมิโน

โนตำแหน่งต่างๆ (ที่ติดสปินไว้) ว่าอยู่ในชั้นเมมเบรนหรือไม่ นอกจากนี้ ยังใช้บอกโครงสร้าง  $\alpha$ -helix หรือ  $\beta$ -sheet และ 3) ค่าระยะทางระหว่างสปินที่ติดบนกรดอะมิโนไว้อย่างน้อยสองตำแหน่ง และเกิด spin-spin coupling

อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดหลายประการที่ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลทั้งสามชนิดมาใช้หาโครงสร้างโดยตรงเหมือนกับเทคนิคผลึกศาสตร์รังสีเอกซ์ (x-ray crystallography) หรือนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์ (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 ที่รายงานไว้ในปีเดียวกัน<sup>9-10</sup> ต่อมา Perozo มีความพยายามในการพัฒนากระบวนการวิธีในการคำนวณโครงสร้างของไอออนแชนแนลจากข้อมูล SDSL/EPR ในปี ค.ศ. 2001 Perozo และคณะใช้วิธี ReDCAT<sup>11</sup> โดยนำคำนวณโครงสร้างของ inner transmembrane segments ใน open state<sup>12</sup> ของ KcsA โดยอาศัยโครงสร้าง x-ray ใน close state ของ KcsA 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 ไปสู่ สภาวะอินเทอร์มีเดียตและสภาวะปิดอย่างสมบูรณ์

13

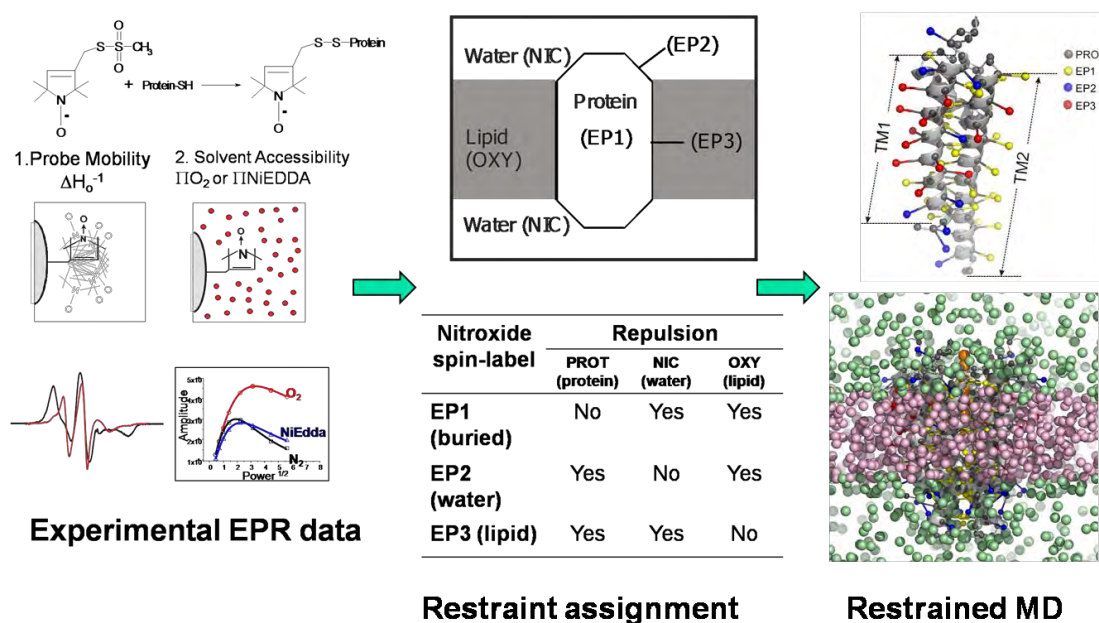
อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญของการคำนวณด้วยวิธี ReDCAT คือ 1) ข้อมูลโครงสร้างถูกสร้างตามระบบกริดหรือ grid search system หากระบบมี degree of freedom มาก จะทำให้ไม่สามารถตรวจหาได้ทุกโครงสร้าง ซึ่งปัญหานี้เรียกว่า combinatorial explosion problem และ 2) การเคลื่อนโมเลกุลจะเป็นแบบแข็งเกร็ง (rigid-body transformation) ดังนั้นไม่สามารถใช้ได้กับโมเลกุลไอออนแชนแนลที่เปลี่ยนแปลงแบบยืดหยุ่นจาก close state ไปสู่ open state

ดังนั้นในปี ค.ศ. 2008 Perozo และคณะได้เสนอวิธีใหม่เรียกว่า PaDSAR (Pseudoatom Driven Solvent Accessibility Refinement)<sup>14</sup> วิธีนี้สร้างอะตอมเสมือน (pseudoatom) 2 ชนิด คือ pseudospin และ pseudoatom environment และใช้อันตรกิริยาระหว่างอะตอมเสมือนทั้งสอง

ชนิดเป็นตัวแปรหรือ 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 1.2 การระบุชนิดของ pseudospin พิจารณาจากค่า  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NIEDDA$  ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตำแหน่งของกรดอะมิโนว่าควรจะอยู่ในเมมเบรน หรือนอกเมมเบรน หรือฝังอยู่ในโปรตีน ส่วน pseudoatom environment มี 3 ชนิดเช่นกัน 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



รูปที่ 1.2 กระบวนการคำนวณโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธี PaDSAR

วิธี PaDSAR นำไปทดสอบโดยการคำนวณโครงสร้างในสภาพ unfolded structure ของ KcsA และถูกนำไปใช้เพื่อแก้ไขโครงสร้างรังสีเอกซ์บริเวณ N-terminal domain ของ mechanosensitive channels of small conductance<sup>15</sup>

### 1.2.2 Magnesium channel

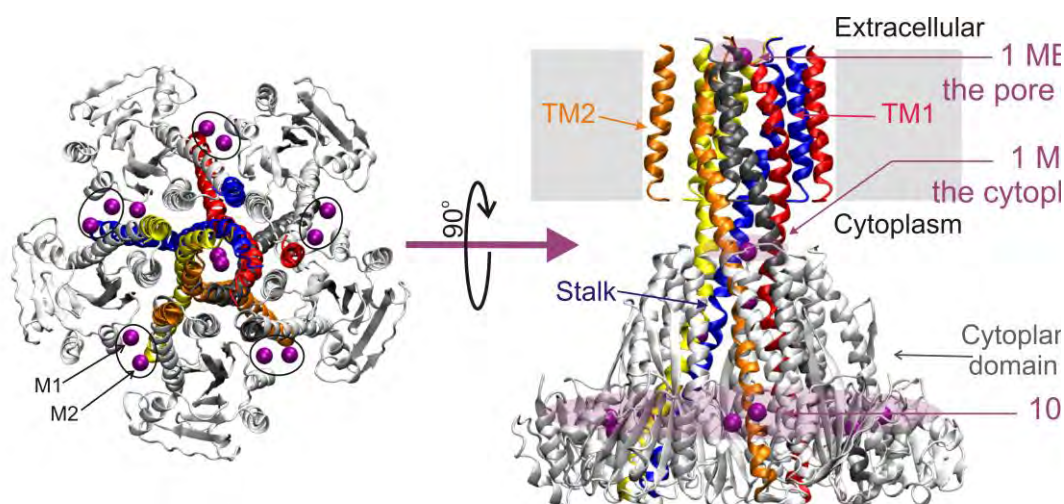
แมกนีเซียม (Mg) เป็นธาตุโลหะจำเป็นที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณมากเป็นอันดับต้นๆ นอกเหนือจาก  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  เนื่องจาก บทบาทที่หลากหลายของ Mg ในแง่ของความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เช่น การสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน การสังเคราะห์แสง เมตาบอลิซึม หรือ การทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ เป็นต้น โรคและปัญหาทางสุขภาพหลายชนิด เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคกระดูกพรุน มีความเกี่ยวข้องกับภาวะการขาดปริมาณ Mg ในเซลล์ ไอออนแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ผ่านชั้นฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์โดยอาศัยเมมเบรนโปรตีนกลุ่มหนึ่ง เรียกว่า แมกนีเซียมแชนแนล ( $\text{Mg}^{2+}$  channel)

$\text{Mg}^{2+}$  channel ที่พบในเซลล์โพรแคริโอต แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ CorA, MgtE และ MgtA/MgtB<sup>16-17</sup> CorA และ MgtE ถูกพบส่วนใหญ่ใน Eubacteria และ Archaea ส่วน MgtA/MgtB พบใน Eubacteria ในเซลล์ยูแคริโอต โปรตีนที่ทำหน้าที่คล้าย CorA ได้แก่ Alr1 ในยีสต์ และ Mrs2 ในไมโทคอนเดรีย Mrs2 เป็น  $\text{Mg}^{2+}$  channel หลักที่พบในมนุษย์ และมีรายงานความเชื่อมโยงระหว่าง multidrug resistance ในเซลล์มะเร็งกับปริมาณ Mrs2 ที่มากเกินไป (Overexpression) ส่วน  $\text{Mg}^{2+}$  channel ของเซลล์ยูแคริโอตทำหน้าที่คล้ายกับ MgtE ในแบคทีเรีย คือกลุ่มโปรตีน SLC41 และ  $\text{Mg}^{2+}$  channel ของเซลล์ยูแคริโอตที่มีความใกล้เคียงกับ MgtA/MgtB จัดอยู่ในกลุ่ม P-type ATPase superfamily ซึ่งเป็นโปรตีนที่ขนส่ง  $\text{Mg}^{2+}$  โดยใช้พลังงานจาก ATP

#### 1.2.2.1 โครงสร้างสามมิติ ของ Magnesium channel

แมกนีเซียมแชนแนลชนิด CorA (Cobalt-resistant phenotype) เป็นโปรตีนตัวแทนของ  $\text{Mg}^{2+}$  channel ที่มีการศึกษากันมากที่สุด ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานโครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ CorA จาก *Thermotoga maritima*<sup>18-20</sup> (รูปที่ 1.3) โครงสร้างของ CorA เป็น Homopentamer สายโปรตีนของแต่ละโมโนเมอร์ประกอบด้วย 351 กรดอะมิโน ภายในสายโปรตีนแบ่งเป็นโดเมนต่างๆ ได้แก่ Cytoplasmic domain (1-245), Stalk และ Transmembrane helix 1 หรือ TM1 (246-310), Periplasmic loop (311-325) และ Transmembrane helix 2 หรือ TM2 (326-351) ที่บริเวณระหว่างมอนอเมอร์ใน Cytoplasmic domain จะมี Metal binding site (MBS) เรียกว่า M1 และ M2 สำหรับยึดจับ  $\text{Mg}^{2+}$  หรือ Divalent cation จำนวน 2 ไอออน ดังนั้น CorA channel สามารถจับ  $\text{Mg}^{2+}$  ทั้งหมด 10 ไอออน ที่บริเวณ M1 และ M2<sup>18, 21</sup> นอกจากนี้ ยังพบโลหะไอออนที่

บริเวณปากทางเข้าของ Pore ด้าน Periplasmic และใน Cytoplasmic pore ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด โครงสร้างบริเวณ Periplasmic loop -ขาดหายไปประมาณ 10-20 เรสซิดิวส์ โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ CorA นี้มีโพรงค่อนข้างแคบและเป็นไฮโดรโฟบิกซึ่งสันนิษฐานว่าโครงสร้างดังกล่าวอยู่ในสภาวะปิด



รูปที่ 1.3 โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ CorA (2uib) แสดง Homopentamer และบริเวณ metal binding site (MBS)

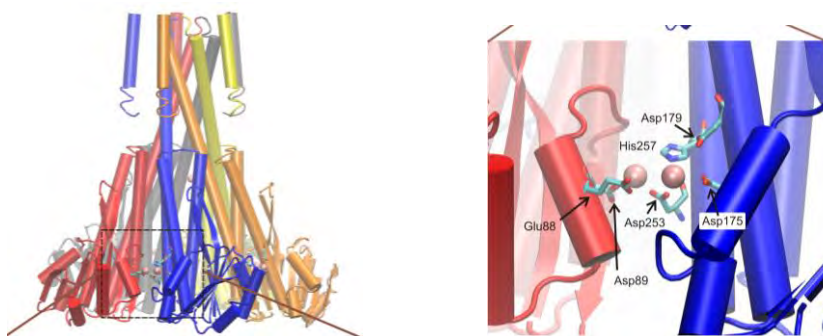
ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกระดับโมเลกุลของ  $Mg^{2+}$  channel ในกระบวนการ  $Mg^{2+}$  homeostasis ในเซลล์มีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับไอออนแชนแนลในกลุ่ม Na หรือ K channels เช่น ความจำเพาะในการคัดกรอง  $Mg^{2+}$  การรับรู้สิ่งเร้าที่มากกระตุ้นในโปรตีนทำงาน การเปิดและปิดของเกต เป็นต้น

มีรายงานวิจัยทาง Electrophysiology ศึกษาการทำงานของ CorA  $Mg$  channel Prof. Perozo และคณะ ใช้กระบวนการวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และเทคนิค Patch-clamp บันทึกกระแสไฟฟ้าอันเนื่องมาจากการไหลของไอออนผ่านเซลล์ *Xenopus oocyte* เซลล์ดังกล่าวผ่านกระบวนการฉีด mRNA ที่มีรหัสยีนของ CorA channel และสามารถแสดงพฤติกรรมเปิดและปิด

ของโพรงใน CorA channel ที่ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  พบว่าระดับความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  ในเซลล์เองที่เป็นสิ่งเร้า (Stimuli) ที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ (unpublished data) โดยในภาวะที่เซลล์มีปริมาณ  $Mg^{2+}$  อย่างเพียงพอ เซลล์จะไม่มีดึง  $Mg^{2+}$  ที่อยู่นอกเซลล์เข้ามาในเซลล์ นั่นคือโพรงทางผ่านของไอออนอยู่ในสภาวะปิด (Closed state) และเมื่อเซลล์ขาด  $Mg^{2+}$  หรือมีความเข้มข้นต่ำมาก เซลล์จะมีกลไกเหนี่ยวนำให้โปรตีนอยู่ในสภาวะเปิดโพรง เพื่อให้  $Mg^{2+}$  ไหลผ่านเข้าไปในเซลล์ และสมมติฐานว่ากลไกเหนี่ยวนำต่อการเกิดนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับการยึดจับระหว่างโปรตีนกับ  $Mg^{2+}$  ข้อสมมติฐานนี้ส่วนหนึ่งมาจากข้อมูลโครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ CorA ที่ยึดจับกับ  $Mg^{2+}$  และอยู่ในสภาวะปิด

### 1.2.2.2 Divalent cation sensor ที่ M1 และ M2 กับการเปิด-ปิดโพรง

เนื่องจากผลึกของโครงสร้างเอ็กซ์เรย์นี้เตรียมภายใต้สภาวะที่มีปริมาณความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  มากพอ และยึดจับกับโปรตีนและ Inactivate ให้ CorA ไม่นำ  $Mg^{2+}$  เข้าเซลล์ (อยู่ในสภาวะปิด) จากโครงสร้างเชิงซ้อนของ  $Mg^{2+}$  ที่ M1 และ M2 ในบริเวณ MBS จะมีกรดอะมิโน Asp89 และ Asp253 เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ  $Mg^{2+}$  (รูปที่ 1.4) ที่บริเวณยึดจับนี้สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการ Regulate กระบวนการขนส่งไอออนของ CorA โดยสันนิษฐานว่าที่สภาวะปิด Asp89 และ Asp253 จะยึดจับกับ  $Mg^{2+}$  เพื่อช่วยกันสร้างความเสถียรให้กับโครงสร้างของ CorA ที่สภาวะปิด แต่ที่สภาวะเปิด เนื่องจากเป็นภาวะขาด  $Mg^{2+}$  กรดอะมิโนทั้งสองอาจจะไม่จับกับ  $Mg^{2+}$  ดังนั้นจึงเชื่อว่า Asp89 และ Asp253 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดของ CorA โดยทำหน้าที่เป็น Divalent cation sensor (DCS) หากทราบโครงสร้างในสภาวะเปิดของโปรตีนจะเป็นหลักฐานสำคัญในการพิสูจน์สมมติฐานนี้ และจะนำไปสู่หลักการพื้นฐานและการประยุกต์เรื่องการขนส่งไอออนผ่านเมมเบรน เช่น การรับรู้และความจำเพาะต่อ Divalent cation การส่งสัญญาณในการเกิด อันตรกิริยาระหว่างลิพิดกับโปรตีน เป็นต้น



รูปที่ 1.4  $Mg^{2+}$  สองไอออนในบริเวณ MBS กับ Asp89 และ Asp253 ที่เชื่อว่าทำหน้าที่เป็น Divalent cation sensor

การศึกษาเคมีโคออร์ดิเนชันของ  $Mg^{2+}$  ในบริเวณ DCS จะช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของ  $Mg^{2+}$  ที่มีต่อความเสถียรของโปรตีนในสภาวะปิด พบว่าโครงสร้างโคออร์ดิเนชันของ  $Mg^{2+}$  จากข้อมูลเอ็กซ์เรย์ (Resolution = 2.9, 3.9, 3.7 Å สำหรับ 2UIB, 2BBJ และ 2HN2 ตามลำดับ) ยังไม่สมบูรณ์ ขาดจำนวนลิแกนด์ไปบางส่วน ( $Mg^{2+}$  มีเลขโคออร์ดิเนชันเท่ากับ 6 เมื่อเกิดเป็นสารเชิงซ้อน) การศึกษาด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลจะช่วยให้ในการทำความรู้ความเข้าใจในประเด็นโครงสร้างโคออร์ดิเนชันของ  $Mg^{2+}$  ต่อความเสถียรของ CorA ที่สภาวะปิด

### 1.2.3 KvAP-voltage-gated potassium channel

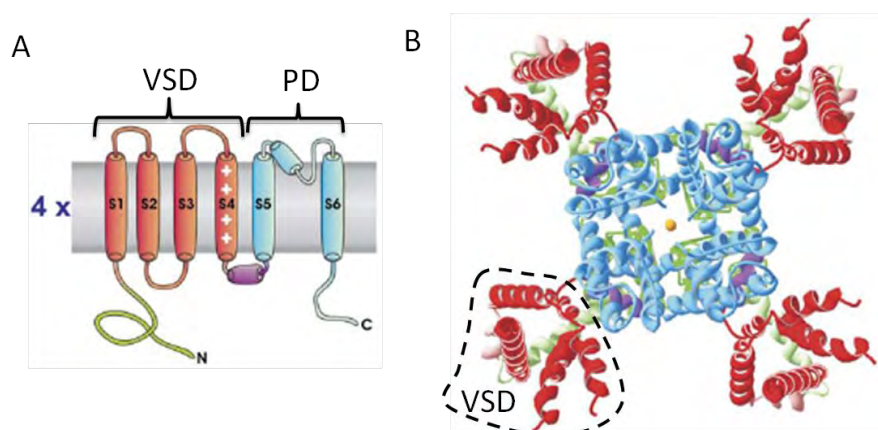
โวลเทจเกตโพแทสเซียมแชนแนล ( $K_v$  channel) เป็นอินทิกรัลเมมเบรนโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นหนึ่งใน Voltage dependent cation channels โดยมีสมาชิกที่ประกอบไปด้วยโพแทสเซียมโซเดียม และแคลเซียมแชนแนล  $K_v$  channel เปิดหรือปิดโพรงแชนแนลตามการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของเมมเบรน<sup>1</sup>  $K_v$  channel มีบทบาทสำคัญด้านสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ระดับเซลล์เดี่ยวไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยเฉพาะกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ประสาท โครงสร้างผลึกของ  $K_v$  channel แสดงให้เห็นว่าเป็นแบบ Homotetramer<sup>22-24</sup> โครงสร้างดังกล่าวประกอบไปด้วย 4 ซับยูนิต แต่ละซับยูนิตประกอบด้วย 6 ท่อนแทรนส์เมมเบรน (รูปที่ 1.5) แทนด้วย S1-S6 เมื่อพิจารณาส่วนที่มีบทบาทต่อการทำงานในโครงสร้างเตตระเมอร์ของ  $K_v$  channel นี้สามารถแบ่งเป็นโดเมนที่สำคัญ 2 โดเมน คือ โดเมนรับรู้ความต่างศักย์ (Voltage-sensing domain, VSD) และโดเมนโพรง (Pore domain, PD) โดเมนรับรู้ความต่างศักย์ประกอบด้วยท่อนแทรนส์เมมเบรน 4 ท่อน (S1, S2, S3 และ S4) โดยเฉพาะท่อน S4 จะมีกรดอะมิโนชนิดประจุบวกโดยเฉพาะอาร์จินีนเป็นจำนวน 3-6 เรสซิดีวส์ซึ่งวางห่างกันทุกๆ 2-3 เรสซิดีวส์ (RXXRXXR) ส่วนโดเมนโพรงประกอบด้วยท่อนแทรนส์เมมเบรน 2 ท่อน (S5 และ S6) ซึ่งมีความสำคัญต่อกลไกการคัดกรองและเลือกผ่านของโพแทสเซียมไอออน

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของ VSD จะเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันที่โดเมนโพรง โดยเรียกสภาวะของ VSD ที่ทำให้โพรงเปิดว่า สภาวะกระตุ้น (Activated state) และสภาวะของ VSD ที่ทำให้โพรงปิดว่า สภาวะพัก (Resting state) โดยทั่วไป เมื่อศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนของเซลล์ (Membrane potential) มีค่าประมาณ -50 - -70 มิลลิโวลต์  $K_v$  channel ส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาวะพัก (โพรงของแชนแนลปิดกั้นเพื่อไม่ให้  $K^+$  เคลื่อนที่ออกนอกเซลล์) และในช่วง Membrane depolarization ค่าศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนของเซลล์สูงขึ้นเกินระดับ Threshold จะเกิดกระบวนการกระตุ้น  $K_v$  channel ให้ปรับคอนฟอร์เมชันเพื่อเปิดโพรง เชื่อว่ากลไกรับรู้การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของเมมเบรนที่ทำให้โพรงของ  $K_v$  channel เปิดหรือปิด (ในช่วง Membrane



depolarization / hyperpolarization) เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสนามประจุบน VSD ซึ่งเป็นผลจากการเคลื่อนที่ของประจุบวกของอาร์จินีนบน S4 และเหนี่ยวนำให้ Gate ของโพรงเปิดออก การเปลี่ยนสนามประจุอันเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ของอาร์จินีนบน S4 นี้เรียกว่า Gating charge เหตุใดอาร์จินีนที่มีประจุบวกจึงมีความเสถียรในเมมเบรนได้ อาร์จินีนเหล่านี้จับคู่กับกรดอะมิโนประจุลบ (Aspartic และ Glutamic acid) โดยเกิด Salt-bridge interaction อย่างไร และเปลี่ยนไปอย่างไรเมื่อเกิดการเคลื่อนที่ของ VSD เนื่องจากการเปลี่ยนสภาวะ การทดลองเพื่อตอบคำถามของประเด็นเหล่านี้ทำได้ยากและมีเงื่อนไขที่ซับซ้อน แต่หากนำข้อมูลการทดลองมาผนวกร่วมกับระเบียบวิธีการออกแบบและการคำนวณทางพลวัตเชิงโมเลกุลจะเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยในการอธิบายกลไกการทำงานของ  $K_v$  channel ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

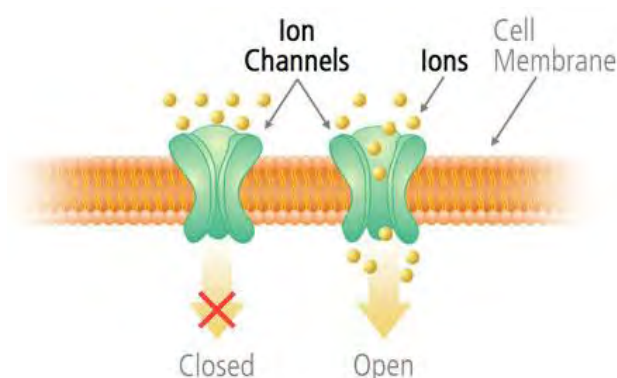
ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการทดลองที่ให้รายละเอียดการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของ VSD ระหว่างสภาวะทั้งสอง เนื่องจากโครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ VSD ใน  $K_v$  channel มีอยู่เพียงสภาวะกระตุ้นเพียงสภาวะเดียวเท่านั้น มีการนำเสนอรูปแบบการเคลื่อนที่ของ S4 หลายรูปแบบ เช่น แบบ Paddle model, Channel model และ Helical screw model ซึ่งแต่ละแบบมีความคล้ายคลึงกันในเรื่องของทิศทางที่ S4 เคลื่อนที่ แต่มีขนาดหรือระยะทางการเคลื่อนที่ต่างกันอย่างมากมีนัยสำคัญ (ตั้งแต่ 5-20 Å) และยังไม่มีการทดลองใดที่สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจน ในงานวิจัยนี้ มุ่งให้ความสนใจในประเด็นเรื่อง การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของ  $K_v$  channel เกี่ยวข้องกับกลไกการรับรู้และตอบสนอง การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของเมมเบรนอย่างไร เช่น ขนาดและรูปแบบการเคลื่อนที่ของ VSD การเกิดและแตกเปลี่ยน Salt-bridge interaction ของอาร์จินีน โดยจะใช้เทคนิคการออกแบบเชิงโมเลกุลเพื่อจำลองโครงสร้างของโดเมนรับรู้ความต่างศักย์ของ KvAP (เป็น  $K_v$  channel จาก *Aeropyrum pernix*) ที่สภาวะพักจากข้อมูล SDSL-EPR และการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของ KvAP ที่สภาวะกระตุ้นและสภาวะพักในลิพิดไบเลเยอร์



รูปที่ 1.5 Structural architecture ของ Kv channels (A) Transmembrane topology ของหนึ่งซับยูนิต และ (B) โครงสร้างเตตระเมอร์ของ Kv1.2 (PDB code: 2A79) มองจาก Top view

### 1.2.4 การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันที่เชื่อมโยงกับสภาวะเปิดและปิดของไอออนแชนแนล

ในการทำงานของไอออนแชนแนล อาจพิจารณาได้ว่าประกอบด้วยสภาวะอย่างน้อย 2 สภาวะ คือ สภาวะปิด (Closed state) และสภาวะเปิด (Open state) ของโปรตีน (รูปที่ 1.6) ในที่นี้ ที่สภาวะปิด โปรตีนจะอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่กั้นไอออนไม่ให้เคลื่อนที่ผ่านบริเวณที่เรียกว่า Pore (โพรงทางผ่านของไอออน) ส่วนสภาวะเปิดใช้นิยามสภาวะที่โพรงของโปรตีนเปิดให้ไอออนเคลื่อนที่ผ่าน จากรายงานวิจัยด้วยกระบวนการวิธีต่างๆ เช่น Electrophysiology, Biochemistry และ Biophysics การเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างสภาวะทั้งสองของไอออนแชนแนลเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันนี้มีกลไกระดับโมเลกุลที่ซับซ้อนซึ่งเป็นประเด็นของโจทย์วิจัย เช่น โปรตีนรับรู้สิ่งเร้าอย่างไร โปรตีนสามารถคัดกรองไอออนได้อย่างไร โปรตีนตอบสนองสิ่งเร้าโดยการเปิด-ปิดโพรงนั้นทำได้อย่างไร มีงานวิจัยที่พยายามศึกษาปัญหาเหล่านี้ แต่ด้วยผลการทดลองจากวิธีต่างๆยังมีข้อโต้แย้งและถกเถียงกันอยู่ การอธิบายกลไกเหล่านี้ยังไม่ชัดเจน เพื่อช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจได้ดียิ่งขึ้น การวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานในเชิงลึกยังมีความจำเป็น เช่น โครงสร้างของโปรตีนที่สภาวะต่างๆ อันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างโปรตีนกับไอออน โปรตีนกับลิพิด หรือกับกรดอะมิโนภายในโปรตีนเอง แรงหรือพลังงานที่ใช้ขับเคลื่อนการเคลื่อนที่ของไอออนข้ามชั้นเมมเบรน เป็นต้น ความรู้ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งซึ่งจะนำไปสู่หลักการพื้นฐานและการประยุกต์เรื่องการขนส่งไอออนผ่านเมมเบรนในระดับจุลภาค (Microscopic level) เพิ่มขึ้นอีกหลายประการ



รูปที่ 1.6 โมเดลจำลองแสดงไอออนแชนแนลในสภาวะปิดและสภาวะเปิด ที่มา

<http://www.neusentis.com/IonChannels.php>

สภาวะเปิดหรือปิดของไอออนแชนแนลเกิดจากการตอบสนองสิ่งเร้าอันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมที่เป็นปัจจัยไปกระตุ้น ไอออนแชนแนลแต่ละประเภทตอบสนองสิ่ง

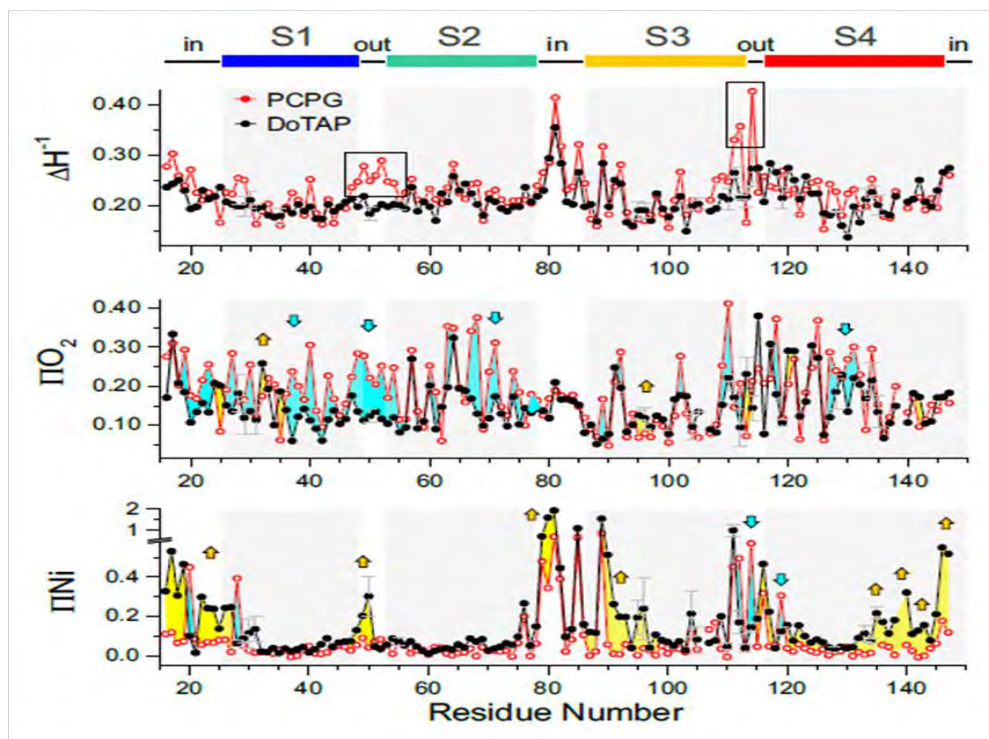
เร้าภายใต้เงื่อนไขที่ต่างกัน เช่น กระตุ้นโดยการเปลี่ยนของศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรน (Membrane potential) ในกลุ่ม Voltage-gated ion channels โดยการยึดจับของลิแกนด์ในกลุ่ม Ligand-gated ion channels โดยการเปลี่ยนของแรงดันเทอร์เกอร์ (Turgor pressure) ของเซลล์โดยการออสโมซิสในกลุ่ม Mechanosensitive channels เป็นต้น แต่ปัญหาสำคัญในการศึกษาเชิงโครงสร้างที่สภาวะต่างๆ ด้วย เทคนิค X-ray หรือ NMR คือ มักทำได้ที่สภาวะใดสภาวะหนึ่งเพียงสภาวะเดียว (สภาวะปิดหรือเปิด) แต่จะไม่ประสบความสำเร็จในอีกสภาวะหนึ่ง เช่น ในกรณีของงานวิจัยนี้ โครงสร้าง X-ray ของ Cobalt-resistant (CorA) magnesium channel มาจากผลึกในสภาวะปิด เพราะสภาวะเปิดโปรตีนไม่เสถียร หรือโครงสร้าง X-ray ของ Voltage-gated potassium channel มาจากผลึกที่สภาวะเปิดเท่านั้น เพราะมีปัญหาการควบคุมศักย์ไฟฟ้าสำหรับตกผลึกที่สภาวะปิด เป็นต้น แม้จะมีความพยายาม เช่น การทำวิศวกรรมโปรตีน หรือปรับตัวแปรในการทดลอง เช่น เปลี่ยนชนิดของ Detergent แต่การบิดเบือนให้ต่างจากความเป็นจริงในธรรมชาติมากเกินไป จะกระทบต่อโครงสร้างให้ต่างไปจาก Native form มากขึ้น

แม้โปรตีนที่กำลังศึกษาอยู่นี้จะมีรายงานโครงสร้างสามมิติที่ได้จากเทคนิค x-ray crystallography แต่ปรากฏว่าโครงสร้างของโปรตีนสอดคล้องกับสภาวะใดสภาวะหนึ่งเท่านั้น ทำให้การอธิบายเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกลไกการทำงานยังมีหลายประเด็นที่ไม่สามารถอธิบายได้ เพราะแบบจำลองโครงสร้างที่มีอยู่ให้ข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์พอ ดังนั้นจึงเป็นที่มาและมูลเหตุจูงใจที่สำคัญของในโครงการวิจัยนี้ในการที่จะพยายามสร้างแบบจำลองโครงสร้างในสภาวะอื่นที่มีความหมายต่อการทำงานของไอออนแชนแนล ในปัจจุบัน แม้จะเคยมีรายงานโมเดลเชิงโครงสร้างของ CorA Mg channel และ  $K_v$  voltage sensor ในสภาวะที่งานวิจัยนี้ให้ความสนใจอยู่ ซึ่งบางรายงานเป็น theoretical model บางรายงานเป็นโมเดลที่สร้างจากข้อมูลการทดลองอื่น เช่น mutagenesis แต่ยังไม่เคยนำข้อมูลจาก SDSL-EPR มาใช้สร้างโมเดล และที่สำคัญยังไม่เคยมีรายงานแบบจำลองโครงสร้าง x-ray ของโปรตีนทั้งสองที่สภาวะดังกล่าว

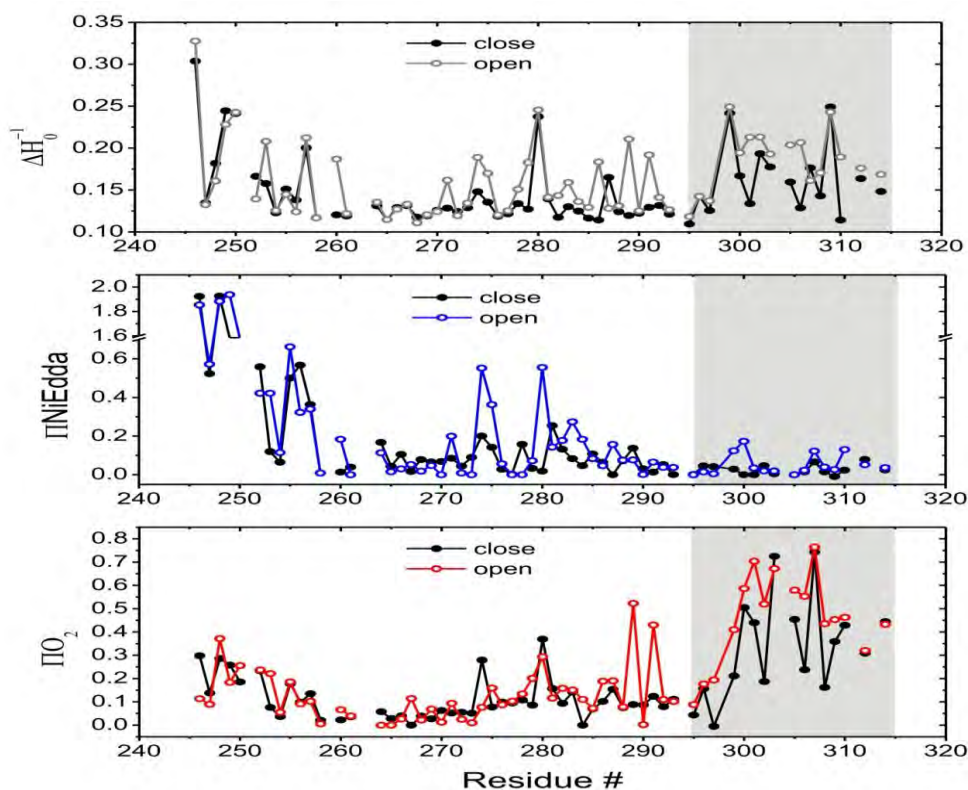
### 1.2.5 ข้อมูล $\Delta H_0^{-1}$ , $\Pi O_2$ และ $\Pi NiEDDA$ ของ CorA และ KvAP

การสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโคปีจากเทคนิค SDSL-EPR ซึ่งได้รับความร่วมมือวิจัยกับ Prof. Eduardo Perozo และคณะที่มหาวิทยาลัยชิคาโก การดำเนินการทดลอง Site-directed cysteine mutagenesis และการติดสปีนบนโปรตีนเพื่อทำการวัดสเปกตรัมด้วยเทคนิค EPR ตัวอย่างกราฟข้อมูล  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NiEDDA$  ของ KvAP และ  $Mg^{2+}$  channel ที่บันทึกในสภาวะที่แตกต่างกัน (รูปที่ 1.7-1.8) แสดงความแตกต่างของโพรไฟล์ของกราฟใน

โปรตีนแต่ละชนิดนี้ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของโครงสร้างของโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนสถานะ การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของโปรตีนระหว่างสภาวะมีรูปแบบอย่างไรและสัมพันธ์กับการทำงานของโปรตีนอย่างไร เป็นโจทย์หลักของโครงการวิจัยนี้



รูปที่ 1.7 กราฟ  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NiEDDA$  ที่สภาวะพัก (DoTAP) และสภาวะกระตุ้น (PCPG) ของ KvAP ของเรสซิดิวซ์ 17-148 (เครื่องหมายลูกศรและกรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ)



รูปที่ 1.8 กราฟ  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NiEDDA$  ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิดของ CorA ของเรสซิวิตซ์ 246-313 (TM1 อยู่ในบริเวณแรเงาสีเทา)

โมเดลเชิงโครงสร้างสามมิติของโปรตีนทั้งสามที่จะสร้างขึ้นมานั้นเป็นการนำเสนอแบบจำลองใหม่โดยจะนำโครงสร้าง x-ray ของโปรตีนชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะอื่นมาใช้เป็นโครงสร้างเริ่มต้นแล้วใช้กระบวนการวิธี PaDSAR และ EPR restraints (ข้อมูลการทดลอง) เพื่อปรับคอนฟอร์เมชันให้สอดคล้องกับสภาวะเป้าหมาย โมเดลเชิงโครงสร้างและสภาวะของโปรตีนที่จะสร้างใหม่มีดังต่อไปนี้

- i) โครงสร้างที่สภาวะเปิดของ CorA Mg channel โดยเริ่มจากโครงสร้าง x-ray ที่สภาวะปิด
- ii) โครงสร้างที่สภาวะพักของ Voltage sensor domain โดยเริ่มจากโครงสร้าง x-ray ที่สภาวะกระตุ้น

ตารางที่ 1.3 เป็นสรุปเพื่อความชัดเจนของแบบจำลองที่จะสร้างขึ้นใหม่ ข้อมูลที่จะนำมาใช้ รวมถึงประเด็นที่สนใจในงานวิจัย

โปรตีน	ข้อมูลทางโครงสร้างและสถานะที่มีรายงานมาก่อนสำหรับใช้เป็นจุดเริ่มต้น	ข้อมูล SDSL-EPR และคอนฟอร์เมชันของสถานะที่จะสร้างใหม่ในงานวิจัยนี้	ประเด็นที่สนใจ (
CorA Mg channel	x-ray / closed state	EPR (รูปที่ 1.7) / open state	รูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันระหว่าง closed และ open states, ion selectivity & permeation, gating mechanism
KvAP Voltage sensor	x-ray/ activated state	EPR (รูปที่ 1.8)/ resting (down) state	รูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันระหว่าง activated และ resting state

### 1.2.6 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อสำรวจกลไกการผ่านของไอออนในเมมเบรนโปรตีนแชนแนลจากแบบจำลองเชิงโครงสร้างที่สร้างจากข้อมูลอีพียาร์สปีนเลเบลลิงและระเบียบวิธีการจำลองในระดับโมเลกุล
- สร้างแบบจำลองเชิงโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีนในกลุ่มไอออนแชนแนลโดยใช้ข้อมูลการทดลองจากเทคนิค SDSL/EPR
- สำรวจกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลำเลียงไอออนของโปรตีนในสถานะแวดล้อมที่มีพอลิฟิไลพิดไบเลเยอร์จากแบบจำลองเชิงโครงสร้างด้วยวิธี MD simulations

โครงการวิจัยนี้ให้ความสนใจสำรวจเอกลักษณ์เชิงโครงสร้างและความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับกลไกการทำงานของไอออนแชนแนลสองชนิด คือ CorA magnesium channel และ KvAP-voltage gated potassium channel

## บทที่ 2

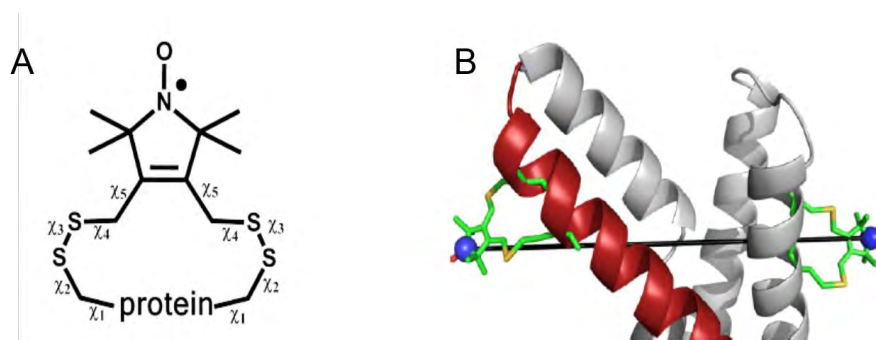
### วิธีการวิจัย

#### 2.1 KvAP voltage sensor

##### 2.1.1 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง

ได้ทำการเตรียมซิสเทอีนมิวแทนต์เดี่ยว (single-cysteine mutants) ของ KvAP-VSD จำนวนทั้งหมด 132 มิวแทนต์ (ครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 16-147) โดยทำการแสดงออก (protein expression) ทำให้บริสุทธิ์ (purification) และการติดสปิน (spin labeling) ให้กับโปรตีน ดำเนินตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้ว<sup>22, 25-26</sup> ในกระบวนการการติดสปิน โปรตีนมิวแทนต์ 1 ตัวอย่าง จะถูกติดสปินโพรบชนิด 1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl methyl methanethiosulfonate แล้วโปรตีนที่ติดสปินจะผ่านกระบวนการ refolding ในลิโปโซม (liposomes) ซึ่งเป็นลิพิดผสมระหว่าง POPC:POPG 3:1 (สำหรับ Up state) และในลิโปโซมชนิด DOTAP (สำหรับ Down state)

นอกเหนือจากนี้ quadruple-cysteine mutants จำนวน 10 มิวแทนต์ (ประกอบด้วย ตำแหน่งต่างๆ ดังนี้ 39/43 118/121; 39/43 121/125; 40/44 118/121; 40/44 121/125; 57/61 118/121; 57/61 121/125; 72/75 118/121; 72/75 121/125; 74/77 118/121; and 74/77 121/125) จะถูกติดสปินโพรบชนิด bifunctional spin label (3,4-bis-(methanethiosulfonylmethyl)-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yloxy radical รูปที่ 2.1) การวิเคราะห์และตรวจสอบโปรตีนใช้วิธีทางสเปกโตรสโคปี light scattering และ fluorescence measurement, Mass spectrometry



รูปที่ 2.1 (A) Bifunctional spin label (B) quadruple-cysteine mutant (39/43 118/121) ที่ติด bifunctional spin label สำหรับวัดระยะห่างระหว่างสปิน

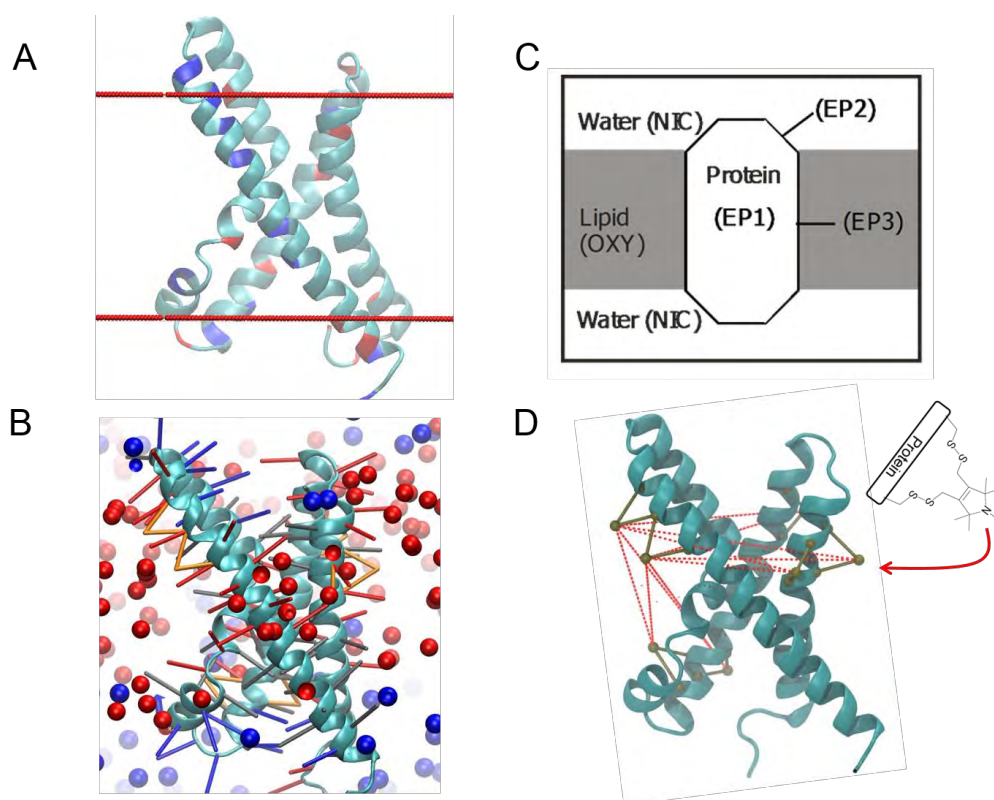


การบันทึกสเปกตรัมอีพ็อดาร์ของโปรตีนตัวอย่างใช้เทคนิค continuous wave EPR method โดยใช้ Bruker EMX spectrometer ที่ติดอุปกรณ์ loop-gap resonator กำหนดความถี่ X-band continuous wave ช่วงไมโครเวฟโดยใช้ 2 mW incident power ในการหาค่า accessibility มีการเติม paramagnetic relaxing agents โดยเติมสารละลายเชิงซ้อนของ nickel(II) ethylenediamine diacetate (NiEDDA) หรือก้ำซอกซีเจนลงในหลอดบรรจุโปรตีนตัวอย่าง และใช้เทคนิค power saturation สเปกตรัมที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาค่า mobility ( $\Delta H_0^{-1}$ ), NiEDDA accessibility ( $\Pi$ NiEDDA) และ O<sub>2</sub> accessibility ( $\Pi$ O<sub>2</sub>) งานด้านการทดลองข้างต้นดำเนินการโดย Prof. Eduardo Perozo และคณะนักวิจัยที่มหาวิทยาลัยชิคาโกรายละเอียดของการทดลองในส่วนนี้สามารถศึกษาได้จากรายงานบทความ<sup>27</sup>

## 2.1.2 สร้างโมเดลเชิงโครงสร้าง KvAP-VSD channel

- 2.1.2.1 ดาวน์โหลดโครงสร้างของโดเมนรับรู้ความต่างศักย์ของ KvAP channel (PDB code 1ORS) เพื่อใช้เป็นโครงสร้างเริ่มต้น (รูปที่ 2.2A)
- 2.1.2.2 กระบวนการสร้างโมเดลด้วยวิธี PaDSAR เริ่มจากสร้างและวิเคราะห์กราฟของข้อมูลค่า mobility, O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility บริเวณ VSD ของ KvAP ที่ติดสปินที่ตำแหน่งเรสซิเดวซ์ 16-147 และทำใน liposomes ชนิด POPC:POPG (สำหรับ Up state) และใน liposome ชนิด DOTAP (สำหรับ Down state) เพื่อกำหนดประเภทของ pseudo-atoms ได้แก่ buried (EP1), water (EP2) และ lipid-exposed (EP3) และ interfacial (EP4) residues (รูปที่ 2.2B) รวมทั้งสร้าง pseudo-atom ชนิดใหม่สำหรับใช้เป็น distance constraint โดยพิจารณาจากระยะทางระหว่างสปินทำวัดโดยใช้ quadruple-cysteine mutants ที่ติด bifunctional spin label
- 2.1.2.3 สร้างชุดคำสั่งที่ใช้สำหรับโปรแกรม CHARMM เพื่อติดประเภทของ pseudo-atoms บนโครงสร้างของ KvAP-VSD (รูปที่ 2.2C และ 2.2D)
- 2.1.2.4 สร้างชุดคำสั่งที่ใช้สำหรับโปรแกรม CHARMM เพื่อเติม pseudo-atoms ของ OXY (oxygen) และ NIC (NiEDDA) ให้ล้อมรอบ KvAP-VSD และวาง OXY ให้อยู่ในบริเวณเมมเบรนและ NIC อยู่ด้านนอกของเมมเบรน (รูปที่ 2.2C)
- 2.1.2.5 สร้างชุดคำสั่งที่ใช้สำหรับโปรแกรม CHARMM เพื่อกำหนดให้ OXY pseudo-atoms เคลื่อนที่อยู่ในบริเวณเมมเบรนและ NIC pseudo-atoms เคลื่อนที่อยู่ด้านนอกเมมเบรน





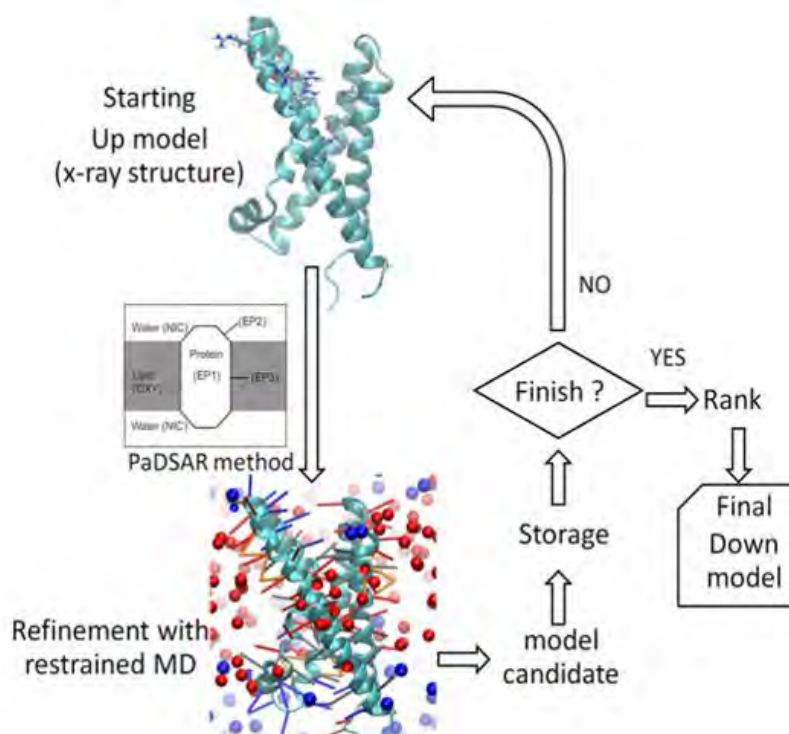
รูปที่ 2.2 (A) โครงสร้างของ KvAP-VSD (1ORS), (B) แผนภาพอย่างง่ายแสดงสภาพแวดล้อมของเรสซิดีวซ์ในโปรตีนเพื่อกำหนดชนิดของ pseudoatom, (C) KvAP-VSD ที่ติด pseudoatoms (EP1, EP2, EP3 และ EP4) แสดงในรูปแบบ stick model ทรงกลมสีแดงและสีน้ำเงินใช้แทน pseudoatom ของ oxygen และ NiEDDA และ (D) KvAP-VSD ที่ติด pseudoatom ชนิดใหม่ที่ใช้สำหรับกำหนด distance constraints เพื่อใช้ในการคำนวณโครงสร้าง

2.1.2.6 สร้างชุดคำสั่งที่ใช้สำหรับโปรแกรม CHARMM เพื่อกำหนดพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณด้วยวิธีพลวัตเชิงโมเลกุล

2.1.2.7 รันโปรแกรม CHARMM เพื่อประมวลชุดคำสั่งที่เตรียมไว้

2.1.2.8 ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของการคำนวณ หากโครงสร้างมีความแตกต่างหรือไม่สอดคล้องกับข้อมูล solvent accessibility ให้กลับไปข้อที่ 2.1.2.2 ใหม่ จนกว่าจะได้โครงสร้างที่สอดคล้องกับข้อมูลมากที่สุด ซึ่งจะใช้เป็นโมเดลของ KvAP-VSD ที่ down-

state ลำดับขั้นตอนการทำงานในกระบวนการสร้างโมเดลด้วยวิธี PaDSAR สรุปไว้ในแผนผังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนในกระบวนการสร้างโมเดล KvAP-VSD ที่สภาวะพักด้วยวิธี PaDSAR

2.1.2.9 สร้างระบบสำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของ KvAP-VSD ที่ down-state และที่ up-state ในลิพิดไบเลเยอร์และน้ำ โดยใช้โปรแกรม VMD

2.1.2.10 ดำเนินการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลด้วยโปรแกรม NAMD โครงสร้าง KvAP-VSD ที่ up-state จะใช้ลิพิดชนิด POPC และ จำลองโครงสร้าง KvAP-VSD ที่ down-state จะใช้ลิพิดไบเลเยอร์สองชนิด คือ DOTAP และ POPC กรณีที่เป็น MD simulation ของ Down-state โดยใช้ POPC เป็นลิพิด จะใส่แรงทางไฟฟ้าที่มีค่า membrane potential เท่ากับ  $-70$  mV ตามสมการ

$$E_z \left( \frac{kcal}{mol \text{ \AA} e} \right) = -23.06 \times \frac{V(volt)}{L_z(\text{\AA})}, \quad (1)$$

โดย  $L_z$  = the length of the system in the z-axis ( $\sim 80$  Å). รายละเอียดเพิ่มเติมของระบบสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สรุปข้อมูลที่ใช้สำหรับ MD simulations ใน Up- และ Down-State Conformation

Models	Electrical field (mV)	Total water molecules	Total phospholipids	Total atoms
Up-state	No	7,025	130	40,722
Down-POPC	-70	7,044	129	40,645
Down-DOTAP	No	6,808	129	39,189

2.1.2.11 ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของการคำนวณ ได้แก่ RMSD, Secondary structure profile เป็นต้น

2.1.2.12 วิเคราะห์และเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้ทั้งสองสภาวะ

2.1.2.13 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลและเขียนบทความ

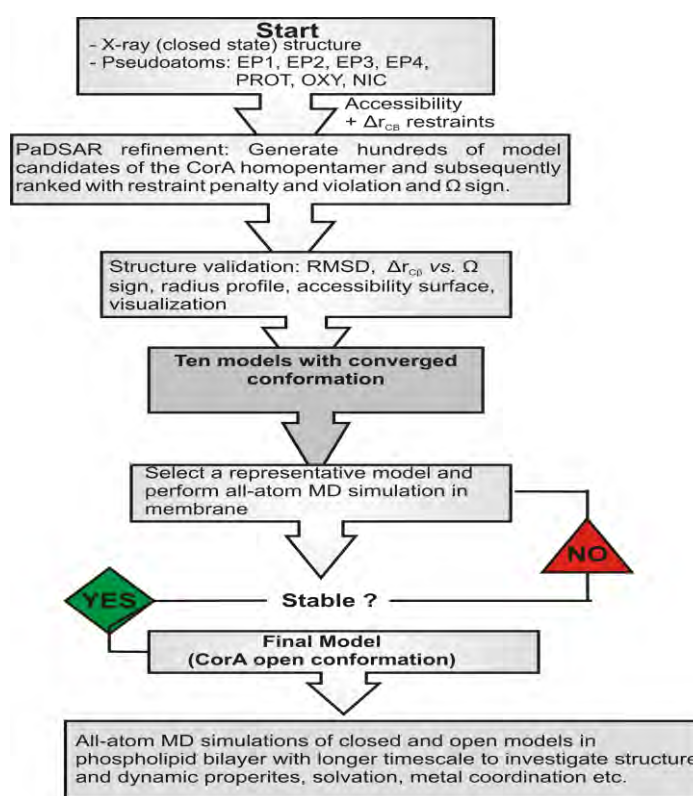
## 2.2 CorA magnesium channel

### 2.2.1 ที่มาของข้อมูลที่ได้จากงานด้านการทดลอง

ได้ทำการเตรียมซิสเตอีนมีวแทนต์เดี่ยว (single-cysteine mutants) ของ CorA magnesium channel จำนวนมากกว่า 100 มีวแทนต์ ซึ่งครอบคลุมโครงสร้างบริเวณ Stalk, TM1, periplasmic loop และ TM2 (กรดอะมิโนลำดับที่ 246-349) โดยทำการแสดงออก (protein expression) ทำให้บริสุทธิ์ (purification) ติดสปีน (spin labeling) และบันทึกสเปกตรัมอีพีอาร์ของซิสเตอีนมีวแทนต์ สเปกตรัมที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาค่า  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi$ NIEDDA และ  $\Pi O_2$  และเนื่องจากเป็น pentamer protein ดังนั้นสามารถใช้เทคนิค DEER (double electron electron resonance) ทหาระยะทางระหว่าง nitroxide spin งานด้านการทดลองข้างต้นดำเนินโดย Prof. Eduardo Perozo และคณะนักวิจัยที่มหาวิทยาลัยชิคาโก รายละเอียดของการทดลองในส่วนนี้สามารถศึกษาได้จากรายงานบทความ<sup>28</sup>

### 2.2.2 สร้างโมเดลเชิงโครงสร้าง CorA magnesium channel

แผนภาพ(รูปที่ 2.3)และขั้นตอนการดำเนินการวิจัยมีรายละเอียดเป็นดังนี้



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนแสดงแผนการดำเนินการวิจัย

- 2.2.2.1 เลือกโมเดลเริ่มต้นซึ่งเป็นโครงสร้างเอกซ์เรย์ของ CorA ปัจจุบันมี 4 โครงสร้างได้แก่ PDB code 2UIB, 2HN2, 2BBJ และ 4EED ทั้งสี่โมเดลมีข้อมูลทางโครงสร้างขาดหายไปคือ บริเวณ Periplasmic loop ดังนั้นจำเป็นต้องวิเคราะห์ทดสอบเปรียบเทียบเพื่อเลือกโครงสร้างที่เหมาะสมที่สุด รวมทั้งการต่อเติมโครงสร้างบริเวณ Loop ที่หายไปด้วย โปรแกรมทำนายโครงสร้าง แล้วทำการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธี PaDSAR
- 2.2.2.2 วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลค่า mobility, O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility ของส่วน Stalk+TM1+TM2 helices ของ CorA ที่ภาวะเปิดและภาวะปิด ข้อมูลดังกล่าวซึ่งได้รับจากผู้ร่วมงานที่มหาวิทยาลัยชิคาโกเป็นผลของการทดลองจากชุดสเปกตรัมอีพาร์ของ nitroxide spin label ที่ติดไว้ตามตำแหน่งต่างๆ บน backbone ของโปรตีน การวิเคราะห์นี้จะสามารถ ระบุแนวทางการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของส่วนดังกล่าวได้อย่างกว้างๆ ระบุชนิดของ pseudoatom EP1, EP2, EP3 และ EP4 ตามการจัดแบ่งประเภทสมบัติของกรดอะมิโนซึ่งได้แก่ buried, water และ lipid-exposed residue เพื่อใช้ในการคำนวณโครงสร้างด้วยวิธี PaDSAR
- 2.2.2.3 สร้างโครงสร้างเริ่มต้น โดยอาศัยผลจากการวิเคราะห์ในข้อ 2.2.2.1 และ 2.2.2.2
- 2.2.2.4 ดำเนินการทำ Structure refinement ด้วยวิธี PaDSAR ซึ่งเป็นการจำลองระบบเพื่อทำการปรับโครงสร้างที่ได้ในข้อ 2.2.2.3 การคำนวณใช้เทคนิคการจำลองทางพลวัตเชิงโมเลกุล ระเบียบวิธีของการคำนวณในขั้นนี้มีรายละเอียดดังนี้: สร้างระบบเพื่อทำการจำลองด้วยวิธีพลวัตเชิงโมเลกุล ระบบประกอบด้วยอะตอมของโครงสร้างของ CorA (ที่ได้ในข้อ 2.2.2.1) และชุด pseudoatom ที่แทนโมเลกุล O<sub>2</sub>, NiEDDA และ nitroxide spin label ที่ติดไว้ที่กรดอะมิโนต่างๆ ของ stalk, TM1, periplasmic loop และ TM2 และประเภทของ pseudoatom ที่แทน nitroxide spin label เป็นไปตามสมบัติ buried, water และ lipid-exposed residue ซึ่งกำหนดไว้ตามข้อ 2.2.2.2 การปรับโครงสร้างอาศัยฟังก์ชันพลังงานศักย์ที่พัฒนาขึ้นเป็นปัจจัยควบคุมอันตรกิริยาระหว่าง pseudoatom ต่างๆ ในระบบ ด้วยระเบียบวิธี PaDSAR โครงสร้างที่ได้จากการถูกปรับตามข้อมูล mobility, O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility
- 2.2.2.5 ตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างที่คำนวณได้และทำการปรับปรุงแก้ไข เลือกโครงสร้างที่สอดคล้องกับค่า O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility มากที่สุดโดยใช้เทคนิคการเทียบสเปกตรัมกับ molecular surface ในขั้นนี้ หากโครงสร้างที่ได้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจสามารถกลับไปทำข้อ 2.2.2.4 โดยปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์หรือเงื่อนไขในการคำนวณตามความเหมาะสม

2.2.2.6 นำโครงสร้าง CorA ที่ภาวะเปิด (ที่ได้จากข้อ 2.2.2.5) และภาวะปิด (ที่ได้จากข้อ 2.2.2.1) ไปสร้างระบบจำลองด้วยวิธี MD simulations เพื่อคำนวณสมบัติต่างๆ ที่เชื่อมโยงกับโครงสร้างและพลวัตของโมเลกุล การจำลองระบบใช้รูปแบบ Explicit solvent simulation กล่าวคือระบบจะจำลองตำแหน่งและการเคลื่อนที่ของอะตอมทุกอะตอมของตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ประกอบด้วย โพรตีน POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) น้ำ (TIP3P) โซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน โดยอาศัยสมการการเคลื่อนที่ของนิวตัน โดยระบบถูกจำลองภายใต้สภาวะเงื่อนไข คือ อุณหภูมิ 298K และความดัน 1 atm เก็บข้อมูลต่างๆ เช่น ตำแหน่งและความเร็วของการเคลื่อนที่ (trajectory) ความดัน ปริมาตร อุณหภูมิ พลังงานจลน์ พลังงานศักย์ พลังงานรวม RMSD) เพื่อวิเคราะห์ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2.7 คำนวณสมบัติต่างๆ ทางโครงสร้างและพลวัตจากข้อมูล simulation, โคออร์ดิเนชันจากราฟ RDF, วัตขนาดของ Pore, RMSF ของโดเมนต่างๆ

2.2.2.8 สรุปและเขียนรายงาน

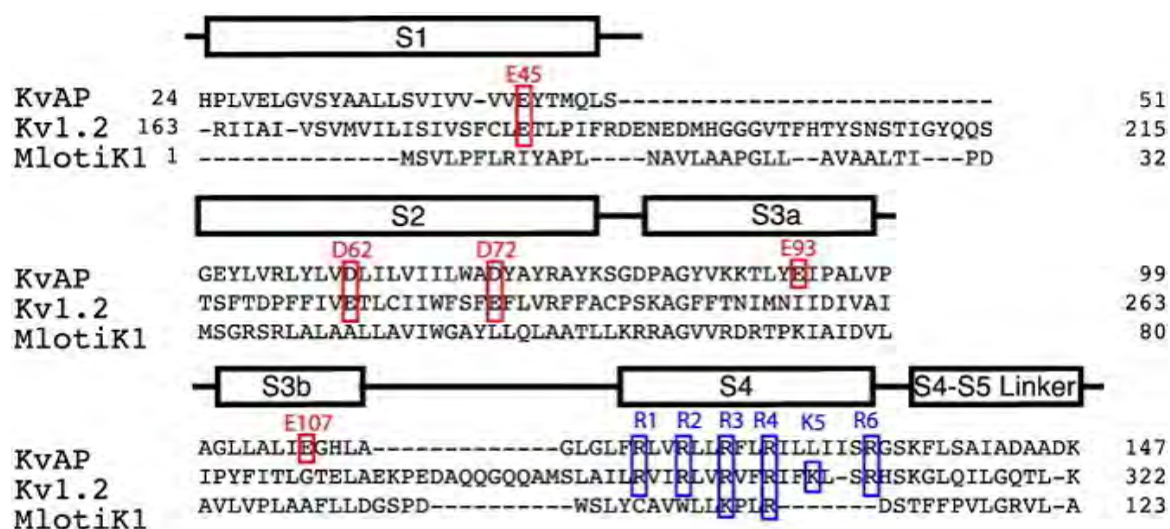
งานด้านการคำนวณและสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ KvAP-VSD และ CorA  $Mg^{2+}$  channel ดำเนินโดยผู้วิจัยหลักของโครงการฯ ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยใช้โปรแกรม CHARMM ในการคำนวณด้วยวิธี MD simulation และวิธี PaDSAR โดยประมวลผลบนเครื่องคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูงของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ (Computational Chemistry Unit Cell) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และใช้โปรแกรม VMD, Pymol, NAMD, Procheck, Wordom, DSSP ในการวิเคราะห์ผล ข้อมูล MD และแสดงภาพโมเลกุลโดยปฏิบัติบนเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

### บทที่ 3

## โมเดลเชิงโครงสร้างของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของ โพแทสเซียมแชนแนลใน KvAP-VSD

### 3.1 Sequence alignment และการวิเคราะห์ข้อมูล EPR ที่ได้จากการทดลอง

ลำดับกรดอะมิโนของ KvAP บริเวณ VSD (KvAP-VSD) ถูกนำมาเปรียบเทียบกับโพแทสเซียมแชนแนลได้แก่ Kv1.2 (Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2), MlotiK1 (cyclic nucleotide-modulated potassium channel from *Mesorhizobium loti*) KvAP ผลของ sequence alignment ที่บริเวณ VSD และส่วนท่อนทรานสเมมเบรน S1-S4 ของ KvAP-VSD ที่ใช้ในการศึกษานี้ แสดงดังรูปที่ 3.1



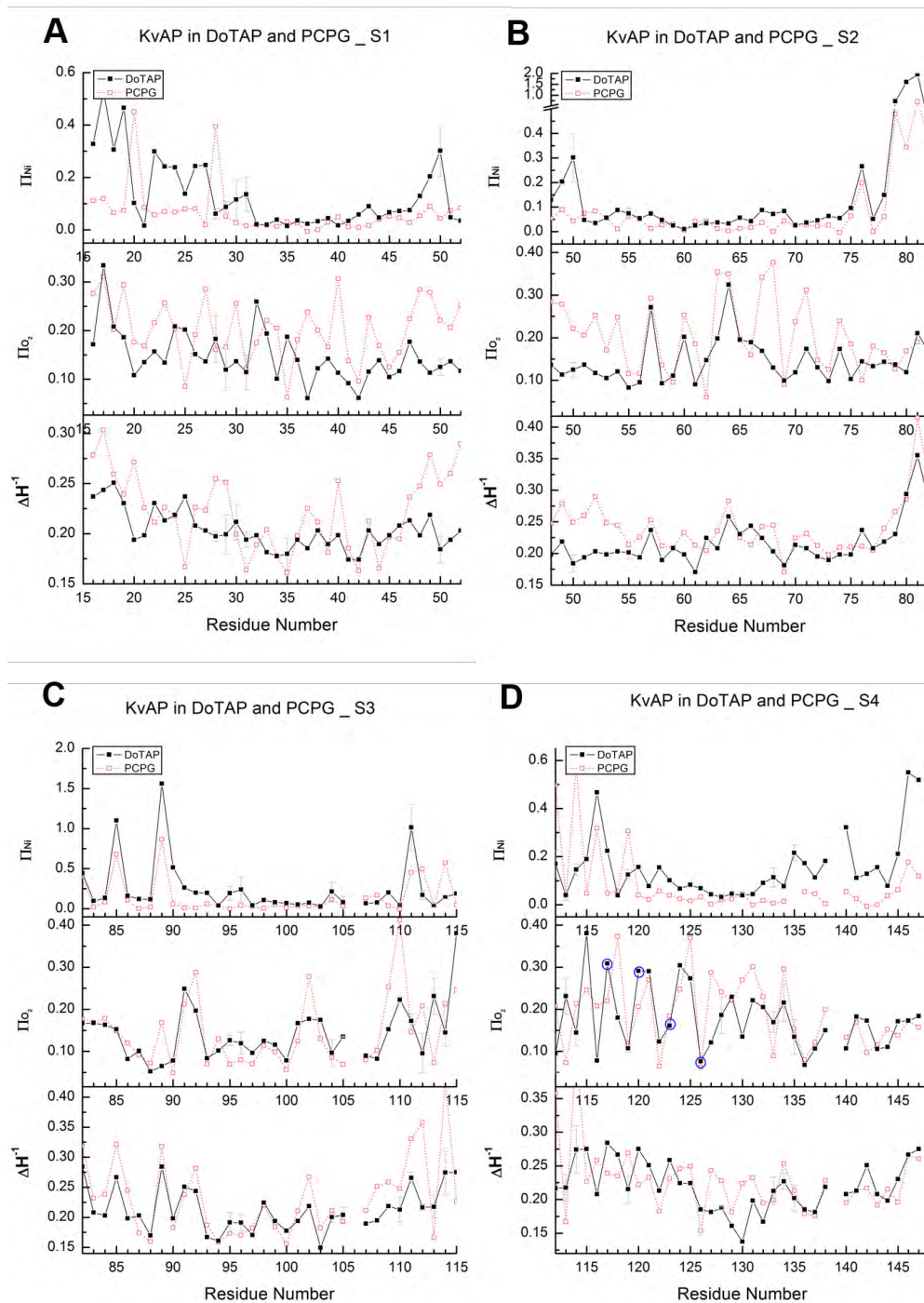
รูปที่ 3.1 Multiple sequence alignment บริเวณ VSD ของโพแทสเซียมแชนแนล (KvAP, Kv1.2 และ MlotiK)

เมื่อวิเคราะห์ค่า  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi$ NIEDDA และ  $\Pi O_2$  ของเรสซิทีวซ์ตำแหน่งต่างๆ ที่อยู่บนท่อนทรานสเมมเบรน S1-S4 จำนวนทั้งหมด 132 ตำแหน่ง (ครอบคลุมบริเวณโครงสร้างของ KvAP-

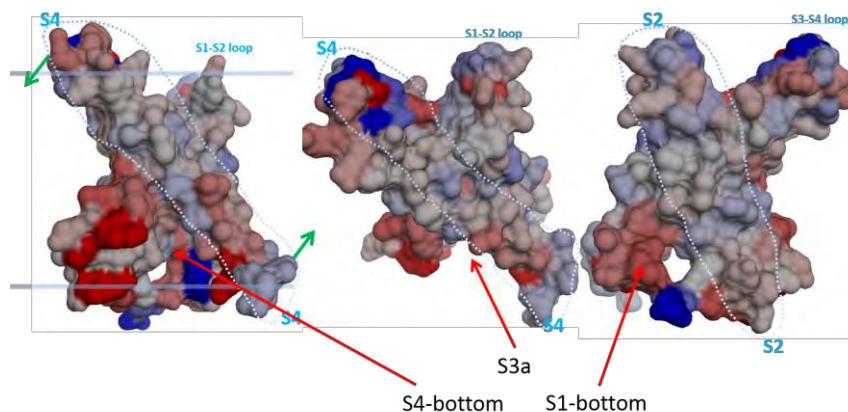
VSD) (รูปที่ 2.2) พบว่าที่บริเวณ S1-S4 ซึ่งเป็นท่อนทรานสเมมเบรนสามารถใช้ข้อมูล  $\Pi O_2$  สูง และค่า  $\Pi NiEDDA$  ต่ำ ยืนยันส่วนที่อยู่ในเมมเบรนได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้กราฟของ  $\Delta H_0^{-1}$  และ  $\Pi O_2$  ของ S1, S2 และ S4 (ยกเว้น S3 ) แสดงความเป็น periodicity ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นโครงสร้างเกลียวอัลฟา ในทางตรงกันข้าม ความเป็น periodicity ของข้อมูล EPR บริเวณ S3 มีความไม่ต่อเนื่อง เนื่องจากโครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของ S3 helix มีลักษณะหัก โค้งงอและไม่ต่อเนื่อง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล EPR ที่ใช้ DoTAP (Down-state) กับ PCPG (Up-state) สามารถสรุปได้ดังนี้

- ใน DoTAP ท่อนทรานสเมมเบรนทั้งสิ้นให้ค่า  $\Pi NiEDDA$  โดยเฉลี่ยสูงขึ้น ในขณะที่ให้ค่า  $\Pi O_2$  โดยเฉลี่ยลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ cavity ของ VSD เปิดกว้างและสัมผัสกับ aqueous phase มากขึ้น
- ใน DoTAP ค่าเฉลี่ย  $\Pi NiEDDA$  ของ S4 และค่า mobility เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะด้านบนของ S4 เป็นไปได้ว่าบริเวณนี้ของ S4 มีการเคลื่อนที่มาก อาจเคลื่อนที่ในลักษณะหมุนเอียงเข้าไปในลิพิด การเคลื่อนแบบนี้จะไปเปิด cavity ที่อยู่ด้านล่างของ S4
- ใน DoTAP บางส่วนของ S3a สัมผัสกับส่วนที่เป็น intracellular มากขึ้น
- ใน DoTAP บริเวณ loop ที่อยู่ระหว่าง S3b-S4 เคลื่อนเข้าไปในลิพิดมากขึ้น และส่วนบน
- cavity ของ VSD เปิดกว้างมากขึ้น
- S2 และส่วนบนของ S1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ส่วนล่างของ S1 อาจมีเคลื่อนที่โดยการหมุน





รูปที่ 3.2 กราฟ  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi_{O_2}$  และ  $\Pi_{NiEDDA}$  ที่ Down-state (DoTAP) และที่ Up-state (PCPG) ของ KvAP-VSD ของเรสซิดิวซ์ 17-147 (A) S1, (B) S2, (C) S3 และ (D) S4



รูปที่ 3.3 Molecular surface เปรียบเทียบกับเวดสีแสดงระดับค่า  $\Delta\Pi_{Ni}$  ที่ได้จากการทดลอง KvAP sensor in DoTAP (โดยที่  $\Delta\Pi_{Ni} = \Pi_{Ni}(\text{DoTAP}) - \Pi_{Ni}(\text{PCPG})$ ) และใช้เวดสี “Blue to White to Red” แสดงค่า “negative to 0 to positive”

### 3.2 EPR constraints สำหรับโมเดลโครงสร้างของ KvAP-VSD ใน Down-state

#### 3.2.1 PaDSAR pseudospin

จากการวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบท่อนทรานสมเมเบรนกับค่า  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi_{NiEDDA}$  และ  $\Pi_{O_2}$  ทำให้สามารถระบุชนิดของ pseudospin ได้แก่ EP1, EP2, EP3 และ EP4 ไปติดบนตำแหน่งของกรดอะมิโนบนโครงสร้างของ KvAP-VSD ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนของโดเมน KvAP-VSD ที่กำหนดชนิดของ pseudospin

ชนิด	ตำแหน่งกรดอะมิโน
EP1 (n=48)	25 31 32 35 36 39 41 42 44 45 46 55 58 59 61 62 66 69 72 73 75 77 87 88 90 93 94 95 96 97 98 99 100 101 103 105 113 122 126 133 136 137 140 141 142 143 144 145
EP2 (n=19)	28 76 79 80 81 82 85 86 89 104 107 108 111 112 114 116 119 146 147
EP3 (n=41)	22 23 27 30 33 37 40 43 47 48 49 50 52 54 57 60 63 64 67 68 70 71 74 91 92 102 109 110 115 117 118 121 124 125 127 128 129 130 131 132 134

### 3.2.2 Distances ระหว่าง Bifunctional spin label

ข้อมูล Intra-domain distances จากเทคนิค DEER distance measurements ซึ่งวัดจา  
โปรตีนตัวอย่างที่เป็น Bifunctional spin label และ Pulsed EPR spectroscopy แสดงในตารางที่  
3.2 จากตารางจำนวน distance constraints ที่ใช้ในการคำนวณมีทั้งหมด 10 ค่า

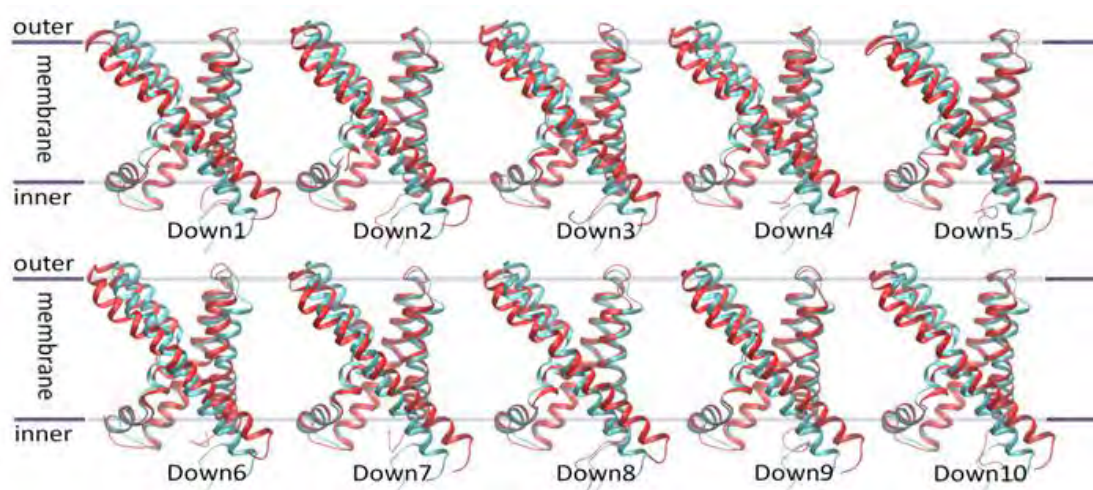
ตารางที่ 3.2 ระยะห่างระหว่างสปินที่วัดได้จาก KvAP-VSD ในสถานะ PC:PG, DOTAP และใน  
โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ ผลต่างของระยะห่างนี้นำมาใช้ในการคำนวณโครงสร้างของสถานะพัก

Double-cysteine residue number		Distance (Å)				Distance difference		Position	
		Crystal structure	PCPG		DOTAP		PCPG – crystal		DOTAP – PCPG
			Max	Dev	Max	Dev			
39/43	118/121	33.1	27.9	5.6	30.8	4.8	-5.2	S1 top	
	121/125	28.8	20.9	2.2	23.6	3.1	-7.9		
40/44	118/121	38.1	33.7	3.0	34.2	2.9	-4.4	S2 top	
	121/125	33.6	29.6	2.3	29.1	2.0	-4.0		
57/61	118/121	38.3	33.5	3.3	36.8	2.5	-4.8	S2 top	
	121/125	33.9	33.8	2.7	33.4	2.5	-0.1		
72/75	118/121	38.1	38.1	2.3	36.1	4.5	0	S2 bottom	
	121/125	32.4	33.1	3.0	32.1	2.6	0.7		
74/77	118/121	22.2	26.4	5.4	25.9	3.8	4.2	bottom	
	121/125	16.9	24.5	5.2	23.6	5.6	7.6		

### 3.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR

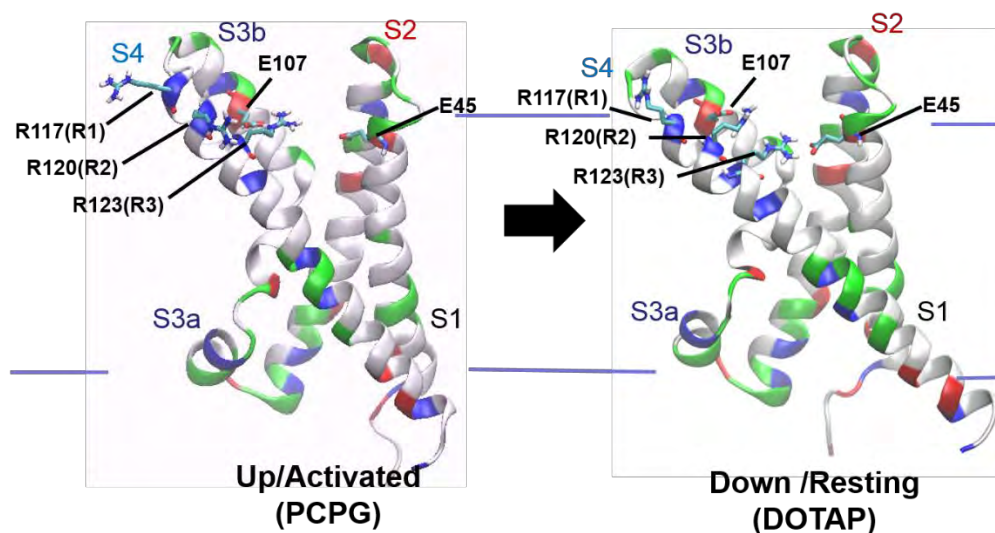
โมเดลเชิงโครงสร้างของ KvAP-VSD ที่ได้จากวิธี PaDSAR ประกอบด้วยเรสซิเดวซ์ตั้งแต่  
Asp20 ถึง Arg151 รูปที่ 3.4 แสดงโมเดลเชิงโครงสร้างที่ดีที่สุดลำดับแรกของ KvAP-VSD ที่  
สถานะพัก โดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบกับของข้อมูลการทดลอง จากการวิเคราะห์เชิง  
เปรียบเทียบของโครงสร้างทั้งสปีโครงสร้างพบว่ามีส่วนที่คล้ายกันและแตกต่างกัน ส่วนของโครงสร้าง

ที่คล้ายกันได้แก่ โครงสร้างบริเวณ S2 และ S3a ซึ่งแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่แตกต่างกันคือโครงสร้างที่บริเวณ S1, S3b และ S4 โดยเฉพาะ S4 มีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งที่ชัดเจนที่สุด แสดงให้เห็นว่าการวางตำแหน่งของ S4 ได้รับผลกระทบมากที่สุด อย่างไรก็ตาม จากการเปรียบเทียบโครงสร้างทั้งสิบโมเดล พบว่า S4 เคลื่อนตำแหน่งไปในทิศทางเดียวกัน (แต่ขนาดของระยะทางที่เคลื่อนที่นั้นมีความแตกต่างกันพอสมควร) รวมทั้งมีการหมุนรอบตัวเองของ S4 การเคลื่อนย้ายของ S4 อยู่ในลักษณะที่เรียกว่า “tilt & slide”



รูปที่ 3.4 โมเดลที่ดีที่สุดสิบอันดับแรกของ KvAP-VSD ที่สภาวะพัก (สีแดง) เปรียบเทียบกับคอนฟอร์เมชันที่สภาวะกระตุ้น (สีฟ้า)

โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จากวิธี PaDSAR ถูกประเมินเพื่อพิจารณาความสอดคล้องกับค่าการทดลอง และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของโครงสร้างดังกล่าวใช้ molecular surface ของโมเดลเทียบกับค่า  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi O_2$  และ  $\Pi NIEDDA$  ของเทคนิค SDLS/EPR ผลการเปรียบเทียบพบว่าโมเดลเชิงโครงสร้างสอดคล้องกับผลการทดลองเป็นอย่างดี



รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบระหว่างโมเดลที่ใช้เป็นตัวแทนของคอนฟอร์เมชันของ KvAP-VSD สภาวะกระตุ้นและที่สภาวะพักแสดงการย้ายที่ของ S4

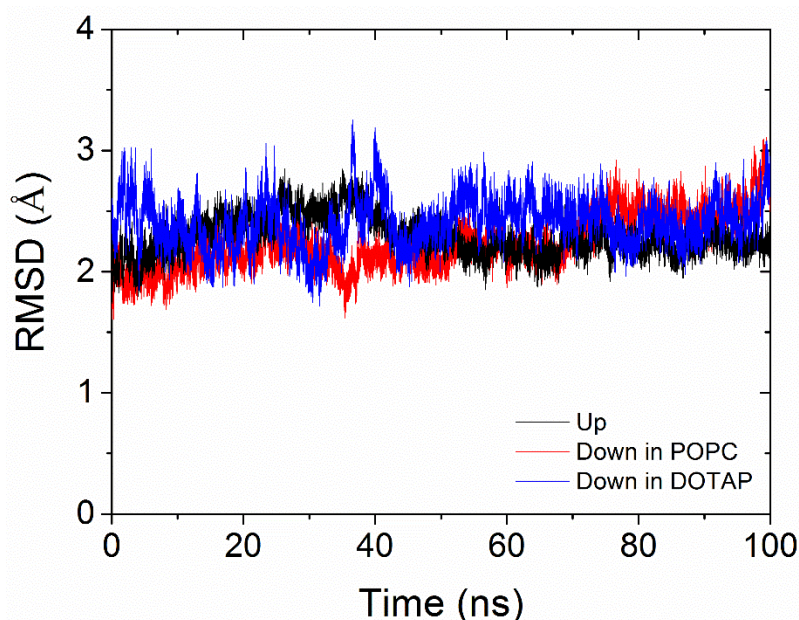
### 3.4 โครงสร้าง KvAP-VSD ใน Down-state ที่ได้จาก PaDSAR

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง KvAP-VSD สภาวะกระตุ้น/Up-state และที่สภาวะพัก/Down-state พบความแตกต่างของคอนฟอร์เมชันระหว่างทั้งสองสภาวะ แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันจาก Up-state ไปที่ Down-state ในลักษณะที่เกลียวเฮลิคซ์ S4 เคลื่อนย้ายตำแหน่งในลักษณะเอียงสไลด์ลงและหมุนรอบตัวเอง ทำให้ R117 ที่อยู่ด้านนอกสุดของเมมเบรน (ส่วนบนของเกลียว S4) แทรกเข้ามาบริเวณรอยต่อของเมมเบรน (membrane interface) และน่าจะทำอันตรกิริยากับหมู่ฟอสเฟตของลิพิด การเคลื่อนของเกลียว S4 นี้ยังทำให้ sidechain ของ arginines อีกหลายตำแหน่งที่อยู่บน S4 เช่น R120, R123 เคลื่อนย้ายตำแหน่งไปด้วย ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงแรงผลักระหว่าง sidechain ของ arginines กับส่วนไฮโดรโฟบิกของลิพิด จะเห็นได้จากตำแหน่ง sidechain ของ R120 ซึ่งมีบางส่วนอยู่บริเวณ membrane interface เมื่ออยู่ใน Up-state เคลื่อนย้ายจากเข้ามาอยู่ภายในแกนกลางของ VSD ใน Down-state และพบว่าจากการเคลื่อนย้ายของ arginines ระหว่าง Up-state และ Down-state ทำให้มีการเปลี่ยนคู่ salt-bridge เช่น คู่ salt-bridge ของ Arg123 กับ Glu107 เปลี่ยนเป็น Arg123 กับ Glu45 และเกิดคู่ salt-bridge ของ Arg120 กับ Glu107 (รูปที่ 3.5)



### 3.5 โครงสร้างและพลวัตของ KvAP-VSD

สมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของโครงสร้าง KvAP-VSD ใน Up-state , Down-state ใน POPC และ Down-state ใน DOTAP ได้มาจากการวิเคราะห์ผลจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล เป็นเวลา 100 นาโนวินาที จากกราฟ (รูปที่ 3.6) ค่า root-mean-square-deviation (RMSD) ของ backbone atoms ของทั้งสามระบบแกว่งอยู่ในช่วง 1.5–3.0 Å ตลอดช่วงเวลาของซิมูเลชัน ค่าเฉลี่ย backbone RMSD ของ MD trajectories ในช่วง 30ns สุดท้ายของซิมูเลชัน เท่ากับ  $2.23 \pm 0.08 \text{ \AA}$  สำหรับ Up conformation,  $2.50 \pm 0.14 \text{ \AA}$  สำหรับ Down-POPC and  $2.42 \pm 0.16 \text{ \AA}$  สำหรับ Down-DOTAP ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ปกติ และเมื่อซูมตรวจโครงสร้างเทอร์เซียร์ของ VSD และโครงสร้างเซคคันดารีของเกลียวเฮลิคซ์ ก็ไม่พบการเสียสภาพเชิงโครงสร้างแต่อย่างใด แสดงว่า MD simulations ของโครงสร้างที่ศึกษานี้ให้ระบบที่มีความเสถียรเชิงโครงสร้าง

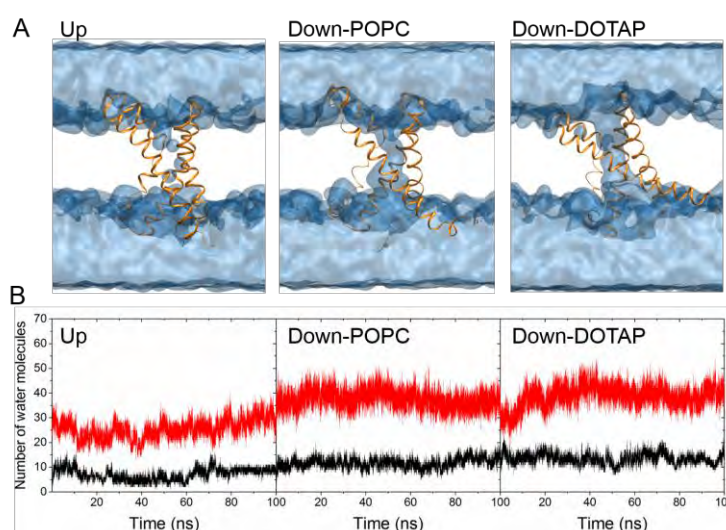


รูปที่ 3.6 Backbone RMSD เทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นตลอดช่วงเวลา 100 ns MD simulation ของ Up-state, Down-state ใน POPC และ Down-state ใน DOTAP

### 3.6 Down conformation กับการปรับขนาดของช่อง water crevice ใน VSD

มีรายงาน พบว่าภายในโครงสร้างของ VSD ใน voltage-gated ion channels จะมีช่องที่ ให้โมเลกุลน้ำแทรกเข้าไปอยู่เรียกว่า water filled crevice รูปร่างของ water filled crevice จะมีลักษณะคล้ายนาฬิกาทรายที่มี 2 ช่องและมีขนาดช่องไม่เท่ากัน ช่องที่อยู่ติดด้านนอกเซลล์เรียกว่า

extracellular water crevice กับช่องที่อยู่ด้าน cytoplasm เรียกว่า intracellular water crevice การที่ส่วนของ VSD มีช่อง water filled crevice นี้ช่วยทำให้ค่า dielectric permittivity ของเมมเบรนไบเลเยอร์ในบริเวณที่มีน้ำแทรกตัวเข้าไปอยู่เพิ่มสูงขึ้น สภาพความเป็นขั้วที่สูงขึ้นภายในเมมเบรนทำให้เหมาะต่อการเคลื่อนย้าย arginines ลดกำแพงพลังงานที่ต้องใช้ในการเคลื่อนย้ายประจุของ arginines ภายในลิพิดไบเลเยอร์ และเพิ่มความเสถียรให้ arginines เมื่ออยู่ภายในเมมเบรน



รูป 3.7 โมเลกุลของน้ำที่แทรกอยู่ใน extracellular และ intracellular water crevices ของ KvAP-VSD ซึ่งเปรียบเทียบกันระหว่างโครงสร้างที่ Up-state และ Down-state (A) MD snapshots เปรียบเทียบลักษณะของช่อง water crevice ของทั้งสามระบบ (B) จำนวนโมเลกุลของน้ำที่พบใน extracellular (black line) และ intracellular (red line) water crevices ที่พบในช่วงเวลาซิมูเลชัน

การวิเคราะห์ความแตกต่างในบริเวณ water filled crevices ของโครงสร้างใน Up-state และ Down-state ทำได้โดยการนับจำนวนโมเลกุลของน้ำที่อยู่ภายในบริเวณ VSD โดยวัดภายในขอบเขต +15 และ -15 Å จากจุดศูนย์กลางของ VSD ตามแนวแกน z รูปที่ 3.7 แสดงให้เห็นความแตกต่างของปริมาณน้ำที่แทรกเข้าไปอยู่ใน extracellular และ intracellular water crevices โดยเฉพาะน้ำใน intracellular water crevice ที่พบใน Down-POPC และ Down-DOTAP มีปริมาณกว่าที่พบใน Up-state conformation ผลของซิมูเลชันนี้สอดคล้องกันข้อมูลการทดลองที่ได้จากเทคนิค EPR ซึ่งพบว่าค่า  $\Pi$ NiEDDA บริเวณปลาย S4 ด้าน intracellular ที่ทดลองกับ KvAP-VSD

ใน DOTAP มีค่ามากกว่าในลิพิดผสม PCPG ดังนั้นจากผลของ MD simulations สรุปได้ว่าค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) บริเวณ intracellular water crevice เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.3 จำนวนเฉลี่ยของโมเลกุลน้ำที่วัดได้จาก extracellular และ intracellular water crevices ของ KvAP-VSD จากซิมูเลชันทั้งสามระบบ

	Up-state	Down-POPC	Down-DOTAP
No. water in extracellular	8.9 ± 0.9	13.1 ± 1.7	13.0 ± 1.6
No. water in intracellular	28.9 ± 3.2	35.8 ± 2.9	38.8 ± 3.3

### 3.7 การเปลี่ยนคู่อันตรกิริยา salt-bridge

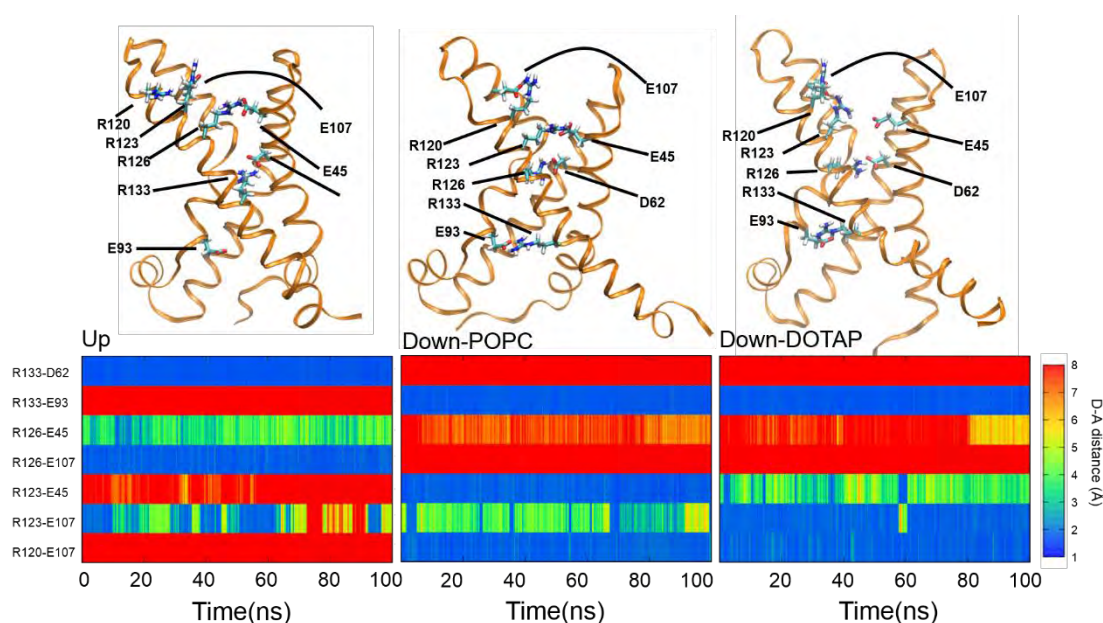
คู่อันตรกิริยา salt bridges ซึ่งเป็นการสะท้อนของประจุระหว่าง arginines ต่างๆที่อยู่บนท่อนทรานสเมมเบรน S4 (R117, R120, R123, R126 และ R133) กับกรดอะมิโนประจุลบที่อยู่บนท่อนทรานสเมมเบรน S1, S2, S3a และ S3b มีความสำคัญต่อความเสถียรของโครงสร้าง VSD การวิเคราะห์คู่อันตรกิริยา salt bridges ทำได้โดยการวัดระยะห่างในการเกิดพันธะไฮโดรเจนของ H-donor และ H-acceptor เนื่องจากการเคลื่อนย้ายตำแหน่งอย่างมีนัยของ S4 ความแตกต่างที่สำคัญที่คาดว่าจะพบระหว่างโครงสร้างใน Up-state และ Down-state จากซิมูเลชัน คือการเปลี่ยนคู่อันตรกิริยา salt-bridge ของ arginines ผลการวิเคราะห์คู่อันตรกิริยา salt-bridge ของ arginines จากซิมูเลชันโดยการวัดระยะห่างของคู่อะตอม H-donor และ H-acceptor ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่ R133-D62, R133-E93, R126-E45, R126-E107 R123-E45, R123-E107 และ R120-E107 แสดงในรูปที่ 3.8

จากการวิเคราะห์ระยะห่างของคู่อะตอมเหล่านี้ในระบบซิมูเลชันของ Up-state conformation พบคู่อันตรกิริยา salt-bridge จำนวนสามคู่ที่สำคัญได้แก่ คู่ของ R133-D62, R126-E107 และ R123-E107 โดยที่คู่ R123-E107 มีความเสถียรค่อนข้างน้อยที่สุด และพบว่า R117 กับ R120 ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด salt bridge ใดๆ กับกรดอะมิโนประจุลบ โดยหมู่ guanidinium ของพบว่า R117 และ R120 วางตัวอยู่ในบริเวณรอยต่อระหว่างเมมเบรนกับน้ำ พบว่าสร้างอันตรกิริยากับน้ำและหมู่ฟอสเฟตของลิพิดที่อยู่รอบๆ

สำหรับการวิเคราะห์ salt-bridge ในระบบซิมูเลชันของ KvAP-VSD ใน Down-POPC และใน Down-DOTAP พบการเปลี่ยนแปลงของคู่อันตรกิริยาเมื่อเปรียบเทียบกับระบบซิมูเลชันของ Up-state conformation ดังนี้ คู่ของ R133-D62 และ R126-E107 ไม่เกิด salt-bridge อีกต่อไป แต่เปลี่ยนเป็นคู่ R133-E93 และคู่ R120-E107 แทนซึ่งพบทั้งใน Down-POPC และ Down-DOTAP



อย่างไรก็ตาม พบความแตกต่างของคู่ salt-bridge ระหว่าง Down-POPC และ Down-DOTAP นั่นคือคู่ R124-E45 ซึ่งพบใน Down-POPC แต่ไม่ปรากฏอย่างชัดเจนใน Down-DOTAP เช่นเดียวกับกับคู่ R123-E107 ซึ่งไม่พบใน Down-POPC แต่ปรากฏอย่างชัดเจนใน Down-DOTAP การแลกเปลี่ยนคู่ salt bridge ที่พบในซิมูเลชันนี้สามารถช่วยอธิบายถึงปัจจัยเกื้อหนุนกระบวนการ depolarization และ gating ของไอออนแชนแนล โดยการเคลื่อนย้ายของ S4 จาก extracellular side ของเมมเบรน (ที่ Up-state) ไปสู่บริเวณเมมเบรนที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงขึ้น (ที่ Down-state) ทั้งนี้ arginines ต่างๆ ยังคงความเสถียรของโครงสร้าง KvAP-VSD แม้จะอยู่ในลิพิดไบเลเยอร์มากขึ้นก็ตาม



รูปที่ 3.8 แสดงผลการวิเคราะห์คู่อันตรกิริยา salt-bridge ของ arginines จากซิมูเลชันโดยการวัดระยะห่างของคู่อะตอม H-donor และ H-acceptor ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนของคู่ R133-D62, R133-E93, R126-E45, R126-E107, R123-E45, R123-E107 และ R120-E107

### 3.8 บทสรุป

บริเวณที่เป็นส่วนโวลเทจเซ็นเซอร์โดเมน (voltage sensor domain, VSD) ของเมมเบรนโปรตีนกลุ่ม voltage-dependent  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  channels มีโครงสร้างและกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน โดยโดเมนส่วนนี้มีหน้าที่เป็นเซ็นเซอร์รับรู้การเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนในเซลล์ประสาท มีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามศึกษาโครงสร้างของโปรตีนเพื่อตอบคำถามเรื่องกลไกการตอบสนองของศักย์ไฟฟ้าในระดับโมเลกุลของ voltage-dependent ion channels แต่ปัญหาคือ

การศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค x-ray crystallography ไม่สามารถเตรียมผลึกเดี่ยวของโปรตีนภายใต้ negative potential ดังนั้นโครงสร้าง x-ray ของโอออนแซนแนลที่สามารถวัดภายใต้ไร้นามความต่างศักย์หรือศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนเป็นศูนย์สอดคล้องกับโปรตีนที่สภาวะ activation state (หรือเรียกว่า Up-state conformation ของ VSD) เท่านั้น

งานวิจัยนี้ใช้กระบวนการ Site-directed spin labeling และ EPR spectroscopy นำเสนอโมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะ Resting หรือ Down conformation ในบริเวณ VSD ของ KvAP (Kv จาก *Aeropyrum Pernix*) ทั้งนี้การบันทึก EPR สเปกตรัม ภายใต้สภาวะ Resting (ค่าศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนน้อยกว่าศูนย์) นั้นไม่สามารถกระทำได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ DOTAP ซึ่งเป็นลิพิดชนิดพิเศษที่ไม่มีหมู่ Phosphodiester ในการชักนำให้ VSD ทรานสิชันไปอยู่ในสภาวะ Resting state โดยที่ไม่ต้องใช้ศักย์ไฟฟ้า งานวิจัยนำเสนอแบบจำลองเชิงโครงสร้างของ KvAP-VSD ใน Down-state และรูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันโดยใช้ข้อมูล Solvent accessibility จาก Standard continuous-wave EPR spectroscopy และข้อมูล Intra-domain distances จากเทคนิค DEER distance measurements ซึ่งวัดจากโปรตีนตัวอย่างที่เป็น Bifunctional spin label และ Pulsed EPR spectroscopy

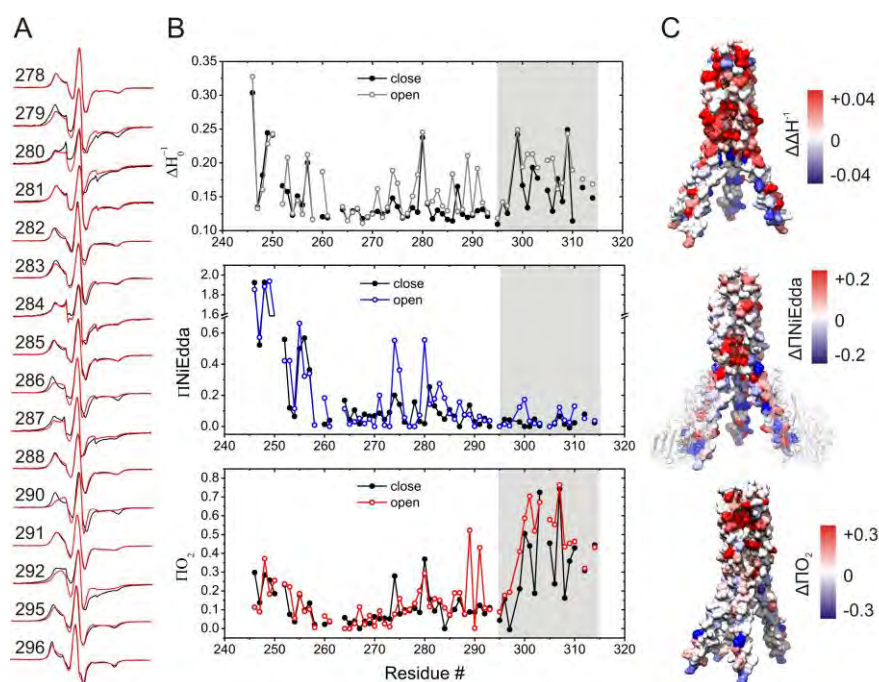
จากโมเดลของ KvAP-VSD ใน Down-state ที่สร้างขึ้น ได้ดำเนินการศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตด้วยเทคนิค molecular dynamics simulation ของโครงสร้างใน Up-state และ Down-state โดยใช้ฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์สองชนิดคือ POPC และ DOTAP จากการศึกษาสามารถอธิบายในประเด็นเรื่องการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของ VSD ในช่วงเกิด membrane depolarization โดยเฉพาะการเคลื่อนตัวของส่วนท่อนทรานสเมมเบรน S4 (voltage sensor segment) ของ VSD แบบ Tilt & Slide ซึ่งเคลื่อนผ่านบริเวณลิพิดไบเลเยอร์ และการเคลื่อนที่ประจุบวกของเรสซิดูวอาร์จินีนตำแหน่ง R120, R123, R126 และ R133 สามารถเกิดขึ้นได้ในเมมเบรนเนื่องจากช่อง water crevice ใน VSD มีขนาดกว้างขึ้นทำให้โมเลกุลน้ำเข้าไปในช่องได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า dielectric ของเมมเบรนสูงขึ้น จึงช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับประจุของอาร์จินีนในเมมเบรน นอกจากปรากฏการณ์ดังกล่าว ยังมีปัจจัยที่ช่วยด้วยคือ การแลกเปลี่ยนพันธะไฮโดรเจนของคู่ salt-bridge ของ R123, R126 และ R133 กับ E45, D62 และ E93 ผลการศึกษานี้ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกการทำงานของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของโอออนแซนแนล

## บทที่ 4

# โมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะเปิดของ CorA Mg<sup>2+</sup> Channel

### 4.1 การวิเคราะห์ข้อมูล EPR ที่ได้จากการทดลอง

จากชุดสเปกตรัมอีพาร์ของ nitroxide spin label ที่ติดไว้ตามตำแหน่งต่างๆ บนบริเวณ stalk, inner และ outer transmembrane segments ของ CorA Mg<sup>2+</sup> channel ที่บันทึกในสภาวะเปิดและสภาวะปิด ดังตัวอย่างแสดงไว้ในรูปที่ 4.1A นำมาวิเคราะห์โดยเขียนกราฟระหว่างข้อมูลค่า mobility, O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility กับตำแหน่งกรดอะมิโน ดังตัวอย่างแสดงไว้ในรูปที่ 4.1B ข้อมูลดังกล่าวได้รับจากผู้ร่วมงานที่มหาวิทยาลัยชิคาโก การวิเคราะห์นี้ทำให้ระบุได้ว่า inner helix ครอบคลุมกรดอะมิโน 294-314 และ outer helix ครอบคลุมกรดอะมิโน 326-349 และที่สภาวะเปิด บริเวณ TM1 มีค่า O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันบริเวณดังกล่าว



รูปที่ 4.1 EPR spectra,  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi_{O_2}$  และ  $\Pi_{NiEDDA}$  โครงสร้างของ CorA Mg<sup>2+</sup> channel สีบนพื้นผิวโครงสร้างแสดงการเปรียบเทียบค่า  $\Delta H_0^{-1}$ ,  $\Pi_{O_2}$  และ  $\Pi_{NiEDDA}$  ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิด (รูปและข้อมูลได้จากผู้ร่วมงาน O. Dalmas ที่ U. of Chicago)

## 4.2 EPR constraints สำหรับโมเดลโครงสร้างของ CorA Mg<sup>2+</sup> channel ในสภาวะเปิด

### 4.2.1 PaDSAR pseudospin

จากข้อมูลค่า mobility, O<sub>2</sub> และ NiEDDA accessibility ทำการจัดแบ่งประเภทสมบัติของกรดอะมิโนซึ่งได้แก่ buried, water และ lipid-exposed residue (ตารางที่ 4.1) เพื่อใช้ในการโมเดลโครงสร้างของ CorA Mg<sup>2+</sup> channel ในสภาวะเปิดด้วยวิธี PaDSAR

ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งกรดอะมิโนของโดเมน TmCorA ที่กำหนดชนิดของ pseudospin

ชนิดของ pseudospin*	ตำแหน่งของกรดอะมิโน
EP1	247 250 254 256 258 261 262 263 265 266 267 268 269 270 272 273 276 277 281 282 285 286 287 288 290 291 293 295 296 297 299 300 302 305 306 308 309 315 318 337 340 344 (n=42)
EP2	246 248 249 252 253 255 257 260 264 271 274 275 278 279 280 283 284 303 310 316 319 320 348 (n=23)
EP3	298 301 303 307 323 324 327 329 332 334 335 336 338 346 (n=14)
EP4	289 292 312 314 (n=4)

หมายเหตุ\* EP1 = Buried, EP2 = Water-exposed, EP3 = Lipid-exposed, EP4= water-lipid interface

### 4.2.2 Distance constraints ระหว่างซัยยูนิท

Distance constraints ที่ใช้ในการคำนวณเป็นผลต่างของระยะห่างระหว่างหมู่ nitroxide ที่ติดสปินเลเบลโปรตีนที่วัดในสภาวะเปิดเทียบกับสภาวะปิด โดยอนุมานว่าระยะห่างที่วัดนี้แทนด้วยระยะห่างของอะตอมคาร์บอน (CB) ของกรดอะมิโนติดสปิน (ได้แก่ ตำแหน่ง 247, 249, 250 และ 252) ในตำแหน่งเดียวกันแต่อยู่คนละซัยยูนิท ผลต่างของระยะห่างนี้สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีน ดังสมการ

$$\Delta r_{CB,i} = r_{CB,i,open} - r_{CB,i,closed}, \quad (4.1)$$

$\Delta r_{CB,i}$  คือผลต่างของระยะห่างระหว่าง CB-CB ของกรดอะมิโนตำแหน่ง  $i$  ที่วัดภายใต้โครงสร้างในสถานะเปิดและสถานะปิด เนื่องจาก CorA Mg<sup>2+</sup> channel มีโครงสร้างเป็นเพนตะเมอร์ ดังนั้นจะมีคู่ระยะห่างระหว่าง CB-CB อยู่สองชนิด คือ ระยะห่างที่มาจากซับยูนิตที่อยู่ใกล้หรือติดกัน ซึ่งในที่นี้เรียกว่า short distance กับระยะห่างที่มาจากซับยูนิตที่อยู่ห่างไปหนึ่งลำดับเรียกว่า long distance ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวน distance constraints ที่ใช้ในการคำนวณ

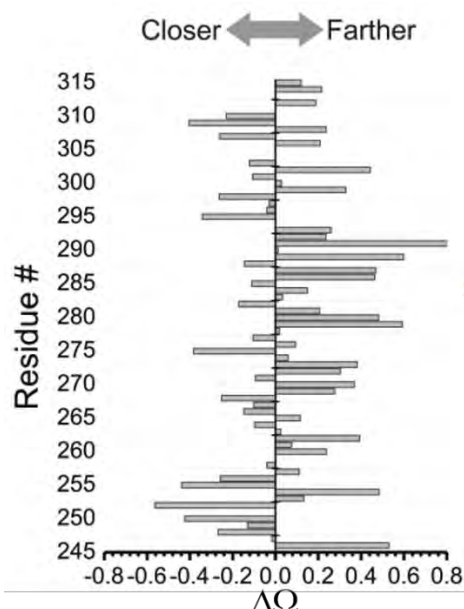
ตารางที่ 4.2 CB-CB distance constraints ระหว่างซับยูนิตสำหรับการคำนวณ

ตำแหน่งของกรดอะมิโน	$\Delta r_{CB,i} \pm \delta^*$ (Å)	
	Short distance ระหว่างซับยูนิตที่ลำดับติดกัน ( A-B, B-C, A-E etc) short	Long distance ระหว่างซับยูนิตที่อยู่ห่างไปหนึ่งลำดับ ( A-C, B-D, A-D etc) long
252	-5	-7
250	-5	-7
249	-5	-7
247	-5	-7

หมายเหตุ \*ค่าติดลบหมายถึงระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนของคู่ซับยูนิตที่สนใจมีตำแหน่งอยู่ใกล้กันมากขึ้นที่สถานะเปิด โดยเทียบกับโครงสร้างที่สถานะปิด และกำหนดให้  $\delta = 1$  หรือ  $2$  สำหรับ upper และ lower restraints.

#### 4.2.3 Proximity ( $\Omega$ ) หรือ interaction parameters

$\Omega$  เป็นข้อมูลการทดลองจากเทคนิคอีพาร์ที่มาจากอิทธิพล dipole-dipole interactions ระหว่างสปิน ข้อมูลชนิดนี้ให้ค่าเชิงคุณภาพที่บอกถึงความใกล้ระหว่างคู่สปินที่เกิดอันตรกิริยากัน ผลการวัดค่า  $\Omega$  ของกรดอะมิโนที่ได้รับการติดสปิน ณ ตำแหน่งต่างๆ (245 - 315) ของโปรตีนที่สถานะเปิด และสถานะปิด แล้วคำนวณผลต่างของค่า  $\Omega$  ระหว่างสถานะทั้งสอง แสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลต่างของค่า interaction parameters ( $\Delta\Omega$ ) ในตำแหน่ง 245 - 315 ของ CorA  $Mg^{2+}$  channel ในสภาวะเปิดและสภาวะปิด ถ้า  $\Delta\Omega$  ของกรดอะมิโนใดมีเครื่องหมายบวกแสดงว่าคู่กรดอะมิโนนั้นของ CorA ในสภาวะเปิดอยู่ห่างออกไป แต่หาก  $\Delta\Omega$  ของกรดอะมิโนใดมีเครื่องหมายลบ แสดงว่าคู่กรดอะมิโนนั้นของ CorA ในสภาวะเปิดอยู่ใกล้เข้ามา

#### 4.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR

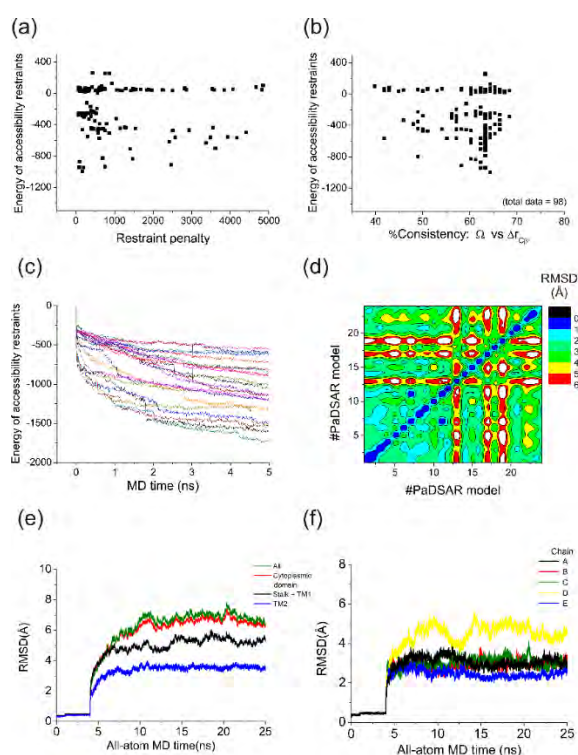
##### 4.3.1. การคัดกรองเพื่อหาโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่เหมาะสม

การคำนวณโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดมีการทดลองทำซ้ำหลายรอบโดยใช้เงื่อนไขที่แตกต่างกัน จากการคำนวณโครงสร้างด้วยวิธี PaDSAR ได้โครงสร้างทั้งหมดเป็นจำนวน 220 โครงสร้าง การคัดกรองเพื่อหาโครงสร้างที่สอดคล้องกับข้อมูลการทดลองแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นที่หนึ่งพิจารณาคัดกรองโครงสร้างโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ restraint penalty และ ระหว่างพลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ %consistency ของ sign of  $\Omega$  กับ  $\Delta r_{C\beta}$  ดังแสดงในรูปที่ 4.3a และ 4.3b เกณฑ์ที่ใช้เลือกสำหรับการคัดกรองชั้นที่หนึ่งเป็นดังต่อไปนี้

- i) พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom ที่มีค่า  $< 0$
- ii) restraint penalty มีค่า  $< 1000$
- iii) %consistency  $> 50\%$

การคัดกรองในขั้นที่หนึ่งทำให้ได้โมเดล 52 โครงสร้างจากจำนวนทั้งหมด 220 โครงสร้าง และทำการเลือก 25 โครงสร้างตามการจัดอันดับตามค่า restraint penalty ที่ดีที่สุด มาทำ PaDSAR refinement เป็นครั้งที่สอง ค่า RMSD ของทั้ง 25 โมเดลมีค่า  $3.9 \pm 1.9 \text{ \AA}$  เมื่อนำมาวิเคราะห์ โดยแสดงค่าพลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom ของแต่ละโมเดลตาม MD time (รูปที่ 4.3c) พบว่ามีจำนวน 10 โมเดลที่ให้โครงสร้างผลอยู่ในทิศทางเดียวกันโดยแสดงจากกราฟคอนทัวร์ของ pairwise RMSD (รูปที่ 4.3d) ค่า RMSD ของทั้ง 10 โมเดล CorA ที่สภาวะเปิดมีค่าเท่ากับ  $2.1 \pm 0.5 \text{ \AA}$ .

ผลการประเมินคุณภาพทางโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดทั้ง 10 โมเดลด้วยโปรแกรม PROCHECK แสดงให้เห็นว่า มี 93.2% (91.0-94.9 สำหรับค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดตามลำดับ) ที่ให้ค่ามุมแบคโบนไดฮีดรัล  $\phi$  และ  $\psi$  ของกรดอะมิโนอยู่ในบริเวณที่เหมาะสมบนกราฟรามาชานทราน (Ramachandran plot) ค่า overall G-factor ของ PROCHECK ของทั้ง 10 โมเดลมีค่าระหว่าง  $-0.78$  และ  $-0.49$  ซึ่งดีกว่าค่าขั้นต่ำที่กำหนดไว้ ( $-1.0$ )



รูปที่ 4.3 การประเมินโมเดล CorA ที่สภาวะเปิด จากการคำนวณด้วยวิธี PaDSAR พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ restraint penalty (a) พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ %consistency ของ sign of  $\Omega$  กับ  $\Delta r_{C\beta}$  (b) พลังงานอันตรกิริยาของ pseudoatom กับ MD time ของ 25 โมเดล (c) กราฟคอนทัวร์แสดง Pairwise RMSD ระหว่างโมเดล (d)

### C $\alpha$ -RMSD จาก MD simulation (d) และ C $\alpha$ -RMSD บริเวณ stalk-TM1 ของแต่ละซับยูนิต จำนวน 5 ซับยูนิต (f)

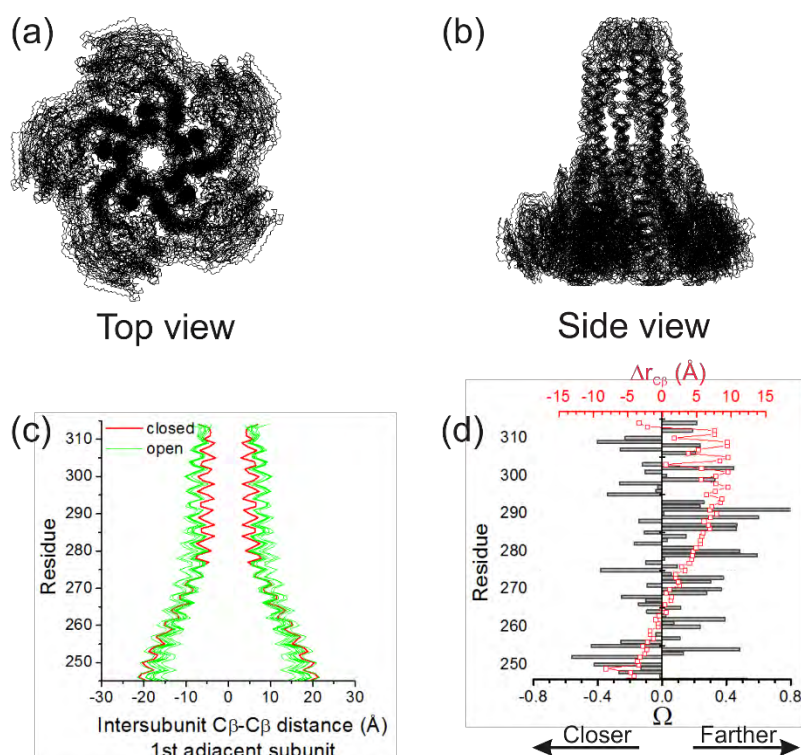
รูปที่ 4.4e แสดงค่า RMSD ของบริเวณ cytoplasmic domain, stalk-TM1, TM2 และของ ทั้งโปรตีน ตามเวลาของการซิมูเลชันเป็นเวลา 25 นาโนวินาที พบว่าโครงสร้างของ CorA ที่สภาวะ เปิดนี้มีความเสถียรโดยเฉพาะบริเวณ stalk-TM1 ให้ค่า C $\alpha$ -RMSD ระหว่าง 2.5-3.5 Å (รูปที่ 4.4f) ยกเว้นมี 1 ซับยูนิตที่ให้ค่า RMSD สูงกว่าช่วงดังกล่าว ส่วนบริเวณอื่น ได้แก่ cytoplasmic domain มีค่า RMSD ประมาณ 6Å ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณนี้ ไม่มีข้อมูลการทดลอง ดังนั้นจึงเป็น บริเวณที่ไม่ได้กำหนด restraint ระหว่างการคำนวณ

#### 4.3.2 ผลการประเมินโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่ได้

เมื่อทำการซ้อนทับ (superimposition) โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดทั้ง 10 โมเดลที่เลือกมามีค่า RMSD เท่ากับ  $2.1 \pm 0.5$  Å แสดงว่าโครงสร้างทั้ง 10 มีความใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะบริเวณ stalk-TM1 มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยมีค่า ค่า RMSD เท่ากับ  $1.7 \pm 0.4$  Å (รูปที่ 4.4a และ 4.4b) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างบริเวณ cytoplasmic domain และ periplasmic loop มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยมีค่า RMSD เท่ากับ  $6.0 \pm 2.6$  และ  $6.9 \pm 2.0$  Å ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างซับยูนิตโดยอาศัยกราฟระยะห่าง C $\beta$ -C $\beta$  ระหว่างซับยูนิต บริเวณ stalk และ TM1 (รูปที่ 4.4c) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่สภาวะปิด บริเวณ TM1 ของทั้ง 10 โมเดล CorA ที่สภาวะเปิด อยู่ห่างกันมากขึ้น (ค่าเฉลี่ยประมาณ 6.7 Å โดยนับจากกรดอะมิโนตำแหน่ง 280-310) ในขณะที่บริเวณ stalk พบว่ามีการขยับเข้าใกล้เข้าหากัน (ค่าเฉลี่ยประมาณ 3.3 Å โดยนับจากกรดอะมิโนตำแหน่ง 245-260) เพื่อเปรียบเทียบโมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่ สภาวะเปิดกับค่า  $\Delta\Omega$  ของบริเวณนี้ พบมีความสอดคล้องกัน (รูปที่ 4.4d)



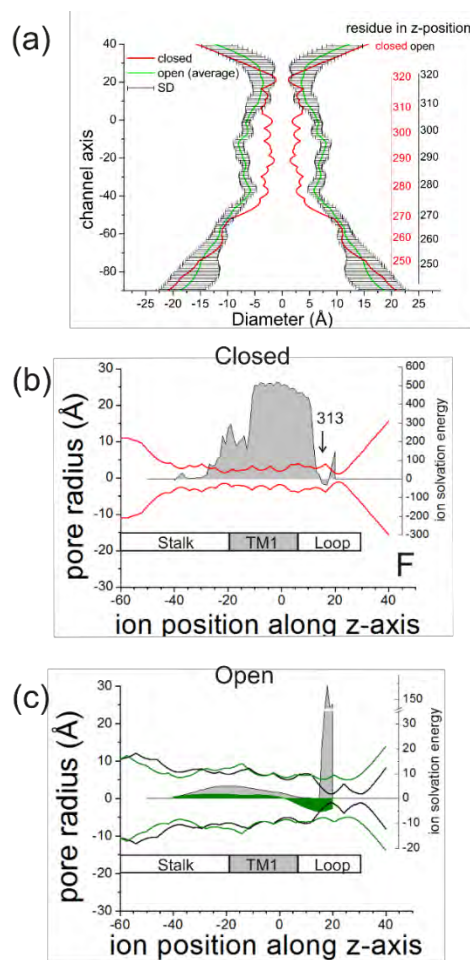


รูปที่ 4.4 โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดทั้ง 10 โมเดลที่วางซ้อนทับกัน มุมมองจากด้านนอกเซลล์ (a) และมุมมองจากด้านข้างของเซลล์ (b) ระยะห่าง  $C\beta-C\beta$  ระหว่างซับยูนิตบริเวณ stalk และ TM1 จากโครงสร้างที่สภาวะปิด และสภาวะเปิด (c) และเปรียบเทียบระหว่างระยะห่าง  $C\beta-C\beta$  กับ  $\Delta\Omega$  แสดงแนวโน้มกันเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันบริเวณ stalk และ TM1

#### 4.3.3 ขนาดบริเวณโพรงที่กว้างขึ้น

โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดทั้ง 10 โมเดลแสดงให้เห็นขนาดของโพรงทางผ่านของไอออนที่กว้างขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้าง CorA ที่สภาวะปิด (รูปที่ 4.5a) ขนาดของโพรงที่กว้างขึ้นนี้น่าจะกว้างมากพอที่จะให้  $Mg^{2+}$  ในรูป hydrated สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้สะดวก

จากการคำนวณค่าพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนย้าย  $Mg^{2+}$  เข้าสู่เซลล์ โดยคำนวณพลังงานโซเวชัน (solvation energy) ของ  $Mg^{2+}$  ที่ถูกวางในอยู่ในโพรง ณ ตำแหน่งต่างๆ ตามแกน z (แนวการเคลื่อนที่ของไอออนจากนอกเซลล์ ผ่านเมมเบรน และเข้าสู่ไซโตพลาซึม) พบว่าพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนย้าย  $Mg^{2+}$  ที่คำนวณจากโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.5b และ 4.5c) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่ได้นี้ สนับสนุนการทำงานของโปรตีนดังกล่าว



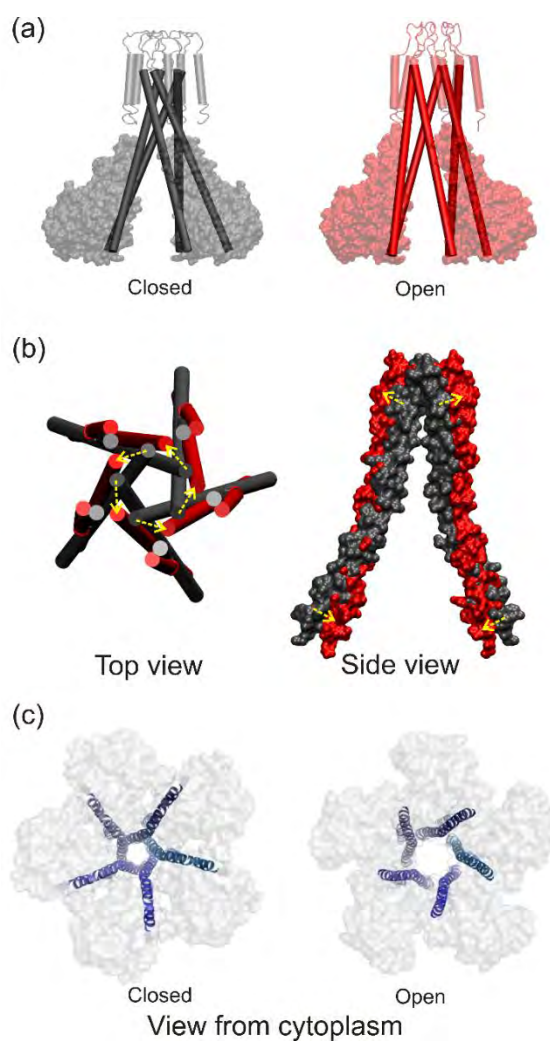
รูปที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโพรงตามแนวแกนของแซนแนล (a) โดยคำนวณจากโครงสร้างที่สภาวะปิด (เส้นสีแดง) และเปิด (เส้นสีดำ และเขียวสำหรับค่าเฉลี่ย) กราฟแสดงขนาดของโพรง และพลังงานโซเวชันของ  $Mg^{2+}$  ในตำแหน่งต่างๆ ตามแนวแกนของแซนแนลที่สภาวะปิด (b) และที่สภาวะเปิด (c)

#### 4.3.4 การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันสำหรับการเกต

โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดที่ได้จากการคำนวณนี้ สอดคล้องกับข้อมูลผลการทดลองอีพีอาร์ และสนับสนุนผลการคำนวณพลังงานในเชิงทฤษฎี ดังนั้น โมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดนี้มีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันโดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่สภาวะปิด ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ได้จากเทคนิคเอ็กซ์เรย์

เมื่อทำการซ้อนทับระหว่างโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดและสภาวะปิด จะเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.6a) โดยเฉพาะบริเวณ stalk และ TM1 ซึ่งแสดงให้เห็น CorA เปลี่ยนคอนฟอร์เมชันจากสภาวะปิดไปสู่สภาวะเปิดโดยการเคลื่อนบริเวณ stalk เข้าหา และขยับส่วน TM1

ให้ออกจากกันในลักษณะคล้ายกรรไกร จากมุมมองด้านข้าง หรือคล้ายรูกล้อง (iris-like camera) จากมุมมองด้านนอกเซลล์ (รูปที่ 4.6b) กลไกการเคลื่อนของ stalk และ TM1 นี้ น่าจะทำให้โพรงทางผ่านของไอออนขยายกว้างขึ้น เพื่อเปิดให้  $Mg^{2+}$  ผ่านได้

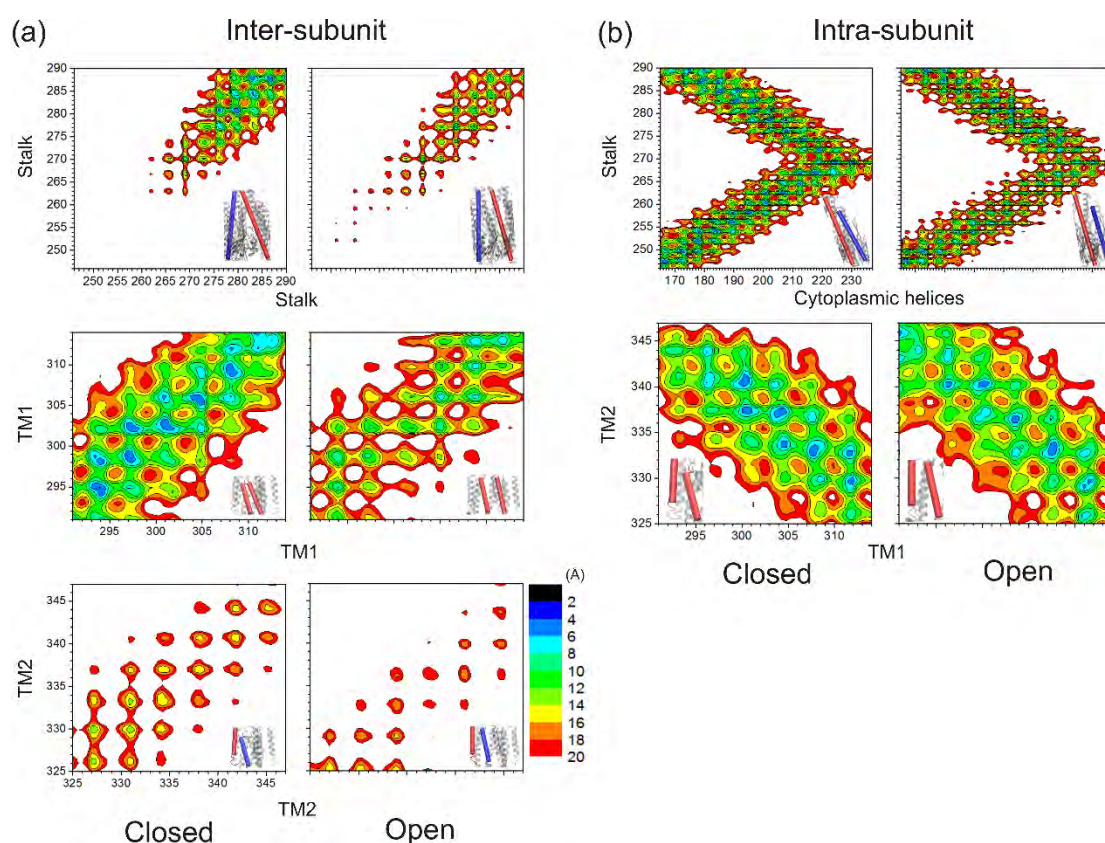


รูปที่ 4.6 โครงสร้าง CorA ที่สภาวะปิดและสภาวะเปิด (a) โครงสร้างซ้อนทับที่บริเวณ stalk และ TM1 แสดงกลไกการเปิด-ปิดแบบกรรไกร หรือรูกล้อง (b) และขนาดของโพรงที่กว้างขึ้น (c)

#### 4.3.5 บริเวณภายในของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป

จากการเปรียบเทียบระหว่างโมเดลเชิงโครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดและสภาวะปิด ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายนอกได้อย่างชัดเจน หากพิจารณาบริเวณภายในของโครงสร้างจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของโดเมนต่างๆ ในรูปแบบที่มีการสัมผัสกัน (domain contact) รูปที่ 4.7 จะ

เห็นการเปลี่ยนแปลงของโดเมนระหว่างซับยูนิต (inter-subunit) ได้ชัดเจนกว่า ภายในซับยูนิตเดียวกัน (intra-subunit) โดยเฉพาะคู่ TM1-TM1, stalk-stalk และ TM2-TM2 แสดงให้เห็นว่า โครงสร้าง CorA ที่สภาวะเปิดมีการเกาะรวมกันแบบหลวมๆ มากกว่าในสภาวะปิด ซึ่งอาจจะเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ซึ่งมีความเสถียรที่สุดจึงเป็นโครงสร้างที่สภาวะปิด และยังไม่มียางานโครงสร้างของ CorA ที่สภาวะเปิด เนื่องจากโครงสร้างมีความไม่เสถียร



รูปที่ 4.7 กราฟคอนแทกซ์ของระยะห่างระหว่างโดเมนต่างๆ ระหว่างซับยูนิต (a) และภายในซับยูนิต (b)

#### 4.4 บทสรุป

ในการศึกษานี้ ได้จำลองคอนฟอร์เมชันที่สถานะเปิดโดยใช้ข้อมูลอิเล็กตรอนพาราแมกเนติกส์เรโซแนนซ์และกระบวนการวิธี PaDSAR ตามด้วยการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (MD) ของโครงสร้างในสถานะปิดและเปิดในลิพิดไบเลเยอร์เพื่อให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน แบบจำลองเชิงโครงสร้างของคอนฟอร์เมชันที่สถานะเปิดแสดงส่วน stalk เคลื่อนเข้าใกล้แกน

สมมาตรของแขนแนลมากขึ้น ในขณะที่ส่วน TM1 เคลื่อนออกจากแกนของแขนแนล ลักษณะการก่อกำเนิดคล้ายกับการเคลื่อนที่ของกรรไกรจากมุมมองด้านข้าง หรือคล้ายรูกล้องหากพิจารณาจากด้านนอกเซลล์ การจัดเรียงเชิงโครงสร้างดังกล่าวนำไปสู่การขยายโพรงในบริเวณเมมเบรน จากผลของ MD ส่วนไซโตพลาสซึมโดเมนและเพอริพลาสซึมมีความยืดหยุ่นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วน stalk, TM1 และ TM2 กราฟโปรไฟล์ของพลังงานโซเวชันที่ใช้แทนการเคลื่อนที่ของ  $Mg^{2+}$  ผ่านตามโพรงของแขนแนลที่สภาวะเปิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลจากการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจกลไกการขนส่งไอออนในโปรตีนขนส่ง  $Mg^{2+}$  ได้ดียิ่งขึ้น

## บทที่ 5

# สรุปผลการศึกษา

รายงานวิจัยนี้เสนอผลงานวิจัยจำนวนสองเรื่อง เรื่องที่หนึ่งนำเสนอผลงานวิจัยของการสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะพัก (Resting or Down state) ของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของ voltage-gated potassium channel (KvAP-VSD) เรื่องที่สองนำเสนอผลงานวิจัยของการสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่สภาวะเปิดของ  $Mg^{2+}$  channel การสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างนี้ใช้หลักการของเทคนิค molecular modeling และกระบวนการวิธี PaDSAR วิธีดังกล่าวได้เคยพัฒนาขึ้นมาโดยเฉพาะสำหรับใช้ประโยชน์จากข้อมูลจากการทดลองด้วยเทคนิคอีพ็อดและการติดสปีนที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีนมาสร้างเป็นข้อมูลเชิงโครงสร้างเพื่อสร้างโมเดลให้สอดคล้องกับข้อมูลการทดลอง โครงสร้างที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับโครงสร้างอีกสภาวะหนึ่ง เช่น up-state conformation กับ Down-state conformation ของ KvAP-VSD หรือ closed-state conformation กับ open-state conformation ของ CorA  $Mg^{2+}$  channel และศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตเพิ่มเติมด้วยเทคนิค molecular dynamics simulation ผลการศึกษาของแต่ละระบบสามารถสรุปได้ดังนี้

### 5.1 Down-state model ของ KvAP-VSD

ประเด็นสำคัญของงานวิจัยนี้คือโครงสร้างของโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าของโวกเทจเกตไอออนแชนแนลที่สภาวะพักเป็นอย่างไร เนื่องจากคอนฟอร์เมชันของ VSD ใน Down-state conformation และรูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันนั้นยังเป็นประเด็นโต้แย้งกันอยู่ในปัจจุบัน ปัญหาคือเทคนิค x-ray crystallography ไม่สามารถวัดโครงสร้างสามมิติที่สภาวะนี้ได้ งานวิจัยนี้ใช้กระบวนการ Site-directed spin labeling และ EPR spectroscopy สร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่ Down-state conformation ในบริเวณ VSD ของ KvAP ( $K_v$  จาก *Aeropyrum Pernix*) อย่างไรก็ตาม การบันทึก EPR สเปกตรัม ภายใต้สภาวะ Resting (ค่าศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนน้อยกว่าศูนย์) นั้นไม่สามารถกระทำได้ แต่มีรายงานว่าการใช้ DOTAP ซึ่งเป็นลิพิดชนิดพิเศษที่ไม่มีหมู่ Phosphodiester สามารถชักนำให้ VSD ทรานสิชันไปอยู่ในสภาวะ Resting state โดยที่ไม่ต้องใช้ศักย์ไฟฟ้า การสร้างโมเดลเชิงโครงสร้างที่ Down state ใช้ข้อมูลการทดลองวัดจากโปรตีนชนิดดังกล่าวในลิพิดสองชนิดคือ ลิพิดผสม PCPG (KvAP-VSD มีความเสถียรที่ up-state) และลิพิดที่ไม่มีหมู่

Phosphodiester (KvAP-VSD มีความเสถียรที่ down-state) ข้อมูลการทดลองจากเทคนิคอีพีอาร์ ได้แก่ Solvent accessibility จาก Standard continuous-wave EPR spectroscopy และข้อมูล Intra-domain distances จากเทคนิค DEER distance measurements ซึ่งวัดจากโปรตีนตัวอย่างที่เป็น Bifunctional spin label และ Pulsed EPR spectroscopy โมเดลที่ได้แสดงสามารถเชื่อมโยงรูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันระหว่าง Up-state และ Down-state ของ VSD

เมื่อนำโมเดลไปศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตด้วยเทคนิค molecular dynamics simulation ทั้งสองสถานะ ผลการศึกษาสามารถอธิบายในประเด็นเรื่องการเคลื่อนตัวของส่วนท่อนทรานสมเมมเบรน S4 (voltage sensor segment) ของ VSD ผ่านบริเวณลิพิดไบเลเยอร์ในช่วงเกิด membrane depolarization และการเคลื่อนที่ประจุบวกของเรสซิดีวอาร์จินีนตำแหน่ง R120, R123, R126 และ R133 สามารถเกิดขึ้นได้ในเมมเบรน เนื่องจากช่อง water crevice ใน VSD มีขนาดกว้างขึ้นทำให้โมเลกุลน้ำเข้าไปในช่องได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า dielectric ของเมมเบรนสูงขึ้น จึงช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับประจุของอาร์จินีนในเมมเบรน นอกจากปรากฏการณ์ดังกล่าว ยังมีปัจจัยที่ช่วยด้วยคือ การแลกเปลี่ยนพันธะไฮโดรเจนของคู่ salt-bridge ของ R123, R126 และ R133 กับ E45, D62 และ E93

## 5.2 Open state model ของ $Mg^{2+}$ channel

เนื่องจากโครงสร้างโฮโมเพนทาเมอร์ที่ได้จากเทคนิคเอกซเรย์ของแมกนีเซียมแชนแนลชนิด CorA จาก *Thermotoga maritima* สอดคล้องกับสภาวะปิดหรือสภาวะที่ไม่มีการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ทำให้ขาดคำอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการทำงานดังกล่าว จากรายงานวิจัย พบวิธีที่สามารถเพิ่มความเสถียรที่สภาวะเปิดให้กับ CorA  $Mg^{2+}$  channel โดยการให้ความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  ที่อยู่ในเซลล์มีระดับเป็นศูนย์หรือต่ำกว่า  $Mg^{2+}$  ที่อยู่นอกเซลล์มากๆ ซึ่ง CorA  $Mg^{2+}$  channel จะถูกกระตุ้นให้เปิดช่องทางผ่านของ  $Mg^{2+}$  CorA งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลจากเทคนิค SDSL/EPR ของ CorA ในสภาวะเปิด แบบจำลองเชิงโครงสร้างของคอนฟอร์เมชันที่สถานะเปิดแสดงส่วนสทอล์คเฮลิกซ์ (stalk helix) เคลื่อนเข้าใกล้แกนสมมาตรมากขึ้น ในขณะที่ส่วน TM1 เคลื่อนออกจากแกนหลักนี้ การเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันนี้เป็นผลจากการหมุนและการเคลื่อนที่ของท่อนเกลียวอัลฟาทั้ง 5 ของส่วน Stalk และ TM1 (transmembrane segment) ในลักษณะที่ทำให้ปลายของโพรง (Pore) ด้านที่อยู่ใน cytoplasmic แคมเบลงและปลายด้าน extracellular กว้างขึ้น การจัดเรียงเชิงโครงสร้างดังกล่าวนำไปสู่การขยายโพรงในบริเวณเมมเบรน จากผลของ MD โดเมนเชิงโครงสร้างทั้งหมดของคอนฟอร์เมชันที่สถานะเปิดมีพลวัตสูงกว่าสถานะปิด ส่วนไฮโดรฟอสฟอไรต์ โดเมนและเพอร์ฟอสฟอไรต์มีความยืดหยุ่นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสทอล์คและทรานสมเมมเบรนเฮลิกซ์ กราฟ Poisson-Boltzmann solvation energy profile ของการเคลื่อนที่ของ  $Mg^{2+}$  ข้ามเมมเบรนโดยผ่านทางโพรงของ CorA  $Mg^{2+}$  channel ที่สถานะเปิดมีค่าต่ำกว่าที่สถานะปิดอย่างมีนัยสำคัญ



### 5.3 ข้อเสนอแนะ: งานวิจัยที่จะดำเนินต่อไป

สิ่งที่น่าสนใจและสามารถดำเนินงานวิจัยต่อไปได้ คือ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกลไกการทำงานของไอออนแชนแนล โดยมุ่งให้ความสนใจหัวข้อรูปแบบการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนศักย์ไฟฟ้าเมมเบรนของ voltage-sensor domain (VSD) ของ voltage-dependence potassium channel และกลไกการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ของ magnesium channel โดยใช้กระบวนการวิธีสร้างแบบจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลภายใต้สภาวะแวดล้อมของฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์และเทคนิคการคำนวณพลังงานเสรี เพื่ออธิบายกระบวนการเกต (gating) การคัดกรอง (selectivity) และการไหลผ่านของไอออนข้ามผ่านชั้นเมมเบรน (ion permeation)



## เอกสารอ้างอิง

- (1) Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed.; Sinauer: Sunderland, Mass., 2001; p xviii, 814 p.
- (2) Bagal, S.; Brown, A. D.; Cox, P. J.; Omoto, K.; Owen, R. M.; Pryde, D. C.; Sidders, B.; Skerratt, S. E.; Stevens, E. B.; Storer, R. I., et al. Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 593-624.
- (3) Zlotkin, E. The Insect Voltage-Gated Sodium Channel as Target of Insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* **1999**, *44*, 429-455.
- (4) Camerino, D. C.; Desaphy, J. F.; Tricarico, D.; Pierno, S.; Liantonio, A. Therapeutic Approaches to Ion Channel Diseases. *Advances in Genetics, Vol 64* **2008**, *64*, 81-145.
- (5) Hubner, C. A.; Jentsch, T. J. Ion Channel Diseases. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2435-2445.
- (6) Lee, A.; Fakler, B.; Kaczmarek, L. K.; Isom, L. L. More Than a Pore: Ion Channel Signaling Complexes. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 15159-15169.
- (7) Altenbach, C.; Flitsch, S. L.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L. Structural Studies on Transmembrane Proteins. 2. Spin Labeling of Bacteriorhodopsin Mutants at Unique Cysteines. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7806-12.
- (8) Altenbach, C.; Greenhalgh, D. A.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L. A Collision Gradient Method to Determine the Immersion Depth of Nitroxides in Lipid Bilayers: Application to Spin-Labeled Mutants of Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1667-71.
- (9) Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **1998**, *280*, 69-77.
- (10) Perozo, E.; Cortes, D. M.; Cuello, L. G. Three-Dimensional Architecture and Gating Mechanism of a K<sup>+</sup> Channel Studied by Epr Spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 459-69.

- (11) Sompornpisut, P.; Liu, Y. S.; Perozo, E. Calculation of Rigid-Body Conformational Changes Using Restraint-Driven Cartesian Transformations. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2530-46.
- (12) Liu, Y. S.; Sompornpisut, P.; Perozo, E. Structure of the Kcsa Channel Intracellular Gate in the Open State. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 883-7.
- (13) Perozo, E.; Cortes, D. M.; Sompornpisut, P.; Kloda, A.; Martinac, B. Open Channel Structure of Mscl and the Gating Mechanism of Mechanosensitive Channels. *Nature* **2002**, *418*, 942-948.
- (14) Sompornpisut, P.; Roux, B.; Perozo, E. Structural Refinement of Membrane Proteins by Restrained Molecular Dynamics and Solvent Accessibility Data. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5349-5361.
- (15) Vasquez, V.; Sotomayor, M.; Cordero-Morales, J.; Schulten, K.; Perozo, E. A Structural Mechanism for Mscs Gating in Lipid Bilayers. *Science* **2008**, *321*, 1210-4.
- (16) Maguire, M. E. The Structure of Cora: A Mg(2+)-Selective Channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 432-8.
- (17) Niegowski, D.; Eshaghi, S. The Cora Family: Structure and Function Revisited. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2007**, *64*, 2564-74.
- (18) Eshaghi, S.; Niegowski, D.; Kohl, A.; Martinez Molina, D.; Lesley, S. A.; Nordlund, P. Crystal Structure of a Divalent Metal Ion Transporter Cora at 2.9 Angstrom Resolution. *Science* **2006**, *313*, 354-357.
- (19) Lunin, V. V.; Dobrovetsky, E.; Khutoreskaya, G.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Doyle, D. A.; Bochkarev, A.; Maguire, M. E.; Edwards, A. M.; Koth, C. M. Crystal Structure of the Cora Mg<sup>2+</sup> Transporter. *Nature* **2006**, *440*, 833-7.
- (20) Payandeh, J.; Pai, E. F. A Structural Basis for Mg<sup>2+</sup> Homeostasis and the Cora Translocation Cycle. *EMBO J* **2006**, *25*, 3762-73.
- (21) Lunin, V. V.; Dobrovetsky, E.; Khutoreskaya, G.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Doyle, D. A.; Bochkarev, A.; Maguire, M. E.; Edwards, A. M.; Koth, C. M. Crystal Structure of the Cora Mg<sup>2+</sup> Transporter. *Nature* **2006**, *440*, 833-837.
- (22) Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Ruta, V.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. X-Ray Structure of a Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel. *Nature* **2003**, *423*, 33-41.

- (23) Lee, S. Y.; Lee, A.; Chen, J.; MacKinnon, R. Structure of the Kvap Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel and Its Dependence on the Lipid Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 15441-6.
- (24) Long, S. B.; Tao, X.; Campbell, E. B.; MacKinnon, R. Atomic Structure of a Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel in a Lipid Membrane-Like Environment. *Nature* **2007**, *450*, 376-82.
- (25) Cuello, L. G.; Cortes, D. M.; Perozo, E. Molecular Architecture of the Kvap Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel in a Lipid Bilayer. *Science* **2004**, *306*, 491-5.
- (26) Chakrapani, S.; Cuello, L. G.; Cortes, D. M.; Perozo, E. Structural Dynamics of an Isolated Voltage-Sensor Domain in a Lipid Bilayer. *Structure* **2008**, *16*, 398-409.
- (27) Li, Q.; Wanderling, S.; Sompornpisut, P.; Perozo, E. Structural Basis of Lipid-Driven Conformational Transitions in the Kvap Voltage-Sensing Domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 160-6.
- (28) Dalmas, O.; Sompornpisut, P.; Bezanilla, F.; Perozo, E. Molecular Mechanism of Mg<sup>2+</sup>-Dependent Gating in Cora. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3590.

## ภาคผนวก

### การเผยแพร่ผลงานการวิจัย

ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนโดยทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชทั้งเต็มจำนวนและบางส่วน โดยได้เผยแพร่ตีพิมพ์เป็นบทความวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ และโปสเตอร์ในงานประชุมทางวิชาการดังต่อไปนี้

1. Dalmas, O.; Sompornpisut, P.; Bezanilla, F.; Perozo, E. "Molecular mechanism of Mg<sup>2+</sup>-dependent gating in CorA." *Nat Commun.* **2014**; 5:3590.
2. Q. Li, S. Wanderling, P. Somponspisut and E. Perozo "Structural Basis of Lipid-Driven Conformational Transitions in the KvAP Voltage Sensing Domain" *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2014**, 21, 160-6.
3. Sunan Kitjaruwankul, Panisak Boonamnaj, Sunit Fuklang, Chirayut Supunyabut, **Pornthep Sompornpisut** "Shaping the water crevice to accommodate the voltage sensor in a down conformation: a molecular dynamics simulation study" *J Phys Chem B.* **2015**; 119: 6516-24.

### ผลงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย (บางส่วน)

1. Chirayut Supunyabut, Sunit Fuklang, **Pornthep Sompornpisut** "Continuum electrostatic approach for evaluating positions and interactions of proteins in a bilayer membrane" *J. Mol. Graph. Model.* **2015**; 59: 81-91.
2. Kanon Sujaree, Sunan Kitjaruwankul, Panisak Boonamnaj, Chirayut Supunyabut, **Pornthep Sompornpisut** "Transmembrane Helix Assembly by Max-Min Ant System Algorithm." *Chem Biol Drug Des.* 2015 Jun 9. doi: 10.1111/cbdd.12600. [Epub ahead of print]
3. Sunan Kitjaruwankul and **Pornthep Sompornpisut** "Insight into the interactions of residues in divalent cation sensor of magnesium channel TmCorA by molecular dynamics simulations" The Joint 7th Asia Oceania Human Proteome Organization Congress and the 9th International Symposium of the Protein

Society of Thailand 6 -8 August 2014, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand.