

Modeling and Bioinformatics Investigations of Human Voltage-Gated Sodium Ion Channels

Ali Jahanbazi Jahan Abad¹, Rahman Yolmeh¹, Fereshteh Parto², Abdorrahim Absalan^{1*}

¹Shefa Neuroscience Research Center, KhatamAlania Hospital, Tehran, Iran.

²Food and Drug Laboratory, Food and Drug Administration, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Article Info:

Received: 19 Feb 2014

Accepted: 5 Apr 2014

ABSTRACT

Introduction: Tertiary (3D) structure determination using X-ray diffraction crystallography is a time consuming method, needs special facilities and expert operators. 3D structure determination by bioinformatics software is worth in experimental research, especially for drug discovery purposes and evolutionary relationships. Using computational biology software and databases, we have determined probable 3D structure of human voltage-gated sodium ion channels (VGSCs) and their developmental associations. **Materials and Methods:** Amino acid sequences of VGSCs were obtained from Uniprot and used to predict their 3D structure using SWISS-MODEL server and by its definitive algorithm for protein basic local alignment search tool (BLAST)-(followed by visualization using Molegro Virtual Viewer software). Phylogenic tree was plotted using Mega 5 application for VGSCs sequences. VGSCs interactions were determined by String-db server.

Results: According to the Neuron data-base, there are 9 types of human VGSCs named SCN1A-5A and SCN8A-11A. SWISS-MODEL software was just only able to predict some domains of VGSCs with high identity percentages. The identity percentages were variable for each VGSC and varied from 16.57% (SCN4A) to 100% (SCN2A, SCN5A). Blast results and drawing phylogenetic trees practice showed that animals, such as chimpanzee, gibbon, and gorilla have the most similar protein sequences. **Conclusion:** In most cases, modeling using SWISS-MODEL is not enough decisive for prediction of protein 3D structure. Thus, we propose that researchers use mentioned animals for experiments of VGSCs, characterized structures for bioinformatics and drug designing surveys. In this case, the results of animal trials could be generalized to human more precisely.

Key words:

1. Protein Structure Tertiary
2. Computational Biology
3. Sodium Channels
4. Phylogeny

*Corresponding Author: Abdorrahim Absalan

E-mail: a.r.absalan@gmail.com

مدل سازی و مطالعه بیوانفورماتیکی کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی

علی جهانبازی جهان آباد^۱، رحمان یلمه^۱، فرشته پرتو^۲، عبدالرحیم آب سالان^{۳*}^۱مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
^۲آزمایشگاه غذا و دارو، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۶ فروردین ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۳۰ بهمن ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: تعیین ساختار سوم پروتئین ها با استفاده از روش کریستالوگرافی اشعه X، روشی زمان بر بوده که نیازمند تسهیلات خاص و اپراتورهای متخصص می باشد. تعیین ساختار سوم با استفاده از روش های بیوانفورماتیک برای مطالعات آزمایشگاهی و به ویژه اکتشاف داروها و ارتباطات تکاملی ارزشمند است. در مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی و پایگاه های اطلاع رسانی، ساختارهای سوم انواع کانال های سدیمی انسان تعیین و ارتباطات تکاملی آن ها بررسی شد. **مواد و روش ها:** توالی های آمینو اسیدی کانال های سدیمی از Uniprot به دست آمد و از SWISS-MODEL جهت پیشگویی ساختار سوم استفاده شد. ساختار سوم این کانال ها با استفاده از نرم افزار SWISS-MODEL با استفاده از الگوریتم تعریف شده برای Protein BLAST، پیشگویی شدند. ساختارهای پیشگویی شده با استفاده از نرم افزار Molegro Virtual Viewer تصویربرداری شد. برای تعیین ارتباطات تکاملی انواع کانال های سدیمی از نرم افزار Mega 5 جهت رسم درخت فیلوژنی براساس توالی کانال ها، استفاده شد. شناسایی ارتباطات متقابل کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ از طریق نرم افزار String db صورت گرفت. **یافته ها:** بر اساس اطلاعات پایگاه داده های نورون، ۹ نوع کانال یونی سدیم در انسان وجود دارد که به صورت SCN1A-5A و SCN8A-11A نام گذاری می شوند. نرم افزار SWISS-MODEL تنها قادر به پیشگویی برخی دُمین های کانال های سدیمی با درصد شناسایی بالا می باشد. درصد یکسانی توالی ها برای هر کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ متفاوت و از ۱۶/۵۷ درصد (SCN4A) تا ۱۰۰ درصد (برای SCN5A و SCN2A) متغیر بود. نتایج حاصل از انجام هم ترازی توالی ها (BLAST) و ترسیم درخت فیلوژنیک، حاکی از آن است که پروتئین کانال سدیمی حیواناتی نظیر شامپانزه، میمون و گوریل نسبت به سایر جانوران، دارای درصد تشابه توالی بیشتری با انسان هستند. **نتیجه گیری:** در اغلب موارد SWISS-MODEL برای پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین های کانال سدیمی مناسب نمی باشد. بنابراین پیشنهاد می شود که در مدل های آزمایشگاهی مطالعات کانال های سدیمی و طراحی یا ارزیابی داروها بهتر است از حیوانات فوق الذکر استفاده شود. در این صورت نتایج حاصل از کارآزمایی های حیوانی قابلیت تعمیم بیشتری به انسان خواهند داشت.

کلید واژه ها:

۱. ساختار سه بعدی پروتئین
۲. زیست شناسی محاسباتی
۳. کانال های سدیمی
۴. فیلوژنی

* نویسنده مسئول: عبدالرحیم آب سالان

آدرس الکترونیکی: a.r.absalan@gmail.com

مقدمه

از اطلاعاتی مانند String-db برای تعیین ارتباطات متقابل انواع کانال‌های سدیمی و هم‌بیانی آن‌ها استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

از آنجا که پروتئین‌های کانال سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی یا به کلی فاقد ساختار تعیین شده‌ای در بانک اطلاعات پروتئین بودند، یا فقط بخشی از ساختارشان شناسایی شده بود، از راه‌کار شبیه‌سازی ساختار سه بعدی پروتئین به منظور پیشگویی ساختارهای سه بعدی استفاده شد. انواع پروتئین‌های کانال سدیمی براساس اطلاعات بانک اطلاعاتی نورون به آدرس <http://senselab.med.yale.edu/neurondb> مشخص گردید و توالی آمینو اسیدی این پروتئین‌ها از پایگاه اطلاعاتی Uniprot <http://www.uniprot.org> به دست آمدند.

برای مدل‌سازی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها، با توجه به این‌که الگوریتم‌های مدل‌سازی کنونی کار مدل‌سازی را مبتنی بر هم‌ترازی یک توالی آمینو اسیدی با توالی‌هایی که ساختارشان شناسایی شده است انجام می‌دهند، از امکانات موجود در پایگاه SWISS-MODEL به آدرس <http://swissmodel.expasy.org> استفاده شد. برای این منظور توالی‌های آمینو اسیدی کانال‌های سدیمی موجود در پایگاه اطلاعاتی Uniprot به نرم‌افزار ارائه گردید، ساختارهای مدل شده با استفاده از هم‌ترازی مدل‌های از پیش تعیین شده به دست آمد و در نرم افزار Molegro Virtual Viewer تصاویر آن‌ها نمایان‌سازی شد.

برای تعیین خویشاوندی ژنتیکی بین پروتئین‌های کانال سدیمی انسان با سایر موجودات از راه‌کار ترسیم دندروگرام فیلوژنیک استفاده شد. برای این منظور توالی آمینو اسیدی هر کدام از پروتئین‌های کانال سدیمی انسان به طور جداگانه در پایگاه اطلاعاتی Uniprot با سایر موجودات BLAST شد که نتایج آن در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

سپس توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های موجوداتی که بیشترین امتیاز همسانی توالی را با انسان داشتند برای ترسیم دندروگرام در نرم‌افزار Mega 5 مورد استفاده قرار گرفتند. به علاوه برای تعیین واکنش متقابل این گیرنده‌ها از امکانات موجود در پایگاه اطلاعاتی String-db ver 9.05 استفاده گردید. این پایگاه اطلاعاتی، وجود یا عدم وجود هم‌بیانی ژن‌ها و حدود تقریبی فراوانی پروتئین در سلول‌های انسان را نیز نشان می‌دهد.

در این پژوهش از امکانات آنالیز ارتباط متقابل بین چند نام^۱ پروتئین‌های کانال یونی سدیم استفاده شد و آنالیز برای ارگانسیم انسان^۲ تعریف گردید. یکی دیگر از امکانات موجود در پایگاه String-db بررسی وجود یا عدم وجود هم‌بیانی ژن‌های مختلف است. از این امکان موجود در پایگاه برای بررسی هم-بیانی ژن‌های کانال سدیمی در انسان بهره گرفته شد.

دردهای نوروپاتیک، ناشی از آسیب به اعصاب محیطی هستند که اغلب به صورت دردهای مزمن خود را نشان می‌دهند (۱). امروزه از مدل‌های حیوانی به طور فراوان برای بررسی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در ایجاد دردهای نوروپاتیک استفاده می‌گردد (۲، ۳).

کانال‌های سدیمی نقش ویژه‌ای در کنترل سیستم عصبی دارند به طوری که تغییر در توزیع و بیان کانال‌های یونی سدیم در ایجاد دردهای مزمن نقش دارند و اهدافی برای مهار فرایند درد هستند (۴). این کانال‌ها مسئول ایجاد پتانسیل عمل در بیشتر سلول‌های عصبی پستانداران هستند که در پاسخ به دپلاریزاسیون غشاء، به طور موقت باز می‌شوند تا یون‌های سدیم به درون سلول وارد شوند. این کانال‌ها، کمپلکس پروتئینی متشکل از یک زیر واحد آلفا و یک زیر واحد بتا هستند (۵، ۶). انواع کانال‌های سدیمی دارای دمین‌های مشترک و شباهت‌های قابل توجهی می‌باشند و رفتار آن‌ها بسته به ایزوفرم‌شان متغیر است. در بیشتر موارد نورون‌ها چندین ایزوفرم از کانال‌های سدیمی را بیان می‌کنند. لذا عملکرد منحصر به فرد هر نورون می‌تواند ناشی از اختلاف در میزان بیان هر یک از ایزوفرم‌های کانال سدیمی نورون باشد (۷).

درحال حاضر برای تعیین ساختار پروتئین‌ها از روش‌های کریستالوگرافی اشعه X و اسپکتروسکوپی NMR^۱ چند بعدی استفاده می‌گردد (۸). لیکن این تکنیک‌ها ضعف‌های خاص خود را دارند، از جمله این‌که تهیه کریستال‌های با کیفیت بسیار بالا کار بسیار دشواری است و احتمال دارد پروتئین، فرم دینامیک محلول خود را از دست بدهد. در روش NMR نیز تفسیر منحنی‌ها برای پروتئین‌های بزرگ بسیار دشوار و زمان‌بر است لذا بیشتر برای پروتئین‌های کوچک مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتیجه این‌که تعیین ساختار کامل بسیاری از پروتئین‌ها هنوز عملی نشده است (۹).

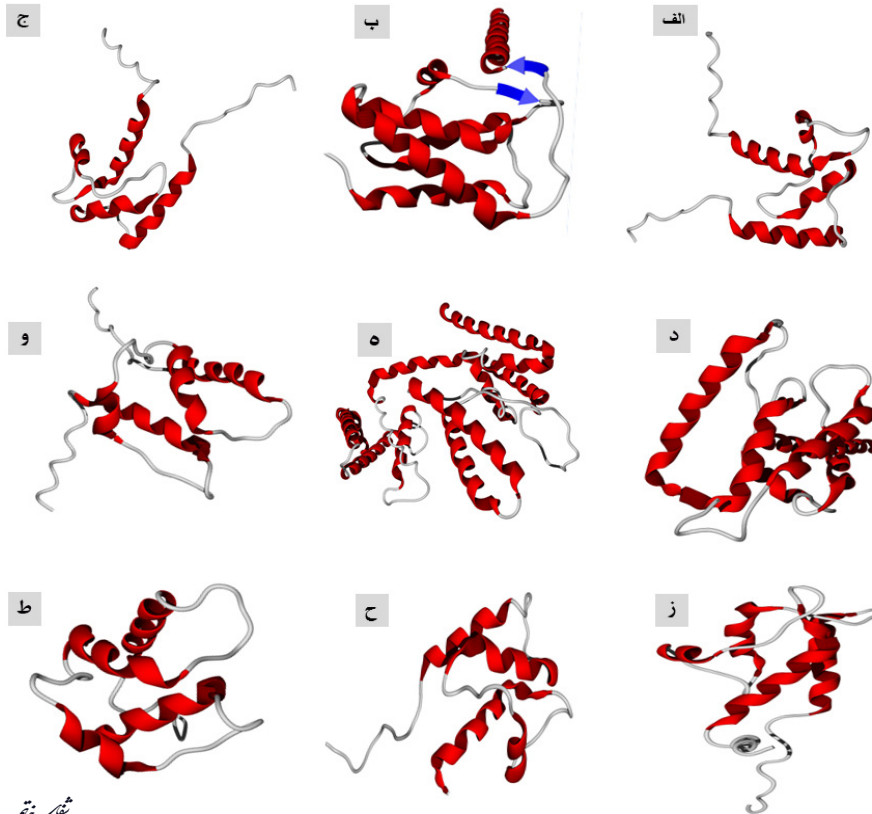
راه‌کاری که امروزه به یاری پژوهشگران آمده است، بهره‌گیری از روش‌های تئوریکال و محاسباتی است. مدل‌سازی ساختار پروتئین‌ها نیازمند کامپیوترهای بسیار حرفه‌ای می‌باشد. در این خصوص می‌توان به یکی از پرکاربردترین نرم‌افزارهای مورد استفاده برای مدل‌سازی، یعنی نرم افزار SWISS-MODEL به آدرس <http://swissmodel.expasy.org> اشاره کرد (۱۰).

در این پژوهش ساختار کانال‌های سدیمی مختلف در سلول‌های عصبی با استفاده از نرم‌افزار SWISS-MODEL مدل‌سازی شدند تا قابلیت این نرم‌افزار در پیشگویی ساختار این پروتئین‌ها مشخص گردد. همچنین برای این‌که مشخص شود کدام موجودات تشابه توالی پروتئینی بیشتری با انسان دارند از آزمون هم‌ترازی توالی‌های (BLAST) پروتئین کانال سدیمی موجودات و ترسیم درخت فیلوژنیک استفاده گردید. به علاوه

¹ Nuclear magnetic resonance spectroscopy

² Multiple Name

³ Human



تصویر ۱- ساختارهای مدل سازی شده کانال‌های سدیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ انسانی با استفاده از نرم‌افزار SWISS MODEL: در هر مورد تنها ساختاری که بیشترین تشابه توالی (هومولوژی) را با پروتئینی دارد و به عنوان الگو از روی آن ساختارش پیشگویی شده، نشان داده شده است. الف) ساختار سه بعدی SCN1A ب) ساختار سه بعدی SCN2A ج) ساختار سه بعدی SCN3A د) ساختار سه بعدی SCN4A ه) ساختار سه بعدی SCN5A و) ساختار سه بعدی SCN8A ز) ساختار سه بعدی SCN9A ح) ساختار سه بعدی SCN10A ط) ساختار سه بعدی SCN11A.

تفاوت

یافته‌ها

ارزیابی قابلیت و میزان موفقیت پیشگویی ساختارهای سه بعدی کانال‌های سدیمی

همسانی ۹۰/۵۷٪ (ب) ساختار سه بعدی SCN2A شامل آمینو اسید ۱۷۸۸ تا ۱۹۲۹ با درصد همسانی ۱۰۰٪ (ج) ساختار سه بعدی SCN3A شامل آمینو اسید ۱۷۷۲ تا ۱۸۷۷ با درصد تشابه ۹۷/۱۷٪ (د) ساختار سه بعدی SCN4A شامل آمینو اسید ۱۶۰۲ تا ۱۷۵۴ با درصد تشابه ۷۷/۷۸٪ (ه) ساختار سه بعدی SCN5A شامل آمینو اسید ۱۷۷۶ تا ۱۹۲۸ با درصد تشابه ۱۰۰٪ (و) ساختار سه بعدی SCN8A شامل آمینو اسید ۱۷۶۷ تا ۱۸۷۲ با درصد تشابه ۸۳/۰۲٪ (ز) ساختار سه بعدی SCN9A شامل آمینو اسید ۱۷۶۱ تا ۱۸۶۶ با درصد تشابه ۹۵/۲۵٪ (ح) ساختار سه بعدی SCN10A شامل آمینو اسید ۱۷۲۳ تا ۱۸۱۵ با درصد تشابه ۸۱/۷۲٪ (ط) ساختار سه بعدی SCN11A شامل آمینو اسید ۱۶۰۵ تا ۱۶۹۷ با درصد تشابه ۷۷/۴۲٪ می‌باشند.

هم‌ترازی توالی‌های پروتئین کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی با سایر موجودات

نتایج مربوط به BLAST توالی پروتئینی انواع مختلف این کانال‌ها در انسان در مقایسه با جانورانی نظیر شامپانزه، میمون، گوریل، خرگوش، موش و موش صحرائی در جدول ۱ نشان داده شده است. در این جدول تنها بالاترین امتیازهای آزمون BLAST نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل در برخی موارد حاکی از وجود تفاوت‌های قابل ملاحظه بین همسانی توالی انواع مختلف این کانال‌های یونی در انسان نسبت به موجودات ذکر شده به‌خصوص موش صحرائی می‌باشد.

انواع کانال‌های سدیمی حساس به ولتاژ طبق پایگاه اطلاعاتی نورون شامل ۹ نوع مختلف می‌باشند که عبارتند از: SCN1A الی SCN11A. نتایج حاصل از انجام آزمون BLAST نشان داد که درصد همسانی توالی ساختارهای سوم پیشگویی شده توسط نرم‌افزار SWISS-MODEL برای هر کدام از این کانال‌ها متغیر بوده و به این شرح می‌باشند:

SCN1A (/۱۸/۵-۹۰/۵۷), SCN2A (/۱۸/۵-۱۰۰), SCN3A (/۱۸/۵-۹۷/۱۷), SCN4A (/۱۶/۵۷-۷۷/۷۸), SCN5A (/۱۸/۰۳-۱۰۰), SCN8A (/۱۸/۸۷-۸۳/۰۲), SCN9A (/۲۰/۰۷-۹۵/۲۵), SCN10A (/۱۹/۸-۸۱/۷۲), SCN11A (/۲۱/۰۵-۷۷/۴۲).

ساختارهای مدل‌سازی شده در تصویر ۱ نشان می‌دهند که این ساختارها عمدتاً دارای ساختار دوم آلفا هلیکس هستند و از این رو از دسته پروتئین‌های تمام آلفا محسوب می‌شوند. در این شکل ساختارهای نشان داده شده مربوط به (الف) ساختار سه بعدی SCN1A شامل آمینو اسید ۱۷۸۷ تا ۱۸۹۲ با درصد

جدول ۱- مقایسه همسانی توالی آمینو اسیدی انواع کانال‌های دریچه‌دار سدیمی سلول‌های عصبی انسان با سایر جانوران.

نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN1A	انسان	۲۰۰۹	٪۱۰۰
H2QIX2	شامپانزه	۲۰۰۹	٪۹۹
G7PKQ4	میمون	۲۰۰۸	٪۹۹
G1SSPB	خرگوش	۲۰۰۹	٪۹۹
A2APX8	موش	۲۰۰۹	٪۹۸
SCN1A	موش صحرایی	۲۰۰۹	٪۹۸
G3QRR8	گوبیل لولاند	۱۹۵۷	٪۹۷
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN3A	انسان	۲۰۰۰	٪۱۰۰
H2RAZ9	شامپانزه	۲۰۰۰	٪۹۹
G1T4K1	خرگوش	۲۰۰۶	٪۹۷
A2ASIS	موش	۱۹۴۷	٪۹۵
SCN3A	موش صحرایی	۱۹۵۱	٪۹۵
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN5A	انسان	۲۰۱۶	٪۱۰۰
H2QMB5	شامپانزه	۲۰۱۶	٪۹۹
G3RB05	گوبیل لولاند	۲۰۲۰	٪۹۹
G7NYK0	میمون	۲۰۱۷	٪۹۸
A6N7T7	موش صحرایی	۲۰۱۶	٪۹۶
K3W4N7	موش	۲۰۲۰	٪۹۵
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN9A	انسان	۱۹۸۸	٪۱۰۰
H2QIX3	شامپانزه	۱۹۷۷	٪۹۹
F7A8X1	میمون	۱۹۸۹	٪۹۸
SCN9A	خرگوش	۱۹۸۴	٪۹۴
SCN9A	موش صحرایی	۱۹۸۴	٪۹۳
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCNBA	انسان	۱۷۹۱	٪۱۰۰
H2QMB6	شامپانزه	۱۷۹۱	٪۹۹
G3QUM3	گوبیل لولاند	۱۷۹۱	٪۹۹
G1SFB0	خرگوش	۱۷۷۵	٪۹۷
SCNBA	موش صحرایی	۱۷۶۵	٪۹۳

نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN2A	انسان	۲۰۰۵	٪۱۰۰
H2R6F6	شامپانزه	۲۰۰۵	٪۹۹
G1U7U1	خرگوش	۲۰۰۶	٪۹۹
G3SIS7	گوبیل لولاند	۲۰۱۴	٪۹۹
B1AWN6	موش	۲۰۰۶	٪۹۸
SCN2A	موش صحرایی	۲۰۰۵	٪۹۷
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN4A	انسان	۱۸۴۶	٪۱۰۰
G3SA24	میمون	۱۸۳۸	٪۹۹
G3R9Y5	گوبیل لولاند	۱۸۳۶	٪۹۹
G1SLL9	خرگوش	۱۸۳۶	٪۹۲
SCN4A	موش	۱۸۴۱	٪۹۲
SCN4A	موش صحرایی	۱۸۴۰	٪۹۲
H2QDN9	شامپانزه	۱۶۶۰	٪۸۹
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCN8A	انسان	۱۹۸۰	٪۱۰۰
G7PIB6	میمون	۱۹۷۶	٪۹۹
G3R1C4	گوبیل لولاند	۱۹۸۰	٪۹۹
F7D6H8	موش	۱۹۷۸	٪۹۹
SCN8A	موش صحرایی	۱۹۷۸	٪۹۹
G1TJH9	خرگوش	۱۹۹۱	٪۹۸
نام پروتئین کانالی	موجود	طول توالی	درصد همسانی توالی
SCNAA	انسان	۱۹۵۶	٪۱۰۰
H2R1N2	شامپانزه	۱۹۵۶	٪۹۹
G7NYJ9	میمون	۱۹۵۶	٪۹۸
G3QUB0	گوبیل	۱۹۵۷	٪۹۹
SCNAA	موش	۱۹۵۸	٪۸۲
SCNAA	موش صحرایی	۱۹۵۶	٪۸۳

دسته‌بندی و ارزیابی فیلوژنیک کانال سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی

بر اساس نتایج آنالیز دندروگرام فیلوژنیک (تصویر ۲)، به طور کلی می‌توان کانال سدیمی وابسته به ولتاژ را به دو دسته طبقه‌بندی نمود. یک دسته شامل انواع ۱، ۳ و ۹ که از نظر تکاملی به هم نزدیک‌تر می‌باشند؛ همچنین کانال سدیمی نوع ۸ و ۱۰ تنها حدود ۲۶ درصد با سه کانال سدیمی فوق‌الذکر و با یکدیگر خویشاوندی دارند. دسته دوم شامل کانال‌های سدیمی نوع ۴ و ۵ با خویشاوندی بسیار بالا بوده

استفاده شده و عملکرد این نرم‌افزار نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. این نرم‌افزار در مطالعات ساختارشناسی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته و بسیاری از محققین در پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها از آن بهره می‌گیرند (۱۴-۱۱).

هرچند نرم‌افزارهای متعددی برای پیشگویی ساختار پروتئین‌ها موجود است لیکن سادگی کار با این نرم‌افزار، بهبود و ارتقاء آن، عدم نیاز به ابرکامپیوترها به دلیل آنلاین بودن نرم‌افزار و بانک اطلاعاتی غنی این نرم‌افزار (۱۵) آن را کاندید مناسبی برای این قبیل مطالعات نموده است. برای مثال Wendt و همکاران از این نرم‌افزار برای پیشگویی ساختار زیرواحد کربوکسیل ترانسفراز که نوعی پمپ سدیمی در باکتری می‌باشد (۱۶) و یا Hazama و همکاران برای پیشگویی ساختار پروتئین ناقل آب AQP6 از آن بهره برده‌اند (۱۷). Rajesh و همکاران نیز با مدل‌سازی کانال سدیمی وابسته به ولتاژ در نوعی مگس، تأثیر جهش ژنی و تغییر در توالی این پروتئین را عاملی برای مقاومت به سم دفع آفت نباتی دی کلرو دی فنیل تری کلرواتان (DDT) بر می‌شمارند. آن‌ها برای مدل‌سازی ساختار پروتئین مورد نظرشان از نرم‌افزار SWISS-MODEL بهره برده‌اند (۱۸).

تفاوت مطالعه ما با این مطالعه در این است که این محققین تنها یک نوع پروتئین کانال سدیمی وابسته به ولتاژ را مدل‌سازی کرده‌اند که این پروتئین از نوع غیرانسانی می‌باشد، درحالی‌که در مطالعه ما همه انواع شناخته شده و آن هم از نوع انسانی، مدل‌سازی گردیده‌اند. اهمیت مدل‌سازی و پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین‌های موجودات مختلف در فضای مجازی به دلیل جنبه‌های کاربردی آن می‌باشد. در حقیقت مدل‌سازی ساختارهای سه بعدی پروتئین‌ها حداقل در تفسیر و درک نتایج حاصل از یافته‌های بالینی مانند ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی، واکنش متقابل ترکیبات شیمیایی با ساختارهای پروتئینی، تفسیر مولکولی مطالعات مداخله‌ای (۱۹)، طراحی یا غربالگری داروها (۲۰) و طراحی مطالعات و تصمیم‌گیری برای مطالعات آینده کاربرد دارد.

با توجه به این‌که عملکرد نرم‌افزار SWISS-MODEL از طریق هم‌تراز کردن توالی پروتئین مورد نظر با پروتئین‌های مشابه تعیین ساختار شده می‌باشد لذا نتایج مطالعه ما نشان می‌دهند که این نرم‌افزار قادر به تعیین ساختار کامل هیچ یک از انواع این کانال‌های سدیمی نمی‌باشد و تنها توالی‌های کوچکی از انواع این کانال‌های سدیمی را پیشگویی می‌کند. انتظار می‌رود طی سال‌های آینده با بهبود الگوریتم‌های برنامه‌نویسی نرم‌افزارهای کامپیوتری به مرور این نقص نرم‌افزار تا اندازه‌های برطرف گردد.

عموماً در مطالعاتی که استفاده از انسان محدودیت دارد از مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی بهره می‌برند. استفاده از حیوانات به عنوان مدل‌های مطالعاتی برای بیماری‌های انسان یا انجام فازهای مطالعاتی طراحی یک دارو مرسوم است. موش و موش صحرائی به عنوان معمول‌ترین مدل‌های حیوانی برای انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱)، لیکن هم‌ترازی توالی

لیکن کانال نوع ۲ حدود ۶۰ درصد با این دو کانال و کانال نوع ۱۱ حدود ۴۶ درصد با کانال‌های نوع ۲، ۴ و ۵ خویشاوندی دارد.

ارزیابی تعاملات و میزان بیان پروتئین‌های کانال سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی

براساس داده‌های پایگاه اطلاعاتی String-db، امکان واکنش متقابل بین کانال‌های یونی SCN2A با SCN3A، SCN8A با SCN5A و SCN3A و همچنین SCN5A با SCN3A وجود دارد. همچنین از بین انواع کانال‌های سدیمی، SCN10A بیش از سایر انواع و SCN4A کمتر از سایر انواع در سلول‌های انسانی سنتز می‌شود (تصویر ۳).

ارزیابی هم‌بیانی کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ

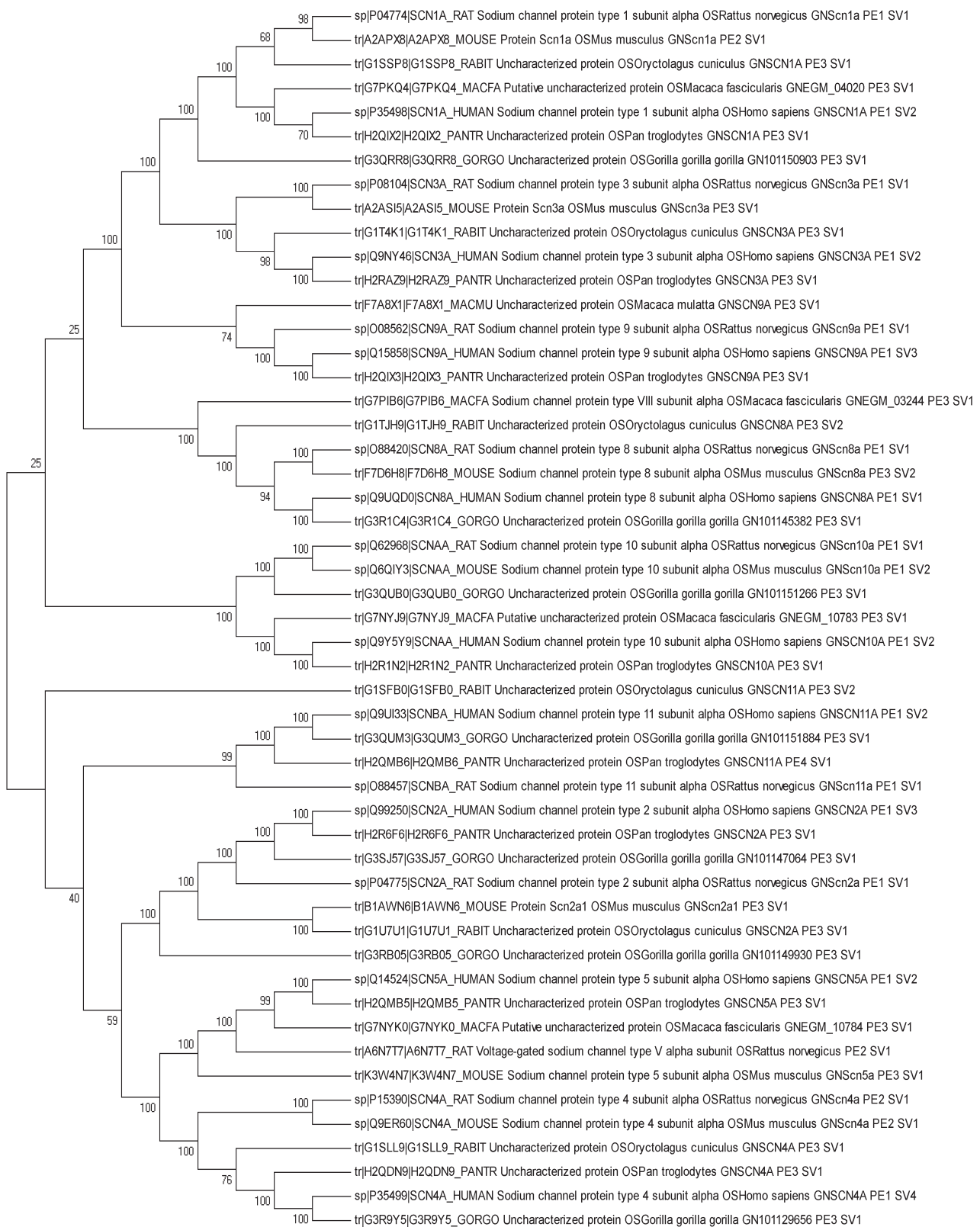
ارزیابی هم‌بیانی کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ در پایگاه اطلاعاتی String-db، نشان داد که تنها بین SCN2A با SCN3A در انسان (نمودار سمت چپ تصویر ۴) و بین SCN2A با SCN8A و SCN1A و همچنین بین SCN8A با SCN1A در برخی موجودات دیگر هم‌بیانی وجود دارد (نمودار سمت راست تصویر ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهشگران نشان داده‌اند که کانال‌های سدیمی نقش ویژه‌ای در کنترل سیستم عصبی دارند و تغییر در بیان و توزیع آن‌ها می‌تواند منجر به ایجاد دردهای نورویاتیک شود (۴). داشتن اطلاعات پایه در خصوص این کانال‌های یونی می‌تواند برای مقاصد مطالعاتی و درمانی راه‌گشای پژوهشگران باشد. به طور کلی نتایج بررسی بیوانفورماتیک کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی به ما نشان داد که این پروتئین‌ها عمدتاً از نوع پروتئین‌های تمام آلفا هستند. نرم‌افزار SWISS-MODEL قدرت چندانی برای پیشگویی ساختارهای سه بعدی پروتئین براساس توالی آن‌ها ندارد. بیشترین میزان تشابه توالی‌های آمینو اسیدی کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ بین انسان و حیواناتی مانند گوریل، شامپانزه و میمون وجود دارد و در موارد کمتری تشابه بین توالی‌های آمینو اسیدی پروتئین‌های انسانی با موش و موش صحرائی وجود دارد. از نظر تکاملی انواع کانال‌های سدیمی با یکدیگر شباهت یا تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای دارند که طی مطالعات داروشناسی و تداخلات تأثیر داروها این تشابه‌ها و تفاوت‌ها را باید در نظر گرفت. ساخت برخی از این کانال‌های یونی می‌تواند به طور همزمان در سلول اتفاق بیافتد.

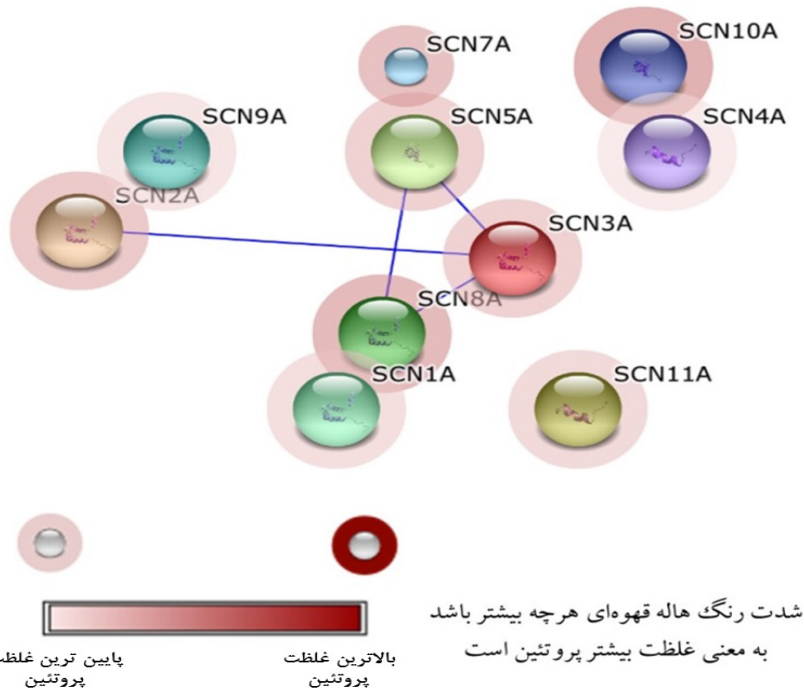
امروزه مدل‌سازی ساختار پروتئین‌ها یکی از رایج‌ترین روش‌های مورد استفاده برای پیشگویی ساختار پروتئین‌هایی است که تاکنون تعیین ساختار نشده‌اند (۱۰).

با توجه به این‌که ساختار کامل هیچ یک از ۹ نوع کانال سدیمی موجود در سلول‌های عصبی مورد شناسایی قرار نگرفته است لذا در این تحقیق از نرم‌افزار آنلاین SWISS-MODEL در پیشگویی ساختار هر یک از این کانال‌ها



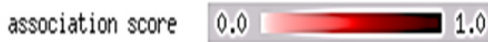
شکل ۲

تصویر ۲- ترسیم دندروگرام فیلوژنتیک برای تعیین خویشاوندی ژنتیکی بین پروتئین‌های کانال سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی با سایر موجودات. برای این منظور توالی آمینو اسیدی هر پروتئین به طور جداگانه در پایگاه اطلاعاتی Uniprot با سایر موجودات BLAST شد که نتایج آن در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. سپس توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های موجوداتی که بیشترین امتیاز همسانی توالی را با انسان داشتند برای ترسیم دندروگرام در نرم‌افزار Mega 5 مورد استفاده قرار گرفتند. هر چه فاصله نقاط شاخه بین دو پروتئین مورد نظر کمتر باشند، آن نقاط از نظر تکاملی ارتباط نزدیک‌تری با یکدیگر دارند.

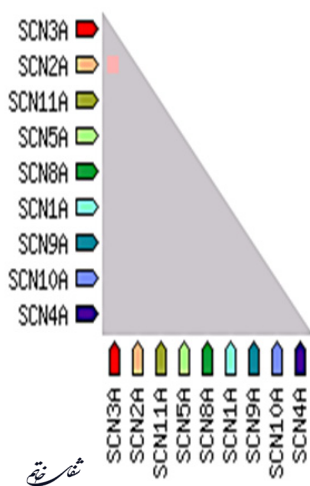


تصویر ۲- تعیین اثر متقابل انواع کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ و غلظت آن‌ها در سلول‌های انسانی براساس اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی String-db. خطوط آبی نشان‌دهنده وجود ارتباط عملکردی بین کانال‌های یونی است و هاله قهوه‌ای رنگ نشان‌دهنده مقدار تقریبی هر پروتئین، درون سلول‌های انسانی می‌باشد.

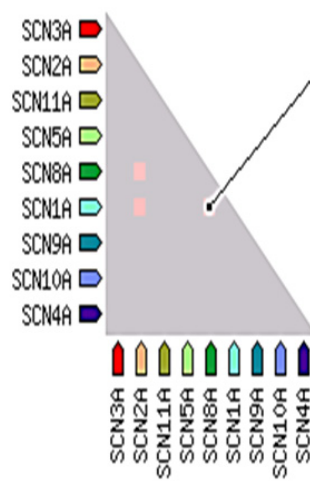
- Coexpression -



... from Coexpression in Homo sapiens:



... from Coexpression in other species (transferred):



شفاخته

تصویر ۴- ارزیابی هم‌بیانی کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی و برخی موجودات دیگر. براساس آنالیز هم‌بیانی ژن‌ها در پایگاه اطلاعاتی String-db، تنها بین SCN3A با SCN2A در انسان (نمودار سمت چپ)، و بین SCN2A با SCN1A و SCN8A و همچنین بین SCN8A با SCN1A در موجودات نشان داده شده در حاشیه نمودار سمت راست هم‌بیانی وجود دارد (نمودار سمت راست).

امروزه بیشتر مطالعات در این زمینه روی موش صحرایی انجام می‌گیرد (۳، ۲).

براساس نتایج به دست آمده از پایگاه اطلاعاتی String-db، امکان تعاملات اتصالی بین انواع کانال‌های سدیمی وجود دارد. این موضوع ممکن است نقشی در انتقال پیام‌های عصبی داشته باشد. برخی انواع کانال‌های سدیمی ممکن است دارای بیان هم‌زمان (هم‌بیانی) باشند، لذا توزیع انواع آن‌ها درون سلول‌های عصبی می‌تواند رفتار فیزیولوژیک یک سلول عصبی را تحت تأثیر قرار دهد. مقدار بیان ژن انواع کانال‌های سدیمی نیز متغیر است و لذا نقش و اهمیت این کانال‌ها تحت تأثیر میزان بیان ژن کانال‌ها قرار می‌گیرد.

پیشنهاد می‌شود پژوهشگران علاقه‌مند در صورت امکان از موجوداتی که خویشاوندی ژنتیکی بیشتری با انسان دارند در مطالعات کارآزمایی حیوانی (Animal Trial) استفاده کنند. هرچند این کار بسیار دشوار است لیکن انتظار می‌رود استفاده از حیواناتی که از نظر فیلوژنیک خویشاوندی کمتری با انسان دارند می‌تواند نتایج غیرقابل تعمیم به انسان را به دنبال داشته باشد.

نشان داد که در مورد برخی کانال‌های سدیمی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین انواع آن وجود دارد.

نتایج هم‌ترازی توالی‌های موجودات مختلف در مطالعه ما نشان داد که توالی برخی انواع کانال‌های سدیمی با برخی دیگر از انواع کانال سدیمی تشابه قابل ملاحظه و با مابقی تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارند. توالی آمینو اسیدی کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی در اغلب موارد تشابه توالی بیشتری با موجوداتی مانند شامپانزه، میمون و گوریل نسبت به موجوداتی مانند موش صحرایی، موش و خرگوش دارند. به طور مثال نتایج مطالعه ما در مورد SCN11A نشان داد که این کانال یونی در شامپانزه دارای درصد تشابه ۹۹٪ با انسان می‌باشد در حالی که موش صحرایی دارای درصد تشابه ۷۳٪ می‌باشد. در مورد اغلب کانال‌های سدیمی تفاوت بین انسان با شامپانزه، میمون، گوریل، خرگوش، موش صحرایی و موش شاید به وضوح کانال نوع SCN11A نباشد لیکن باز در بیشتر موارد این تفاوت دیده می‌شود. با این وجود نباید فراموش کرد که کار با حیوانات بزرگتر در آزمایشگاه تحقیقاتی بسیار دشوارتر و پرهزینه‌تر از کار با موش و موش صحرایی است و اغلب محققین ترجیح می‌دهند با این قبیل حیوانات کار کنند.

منابع

- Arner S, Meyerson B. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain*. 1988; 33(1): 11-23.
- Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33(1): 87-107.
- Seltzer Ze, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990; 43(2): 205-18.
- Dickenson AH, Matthews EA, Suzuki R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur J Pain*. 2002; 6(SA): 51-60.
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano P, et al. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ subunits. *Mol Cell Neurosci*. 2001; 18(5): 570-80.
- Chen C, Bharucha V, Chen Y, Westenbroek RE, Brown A, Malhotra JD, et al. Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel $\beta 2$ -subunits. *PNAS*. 2002; 99(26): 17072-7.
- Frank HY, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*. 2005; 57(4): 387-95.
- Brünger AT. X-ray crystallography and NMR reveal complementary views of structure and dynamics. *Nat Struct Biol*. 1997; 4: 862-5.
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1998; 54(5): 905-21.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014; 12(Web Server issue): W252-8.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc*. 2008; 4(1): 1-13.
- Rodriguez R, Chinea G, Lopez N, Pons T, Vriend G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics*. 1998; 14(6): 523-8.

13. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006; 22(2): 195-201.
14. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13): 3381-5.
15. Wallner B, Elofsson A. All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci*. 2005; 14(5): 1315-27.
16. Wendt KS, Schall I, Huber R, Buckel W, Jacob U. Crystal structure of the carboxyltransferase subunit of the bacterial sodium ion pump glutaconyl-coenzyme A decarboxylase. *EMBO J*. 2003; 22(14): 3493-502.
17. Hazama A, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. Ion permeation of AQP6 water channel protein single-channel recordings after Hg²⁺ activation. *J Biol Chem*. 2002; 277(32): 29224-30.
18. Rajesh R, Gunasekaran K, Muthukumaravel S, Balaraman K, Jambulingam P. In Silico analysis of volt age-gated sodium channel in relation to DDT resistance in vector mosquitoes. *In Silico Biol*. 2007; 7(4): 413-21.
19. Parsaeyan N, Mozaffari-Khosravi H, Absalan A, Mozayan MR. Beneficial effects of cocoa on lipid peroxidation and inflammatory markers in type 2 diabetic patients and investigation of probable interactions of cocoa active ingredients with prostaglandin synthase-2 (PTGS-2/COX-2) using virtual analysis. *J Diabetes Metab Disord*. 2014; 13(1): 30.
20. Cavasotto CN, Phatak SS. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today*. 2009; 14(13-14): 676-83.
21. Nilsson MF, Sköld AC, Ericson AC, Annas A, Villar RP, Cebers G, et al. Comparative effects of sodium channel blockers in short term rat whole embryo culture. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 272(2): 306-12.