

بررسی ساز و کار انتقال انتخابی از میان کمپلکس منفذ هسته سلول با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

زینب قسمتی و سارا محمدی‌نژاد*

زنجان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، دانشکده علوم زیستی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۸

چکیده

کمپلکس‌های منفذ هسته (NPCs) گذرگاه‌های دوطرفه انتخابی بین هسته و سیتوپلاسم هستند. درحالی که مولکول‌های کوچک می‌توانند آزادانه از میان NPCها انتشار یابند، مولکول‌های بزرگ تنها بواسطه اتصال به گیرنده‌های انتقالی، می‌توانند از خلال آنها عبور کنند. کانال مرکزی NPC با پروتئین‌های نامنظم غنی از تکرارهای فنیل آلانین-گلايسین (FG) پوشیده شده است که به عنوان ناپ FG شناخته می‌شوند و ادعا می‌شود این پروتئینها مسئول عملکرد انتخابی NPCها هستند. در این مقاله رفتار انفرادی و دسته‌جمعی Nsp1، به عنوان نماینده‌ای از ناپهای FG، با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی درشت‌دانه مطالعه شده است. در مدل درشت‌دانه این تحقیق، قدرت آگریزی متفاوت آمینواسیدها به خوبی لحاظ شده است. نتایج شبیه‌سازیها نشان می‌دهد ناپهای FG انفرادی، در حالت تعادل ساختارهای گلوبولی دارند در حالی که آرایه‌ای از ناپهای FG متصل شده به یک سطح، ساختارهایی کشیده و برس‌مانند تشکیل می‌دهند. همچنین گیرنده انتقالی NTF2 علاوه بر نفوذ به درون ساختار بررسی منجر به فروریختگی آن نیز می‌شود. این مشاهدات نشان می‌دهند مدل دروازه مجازی می‌تواند مدل پیشنهادی مناسبی برای سازوکار انتقال انتخابی از میان NPCها باشد.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس منفذ هسته، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی درشت‌دانه، انتقال انتخابی، ساختار برس‌مانند

* نویسنده مسئول، شماره تلفن: ۰۲۴۳۳۱۵۳۳۱۳، پست الکترونیکی: sarah@iasbs.ac.ir

مقدمه

کوچک و یونها با قطری کمتر از ۹ نانومتر به وسیله انتشار ساده از میان NPCها انتقال می‌یابند، در حالی که مولکول‌های بزرگتر با قطر حدود ۹ تا ۴۰ نانومتر مانند RNAها و بعضی از پروتئینها، نیازمند انتشار تسهیل شده ای هستند که از خلال NPCها و به وسیله اتصالشان به گیرنده‌های انتقالی فراهم می‌شود. این گیرنده‌ها عبور محموله‌های بزرگ دارای توالی نشانه صحیح را از NPCها مدیریت می‌کنند و به این ترتیب فرآیند انتقال از خلال NPCها یک فرآیند انتخابی است (۱۶، ۲۳، ۲۴، ۲۹ و ۳۰). NPCها از ۳۰ نوع پروتئین به نام نوکلئوپورین تشکیل شده‌اند که به اختصار ناپ (nup) نامیده می‌شوند. تمام

هسته سلول به وسیله غشایی دولایه به نام پوشش هسته احاطه شده است که فضای درون هسته را از فضای سیتوپلاسم جدا می‌کند و در حفظ ماده ژنتیکی درون هسته کمک می‌کند. با این وجود حیات سلول، همواره به تبادل کنترل شده مواد بین هسته و سیتوپلاسم وابسته است. این تبادل از طریق منافذ بزرگی به نام کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای (NPC) (Nuclear Pore Complexes) انجام می‌شود که روی سطح پوشش هسته به تعداد فراوان یافت می‌شوند (۲۳ و ۲۴). به عنوان مثال، ورود پروتئینها از سیتوپلاسم به هسته و خروج mRNA از هسته به سیتوپلاسم از طریق این منافذ انجام می‌شود. مولکول‌های

برای اینکه بتوانند بیشترین تعداد پیکربندی ممکن را اتخاذ کنند و به عبارتی آن‌تروپی خود را بیشینه کنند، به صورت موازی در کنار هم قرار می‌گیرند تا به این ترتیب فضای در دسترس هر پلیمر بیشینه مقدار ممکن باشد. به چنین ساختارهایی که پلیمرهای نشانده روی سطح به دلیل بیشینه کردن آن‌تروپی به صورت موازی هم آرایش پیدا می‌کنند، برس آن‌تروپیک گفته می‌شود.

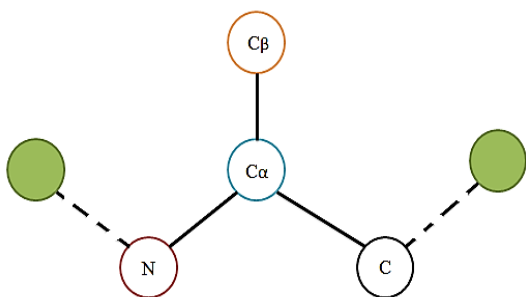
در شرایط عادی، ناپهای FG، کشیده شده و به صورت یک سد آن‌تروپیک عمل می‌کنند و مانع از ورود مولکولهای بزرگ می‌شوند. اما اگر یک مولکول بزرگ به یک گیرنده انتقالی متصل شود، برهمکنش گیرنده انتقالی با توالیهای تکرار FG در ناپها، منجر به جمع شدن ناپها و در نتیجه باز شدن فضایی برای عبور محموله می‌شود. اما مولکولهای بزرگی که فاقد گیرنده انتقالی باشند، قادر به عبور از NPC نیستند (۲۵). در مدل فاز ژل، ناپهای FG در شرایط عادی از طریق برهمکنشهای آبرگریزی ضعیف بین زنجیره‌های جانبی فنیل‌آلانین در تکرارهای FG، یک شبکه سه‌بعدی ژل‌مانند در داخل کانال مرکزی NPC تشکیل می‌دهند. گیرنده‌های انتقالی در یک فرآیند رقابتی با ایجاد برهمکنش آبرگریزی قوی‌تر و جداکردن موقتی اتصال بین تکرارهای FG، از میان این شبکه ژل‌مانند عبور می‌کنند (۱۰ و ۱۱). در مدل کاهش ابعادی، تکرارهای FG کانال مرکزی NPC را با یک سطح پیوسته از FG می‌پوشانند. گیرنده‌های انتقالی می‌توانند از میان کانال مرکزی NPC توسط سرخوردن از روی سطح FG به شکل حرکت تصادفی دوبعدی به جای حرکت تصادفی سه‌بعدی عبور کنند (۲۸). با وجود اهمیت فهمیدن نحوه عملکرد این کمپلکسها، ماهیت نامنظم و همچنین نبود روشهای تصویربرداری با کیفیت بالا چالشی برای فهمیدن جزئیات عملکرد NPC با روشهای آزمایشگاهی ایجاد می‌کنند. در چنین شرایطی، روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ابزاری مناسب برای مطالعه دقیق‌تر این ساختارهای بیومولکولی نامنظم فراهم می‌کند (۱۲). همچنین با توجه به اینکه روش

NPCها اساس ساختاری مشابهی دارند و از یک کانال مرکزی استوانه‌ای، هشت رشته سیتوپلاسمی و یک سبد هسته‌ای تشکیل شده‌اند (۸ و ۲۵). کانال مرکزی که نقش کلیدی در انتقال انتخابی دارد، دارای قطر ۳۸ nm و طول ۳۷nm است (۳، ۴ و ۲۲). این کانال با ناپهایی غنی از توالیهای تکراری فنیل‌آلانین-گلیسین به نام ناپهای FG فرش شده است (۶، ۲۱ و ۲۵). ناپهای FG بسیار انعطاف‌پذیر هستند و خصوصیات نوعی پروتئینهای نامنظم و تانخورده دارند (۹ و ۱۸). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ناپهای FG فرش‌کننده کانال مرکزی مسئول عملکرد انتخابی NPCها هستند (۲۵). برهمکنش بین ناپهای FG در کانال مرکزی NPC و گیرنده‌های انتقالی، کلید اساسی برای انتقال انتخابی از NPC است. گیرنده‌های انتقالی، بین محموله‌هایی با توالی نشانه NLS (Nuclear localization signal) برای ورود محموله‌ها به هسته و توالی نشانه NES (Nuclear export signal) برای خروج از هسته و مولکولهای بدون توالی نشانه تمایز قائل می‌شوند و به این ترتیب انتقال انتخابی انجام می‌شود. NTF2 (Nuclear Transport Factor2) یک گیرنده انتقالی مهم در NPC است (۱۶ و ۲۷).

نتایج کارهای تجربی و شبیه‌سازی پیشین نشان می‌دهند که گیرنده‌های انتقالی از طریق ایجاد برهمکنش آبرگریزی با ناپهای FG فرآیند انتقال را امکان‌پذیر می‌کنند (۵، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۰ و ۲۶). اگرچه تاکنون سازوکار دقیقی که تمامی جنبه‌های انتقال انتخابی از میان NPCها را توضیح دهد پذیرفته نشده است، اما مدل‌های متعددی برای آن ارائه شده است. از جمله پرکاربردترین این مدلها می‌توان مدل دروازه مجازی و مدل فاز ژل و مدل کاهش ابعادی را نام برد.

در مدل دروازه مجازی، ناپهای FG با آرایشی متراکم به سطح درونی کانال مرکزی NPC متصل شده‌اند و آرایشی شبیه برس پلیمری تشکیل می‌دهند. در حالتی که قطعات پلیمر در کنار هم با چگالی بالا روی سطح نشانده شوند

آمینواسیدها مشابهند. تفاوت بین آمینواسیدها که به زنجیره جانبی آنها برمی‌گردد، در کره سوم لحاظ شده است.



شکل ۱- مدل درشت‌دانه استفاده شده برای مدل کردن Nsp1. در این مدل هر آمینواسید با ۴ کره مدل می‌شود (۵).

در این مدل، برهمکنش‌های پیوندی و غیرپیوندی مختلفی بین کره‌های سازنده آمینواسیدها، در نظر گرفته می‌شود. برهمکنش‌های پیوندی در این مدل شامل سه برهمکنش است: (۱) برهمکنش دوزره‌ای هارمونیک جهت اعمال قدرت و طول پیوند بین کره‌های مجاور، (۲) برهمکنش سه‌دزه‌ای زاویه پیوندی برای در نظر گرفتن سختی خمشی زنجیره پروتئینی و (۳) برهمکنش چهاردزه‌ای دوجوهی جهت اعمال زوایای دوجوهی مربوط به زنجیره پروتئینی. برهمکنش‌های غیرپیوندی در نظر گرفته شده در این مقاله نیز شامل سه برهمکنش است: (۱) برهمکنش لناردجونز برای اعمال حجم اشغالی کره‌ها، (۲) برهمکنش آگریزی برای اعمال جاذبه آگریزی بین زنجیره جانبی آمینواسیدهای مختلف که برای ۲۰ آمینواسید قدرت متفاوتی دارد و (۳) برهمکنش هیدروژنی بین گروه آمید از یک آمینواسید با گروه کربوکسیل از یک آمینواسید دیگر که زمانی مقدار قابل توجهی دارد که گروه آمید و گروه کربوکسیل تقریباً در یک راستا قرار گرفته باشند. برای اطلاع از جزئیات بیشتر در مورد روابط و مقادیر پارامترهای مربوط به این برهمکنش‌ها به مقاله تریستن (۷) رجوع شود.

مزیت این مدل درشت‌دانه نسبت به مدل‌های دیگر دقت بالای آن می‌باشد. همان‌طور که پیداست تفاوت بین آمینواسیدها اعم از قدرت برهمکنش آگریزی و تمایل به

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روشی قدرتمند در بررسی جزئیات ساختاری در پروتئین‌هاست (۱) بنابراین با استفاده از آن سعی شده است تا ارتباط بین ساختار و عملکرد NPC مورد بررسی قرار گیرد.

در این مقاله، به مطالعه سازوکار انتقال انتخابی از میان کمپلکس منفذ هسته پرداخته شده است. برای این منظور با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، رفتار انفرادی و دسته‌جمعی یکی از ناپهای FG پرتکرار در منافذ غشای هسته مخمرها، به نام Nsp1، را به عنوان یک پروتئین نوعی فرش‌کننده NPCها مورد بررسی قرار گیرد. سپس در ادامه، چگونگی برهمکنش این ناپ با NTF2، به عنوان نمونه‌ای از یک گیرنده انتقالی، مورد مطالعه قرار می‌گیرد. برای مقایسه، برهمکنش یک مولکول غیرگیرنده با این ساختارها نیز مورد مطالعه قرار می‌گیرد. نتایج تحقیق حاضر، تأییدی بر مدل دروازه مجازی برای سازوکار انتقال انتخابی منافذ هسته است.

مواد و روشها

در تحقیق حاضر رفتار انفرادی و دسته‌جمعی Nsp1، به عنوان یک پروتئین نوعی فرش‌کننده NPCها مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور از روش دینامیک مولکولی درشت‌دانه و بسته نرم‌افزاری اسپرسو استفاده شد. از آنجا که به دلیل بزرگ بودن سیستم شبیه‌سازی، امکان شبیه‌سازی جزئیات اتمی پروتئین وجود ندارد. بنابراین در قدم اول باید مدل درشت‌دانه‌ای برای مدل‌سازی پروتئین انتخاب شود که علاوه بر دقت کافی، بازدهی مناسبی نیز داشته باشد. برای این منظور، از مدل درشت‌دانه تریستن و همکارانش برای پروتئین‌ها استفاده شد (۷) که در آن هر آمینواسید با ۴ کره مدل می‌شود (شکل ۱). کره اول گروه آمینو (NH_3)، کره دوم گروه کربن آلفا (C_α)، کره سوم گروه زنجیره جانبی (C_β) و کره چهارم گروه کربوکسیل (COOH) هر آمینواسید هستند. کره‌های اول، دوم و چهارم اسکلت زنجیره پروتئین را تشکیل می‌دهند و در تمامی

نظر کامپیوتری زمان‌بر است، در ابتدا توالی یک پروتئین Nsp1 به ۶ قطعه ۱۰۰ تایی با نامگذاریهای S_1, S_2, S_3, S_4, S_5 و S_6 (جدول ۱) تقسیم‌بندی شده و شبیه‌سازی برای هر کدام از این ۶ قطعه به طور مجزا انجام شد. در ابتدای شبیه‌سازی، ساختار اولیه به صورت کاملاً کشیده در نظر گرفته شد که در آن ستون فقرات پروتئین در راستای محور z در دستگاه مختصات دکارتی قرار دارد (شکل ۲ الف). ساختار اولیه بعلاوه ساختارهای تعادلی این قطعات در شکل ۲ الف نشان داده شده است که مشاهده می‌شود با وجود حالت اولیه کاملاً کشیده، این قطعات در حالت تعادل ساختاری کروی را اتخاذ می‌کنند. تحول زمانی شعاع ژیراسیون این ۶ قطعه در نمودار شکل ۲ ب نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود، با گذشت زمان شعاع ژیراسیون زنجیره‌ها کاهش می‌یابد که بیانگر این موضوع است که زنجیره‌ها از حالت کشیده به حالت جمع‌شده گلوبولی در می‌آیند. میانگین شعاع ژیراسیون تعادلی حاصل از شبیه‌سازی برای هر ۶ قطعه به همراه تعداد تکرارهای FG در هر قطعه، در جدول ۱ آورده شده است. با در نظر گرفتن شعاع ژیراسیون تعادلی برای هر قطعه، حجم ساختارهای کروی از طریق رابطه $\frac{4}{3} \pi R_g^3$ محاسبه شد و با تقسیم تعداد تکرارهای FG در هر قطعه بر حجم آن، چگالی تکرار FG برای هر ۶ قطعه نیز محاسبه شد که در جدول ۱ ارائه شده است.

برهمکنش هیدروژنی در زنجیره‌های جانبی آنها در این مدل به خوبی لحاظ شده است و گزینه مناسبی برای مدل کردن زنجیره پروتئینی است زیرا دارای جزئیات مناسبی از خصوصیات هر آمینواسید است.

توالی مربوط به ناپ Nsp1 از پایگاه داده UniProt با کد مشخصه p14907 دانلود شد و با استفاده از مدل درشت‌دانه توضیح داده شده در بالا و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، رفتار انفرادی و دسته‌جمعی آن مطالعه شد. در این شبیه‌سازیها برای جلوگیری از اثرات سطحی از شرایط مرزی دوره‌ای استفاده شد. ابعاد جعبه شبیه‌سازی $130 \text{ \AA} \times 130 \text{ \AA} \times 416 \text{ \AA}$ در نظر گرفته شد. شبیه‌سازیها با استفاده از ترموستات لانه‌زون در دمای ثابت 300 K انجام شدند. محیط آبی به صورت یک محیط پیوستار در نظر گرفته شد و شبیه‌سازیها برای مدت زمانی ۵ میکروثانیه اجرا شدند.

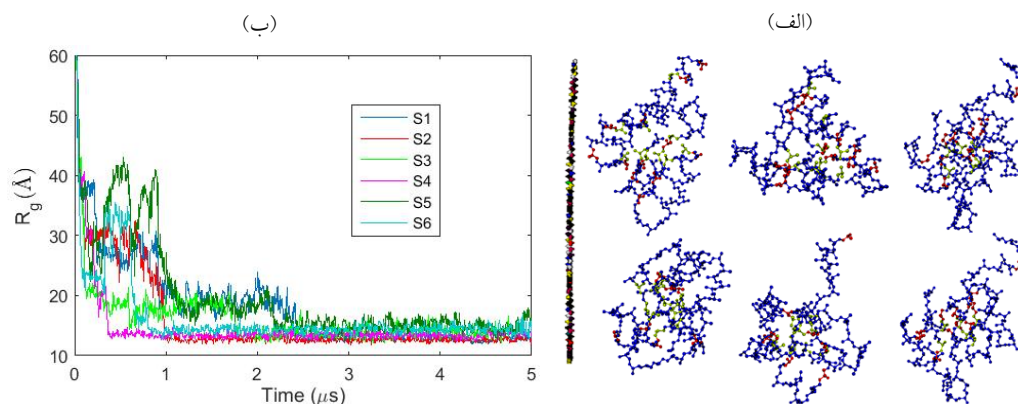
نتایج

به منظور بررسی سازوکار انتقال انتخابی از خلال کانال مرکزی NPC با جزئیات بیشتر، در ابتدا رفتارهای انفرادی و دسته‌جمعی ناپ Nsp1 با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در سطح درشت‌دانه مطالعه می‌شود. سپس گیرنده انتقالی NTF2 به ساختارهای نهایی حاصل اضافه می‌شود و برهمکنش آن با Nsp1 مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

قطعات انفرادی Nsp1: برای بررسی رفتار انفرادی از آنجا که شبیه‌سازی تمام آمینواسیدهای Nsp1 به طور همزمان از

جدول ۱- اطلاعات مربوط به شبیه‌سازی ۶ قطعه Nsp1 انفرادی. شماره توالی هر قطعه، طول زمان شبیه‌سازی، شعاع ژیراسیون حاصل از شبیه‌سازی و تعداد و چگالی تکرار FG در هر قطعه.

قطعات	شماره توالی	زمان شبیه‌سازی (μs)	شعاع ژیراسیون (\AA)	تعداد تکرارهای FG	چگالی تکرار FG ($\text{FG-repeat}/\text{nm}^3$)
S_1	۱-۱۰۰	۵	۱۳/۰۵	۷	۰/۷۵
S_2	۱۰۱-۲۰۰	۵	۱۲/۶۸	۶	۰/۷۰
S_3	۲۰۱-۳۰۰	۵	۱۳/۹۰	۴	۰/۳۵
S_4	۳۰۱-۴۰۰	۵	۱۳/۴۸	۵	۰/۳۹
S_5	۴۰۱-۵۰۰	۵	۱۵/۱۰	۵	۰/۳۴
S_6	۵۰۱-۶۰۰	۵	۱۴/۵۰	۵	۰/۳۹



شکل ۲- الف) ساختار اولیه کشیده و ساختارهای تعادلی گلوبولی ۶ قطعه Nsp1 که به طور انفرادی شبیه‌سازی شده‌اند. ب) تحول زمانی شعاع ژیراسیون قطعات انفرادی. با گذشت زمان شعاع ژیراسیون در حال کاهش است که نشان دهنده تحول ساختاری زنجیره‌ها از حالت کشیده به حالت گلوبولی می‌باشد.

بر این اساس در این قسمت قطعاتی از Nsp1 مطابق شکل قرارگیری آنها در کانال مرکزی NPC، کنار هم روی سطحی قرار داده و رفتار دسته‌جمعی آنها مورد بررسی قرار می‌گیرد. Nsp1 به عنوان نوکلئوپورینی که در کانال مرکزی NPC، رفتار دسته‌جمعی بر سر مانند دارد، مطابق جدول ۲ به ۲۵ قطعه ۱۰۰ آمینواسیدی که با هم همپوشانی دارند تقسیم گردید. سپس این ۲۵ قطعه به صورت آرایه ۵×۵ و با فاصله ۲۶ Å از همدیگر به سطح یک صفحه ثابت شدند. انتخاب این فاصله برای آرایش قطعات پروتئینی در کنار هم بر اساس نتایج حاصل از مرجع ۲۸ مقاله و چگالی واقعی اتصال نوکلئوپورین‌ها به سطح کانال NPC انجام شده است. شکل ۳ الف و ب نحوه آرایش این رشته‌ها را به صورت نما از بالا و کنار این آرایه را نشان می‌دهد. در این شبیه‌سازی نیز در حالت اولیه، پپتیدها به صورت کشیده در نظر گرفته شدند به طوری که ستون فقرات آنها در راستای محور Z و عمود بر صفحه اتصال قرار گرفته‌اند. به این ترتیب آرایه ۵×۵ به عنوان حجم نماینده‌ای از ناپه‌ای FG در کانال مرکزی NPC، مورد مطالعه شبیه‌سازی این تحقیق ما قرار گرفت.

در حالت تعادل، قطعات نشانده شده روی سطح با اینکه از حالت اولیه کاملاً کشیده شده مقداری جمع می‌شوند و

میانگین چگالی تکرار FG در این ۶ قطعه، مقدار ۰/۴۹ تکرار FG بر هر نانومتر مکعب به دست می‌آید که تقریباً ۶ برابر چگالی تکرار FG اندازه‌گیری شده در NPC واقعی مخمر می‌باشد. تعداد تکرار FG بر هر نانومتر مکعب در NPC واقعی مخمر، ۰/۰۸ اندازه‌گیری شده است (۵). از آنجا که چگالی به دست آمده برای ۶ قطعه انفرادی در مقایسه با مقدار واقعی به طور قابل توجهی بزرگتر است، به نظر می‌رسد نحوه قرارگیری این ناپه‌ها در شرایط واقعی NPC، متراکم‌تر از حالت انفرادی است. بنابراین در ادامه رفتار دسته‌جمعی این ناپه‌ای FG مورد بررسی قرار می‌گیرد.

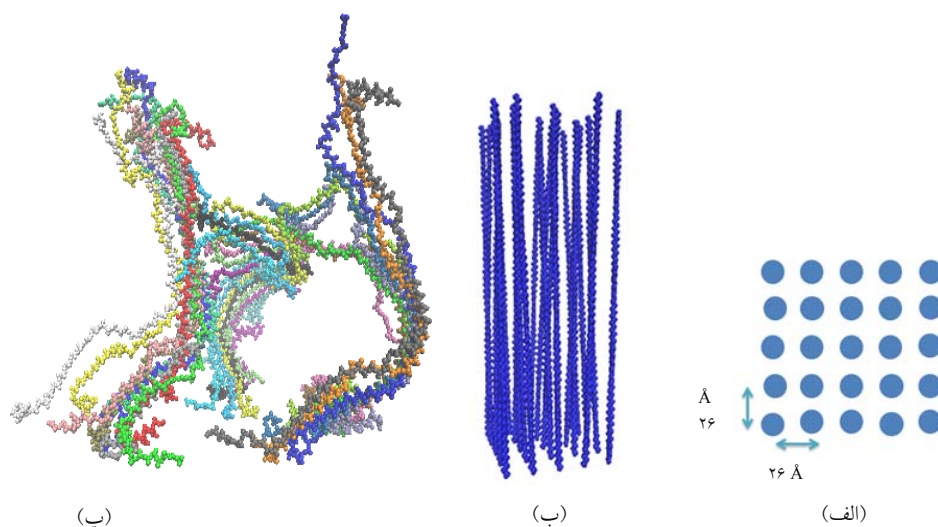
آرایه‌ی دسته‌جمعی از Nsp1: در کانال مرکزی NPC مشاهده شده که ناپه‌ای FG با تراکم بالا درون کانال را فرش می‌کنند و برای ایجاد فضای بیشتر جهت بیشینه کردن تعداد پیکربندی‌های خود (به عبارتی افزایش آنتروپی)، در جهت عمود بر سطح کشیده می‌شوند و ساختاری شبیه برس پلیمری اتخاذ می‌کنند. همان‌طور که در قسمت مقدمه ذکر شد چنین ساختار برس‌مانندی منشاء یک مدل شناخته شده برای سازوکار عملکرد انتخابی NPC نیز شناخته می‌شود.

می‌شود. تشکیل این ساختار برس‌مانند تأکیدی بر مدل دروازه مجازی پیشنهاد شده برای NPC است. همچنین در ساختار برس‌مانند نهایی مشاهده می‌شود که دسته‌های چندتایی تشکیل می‌شود که فضای مناسب برای عبور مولکولهای کوچک را فراهم می‌آورند. علاوه بر این در نتایج شبیه‌سازیها مشاهده شد که بیش از نصف تکرارهای FG روی سطح برس قرار می‌گیرند که یک محیط مناسب برای انتقال گیرنده‌های انتقالی را فراهم می‌آورند.

ارتفاع آنها نسبت به حالت اولیه کاهش می‌یابد، اما همچنان با حالتی کشیده و با تشکیل دسته‌هایی از چند قطعه در کنار هم ساختاری شبیه برس را به خود می‌گیرند (شکل ۳ پ). دلیل به وجود آمدن این ساختار برس‌مانند این است که برهمکنش حجم اشغالی بین قطعات باعث می‌شود با کنار هم قرار گرفتن به صورت موازی بیشترین حجم ممکن را برای آزادی خود داشته باشند و به این ترتیب با اتخاذ ساختار برس‌مانند آنتروپی سیستم بیشینه می‌شود. به همین دلیل به چنین ساختاری، برس آنتروپیک نیز گفته

جدول ۲- توالیهای ۲۵ قطعه Nsp1 که برای آرایه ۵x۵ استفاده می‌شود.

S ₅ ۸۱-۱۸۰	S ₄ ۶۱-۱۶۰	S ₃ ۴۱-۱۴۰	S ₂ ۲۱-۱۲۰	S ₁ ۱-۱۰۰	نام توالی توالی Nsp1
S ₁₀ ۲۰۱-۳۰۰	S ₉ ۱۸۱-۲۸۰	S ₈ ۱۶۱-۲۶۰	S ₇ ۱۴۱-۲۴۰	S ₆ ۱۰۱-۲۰۰	نام توالی توالی Nsp1
S ₁₅ ۳۰۱-۴۰۰	S ₁₄ ۲۸۱-۳۸۰	S ₁₃ ۲۶۱-۳۶۰	S ₁₂ ۲۴۱-۳۴۰	S ₁₁ ۲۲۱-۳۲۰	نام توالی توالی Nsp1
S ₂₀ ۴۰۱-۵۰۰	S ₁₉ ۳۸۱-۴۸۰	S ₁₈ ۳۶۱-۴۶۰	S ₁₇ ۳۴۱-۴۴۰	S ₁₆ ۳۲۱-۴۲۰	نام توالی توالی Nsp1
S ₂₅ ۵۰۱-۶۰۰	S ₂₄ ۴۸۱-۵۸۰	S ₂₃ ۴۶۱-۵۶۰	S ₂₂ ۴۴۱-۵۴۰	S ₂₁ ۴۲۱-۵۲۰	نام توالی توالی Nsp1



شکل ۳- طرح شماتیک آرایه ۵x۵ مربوط به ساختار برس‌مانند. الف) نما از بالا و ب) نما از کنار. اولین آمینواسید هر ۲۵ قطعه به سطح ثابت شده‌اند و فاصله بین قطعات ۲۶ Å در نظر گرفته شده است. پ) ساختار برس‌مانند بعد از رسیدن به حالت تعادلی. ۲۵ قطعه با رنگهای مختلف نشان داده شده‌اند.

شبهه‌سازی‌های قبلی اضافه شد و تغییرات ارتفاع ساختار برس‌مانند و میزان نفوذ آن به درون ساختار بررسی شد. تحولات زمانی مربوط به ارتفاع برس و عمق نفوذ NTF2 به درون ساختار حاصل از این دو اجرا در شکل ۴ نشان داده شده است (NTF2+Brush1,2). همان طور که در قسمت الف شکل مشاهده می‌شود ارتفاع ساختار برس بعد از اضافه شدن NTF2 تا حدودی کاهش می‌یابد. این کاهش ارتفاع نشان می‌دهد که در کانال مرکزی NPC، ناپه‌ای FG که در کنار هم با تشکیل ساختار برس‌مانند به صورت مانعی برای عبور محموله عمل می‌کنند، در اثر رویارویی با گیرنده‌های انتقالی مانند NTF2، دچار فروریختگی شده و در نتیجه محیطی مناسب برای عبور گیرنده‌های انتقالی را فراهم می‌کنند.

شکل ۴ ب، عمق نفوذ گیرنده انتقالی NTF2 اضافه‌شده به دو موقعیت مختلف ساختار برس را نشان می‌دهد. همان طور که دیده می‌شود NTF2 تمایل به نفوذ به درون ساختار برس دارد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که این گیرنده انتقالی در حالت تعادل، روی سطح خود دارای ۶ نقطه برای ایجاد برهمکنش آبگریزی با تکرارهای FG است (۱۴). در این تحقیقات نیز ساختار تعادلی شبهه‌سازی شده از NTF2، وجود این ۶ نقطه اتصال روی سطح NTF2 تأیید گردید. علاوه بر این، تحول زمانی موقعیت فضایی NTF2 نسبت به آرایه بررسی، تمایل این ۶ نقطه به برهمکنش با آرایه را به طور کیفی نشان می‌دهد. بنابراین دلیل حرکت NTF2 به درون ساختار برس‌مانند می‌تواند مربوط به وجود نقاط اتصالی آبگریز روی سطح NTF2 باشد که با فنیل‌آلانی‌های بی‌شمار موتیف تکرار FG در سطح ساختار برس برهمکنش آبگریزی دارند و به این ترتیب حرکت NTF2 به داخل ساختار برس تسهیل می‌شود.

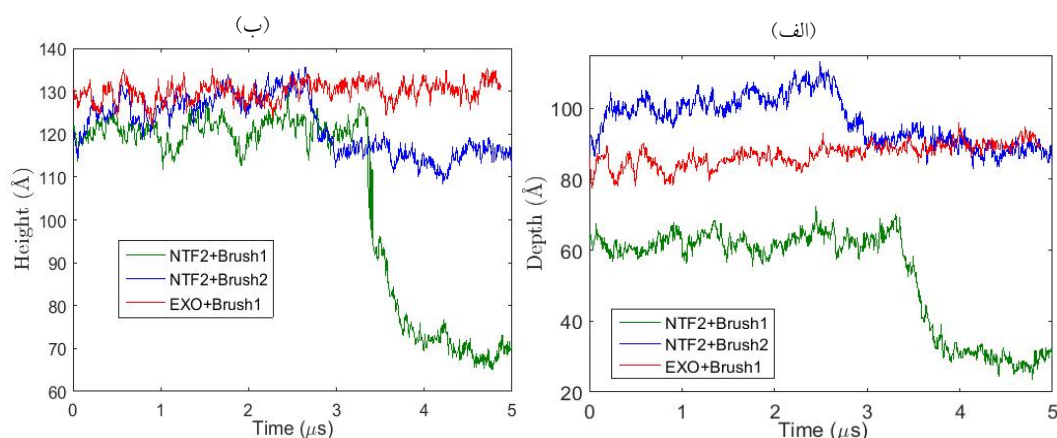
برای آزمودن ضرورت اثر آبگریزی در ورود گیرنده‌های انتقالی به کانال مرکزی NPC، به جای گیرنده انتقالی یک

شبهه‌سازی آرایه دسته‌جمعی برای دو اجرای مختلف با سری اعداد تصادفی متفاوت انجام شد و ارتفاع متوسط برس محاسبه شد. مقادیر به دست آمده برای میانگین ارتفاع تعادلی حاصل از این دو اجرا، به صورت \AA و $118/86$ و $117/20$ به دست آمد که این اعداد در مقایسه با مقادیر شعاع ژیراسیون به دست آمده برای قطعات منفرد، به مقدار قابل توجهی بزرگتر هستند و نشان می‌دهند که قطعات Nsp1 در کنار هم و به صورت دسته‌جمعی ساختارهای کشیده‌تری دارند کشیدگی قطعات Nsp1 به صورت عمود بر سطح کانال و به سمت محور کانال می‌باشد. نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که نوکلئوپورین‌ها درون کانال NPC، دو منطقه مجزا با ساختارهای مختلف تشکیل می‌دهند: برس‌مانند و ژل‌مانند. ساختار برس‌مانند در اطراف سطح کانال و ساختار ژل‌مانند در وسط کانال مرکزی مشاهده می‌شود. نتایج این تحقیق تشکیل ساختار برس‌مانند برای آرایه‌ای متراکم از Nsp1‌ها را که به سطح کانال متصل شده‌اند، تأیید می‌کند.

با در نظر گرفتن تعداد تکرارهای FG موجود در توالیهای سازنده ساختار برس‌مانند و حجم جعبه متشکل از ساختار برس‌مانند، چگالی تعداد FG برای این ساختار برس‌مانند به صورت $0/07$ تعداد تکرار FG بر هر نانومتر مکعب محاسبه شد که به مقدار واقعی چگالی تکرار FG در NPC واقعی مخمر که $0/08$ تعداد تکرار FG بر هر نانومتر مکعب گزارش شده، نزدیک می‌باشد (۵).

برهمکنش NTF2 با ساختار دسته‌جمعی: در این قسمت برهمکنش گیرنده انتقالی NTF2، با ساختار برس تعادلی حاصل از قسمت قبل بررسی می‌شود. گیرنده انتقالی NTF2 یک پروتئین ۲۵۴ آمینواسیدی است که یکی از شناخته‌شده‌ترین گیرنده‌های انتقالی مسئول انتقال انتخابی از کانال مرکزی NPC محسوب می‌شود. بنابراین در ادامه در دو اجرا با سری اعداد مختلف و با پیکربندی اولیه متفاوت، مولکول NTF2 به ساختار برس متعادل شده از

در این شکل دیده می‌شود در مقایسه با NTF2، اگزونوکلئاز تغییر چندانی در ارتفاع برس ایجاد نمی‌کند. نمودار عمق نفوذ اگزونوکلئاز به درون ساختار برس (شکل ۴ ب) نیز نشان می‌دهد مولکول اگزونوکلئاز، تمایل چندانی به نفوذ ندارد که این موضوع به دلیل فقدان نقاط اتصال کافی برای برهمکنش‌های آبرگریزی با توالیهای تکرار FG است.



شکل ۴- الف) تغییرات زمانی ارتفاع ساختارهای برس مانند بعد از اضافه شدن NTF2 و اگزونوکلئاز. ب) عمق نفوذ مولکول NTF2 و اگزونوکلئاز به درون ساختارهای برس مانند. نمودارهای سبز و آبی نتایج شبیه‌سازیهای مربوط به اضافه شدن NTF2 به برس در دو ارتفاع متفاوت از برس و نمودار قرمز نتیجه شبیه‌سازی مربوط به اضافه شدن اگزونوکلئاز به برس است.

در این قطعات مقدار 0.49 تکرار FG بر هر نانومتر مکعب محاسبه شد که چند مرتبه بزرگتر از مقدار اندازه‌گیری شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئینها در NPC متراکم‌تر هستند و در شرایط واقعی فضای محدودتری نسبت به پیکربندی در نظر گرفته شده در حالت انفرادی دارند.

بنابراین برای آزمودن این ادعا، رفتار دسته‌جمعی Nsp1 با شبیه‌سازی ۲۵ قطعه Nsp1 متصل شده به یک سطح صفحه‌ای در یک آرایه 5×5 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج شبیه‌سازی این تحقیق نشان داد که قطعات Nsp1، در کنار هم ساختاری کشیده به خود می‌گیرند. با در نظر گرفتن ارتفاع برس‌ها و تعداد تکرارهای FG قرار گرفته در کل سیستم، چگالی تکرار FG محاسبه شد که با مقدار چگالی

پروتئین غیرگیرنده با وزن مشابه NTF2 به نام اگزونوکلئاز بر روی ساختار برس تعادلی قرار داده شد. اگزونوکلئاز یک مولکول ۲۶۸ آمینواسیدی است و وزن مولکولی تقریباً مشابه با NTF2 دارد. بنابراین می‌توان مقایسه قابل اطمینانی بین نتیجه ارتفاع برس و عمق نفوذ این مولکول با NTF2 انجام داد. شکل ۴ الف تحولات زمانی ارتفاع برس بعد از اضافه شدن اگزونوکلئاز را نیز نشان می‌دهد. همان طور که

بحث و نتیجه‌گیری

در این مقاله رفتار انفرادی و دسته‌جمعی قطعات Nsp1، به عنوان نماینده‌ای از پروتئینهای فرش کننده NPC، با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (۱) در سطح درشت‌دانه برای مدت زمانی ۵ میکروثانیه مورد مطالعه قرار گرفت. مدل درشت‌دانه استفاده شده برای زنجیره پروتئینی دارای جزئیات مناسبی از خصوصیات هر آمینواسید است و تفاوت بین آمینواسیدها اعم از قدرت آبرگریزی و برهمکنش هیدروژنی در این مدل به خوبی لحاظ شده است. نتایج این مطالعه نشان دادند که قطعات انفرادی Nsp1 از حالت اولیه کاملاً کشیده، به صورت ساختارهای تعادلی گلوبولی در می‌آیند. با توجه به شعاع ژیراسیون به دست آمده برای حالت تعادلی این قطعات، چگالی تکرار

مانند می‌شود، امکان ورود به درون ساختار برس را نیز پیدا می‌کند. اما مولکول اگزونوکلئاز در مقایسه با NTF2 تغییر چندانی در ارتفاع برس ایجاد نمی‌کند، علاوه بر این نفوذ قابل توجهی به درون ساختار نیز از خود نشان نمی‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ساختار برس بین گیرنده انتقالی NTF2 و مولکول غیرگیرنده اگزونوکلئاز تبعیض قائل می‌شود. دلیل اصلی وارد شدن NTF2 به ساختار برس مانند، به خاطر برهمکنش‌های آبرگریزی بین نقاط اتصالی آبرگریز در سطح NTF2 با فنیل‌آلانی‌های تکرار FG می‌باشد. بنابراین حضور برهمکنش‌های آبرگریزی برای ورود گیرنده‌های انتقالی به درون ساختار برس مانند ضروری می‌باشد. به این ترتیب نتایج شبیه‌سازی‌های این تحقیق نشان دادند که مدل دروازه مجازی می‌تواند مدل پیشنهادی مناسبی برای سازوکار انتقال انتخابی از میان NPCها باشد.

ایجاد جهش‌هایی در ناپها نیز می‌تواند با تأثیر بر روی ساختار و عملکرد NPC باعث کاهش یا از بین رفتن فعالیت آن شوند (۲). بنابراین بررسی چگونگی تأثیر جهش‌ها بر فعالیت و عملکرد NPC و همچنین تجزیه و تحلیل ساختار NPC جهش یافته در تحقیقات آینده نیز ضروری به نظر می‌رسد.

واقعی تکرار FG اندازه‌گیری شده در NPC مخمر همخوانی دارد (۵).

در توضیح رفتار برس مانند مشاهده شده برای حالت دسته‌جمعی می‌توان گفت قطعات متصل شده نزدیک به هم در آرایه ۵×۵ برای کم کردن برهمکنش‌های حجم اشغالی و حفظ آنروپی خود، ساختار کشیده برس مانند را اتخاذ می‌کنند که این مشاهده فرضیه سد آنروپی ارائه شده در مدل دروازه مجازی را حمایت می‌کند. در پژوهش‌های آزمایشگاهی پیشین با روش AFM نیز ساختار برس مانند مشابهی برای ناپهای FG مشاهده شده بود (۱۸ و ۱۹). علاوه بر این در نتایج شبیه‌سازی مشاهده شد که بیش از نصف تکرارهای FG روی سطح برس قرار می‌گیرند که یک محیط مناسب برای انتقال گیرنده‌های انتقالی را فراهم می‌آورند.

در نهایت، برای تکمیل بررسی سازوکار عبور محموله از خلال NPC، برهمکنش ساختارهای برس مانند تشکیل شده با گیرنده انتقالی NTF2 و یک مولکول غیرگیرنده اگزونوکلئاز نیز مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج به دست آمده همخوانی خوبی با نتایج کارهای تجربی دارد (۱۷). NTF2 علاوه بر اینکه باعث سقوط ارتفاع ساختار برس-

منابع

- گنجعلی خانی م.، رنجبر، م.، ۱۳۹۱. مطالعه دینامیک مولکولی و حرکات عملکردی آنزیم لیپاز A از گونه باسیلوس سوبتیلیس. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۷: ۲۹۶-۳۰۷
- صفرزاده م.، پاژنگ، م.، مهرزاد، ف.، دوستدار، ف.، چاپارزاده، ن.، ربیعی فرادنبه، د.، یاری خسرو شاهی، ا.، محمدپور، ا.، *architecture of the nuclear pore complex*. Nature, 450(7170): p. 695-701.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Rout, M.P., and Sali, A., 2007. *Determining the architectures of macromolecular assemblies*. Nature, 450(7170): p. 683-694.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., and Rout, M.P., 2007. *The molecular*
- Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Went, S.R., and Stewart, M., 2002. *GLFG and FxFG Nucleoporins Bind to Overlapping Sites on Importin-β*. Journal of Biological Chemistry. 277(52): p. 50597-50606.
- Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O., 2004. *Nuclear Pore Complex*

- Structure and Dynamics Revealed by Cryoelectron Tomography*. Science. 306(5700): p. 1387-1390.
7. Bereau, T. and Deserno, M., 2009. *Generic coarse-grained model for protein folding and aggregation*. The Journal of chemical physics, 130(23): p.235106-235106.
 8. Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., and Matunis, M.J., 2002. *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. The Journal of Cell Biology. 158(5): p. 915-927.
 9. Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., and Rexach, M., 2003. *Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100(5): p. 2450-2455.
 10. Frey, S., Richter, R.P., and Görlich, D., 2006. *FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties*. Science. 314(5800): p. 815-817.
 11. Frey, S. and Görlich, D., 2007. *A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes*. Cell. 130(3): p. 512-523.
 12. Gumbart, J., Wang, Y., Aksimentiev, A., Tajkhorshid, E., and Schulten, K., 2005. *Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers*. Current Opinion in Structural Biology. 15(4): p. 423-431.
 13. Isgro, T.A. and Schulten, K., 2005. *Binding Dynamics of Isolated Nucleoporin Repeat Regions to Importin- β* . Structure. 13(12): p. 1869-1879.
 14. Isgro, T.A. and Schulten, K., 2007. *Association of Nuclear Pore FG-repeat Domains to NTF2 Import and Export Complexes*. Journal of Molecular Biology. 366(1): p. 330-345.
 15. Isgro, T.A. and Schulten, K., 2007. *Cse1p-Binding Dynamics Reveal a Binding Pattern for FG-Repeat Nucleoporins on Transport Receptors*. Structure. 15(8): p. 977-991.
 16. Jamali, T., Jamali, Y., Mehrbod, M., and Mofrad, M.R.K., 2011. *Chapter six - Nuclear Pore Complex: Biochemistry and Biophysics of Nucleocytoplasmic Transport in Health and Disease*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, W.J. Kwang, Editor, Academic Press. p. 233-286.
 17. Jovanovic-Talisman, T., Tetenbaum-Novatt, J., McKenney, A.S., Zilman, A., Peters, R., Rout, M.P., and Chait, B.T., 2009. *Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex*. Nature. 457(7232): p. 1023-1027.
 18. Lim, R.Y.H., Huang, N.-P., Köser, J., Deng, J., Lau, K.H.A., Schwarz-Herion, K., Fahrenkrog, B., and Aebi, U., 2006. *Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103(25): p. 9512-9517.
 19. Lim, R.Y.H., Fahrenkrog, B., Köser, J., Schwarz-Herion, K., Deng, J., and Aebi, U., 2007. *Nanomechanical Basis of Selective Gating by the Nuclear Pore Complex*. Science. 318(5850): p. 640-643.
 20. Liu, S.M. and Stewart, M., 2005. *Structural Basis for the High-affinity Binding of Nucleoporin Nup1p to the Saccharomyces cerevisiae Importin- β Homologue, Kap95p*. Journal of Molecular Biology. 349(3): p. 515-525.
 21. Macara, I.G., 2001. *Transport into and out of the Nucleus*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(4): p. 570-594.
 22. Maimon, T., Elad, N., Dahan, I., and Medalia, O., 2012. *The Human Nuclear Pore Complex as Revealed by Cryo-Electron Tomography*. Structure. 20(6): p. 998-1006.
 23. Miao, L. and Schulten, K., 2009. *Transport-Related Structures and Processes of the Nuclear Pore Complex Studied through Molecular Dynamics*. Structure. 17(3): p. 449-459.
 24. Miao, L. and Schulten, K., 2010. *Probing a Structural Model of the Nuclear Pore Complex Channel through Molecular Dynamics*. Biophysical Journal. 98(8): p. 1658-1667.
 25. Michael P. Routa, J.D.A., Adisetyantari Suprpto, Kelly Hjertaasb, Yingming Zhaoa, and Brian T. Chaita., 2000. *The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism*. The Journal of cell biology. 148(4): p. 635-652.
 26. Morrison, J., Yang, J.-C., Stewart, M., and Neuhaus, D., 2003. *Solution NMR Study of the Interaction Between NTF2 and Nucleoporin FxFG Repeats*. Journal of Molecular Biology. 333(3): p. 587-603.
 27. Pemberton, L.F. and Paschal, B.M., 2005. *Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear*

- Import and Nuclear Export*. Traffic. 6(3): p. 187-198.
28. Peters, R., 2005. *Translocation Through the Nuclear Pore Complex: Selectivity and Speed by Reduction-of-Dimensionality*. Traffic. 6(5): p. 421-427.
29. Suntharalingam, M. and Wente, S.R., 2003. *Peering through the Pore*. Developmental Cell. 4(6): p. 775-789.
30. Yang, W. and Musser, S.M., 2006. *Nuclear import time and transport efficiency depend on importin β concentration*. The Journal of Cell Biology. 174(7): p. 951-961.

Investigating the Mechanism of Selective Transport through the Pore Complex of the Cell Nucleus Using Molecular Dynamics Simulation

Ghesmati Z. and Mohammadinejad S.

Biological Sciences Dept., Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Nuclear pore complexes (NPCs) are selectively gated pathways between nucleoplasm and cytoplasm. Whereas small molecules can diffuse freely through NPCs, large molecules can pass only when bound to transport receptors. The NPC central channel is filled with disordered proteins, rich in phenylalanine-glycine (FG) repeats, called FG-nups which are claimed to be responsible for selective function of NPCs. In this paper, the individual and collective behavior of Nsp1, as a representative of FG nups, has been studied using coarse-grained molecular dynamics simulations. In our coarse-grained model, detailed hydrophobic properties of amino acids are considered. Our simulation results show that individual FG-nups form globular structures, whereas arrays of FG-nups tethered to a planar surface, form extended and brush-like structures. Moreover, NTF2 (Nuclear Transport Factor 2), as a transport receptor is observed to penetrate inside brush and also leads to its collapse. These observations indicate that virtual-gate model could be a suitable model for describing selective transport through NPCs.

Key words: Nucleus pore complex, coarse-grained molecular dynamics simulation, selective transport, brush-like structure