บทที่ 4
การอภิปรายผล

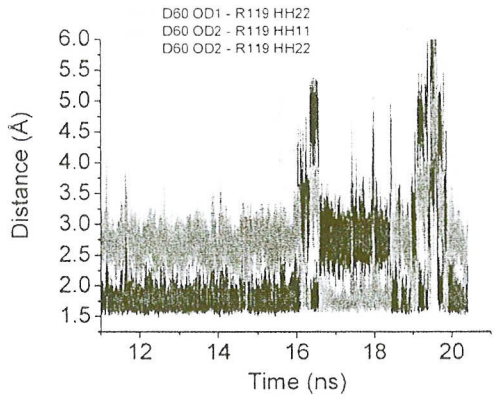
โมเดลเชิงโครงสร้างบริเวณ VSD ของ NaChbac ที่คำนวณด้วยระเบียบวิธี PaDSAR โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอีพีอาร์และการติดสปินที่ตำแหน่งจำเพาะต่างๆบนโปรตีนซึ่งได้แก่ ΔH_0^{-1} , ΠO_2 และ ΠNiEDDA ที่วัดจากโปรตีนตัวอย่างจำนวน 118 มิวแตนท์ครอบคลุมส่วน VSD โครงสร้างที่ได้ประกอบด้วยท่อนทรานสเมมเบรน S1 และ S2 มีโครงสร้างเกลียวอัลฟา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

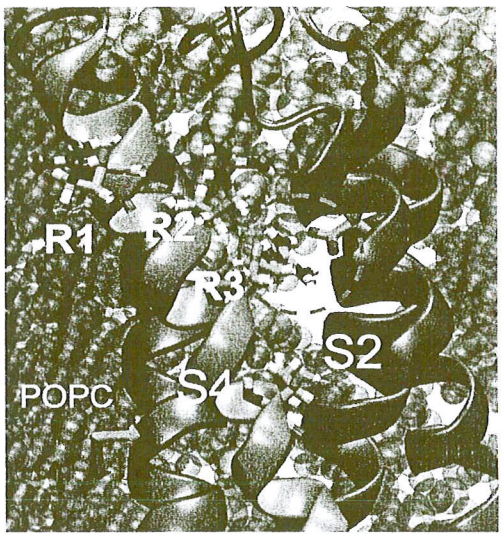
โครงสร้างโดยรวมบริเวณ VSD ของ NaChbac นี้มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างบริเวณ VSD ของ voltage-gated K channels อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางโครงสร้างของ VSD ที่เกิดจากการอยู่รวมกัน (assembly) ของ S1-S4 ใน NaChbac ค่อนข้างบีบแน่น มากกว่า K channel ข้อสังเกตดังกล่าวสามารถยืนยันด้วยข้อมูล mobility (ΔH_0^{-1}) ที่มีค่าค่อนข้างต่ำแสดงให้ว่าโครงสร้าง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

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

การวิเคราะห์โครงสร้างและพลวัติบริเวณ VSD ของ NaChbac ที่ได้จากข้อมูลทราเจคทอรีของการจำลองพลวัติเชิงโมเลกุลเป็นเวลา 20 นาโนวินาที สามารถตรวจพบระยะห่างของคู่ Hydrogen bond donor-acceptor ระหว่าง R119-D60 ที่เข้าข่ายการเกิดพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 11) และยังพบโมเลกุลน้ำจำนวนหนึ่งอยู่ภายใน VSD (รูปที่ 10ข) แสดงให้เห็นว่า VSD มีรอย

แยกที่ลึกซึ่งน้ำสามารถเข้าไปเกือบถึงแกนกลางของส่วน VSD ได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาและแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ NaChBac-VSD อยู่ในสภาวะแอคติเวชัน



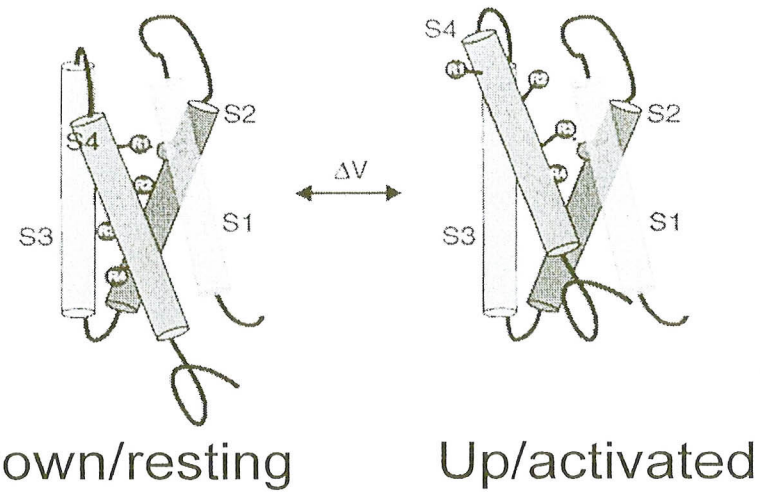


รูปที่ 11 กราฟระยะห่างแสดงพันธะไฮโดรเจนระหว่าง R119-D60 ที่ได้จาก MD simulation

มีรายงานการศึกษาโครงสร้างและนำเสนอโมเดลการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของ VSD ระหว่างสภาวะแอคติเวชันกับสภาวะพัก เนื่องจากกระบวนการเปิดหรือปิดของโพรงไอออนแชนแนลอาศัยการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันและอันตรกิริยาระหว่าง VSD และ PD ในสภาวะแอคติเวชัน PD อยู่ในสภาวะปิด คอนฟอร์เมชันของ VSD โดยเฉพาะที่ S4 ตำแหน่ง arginine ที่สำคัญจำนวน 4 ตำแหน่ง (R1, R2, R3 และ R4) ส่วนใหญ่ค่อนไปทางเมมเบรนที่อยู่ด้านในของเซลล์ (intracellular side) ดังนั้นที่ molecular configuration นี้จึงเรียกว่า "Down" state หรือ Down conformation เมื่อมีการเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณเมมเบรน ทำให้ PD เปลี่ยนไปอยู่ในสภาพแอคติเวชันเปิดโพรงให้ไอออนผ่าน การเปลี่ยนสภาวะของ PD นี้เกิดจากการเคลื่อนที่ของส่วน VSD โดยเฉพาะที่ S4 เกิดการเลื่อนตำแหน่งประจุของ arginine ในทิศที่ออกนอกเซลล์ กล่าวคือ ตำแหน่ง arginine ส่วนใหญ่ค่อนไปทางเมมเบรนที่อยู่ด้านนอกเซลล์ (extracellular side) ที่สภาวะนี้จึงเรียกว่า "Up" state หรือ conformation ดังนั้นโครงสร้าง NaChBac-VSD ที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับ "Up" conformation

โครงสร้าง NaChBac-VSD ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อสร้างโครงสร้างในสภาวะ Down conformation ต่อไป รูปแบบการนำเสนอการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันในสภาวะแอคติเวชันและสภาวะพักของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าในโซเดียมแชนแนลแสดงดังรูปที่ 12

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 12 แบบเสนอการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันในสภาวะแอคติเวชันและสภาวะพักของส่วนรับรู้ศักย์ไฟฟ้าในโซเดียมแชนแนล

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