

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 Sequence alignment และการวิเคราะห์ก่อนทรานสเมมเบรนของ NaChBac-VSD

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

```

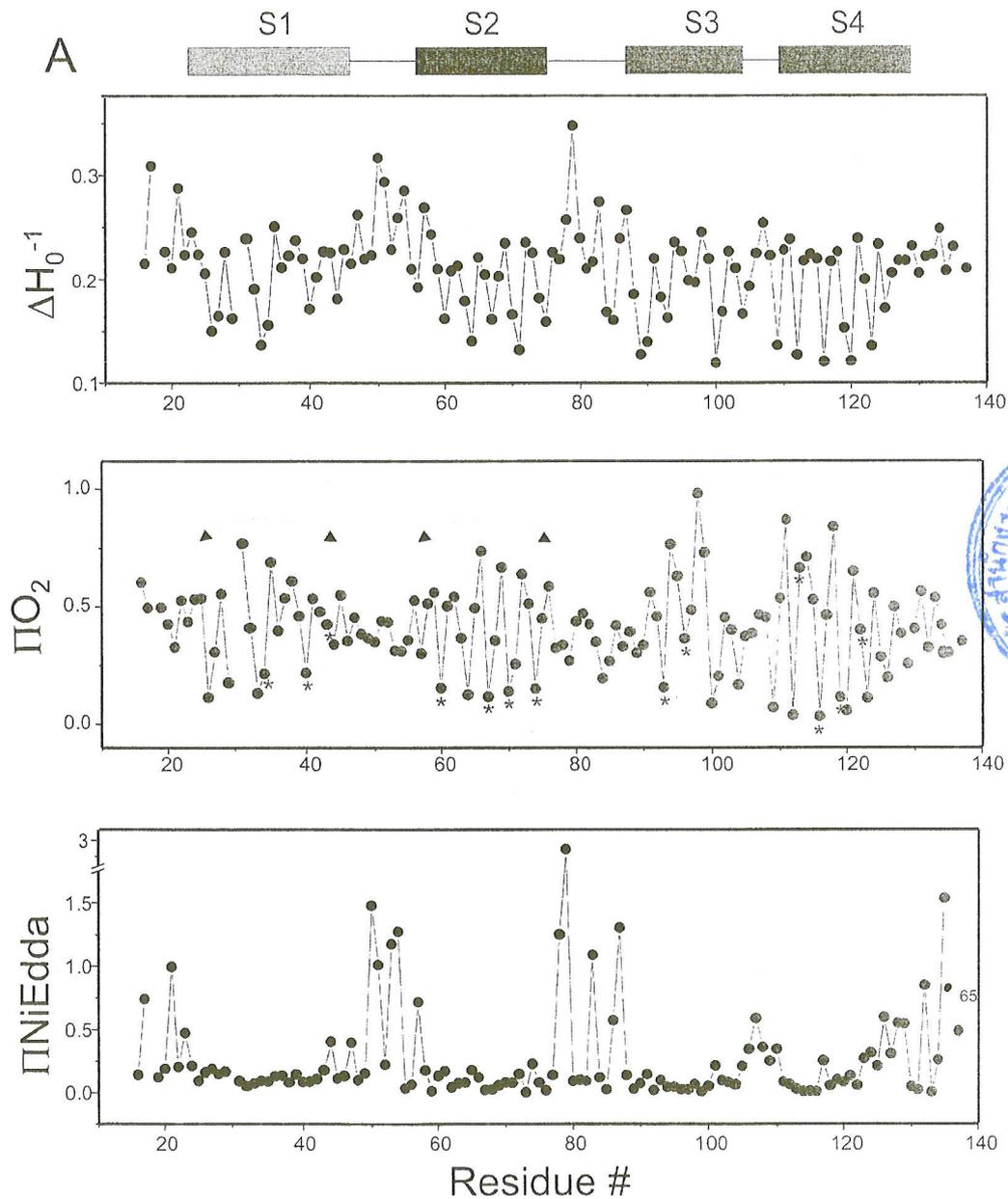
1   MKMEARQKQNSFTSKMQKIVNHRRAFTFTVIALILFNALIVGIETYPRIYADHKWLFYRJDVLVLLWIFTIE
71  IAMRFLASNPKSAFFRSSWNWFDLIVAAGHIFAGAQFVTVLRILRVLRLVLRRAISVVP SLRRLVDALVMT
141 IGSRS
    
```

รูปที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโซเดียมแชนแนลบริเวณโดเมนรับรู้ศักย์ไฟฟ้า

	S1	
Kv1.2-2.1	YIKEEERPLPENEFQRQVWLLFEYPESSGPARILAIIVSVMVLLISIVSFCLETLPFRDENEDMHGGGVTFHTY	224
Kv1.2	YIKEEERPLPENEFQRQVWLLFEYPESSGPARILAIIVSVMVLLISIVSFCLETLPFRDENEDMHGGGVTFHTY	205
KvAP	-----DVMHHIVVSLGVSYYAALLSVIVVVVEYT-----	28
NaChBac	--MKMEARQKQNSFTSKMQKIVNHRRAFTFTVIALILFNALIVGIETY-----	46
	S2	S3
Kv1.2-2.1	SQSTIGYQQSFTDPPFTVETGCLWFSRFLVRFACPSKAGFFTNIMNLIIDVAITPFYVFI--FLVESIKSV	298
Kv1.2	SNSTIGYQQSFTDPPFTVETGCLWFSRFLVRFACPSKAGFFTNIMNLIIDVAITPFYVFI--FLVESIKSV	281
KvAP	-----MQLSCEYLVRLEYVBLILVILMADYAYPAYKSGDDAGYVK--KTFYELIPAVVAGLJA--LIECHLAG	93
NaChBac	-----RIYADHKWLFYRJDVLVLLWIFTIEIAMRFLASNPKSAFFRSSWNWFDLIVAAGHIFA-----GAQ--	107
	S4	
Kv1.2-2.1	LQFQNVK---RVVQTFEIRHRTLRTEKLSRHSKGLQILGQTLKASMRLEK	344
Kv1.2	QQQQQAMSL--AIVLIVLIVRVERIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRLEK	329
KvAP	LGFLR-----IVRLLFELRLTLISRC-----	115
NaChBac	-----EVVLELIRVLRVLRRAIS-----	125
Kv1.2-2.1	LLIFFLFIVGILFSSAVYFAADERSQFPTSPDAFWAVVSMITVGYGD	394
Kv1.2	LLIFFLFIVGILFSSAVYFAADERSQFPTSPDAFWAVVSMITVGYGD	379
KvAP	-----SKFLSALADAADKLVPR-----	132
NaChBac	-----VVP SLRRLVDALVMTIGSRS-----	145

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

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



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



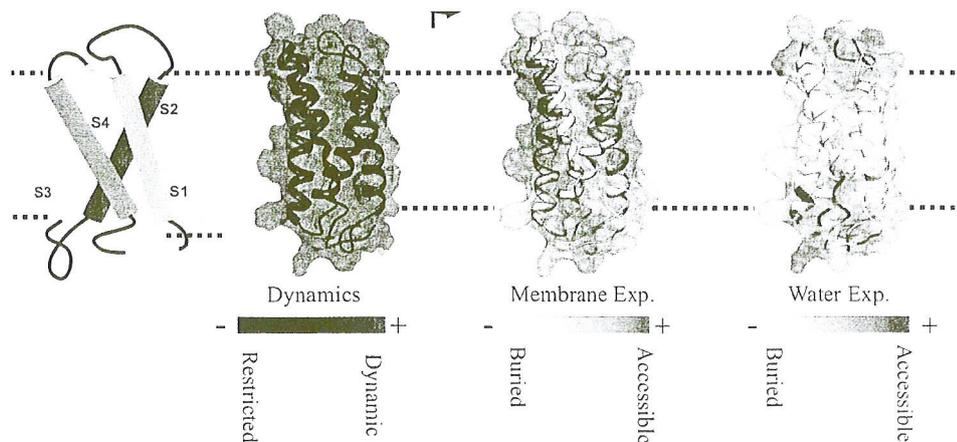
จากการวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบท่อนทรานสเมมเบรนกับค่า ΔH_0^{-1} , Π NIEDDA และ ΠO_2 ทำให้สามารถระบุชนิดของ pseudospin ได้แก่ EP1, EP2 , EP3 และ EP4 ไปติดบนตำแหน่งของกรดอะมิโนบนโครงสร้างของ NaChBac-VSD ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

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

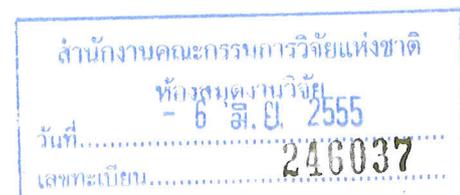
Type	Residue assignment
EP1	26 27 29 33 34 40 60 63 64 67 68 70 71 74 89 90 93 96 97 100 101 104 105 109 112 116 119 120 123 125
EP2	21 23 47 50 51 53 54 57 78 79 83 86 87 126 129 132 134 135 137
EP3	22 24 25 28 31 35 37 38 39 41 42 43 45 58 59 61 62 65 66 69 72 73 75 76 91 92 94 95 98 99 102 103 111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

3.3 โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จาก PaDSAR

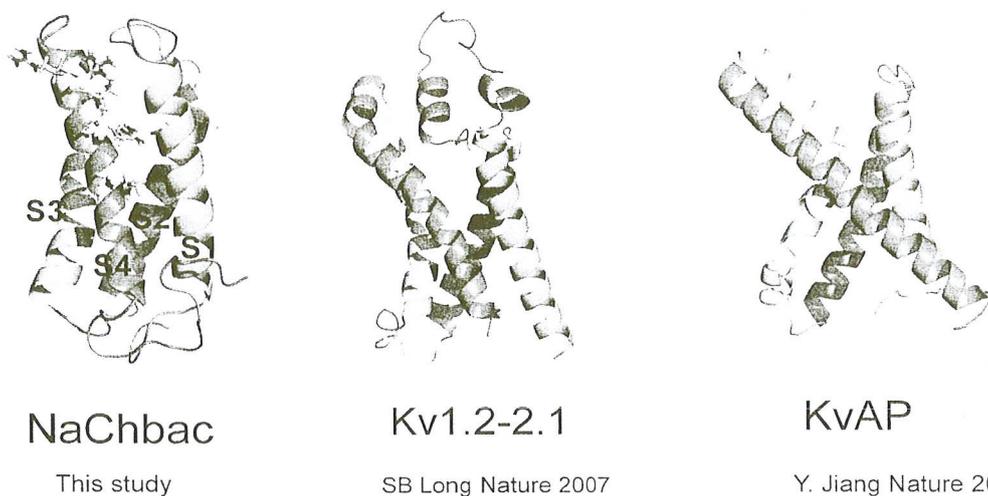
โมเดลเชิงโครงสร้างที่ได้จากวิธี PaDSAR ถูกประเมินเพื่อพิจารณาความสอดคล้องกับค่าการทดลอง และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของโครงสร้างดังกล่าวใช้ molecular surface ของโมเดลเทียบกับค่า ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ Π NIEDDA ของเทคนิค SDLS/EPR โดยให้เจดสีแทนระดับของค่าที่ได้จากการทดลอง (รูปที่ 8) ผลการเปรียบเทียบพบว่าโมเดลเชิงโครงสร้างสอดคล้องกับผลการทดลองเป็นอย่างดี



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



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

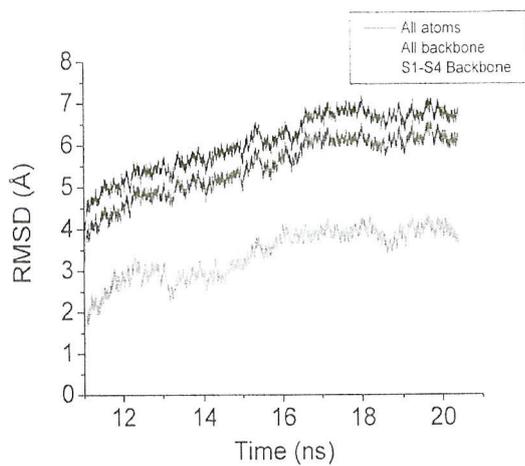


รูปที่ 9 เปรียบเทียบโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChBac กับ Kv1.2-2.1 และ KvAP

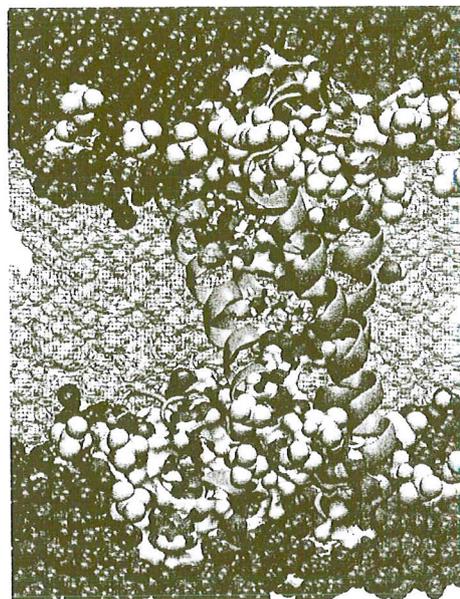
3.4 การประเมินโครงสร้างด้วยวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

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

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



(ก)



(ข)

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