# บทที่ 1
# บทนำ

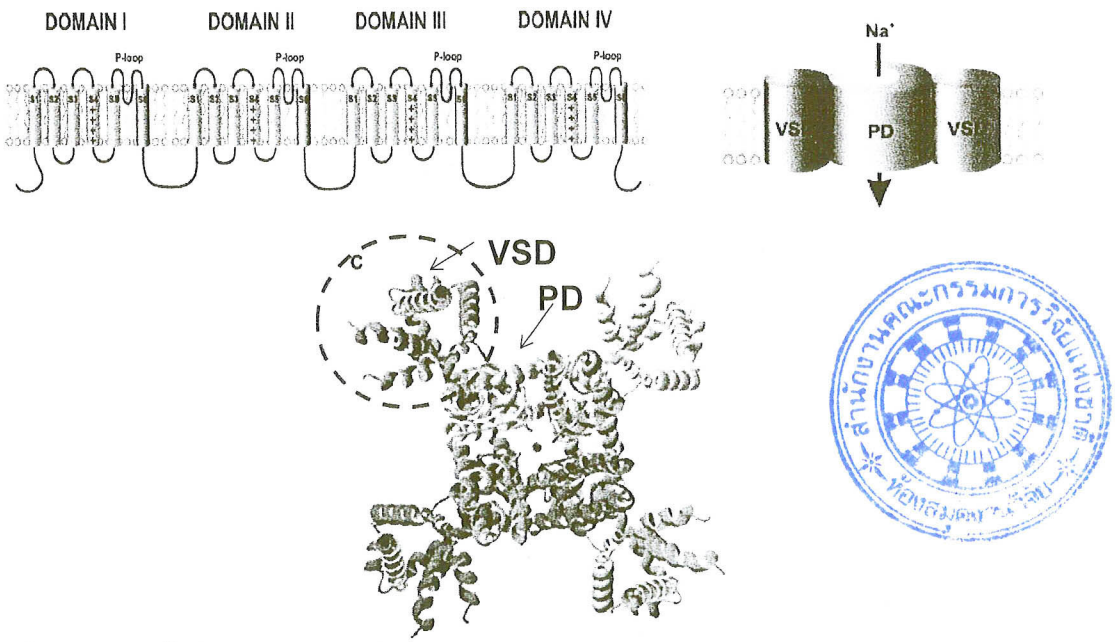
## 1.1 ไอออนแชนแนล

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

ไอออนแชนแนลเป็นเมมเบรนโปรตีนที่ทำงานโดยการเปิด-ปิดทางผ่านของไอออนที่บริเวณเซลล์เมมเบรน โปรตีนตระกูลไอออนแชนแนลที่ทำงานโดยการรับรู้ศักย์ไฟฟ้า (voltage-gated ion channels) เช่น $K_v$ และ $Na_v$ channels เป็นโปรตีนเตตระเมอร์ โดยมีท่อนทรานส-เมมเบรน transmembrane (TM) segments ที่ก่อโครงสร้างเป็นเกลียวอัลฟา ($\alpha$-helix) ฝังอยู่ในชั้นเมมเบรน โพรงทางผ่านของไอออนเรียกว่า pore เกิดจากท่อนทรานสเมมเบรนของทั้งสี่มอนอเมอร์ประกอบร่วมอยู่ด้วยกัน (รูปที่ 1)

ช่องโซเดียมหรือโซเดียมแชนแนลเป็นเมมเบรนโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ลำเลียงไอออนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์[1-2] โซเดียมแชนแนลเป็นโปรตีนที่พบทั้งเซลล์โพรแคริโอตและยูแคริโอต โครงสร้างของโซเดียมแชนแนลชนิดทำงานโดยศักย์ไฟฟ้า หรือ voltage-gated sodium ($Na_V$) channels ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรนจำนวน 6 ท่อนต่อหนึ่งมอนอเมอร์ โดยกำหนดชื่อแต่ละท่อนทรานสเมมเบรนว่า S1, S2, S3, S4, S5 และ S6 การลำเลียงไอออน

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



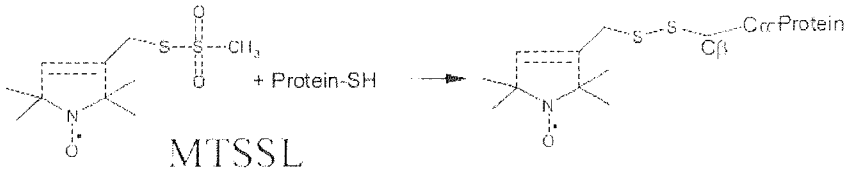

**รูปที่ 1 โดเมนทั้งสี่ ส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าและส่วนโพรงของโมเลกุลของ voltage-gated $Na_v$ channels**

งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของไอออนแชนแนลเป็นงานที่มีนักวิจัยให้ความสนใจกับอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้โครงสร้างจะนำไปสู่คำอธิบายที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานระดับโมเลกุล อาทิเช่น เหตุใดที่ทำให้ไอออนแชนแนลมีความจำเพาะต่อชนิดของไอออน ส่วนโพรงและ gate มีลักษณะอย่างไรจึงสามารถเป็นทางผ่านของไอออนได้ ไอออนแชนแนลสภาวะปิดและเปิดมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างไร การทำงานของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าเกี่ยวข้องกับการทำงานของส่วนโพรงอย่างไร เป็นต้น คำตอบที่ได้จะนำไปสู่ความรู้พื้นฐานที่สำคัญทางประสาทวิทยาศาสตร์ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในวงการแพทย์

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

**1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา**

เทคนิค SDSL/EPR ใช้หลักการการติดอนุมูลอิสระ (free radical) หรือเรียกสั้นๆ ว่า สปิน ให้กับโมเลกุลเป้าหมาย เช่น โปรตีน โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสปินรีเอเจนต์หรือสารที่มีอนุมูลอิสระที่เสถียร (รูปที่ 2) เช่น methanethiosulfonate spin label (MTSSL) กับโปรตีนที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl, -SH) นั่นคือ side chain ของกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) แล้วได้โปรตีนที่มีสปินติดอยู่บริเวณตำแหน่งซีสเทอีนนั้น เมื่อนำไปบันทึกด้วยเทคนิค EPR จะได้พีคของสปินนั้น โดยสปินจะทำหน้าที่เป็นโพรบ (probe) หรือตัวรายงานสภาพแวดล้อม (environmental reporter) นักวิจัยคนสำคัญในลำดับแรกๆ ของการนำเทคนิค SDSL/EPR สำหรับใช้ศึกษาโครงสร้างของโปรตีน คือ W. Hubbell[3-4]




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

เทคนิค SDSL/EPR สามารถให้ข้อมูลทางโครงสร้าง 3 ประเภท คือ 1) ข้อมูลแสดงระดับพลวัติของ side chain ที่มีสปินติดอยู่ โดยคำนวณส่วนกลับของความกว้างของพีคกลางที่ได้จากการอนุพันธ์ของสเปกตรัมดูดกลืนของเทคนิค EPR โดยเรียกว่าค่า mobility ($\Delta H_o^{-1}$) 2) ค่าความสามารถของสปินที่จะเกิดอันตรกริยากับ 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 เป็นข้อมูลที่บอกสภาพแวดล้อมของกรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ (ที่ติดสปินไว้) ว่าอยู่ในชั้นเมมเบรนหรือไม่ นอกจากนี้ ยังใช้บอกโครงสร้าง $\alpha$-helix หรือ $\beta$-sheet และ 3) ค่าระยะทางระหว่างสปินที่ติดบนกรดอะมิโนไว้อย่างน้อยสองตำแหน่ง และเกิด spin-spin coupling

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

นอกจาก W. Hubbell แล้ว ยังมีนักวิจัยอีกหลายคนที่นำเทคนิค 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[5-6] ต่อมา Perozo มีความพยายามในการพัฒนากระบวนวิธีในการคำนวณโครงสร้างของไอออนแชนแนลจากข้อมูล SDSL/EPR ในปี ค.ศ. 2001 Perozo และคณะใช้วิธี ReDCAT[7] โดยนำคำนวณโครงสร้างของ inner transmembrane segments ใน open state[8] ของ KcsA โดยอาศัยโครงสร้าง x-ray ใน close state ของ KcsA[6] 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 ไปสู่สภาวะอินเทอร์มีเดียตและสภาวะปิดอย่างสมบูรณ์[9]

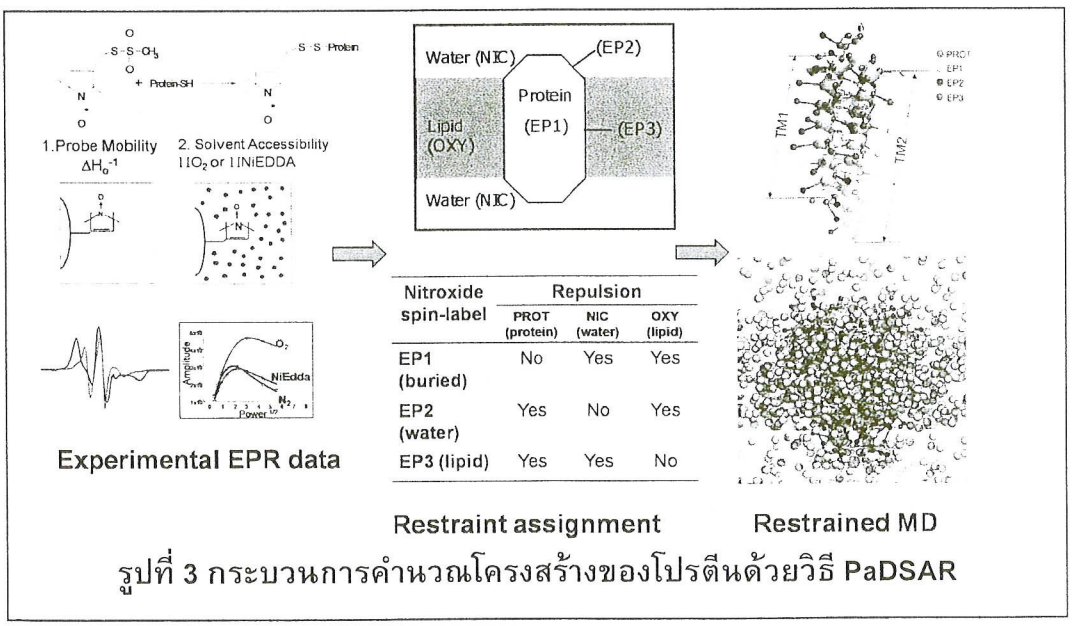
อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญของการคำนวณด้วยวิธี ReDCAT คือ 1) ข้อมูลโครงสร้างถูกสร้างตามระบบกริดหรือ grid search system หากระบบมี degree of freedom มาก จะทำ

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

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

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

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




รูปที่ 3 กระบวนการคำนวณโครงสร้างของโปรตีนด้วยวิธี PaDSAR

วิธี PaDSAR นำไปทดสอบโดยการคำนวณโครงสร้างในสภาพ unfolded structure ของ KcsA และถูกนำไปใช้เพื่อแก้ไขโครงสร้างรังสีเอ็กซ์บริเวณ N-terminal domain ของ mechanosensitive channels of small conductance[11]

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครงสร้างสามมิติของโซเดียมแชนแนลใดๆ เลย ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างบริเวณโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโซเดียมแชนแนล แต่มีงานวิจัยนำเสนอโมเดลเชิงโครงสร้างของโซเดียมแชนแนลด้วยวิธี molecular modeling โดยอาศัยข้อมูลโครงสร้างรังสีเอ็กซ์ของ $K_v$ channel ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น KvAP[15], Kv1.2-2.1 chimera[16] จากรายงานการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโพแทสเซียมแชนแนลโดย Perozo และคณะ พบว่าบริเวณ VSD สามารถทำงานได้โดยปราศจากส่วนของ pore domain[12] และพบในโปรตีนอื่นๆ ด้วย จึงเสนอว่าส่วน VSD น่าจะเป็นชิ้นส่วนพื้นฐานของการทำงานของโปรตีน ในปี 2009 Guy และคณะวิจัยที่ National Institutes of Health เสนอ homology model ที่บริเวณโดเมนรับรู้ทางศักย์ไฟฟ้าของโซเดียมแชนแนลจาก *Bacillus halodurans* (NaChBac) ในสภาวะปิดและเปิดโดยอาศัยเทคนิค sequence alignment กับ KvAP และ Kv1.2/2.1 chimera แม้ว่าโมเดลดังกล่าวจะสอดคล้องกับผลการทดลองจากเทคนิค LRET (Luminescence resonance energy transfer)[13] แต่พบว่ายังมีจุดบกพร่องอยู่และบางส่วนขัดแย้งกับผลของ SDSL/EPR