

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 SCN2A و SCN5A) 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

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 α و یک زیر واحد β 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 نوروها چندین ایزوفرم از کانال‌های سدیمی را بیان می‌کنند. لذا عملکرد منحصر به فرد هر نورو می‌تواند ناشی از اختلاف در میزان بیان هر یک از ایزوفرم‌های کانال سدیمی نورو باشد (۷).

در حال 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 این که 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 این که 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 این که 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

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 نورو 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 این که 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.

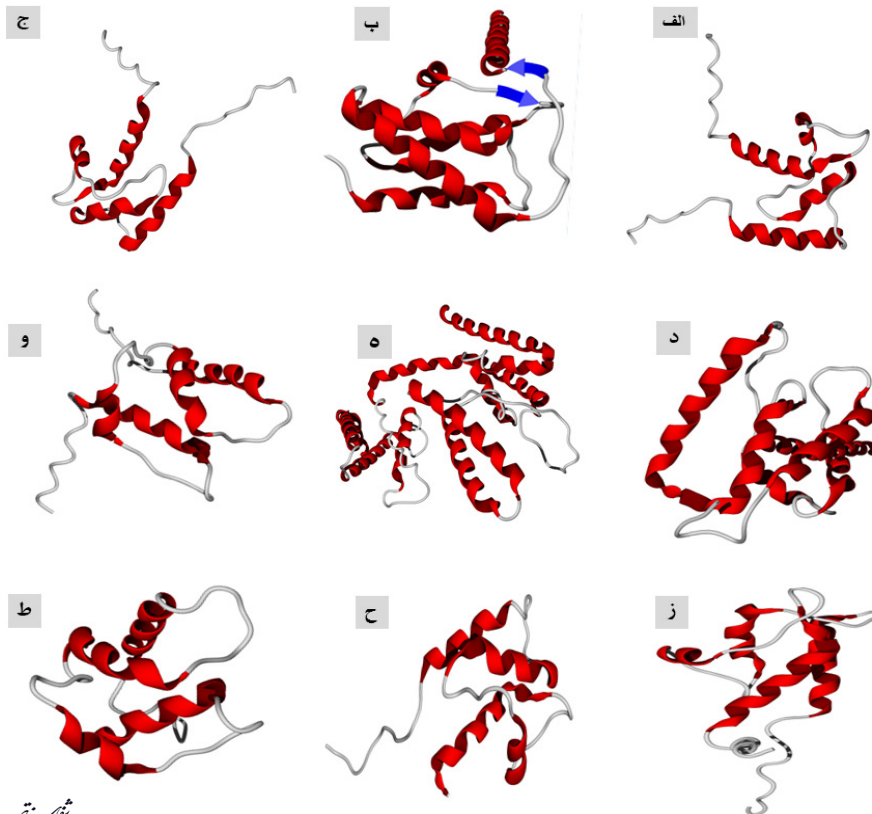
سپس توالی آمینو اسیدی پروتئین‌های موجوداتی که بیشترین امتیاز همسانی توالی را با انسان داشتند برای ترسیم دندروگرام نرم‌افزار Mega 5 مورد استفاده قرار گرفتند. به علاوه برای تعیین واکنش متقابل این گیرنده‌ها از امکانات موجود در پایگاه اطلاعاتی String-db ver 9.05 استفاده گردید. این پایگاه اطلاعاتی، وجود یا 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^۲ پروتئین‌های کانال یونی سدیم استفاده شد و آنالیز برای ارگانسیم انسان^۳ 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.

^۱ Nuclear magnetic resonance spectroscopy

^۲ Multiple Name

^۳ Human



تفاوت

تصویر ۱- ساختارهای مدل سازی شده کانال های سدیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ انسانی با استفاده از نرم افزار SWISS MODEL: در هر مورد تنها ساختاری که بیشترین تشابه توالی (هومولوژی) را با پروتئینی دارد و به عنوان الگو از روی آن ساختار 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 ز) ساختار سه بعدی SCN8A ح) ساختار سه بعدی SCN9A ط) ساختار سه بعدی SCN10A ی) ساختار سه بعدی SCN11A.

یافته ها

ارزیابی قابلیت و میزان موفقیت پیشگویی ساختارهای سه بعدی کانال های 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٪ می باشند.

هم ترازی توالی های پروتئین کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی با سایر موجودات

نتایج مربوط به BLAST توالی پروتئینی انواع مختلف این کانال ها در انسان در مقایسه با جانورانی نظیر شامپانزه، میمون، گوریل، خرگوش، موش و موش صحرایی در جدول ۱ نشان داده شده است. در این جدول تنها بالاترین امتیازهای آزمون BLAST نشان داده شده اند. نتایج حاصل در برخی موارد حاکی از وجود تفاوت های قابل ملاحظه بین همسانی توالی انواع مختلف این کانال های یونی در انسان نسبت به موجودات ذکر شده به خصوص موش صحرایی می باشد.

انواع کانال های سدیمی حساس به ولتاژ طبق پایگاه اطلاعاتی نورون شامل ۹ نوع مختلف می باشند که عبارتند از: SCN1A الی SCN5A و SCN8A الی SCN11A. نتایج حاصل از انجام آزمون BLAST نشان داد که درصد همسانی توالی ساختارهای سوم پیشگویی شده توسط نرم افزار SWISS-MODEL برای هر کدام از این کانال ها متغیر بوده و به این شرح می باشند:

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 مدل سازی شده در تصویر ۱ نشان می دهند که این ساختارها عمدتاً دارای ساختار دوم آلفا هلیکس هستند و از این رو از دسته پروتئین های تمام آلفا محسوب می شوند. 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.

درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۲۰۰۵	انسان	SCN2A
٪۹۹	۲۰۰۵	شامپانزه	H2R6F6
٪۹۹	۲۰۰۶	خرگوش	G1U7U1
٪۹۹	۲۰۱۴	گوبیل لولاند	G3SJ57
٪۹۸	۲۰۰۶	موش	B1AWN6
٪۹۷	۲۰۰۵	موش صحرایی	SCN2A
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۱۸۴۶	انسان	SCN4A
٪۹۹	۱۸۳۸	میمون	G3SA24
٪۹۹	۱۸۳۶	گوبیل لولاند	G3R9Y5
٪۹۲	۱۸۳۶	خرگوش	G1LL9
٪۹۲	۱۸۴۱	موش	SCN4A
٪۹۲	۱۸۴۰	موش صحرایی	SCN4A
٪۸۹	۱۶۶۰	شامپانزه	H2QDN9
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۱۹۸۰	انسان	SCN8A
٪۹۹	۱۹۷۶	میمون	G7PIB6
٪۹۹	۱۹۸۰	گوبیل لولاند	G3R1C4
٪۹۹	۱۹۷۸	موش	F7D6H8
٪۹۹	۱۹۷۸	موش صحرایی	SCN8A
٪۹۸	۱۹۹۱	خرگوش	G1TJH9
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۱۹۵۶	انسان	SCNAA
٪۹۹	۱۹۵۶	شامپانزه	H2R1N2
٪۹۸	۱۹۵۶	میمون	G7NYJ9
٪۹۹	۱۹۵۷	گوبیل	G3QUB0
٪۸۲	۱۹۵۸	موش	SCNAA
٪۸۳	۱۹۵۶	موش صحرایی	SCNAA
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۲۰۰۹	انسان	SCN1A
٪۹۹	۲۰۰۹	شامپانزه	H2QIX2
٪۹۹	۲۰۰۸	میمون	G7PKQ4
٪۹۹	۲۰۰۹	خرگوش	G1SSP8
٪۹۸	۲۰۰۹	موش	A2APX8
٪۹۸	۲۰۰۹	موش صحرایی	SCN1A
٪۹۷	۱۹۵۷	گوبیل لولاند	G3QRR8
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۲۰۰۰	انسان	SCN3A
٪۹۹	۲۰۰۰	شامپانزه	H2RAZ9
٪۹۷	۲۰۰۶	خرگوش	G1T4K1
٪۹۵	۱۹۴۷	موش	A2ASIS
٪۹۵	۱۹۵۱	موش صحرایی	SCN3A
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۲۰۱۶	انسان	SCN5A
٪۹۹	۲۰۱۶	شامپانزه	H2QMB5
٪۹۹	۲۰۲۰	گوبیل لولاند	G3RB05
٪۹۸	۲۰۱۷	میمون	G7NYK0
٪۹۶	۲۰۱۶	موش صحرایی	A6N7T7
٪۹۵	۲۰۲۰	موش	K3W4N7
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۱۹۸۸	انسان	SCN9A
٪۹۹	۱۹۷۷	شامپانزه	H2QIX3
٪۹۸	۱۹۸۹	میمون	F7A8X1
٪۹۴	۱۹۸۴	خرگوش	SCN9A
٪۹۳	۱۹۸۴	موش صحرایی	SCN9A
درصد همسانی توالی	طول توالی	موجود	نام پروتئین کانالی
٪۱۰۰	۱۷۹۱	انسان	SCNBA
٪۹۹	۱۷۹۱	شامپانزه	H2QMB6
٪۹۹	۱۷۹۱	گوبیل لولاند	G3QUM3
٪۷۷	۱۷۷۵	خرگوش	G1SFB0
٪۷۳	۱۷۶۵	موش صحرایی	SCNBA

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 فوق الذکر و با یکدیگر خویشاوندی دارند. دسته دوم شامل کانال‌های سدیمی نوع ۴ و ۵ با خویشاوندی بسیار بالا بوده

استفاده شده و عملکرد این نرم افزار نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. این نرم افزار در مطالعات ساختارشناسی فراوانی مورد استفاده قرار گرفته و بسیاری از محققین در پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین ها از آن بهره می گیرند (۱۴-۱۱).

هرچند نرم افزارهای متعددی برای پیشگویی ساختار پروتئین ها موجود است لیکن سادگی کار با این نرم افزار، بهبود و ارتقاء آن، عدم نیاز به ابرکامپیوترها به دلیل آنلاین بودن نرم افزار و بانک اطلاعاتی غنی این نرم افزار (۱۵) آن را کاندید مناسبی برای این قبیل مطالعات نموده است. برای مثال Wendt و همکاران از این نرم افزار برای پیشگویی ساختار زیرواحد کربوکسیل ترانسفراز که نوعی پمپ سدیمی در باکتری می باشد (۱۶) و یا Hazama و همکاران برای پیشگویی ساختار پروتئین ناقل آب AQP6 از آن بهره برده اند (۱۷). Rajesh و همکاران نیز با مدل سازی 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 می شمارند. آن ها برای مدل سازی ساختار پروتئین مورد نظرشان از نرم افزار SWISS-MODEL بهره برده اند (۱۸).

تفاوت مطالعه ما با این مطالعه در این است که این محققین تنها یک نوع پروتئین کانال سدیمی وابسته به ولتاژ را مدل سازی کرده اند که این پروتئین از نوع غیرانسانی می باشد، درحالی که در مطالعه ما همه انواع شناخته شده و آن هم از نوع انسانی، مدل سازی گردیده اند. اهمیت مدل سازی و پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین های موجودات مختلف در فضای مجازی به دلیل جنبه های کاربردی آن می باشد. در حقیقت مدل سازی ساختارهای سه بعدی پروتئین ها حداقل در تفسیر و درک نتایج حاصل از یافته های بالینی مانند ارزیابی مکانیسم های مولکولی، واکنش متقابل ترکیبات شیمیایی با ساختارهای پروتئینی، تفسیر مولکولی مطالعات مداخله ای (۱۹)، طراحی یا غربالگری داروها (۲۰) و طراحی مطالعات و تصمیم گیری برای مطالعات آینده کاربرد دارد.

با توجه به این که عملکرد نرم افزار SWISS-MODEL از طریق هم تراز کردن توالی پروتئین مورد نظر با پروتئین های مشابه تعیین ساختار شده می باشد لذا نتایج مطالعه ما نشان می دهند که این نرم افزار قادر به تعیین ساختار کامل هیچ یک از انواع این کانال های سدیمی نمی باشد و تنها توالی های کوچکی از انواع این کانال های سدیمی را پیشگویی می کند. انتظار می رود طی سال های آینده با بهبود الگوریتم های برنامه نویسی نرم افزارهای کامپیوتری به مرور این نقص نرم افزار تا اندازه های برطرف گردد.

عموماً در مطالعاتی که استفاده از انسان محدودیت دارد از مدل های حیوانات آزمایشگاهی بهره می برند. استفاده از حیوانات به عنوان مدل های مطالعاتی برای بیماری های انسان یا انجام فازهای مطالعاتی طراحی یک دارو مرسوم است. موش و موش صحرایی به عنوان معمول ترین مدل های حیوانی برای انسان مورد استفاده قرار می گیرند (۲۱)، لیکن هم ترازی توالی

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

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

براساس داده های پایگاه اطلاعاتی String-db، امکان واکنش متقابل بین کانال های یونی SCN2A با SCN3A، SCN8A با SCN5A و SCN3A و همچنین SCN5A با SCN3A وجود دارد، همچنین از بین انواع کانال های سدیمی، SCN10A بیش از سایر انواع و SCN4A کمتر از سایر انواع در سلول های انسانی سنتز می شود (تصویر ۳).

ارزیابی هم بیانی کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ

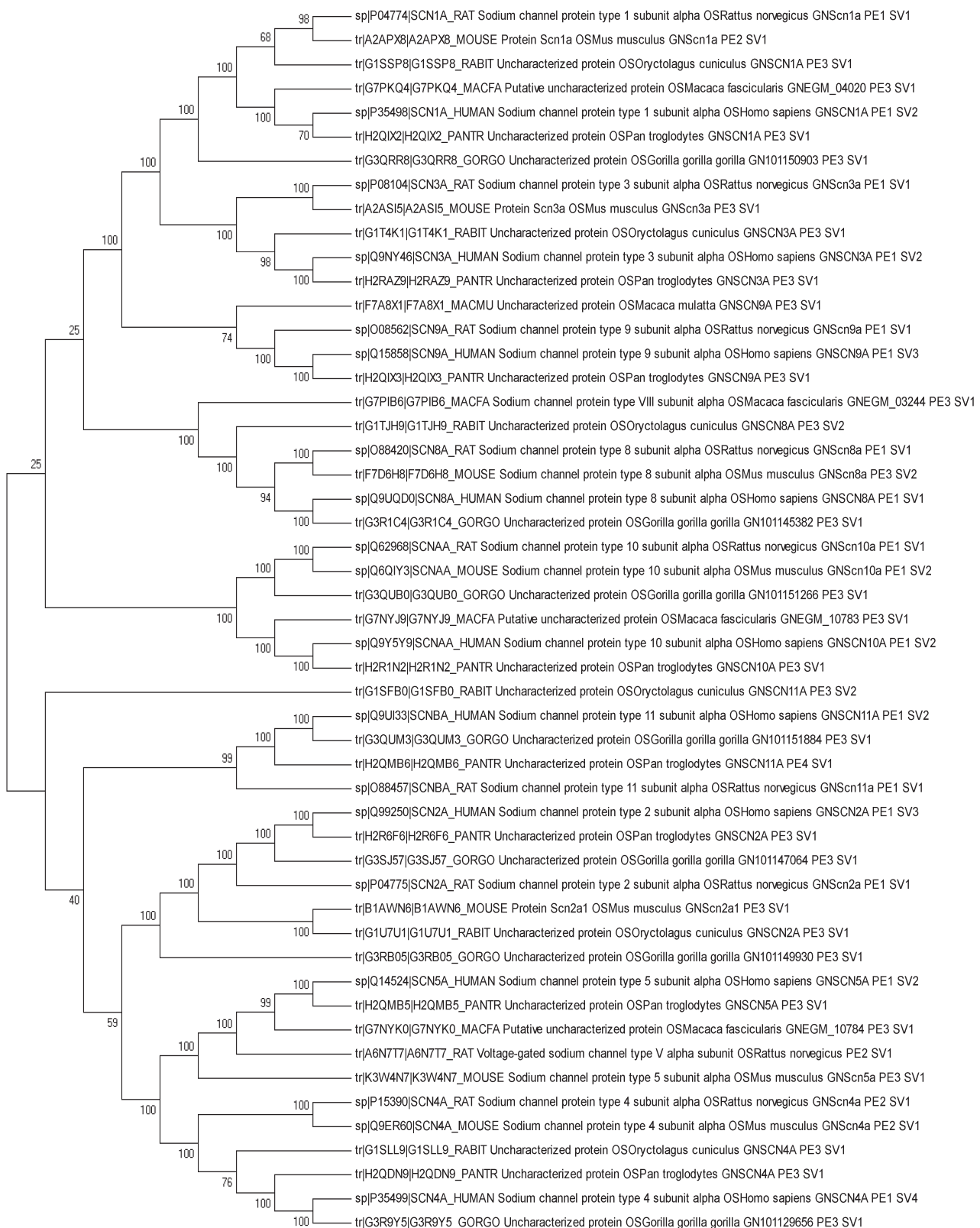
ارزیابی هم بیانی کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ در پایگاه اطلاعاتی String-db، نشان داد که تنها بین SCN2A با SCN3A در انسان (نمودار سمت چپ تصویر ۴) و بین SCN2A با SCN1A و SCN8A و همچنین بین SCN8A با SCN1A در برخی موجودات دیگر هم بیانی وجود دارد (نمودار سمت راست تصویر ۴).

بحث و نتیجه گیری

پژوهشگران نشان داده اند که کانال های سدیمی نقش ویژه ای در کنترل سیستم عصبی دارند و تغییر در بیان و توزیع آن ها می تواند منجر به ایجاد دردهای نوروپاتی شود (۴). داشتن اطلاعات پایه در خصوص این کانال های یونی می تواند برای مقاصد مطالعاتی و درمانی راه گشای پژوهشگران باشد. به طور کلی نتایج بررسی بیوانفورماتیک کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ نوع انسانی به ما نشان داد که این پروتئین ها عمدتاً از نوع پروتئین های تمام آلفا هستند. نرم افزار SWISS-MODEL قدرت چندانی برای پیشگویی ساختارهای سه بعدی پروتئین براساس توالی آن ها ندارد. بیشترین میزان تشابه توالی های آمینو اسیدی کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ بین انسان و حیواناتی مانند گوریل، شامپانزه و میمون وجود دارد و در موارد کمتری تشابه بین توالی های آمینو اسیدی پروتئین های انسانی با موش و موش صحرایی وجود دارد. از نظر تکاملی انواع کانال های سدیمی با یکدیگر شباهت یا تفاوت های قابل ملاحظه ای دارند که طی مطالعات داروشناسی و تداخلات تأثیر داروها این تشابه ها و تفاوت ها را باید در نظر گرفت. ساخت برخی از این کانال های یونی می تواند به طور همزمان در سلول اتفاق بیافتد.

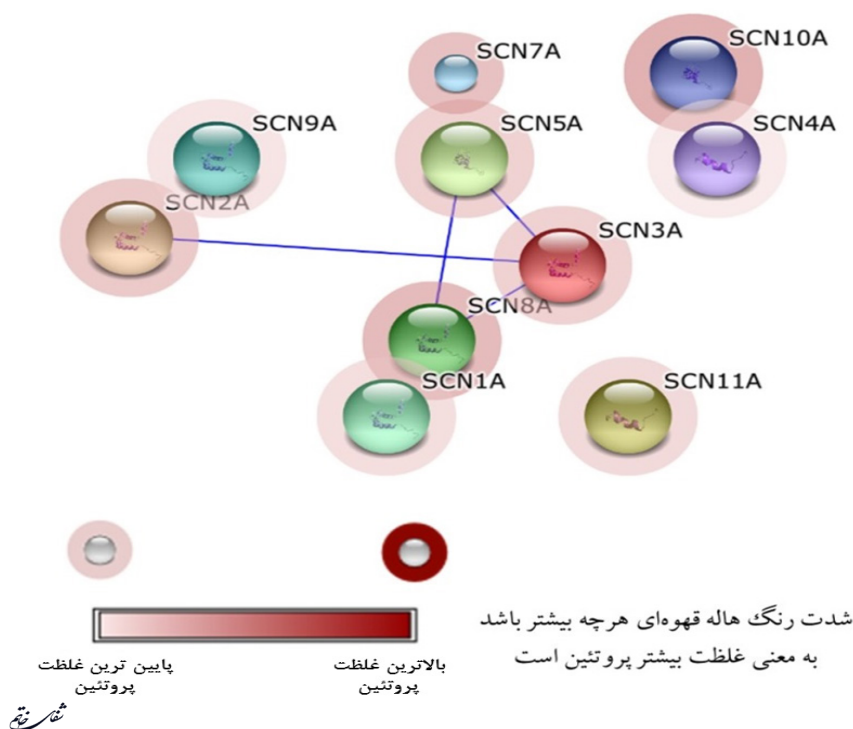
امروزه مدل سازی ساختار پروتئین ها یکی از رایج ترین روش های مورد استفاده برای پیشگویی ساختار پروتئین هایی است که تاکنون تعیین ساختار نشده اند (۱۰).

با توجه به این که ساختار کامل هیچ یک از ۹ نوع کانال سدیمی موجود در سلول های عصبی مورد شناسایی قرار نگرفته است لذا در این تحقیق از نرم افزار آنلاین SWISS-MODEL در پیشگویی ساختار هر یک از این کانال ها



شکل ۲

تصویر ۲- ترسیم دندروگرام فیلوژنیک 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.



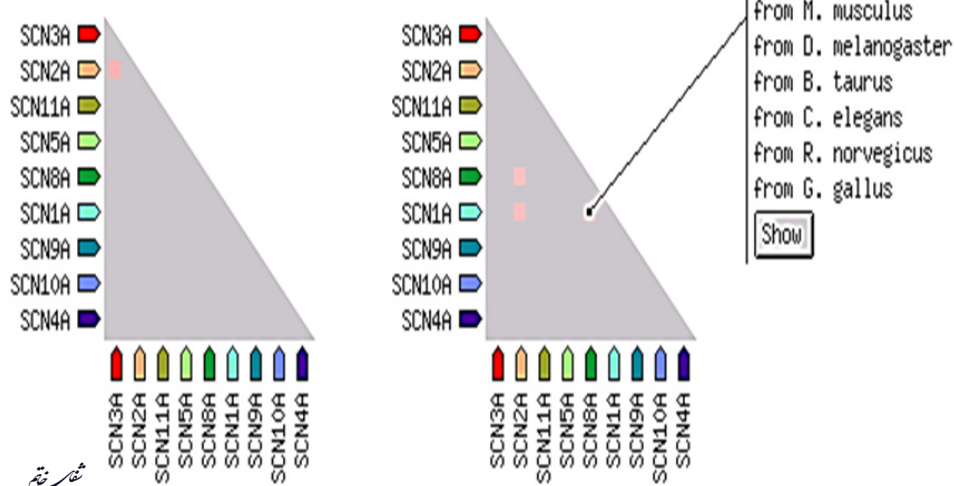
تصویر ۳- تعیین اثر متقابل انواع کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ و غلظت آن‌ها در سلول‌های انسانی براساس اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی String-db. خطوط آبی نشان‌دهنده وجود ارتباط عملکردی بین کانال‌های یونی است و هاله قهوه‌ای رنگ نشان‌دهنده مقدار تقریبی هر پروتئین، درون سلول‌های انسانی می‌باشد.

- Coexpression -

association score 0.0 1.0

... from Coexpression in
Homo sapiens:

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



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 (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 درحالی‌که 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 voltage-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.