

بررسی اثر قدرت یونی بر دینامیک کانال یونی پتاسیم KcsA

کاظمی فر^۱، فرزانه^۱؛ هاشمی فر^۲، سید جواد^۲؛ سالاری^۲، وحید^۲

^۱،^۲ دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱ اصفهان

چکیده

در این مقاله تلاش شده است که با استفاده از محاسبات دینامیک مولکولی، اثر قدرت یونی بر دینامیک یون در کانال یونی پتاسیم KcsA بررسی شود. نتایج نشان می‌دهد که اعمال قدرت یونی تاثیر مثبتی بر پایداری سیستم دارد، اما دینامیک یون‌های پتاسیم را در کانال دچار اختلال می‌کند، به گونه‌ای که ظاهراً اختلاف پتانسیل 100 mV در دو سر کانال، برای شارش یون کافی نیست. این رفتار به میدان موضعی متقابل ایجاد شده در اثر یون‌های اضافی نسبت داده می‌شود و لذا با افزایش اختلاف پتانسیل دو سر کانال مشاهده کردیم که شارش یون دوباره برقرار می‌شود.

Investigating the effect of ionic strength on dynamics of KcsA potassium ion channel

Kazemifar, Farzaneh^{1*}; Hashemifar, Seyed Javad²; Salari Vahid²

^{1,2} Department of Physics, Isfahan University of Technology, 8415683111 Isfahan

Abstract

In this paper, molecular dynamics simulations are used to investigate the effect of ionic strength on ion dynamics in KcsA potassium ion channel. The results show that although ionic strength enhances stability of the system, it disturbs ion dynamics in the channel in such a way that a potential difference of about 100 mV between the channel sides seems insufficient for ion flow. This behavior is attributed to the inverse local field produced by extra ions and hence increasing the potential difference re-establishes the ion flow.

شناخت میکروسکوپی این کانال‌ها و عملکرد آنها از جایگاه ویژه-ای برخوردار است. کانال‌های یونی قادر به هدایت یک جریان یونی با آهنگ چشمگیر 10^7 یون در ثانیه می‌باشند. جالب است که با این سرعت ترابرد بالا کانال می‌تواند به شدت انتخاب‌گر باشد و تعیین کند که کدام نوع یون می‌تواند عبور کند. در میان انواع کانال‌های یونی که هر یک یون ویژه‌ای را از غشای سلول عبور می‌دهند، کانال‌های یونی پتاسیم تنظیم طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی را بر عهده دارند [۲].

ساختار کانال یونی پتاسیم KcsA

کانال یونی پتاسیم KcsA که از باکتری *Streptomyces lividans* گرفته شده است، اولین کانال یونی بلوری شده است. کانال پتاسیم از چهار زیرواحد متقارن تشکیل شده که حول یک محور فرضی قرار گرفته‌اند و یک مخروط ناقص تشکیل می‌دهند. هر زیرواحد

مقدمه

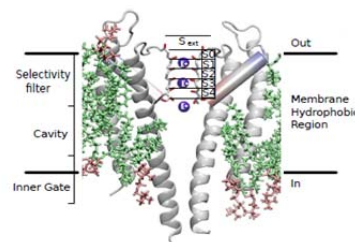
همه‌ی سلول‌های زنده توسط دو لایه‌ی لیپیدی به ضخامت 40 \AA آنگستروم به نام غشای سلولی احاطه شده‌اند. این غشا مانند سدی در برابر عبور مواد ضروری برای حیات سلول مانند یون‌های پتاسیم، سدیم، کلسیم و... عمل می‌کند. در اثر اختلاف غلظت یون‌ها در دو طرف غشا یک اختلاف پتانسیل و در نتیجه یک جریان یونی ایجاد می‌شود. این اختلاف پتانسیل به عنوان کلید اصلی فرآیندهای بیولوژیکی مانند نفوذ یون در کانال‌های یونی تلقی می‌شود. پروتئین‌های کانال یونی در غشای سلول جای دارند و یک مسیر عبور ایجاد می‌کنند که یون‌ها از طریق این مسیر بر اساس شیب الکتروشیمیایی خود جریان می‌یابند [۱]. فرآیند سیگنال دهی الکتریکی که از طریق آن کلیه‌ی اعمال حیاتی بدن موجودات زنده کنترل می‌شود، پیامد عملکرد کانال‌های یونی است و به همین دلیل

این روش به یک سیستم خنثی نیاز داریم [۵]. برای خنثی کردن سیستم می‌توان به دو روش عمل کرد، در راه اول، که ما آن را I' می‌نامیم، تعداد کافی یون با بار مخالف به سیستم اضافه می‌شود تا بار خالص آن صفر شود. راه دوم، که ما آن را I می‌نامیم، خنثی کردن سیستم با در نظر گرفتن قدرت یونی محلول است. به دلیل این‌که همه فرآیندهای زیستی در محلول الکترولیت با قدرت یونی محدود رخ می‌دهند، اعمال قدرت یونی نزدیک به شرایط فیزیولوژیکی بدن موجودات زنده به منظور حفظ پایداری ساختار کانال‌های یونی ضروری است [۶]. مقدار قدرت یونی برای یون-های Na^+ و Cl^- موجود در آب $I = 0.14 M$ می‌باشد. در این مقاله یک بار سیستم به روش I' شبیه‌سازی شده و سپس یک شبیه‌سازی دیگر به روش I انجام شده است تا میزان پایداری سیستم در دو حالت با هم مقایسه شود. معیار سنجش پایداری ساختار پروتئین کمیتی به نام RMSD است که انحراف ساختار از حالت ساختار اولیه‌ی خود را نشان می‌دهد [۷].

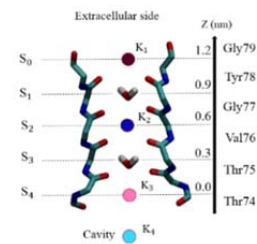
جزئیات محاسبات

فایل ساختار پروتئین به نام IBL8 از بانک داده‌های پروتئین دریافت شده است که شامل ۱۰۱ اسید آمینه و ۱۶۳۲ اتم است. این فایل شامل اطلاعاتی از قبیل نام و شماره اتم‌ها و اسید آمینه‌ها و مختصات مکانی اتم‌ها می‌باشد. با استفاده از نرم‌افزار Gromacs-5.1.1 ساختار پروتئین در یک جعبه‌ی شبیه‌سازی مکعبی به ابعاد 8.8367 nm قرار گرفته و سپس با تعداد ۲۱۱۹۴ مولکول آب مدل Tip3p حلال پوشی شده است. به منظور جلوگیری از سنگین شدن بیش از حد حجم محاسبات، از قرار دادن غشا در جعبه شبیه‌سازی چشم‌پوشی شد. امیدواریم که این مساله تاثیر چندانی بر بررسی دینامیک موضعی یون در داخل فیلتر انتخاب‌گر نداشته باشد. زیرا این فیلتر کاملاً توسط پروتئین احاطه شده و تماس مستقیمی با غشا ندارد. در تمام شبیه‌سازی‌ها میدان نیروی Amber03 به کار رفته است. این میدان نیرو دارای پارامترهای مناسب برای یون پتاسیم می‌باشد. انرژی سیستم در دو مرحله کمینه شده است. سپس به منظور رسیدن به دما و فشار ثابت سیستم به مدت 500 ps در آنسامبل NVT و 1000 ps در آنسامبل NPT به تعادل رسیده است. فشار و دمای سیستم به

شامل سه هلیکس می‌باشد که توسط حلقه‌ها (loops) به هم متصل شده‌اند. ساختار کانال را می‌توان مطابق شکل ۱-الف به سه ناحیه با عملکردهای مختلف تقسیم کرد: دهانه‌ی ورودی، کاواک و فیلتر انتخاب‌گر که به نظر می‌رسد مسئول انتخاب یون K^+ از میان گونه‌های کاتیونی متفاوت باشد. فیلتر انتخاب‌گر به طول 1.2 nm مطابق شکل ۱-ب، دارای چهار محل اتصال داخلی $S_1 - S_4$ و محل اتصال خارجی S_0 برای یون‌های K^+ است که طول هر یک از محل‌های اتصال داخلی 0.3 nm می‌باشد [۳].



(الف)



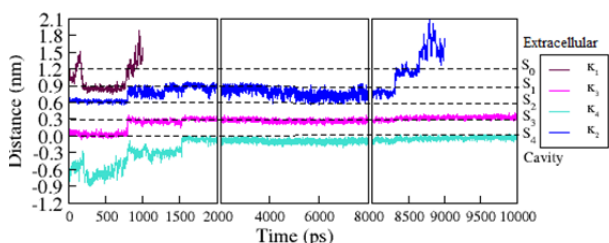
(ب)

شکل ۱: ساختار کانال یونی KcsA (الف) و ساختار فیلتر انتخاب‌گر (ب) [۳]

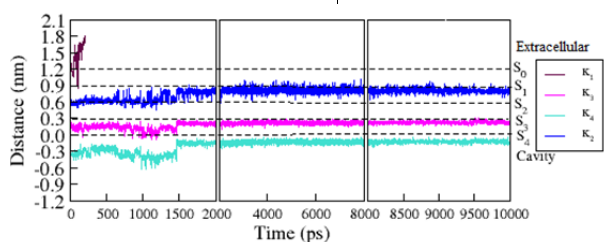
شبیه‌سازی شارش یون در طول کانال KcsA

یکی از ابزارهای نظری مهم برای درک میکروسکوپی عملکرد مولکول‌های زیستی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. در این گونه شبیه‌سازی‌ها رفتار دینامیکی سیستم مورد نظر با حل معادلات حرکت محاسبه و اندازه‌گیری می‌شود. محاسبه‌ی برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بلندبرد سنگین‌ترین بخش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. راه حل مرسوم برای افزایش بازده محاسبات، استفاده از روش مش‌بندی اوالد PME است. در روش اوالد، در اطراف هر ذره باردار سیستم یک توزیع گاوسی با مقدار بار یکسان و علامت مخالف در نظر گرفته می‌شود، در نتیجه جمع روی انرژی‌های پتانسیل به دو جمع تبدیل می‌شود، یک جمع در فضای حقیقی و دیگری جمع در فضای وارون. انتخاب مناسب توزیع پهنای گاوسی باعث همگرایی سریع جمع مذکور می‌گردد [۴]. در

مطابق شکل ۱-ب، قبل از شروع شبیه‌سازی، یون K_4 درون کاواک، یون K_3 در مکان S_4 ، یون K_2 در مکان S_2 و یون K_1 در مکان S_0 و در بین هر دو یون پتاسیم یک مولکول آب در مکان‌های S_1 ، S_3 قرار دارد. برای بررسی دینامیک یون‌های پتاسیم، جابه‌جایی هر یون نسبت به یکی از اتم‌های کربن پروتئین، THR-C، ۱۱۲، که در طول شبیه‌سازی حرکتی ندارد یا اصطلاحاً فریز شده‌است، در شکل‌های ۳ و ۴ رسم شده‌است. شکل ۳-الف نتایج شبیه‌سازی معمولی و شکل ۳-ب نتایج شبیه‌سازی در حضور قدرت یونی $M = 0.14$ را نشان می‌دهد. مقایسه‌ی نتایج، نشان می‌دهد که دینامیک یون‌های K^+ با لحاظ کردن قدرت یونی تغییر کرده‌است.



(الف)



(ب)

شکل ۳: رفتار یون‌های پتاسیم بر حسب زمان در شبیه‌سازی معمولی (الف) و شبیه‌سازی با لحاظ کردن قدرت یونی (ب)

همانگونه که در شکل ۳-الف دیده می‌شود، در شبیه‌سازی اول، حدوداً 1100 ps پس از شروع، یون K_1 که در مکان S_0 قرار داشت، آزاد شده، یون K_4 از کاواک به مکان S_4 و یون K_3 از مکان S_4 به مکان S_3 منتقل شده‌است و یون K_2 ابتدا از مکان S_2 به مکان S_1 رفته و پس از گذشت 9000 ps از کانال خارج گردیده‌است. این رفتار نشان می‌دهد که شارش یون صورت گرفته‌است و با نتایج آزمایشگاهی که نرخ شارش یون را 10^7 یون در ثانیه گزارش می‌کنند، تطابق دارد [۲]. در شکل ۳-ب مشاهده می‌شود که وقتی $M = 0.14$ باشد، تنها یون K_1 که در شروع شبیه‌سازی در مکان S_0 قرار داشت، آزاد شده و یون‌های K_2 ، K_3 و K_4 در مکان خود جست‌وجوی کرده، اما قادر نبوده‌اند به مکان بعدی

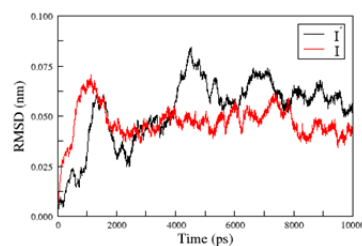
ترتیب ۱ اتمسفر و 300 درجه‌ی کلون می‌باشد و شعاع برهم‌کنش‌های کولنی و واندروالس 1.4 nm در نظر گرفته شده‌است. برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کانال یونی پتاسیم اختلاف پتانسیل الکتریکی دو سر کانال نزدیک به 100 mV در نظر گرفته می‌شود [۸]. در شبیه‌سازی‌های انجام شده، این اختلاف پتانسیل با توجه به طول کانال که 3.4 nm می‌باشد، به صورت یک میدان الکتریکی با بزرگی 29.41 mV/nm در راستای محور کانال (محور Z) اعمال شده‌است. برای مطالعه‌ی اثر قدرت یونی بر دینامیک یون‌های K^+ در کانال یونی KcsA در اولین شبیه‌سازی، روش I ، به صورت معمولی و بدون در نظر گرفتن قدرت یونی، 12 یون Cl^- برای خنثی کردن سیستم اضافه شده‌است. در دومین شبیه‌سازی، روش I ، 40 یون K^+ و 52 یون Cl^- به سیستم افزوده شده تا علاوه بر خنثی‌سازی، قدرت یونی مشابه بدن موجودات زنده را، $I = 0.14$ M، شبیه‌سازی کند. به منظور سنجش میزان پایداری ساختار پروتئین، کمیت RMSD از رابطه‌ی زیر به محاسبه شده‌است:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

که در این رابطه، m_i جرم اتم شماره i و r_i مکان لحظه‌ای این اتم در زمان t می‌باشد و M جرم کل سیستم $(\sum_{i=1}^N m_i)$ است.

نتایج و محاسبات

نمودار RMSD مربوط به شبیه‌سازی اول و دوم در شکل ۲ نشان می‌دهد که ساختار پروتئین در شرایط $I = 0.14$ M (رنگ قرمز) نسبت به شبیه‌سازی اول که قدرت یونی در نظر گرفته نشده‌است (رنگ مشکی) پایدارتر است. بنابراین به نظر می‌رسد که لحاظ کردن قدرت یونی منجر به افزایش صحت و اعتبار نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌شود.



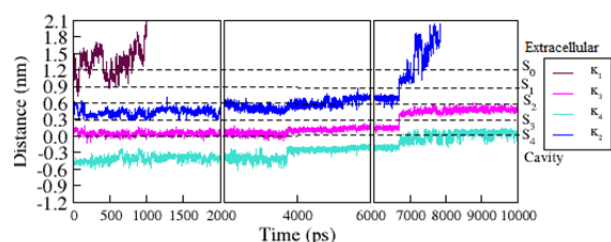
شکل ۲: نمودار RMSD مربوط به شبیه‌سازی معمولی (مشکی) و شبیه‌سازی در حضور قدرت یونی I (قرمز)

نشان می‌دهد که در نظر گرفتن قدرت یونی نزدیک به شرایط فیزیولوژیکی موجود در بدن موجودات زنده به منظور حفظ پایداری ساختار کانال‌های یونی ضروری است. با لحاظ کردن قدرت یونی برهم کنش‌های الکترواستاتیکی تغییر می‌کنند به طوری که شارش یون در طول کانال مختل می‌شود. شبیه سازی‌ها نشان می‌دهند که با اعمال قدرت یونی یک میدان الکتریکی موضعی ایجاد می‌شود که گویا میدان حاصل از اختلاف پتانسیل طبیعی موجود در دو سر کانال را تضعیف کرده و در نتیجه باعث اختلال در شارش می‌شود. با افزایش اختلاف پتانسیل، اختلال ناشی از قدرت یونی جبران شده و شارش یون با موفقیت انجام می‌شود.

مرجع‌ها

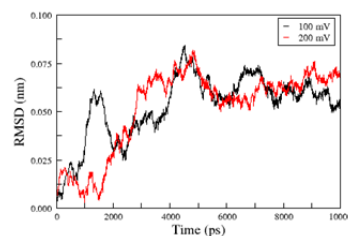
- [۱] R. MacKinnon, "Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction," *Bioscience Reports*, vol. 24, pp. 75-100, 2004.
- [۲] I. H. Shrivastava and M. S. Sansom, "Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer," *Biophysical Journal*, vol. 78, pp. 557-570, 2000.
- [۳] V. Salari, M. Sajadi, H. Bassereh, V. Rezanian, M. Alaei, and J. Tuszynski, "On the classical vibrational coherence of carbonyl groups in the selectivity filter backbone of the KcsA ion channel," *Journal of integrative neuroscience*, vol. 14, pp. 195-206, 2015.
- [۴] D. Frenkel and B. Smit, "Understanding molecular simulations: from algorithms to applications," *Academic, San Diego*, 1996.
- [۵] J. Zuegg and J. Gready, "Molecular dynamics simulations of human prion protein: importance of correct treatment of electrostatic interactions," *Biochemistry*, vol. 38, pp. 13862-13876, 1999.
- [۶] G. T. Ibragimova and R. C. Wade, "Importance of explicit salt ions for protein stability in molecular dynamics simulation," *Biophysical journal*, vol. 74, pp. 2906-2911, 1998.
- [۷] C. Domene and M. S. Sansom, "Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution X-ray structure of KcsA," *Biophysical journal*, vol. 85, pp. 2787-2800, 2003.
- [۸] Z. Lu, A. M. Klem, and Y. Ramu, "Ion conduction pore is conserved among potassium channels," *Nature*, vol. 413, pp. 809-813, 2001.
- [۹] R. Friedman, E. Nachliel, and M. Gutman, "Molecular dynamics of a protein surface: ion-residues interactions," *Biophysical journal*, vol. 89, pp. 768-781, 2005.

بروند، در نتیجه شارش یون مختل شده است. از مقایسه‌ی نمودار RMSD مربوط به دو شبیه‌سازی می‌توان دید که ساختار کانال یونی KcsA در شرایط $I = 0.14 \text{ M}$ نسبت به شبیه‌سازی اول پایدارتر است، اما در این حالت شارش یون مختل شده است. بررسی رفتار یون‌های Na^+ و Cl^- که برای خنثی کردن به سیستم اضافه شده‌اند، نشان می‌دهد که حرکت این یون‌ها نسبت به شبیه‌سازی اول، منظم‌تر شده و حدود چند صد پیکوثانیه در نزدیکی پروتئین محدود گشته است. از این رفتار چنین برمی‌آید که همانگونه که در مرجع [۹] اشاره شده است، یک میدان الکتریکی موضعی ایجاد شده است که با میدان حاصل از اختلاف پتانسیل طبیعی موجود در دو سر کانال در تقابل است و باعث اختلال در شارش یون در طول کانال شده است. برای جبران این اختلال، اختلاف پتانسیل الکتریکی را ابتدا از 100 mV به 150 mV افزایش دادیم که باز هم شارش انجام نشد. سپس اختلاف پتانسیل الکتریکی 200 mV را اعمال کردیم که این بار شارش پس از گذشت حدوداً 7300 ps مطابق شکل ۴ انجام شد.



شکل ۴: رفتار یون‌های پتاسیم در اختلاف پتانسیل 200 mV و قدرت یونی 0.14 M

در شکل ۵ نمودار RMSD مربوط به اختلاف پتانسیل الکتریکی 100 mV (رنگ مشکی) و 200 mV (رنگ قرمز) داده شده است.



شکل ۵: نمودار RMSD مربوط به اختلاف پتانسیل 100 mV (مشکی) و 200 mV (قرمز)

نتیجه گیری

نمودارهای RMSD به دست آمده از شبیه‌سازی‌های انجام شده،