



Molecular Dynamic Simulations of OmpF in a Double Bilayer Membranes: The Different Behavior of OmpF in an asymmetric Ionic Concentration System

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Poulakchi Saber S.¹ MSc,
Arab S.Sh.*¹ PhD

How to cite this article

Poulakchi Saber S, Arab S Sh. Molecular Dynamic Simulations of OmpF in a Double Bilayer Membranes: The Different Behavior of OmpF in an asymmetric Ionic Concentration System. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):93-101.

¹Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jaleh-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82883494
Fax: +98 (21) 82884417
sh.arab@modares.ac.ir

Article History

Received: June 09, 2017

Accepted: September 06, 2017

ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

OmpF is one of the bacterial outer membrane protein which can transfer the ions into the membrane. During the last years different theoretical and experimental methods have been used for the investigation of the bacterial protein. In this study for retaining periodic boundary condition and investigation of the channel structural changes, we use double lipid bilayer in the system. Different ion concentration was applied into the lipid bilayers to make simulation much more realistic. The aim of this simulation is if there is any prominent direction in the ion passage of the channels. Structural analysis for two proteins with a different orientation is dissimilar and dssp analysis shows different peaks although there are common peaks. Lining residues and constriction zone amino acids in the two final frames are also diverse. There is no ion passage thorough protein 2. The results are completely different for the ion channels and it shows which after 100ns simulation one of the channels which its direction is similar to the natural channel in the bacterial membrane is open and the ion passage is clear and the other channel is completely closed which is related to the direction of the channel due to the ion concentration.

Keywords Double Bilayer Simulation; Membrane Protein Simulation; Asymmetric Ion Concentration ; OmpF

CITATION LINKS

[1] Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling ... [2] Intrinsically disordered protein threads through the bacterial outer-membrane porin ... [3] Molecular Dynamics simulation studies of interactions of E. coli-K12 with OmpF in outer membranes: Effects of LPS structures on monoclonal antibodies ... [4] Molecular dynamics simulations of membrane channels and ... [5] Computer simulations of membrane ... [6] Molecular dynamics simulations of proteins in ... [7] Ions and counterions in a biological channel: A molecular dynamics simulation of OmpF porin from Escherichia coli in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt ... [8] Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria, review on bacterial ... [9] Biophysics of the structure ... [10] Transport across the bacterial outer ... [11] The structure of OmpF porin in a tetragonal ... [12] Molecular basis of voltage gating of OmpF ... [13] Crystal structure and functional characterization ... [14] Ion selectivity of gram-negative ... [15] Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional ... [16] Computational observation of an ion permeation ... [17] A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine ... [18] An alamethicin channel in a lipid bilayer: Molecular ... [19] Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, influenza M2, and alamethicin systems: Molecular dynamics ... [20] Residue ionization and ion transport through ... [21] Ion permeation and selectivity of OmpF ... [22] Molecular dynamics simulations of membrane ... [23] PoreWalker: A novel tool for the identification ... [24] CAVER: A new tool to explore routes from ... [25] Insights into the function of ion channels by computational electrophysiology ... [26] Orientation of the OmpF porin in planar lipid ... [27] Understanding ion conductance on a molecular level ... [28] Modeling membranes under a transmembrane ... [29] Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. Biochimica et ... [30] The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer ... [31] Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential ... [32] Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and ... [33] Why do the outer membrane proteins OmpF from E. coli and OprP from P. aeruginosa prefer ...

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی OmpF در غشا دولایه دوقلو: مطالعه رفتار متفاوت پروتئین OmpF در یک سیستم با حضور غلظت‌های یونی نامتقارن

سمیرا پولکچی صابر MSc

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

سیدشهریار عرب PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

یکی از پروتئین‌های غشای خارجی باکتری /شریشیا کلی (OmpF (*E. coli*) است که امکان عبور یون‌ها را میسر می‌سازد. در سالیان اخیر روش‌های متنوع تجربی و تئوری برای مطالعه این پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه به منظور حفظ شرایط مرزی از دو غشای دولایه در یک جعبه شبیه‌سازی برای بررسی تغییرات کانال در حین عبور یون‌ها استفاده شده است. غلظت‌های یونی متفاوت در دو طرف غشا اعمال شده است تا شرایط شبیه‌سازی به شرایط واقعی باکتری بیشتر شباهت داشته باشد. در این شبیه‌سازی دو سیستم مشابه هم درون یک جعبه شبیه‌سازی قرار گرفته‌اند. برای بررسی بیشتر در این دو سیستم جهت‌گیری کانال پروتئینی نسب به شیب غلظت یونی در هر دو جهت اعمال شده است. در این تحقیق به بررسی اینکه در انتقال یونی جهت‌گیری ارجح برای این کانال وجود دارد یا خیر پرداخته می‌شود. آنالیزهای ساختاری برای پروتئین در دو جهت‌گیری نشان‌دهنده تفاوت بین دو کانال است همچنین الگوهای مربوط به بررسی‌های ساختار دوم با وجود پیک‌های مشابه در برخی نقاط متفاوت بود. نتایج بررسی اسیدهای آمینه درون گذرگاه و حفره درون کانال نیز برای ساختار انتهایی پروتئین دوم متفاوت از ساختار انتهایی پروتئین اول بود. همچنین عبور یون در پروتئین دوم مشاهده نشد. نتایج نشانگر این است که یکی از کانال‌ها که جهت‌گیری آن مشابه با جهت‌گیری واقعی این کانال در غشای باکتری است در طول این شبیه‌سازی ۱۰۰ نانوثانیه‌ای باز و عبور یون از آن قابل مشاهده و پیگیری است، در حالی که کانال دیگر که جهت آن برعکس آنچه در طبیعت وجود دارد، بسته شده که نشان‌دهنده اثرات شیب غلظت یونی روی کانال است.

کلیدواژه‌ها: شبیه‌سازی پروتئین غشایی، شبیه‌سازی غشای دولایه دوقلو، غلظت یونی نامتقارن، پروتئین OmpF

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۵

*نویسنده مسئول: sh.arab@modares.ac.ir

مقدمه

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یکی از روش‌های معتبر در بررسی‌های زیست‌شناسی و زمینه‌های سلولی و مولکولی است. یکی از کاربردهای آن در مطالعات غشای سلول و پروتئین‌های غشایی است^[1]. پروتئین‌های غشایی در فرآیندهای مختلف سلولی مانند انتقال یون‌ها و انتقال سیگنال نقش دارند. این کانال‌ها در موجودات دیگر نیز نقش‌های مهمی دارند. یکی از این کانال‌ها، کانال OmpF است که یک پروتئین غشای خارجی باکتری /شریشیا کلی (*E. coli*) است^[2]. کانال‌های غشایی کنترل ورود و خروج مواد را در طول غشاهای زیستی همراه با انتخاب‌گری و رسانش بالا بر عهده دارند که این عمل بدون مصرف انرژی و توسط دریچه حساس به عوامل محیطی صورت می‌گیرد^[3]. از آنجایی که کانال‌ها معمولاً در طول پدیده‌های انتقال ملزم به انجام حرکت‌های کوچک در محدوده زمانی کوتاه‌تر از میکروثانیه می‌باشند، این رخدادها معمولاً توسط روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به آسانی قابل مطالعه هستند^[4]. کانال‌های یونی بین پروتئین‌های

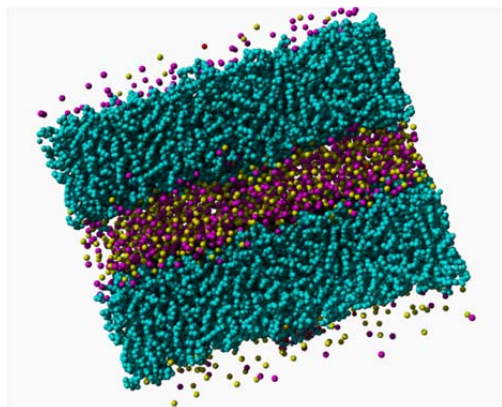
غشایی به دلیل عملکرد ساده‌شان شامل انتقال یون‌ها از غشا، افزایش رسانش، انتخاب‌گری و دریچه‌داربودن، یک گروه جالب توجه برای مطالعات تئوری است^[5]، اما در عین حال کانال‌های یونی یک چالش بزرگ در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هستند. این کانال‌ها برای شبیه‌سازی صحیح نیازمند به استخراج پارامترهای دقیق توابع نیرو برای میان‌کنش‌های الکتروستاتیک بین حلال، یون و پروتئین و البته لیپید هستند^[6].

غشای خارجی باکتری‌ها می‌تواند از سلول در برابر عوامل خارجی پشتیبانی و امکان جذب مواد غذایی را تسهیل کند^[7]. این فعالیت توسط ساختارهای ماکرومولکولی بنام پورین انجام می‌شود^[8-10]. این پورین‌های غیراختصاصی، که اجازه انتشار مولکول‌های هیدروفیلیک با جرم وزنی تا ۶۰۰ کیلودالتون را می‌دهند، خیلی رفتار انتخاب‌گرانه‌ایی از خود نمایش نمی‌دهند و تنها تمایل کمی به آنیون‌ها و کاتیون‌ها دارند^[2, 7]. اگرچه بین پورین‌های انتخاب‌گر کاتیونی که در ماتریکس قرار دارند، OmpF، یکی از اجزای اصلی غشای خارجی باکتری /شریشیا کلی است که در شرایط نرمال، بیان ژن آن صورت می‌گیرد^[7].

پروتئین OmpF به‌صورت هموتریمر وجود دارد که هر منومر از ۱۶ شبکه پتا غیرموازی تشکیل شده است^[2] و همچنین دارای ۸ پیچ و ۸ لوپ است؛ که از این لوپ‌ها، لوپ شماره ۳ و لوپ‌های شماره ۴ تا ۸ با یکدیگر تجمع پیدا کرده و به‌طور جزئی ورودی کانال را می‌بندند. لوپ شماره ۲ در برهم‌کنش بین منومرها دخیل است و لوپ شماره ۳ به درون بشکه تاخورد و باعث انقباض سائز حفره می‌شود^[11]. این لوپ را منطقه حلقه یا منطقه انقباضی نیز می‌نامند^[12].

خصوصیات نفوذپذیری پورین‌های باکتریایی به‌وسیله محلول‌های نمکی پتاسیم‌کلرید و سدیم‌کلرید در محدوده غلظت‌های مختلف خصیصه‌یابی می‌شود^[8, 13-15]. برای درک مکانیزم انتقال یونی سوئنگ و همکاران شبیه‌سازی OmpF را در حضور پتانسیل غشا انجام دادند^[16]. پورین OmpF یک پروتئین پروتئولیتیک غشای خارجی و اولین پروتئین شبیه‌سازی‌شده در محیط لیپیدی بوده است^[17, 18]. در یک شبیه‌سازی یک نانوثانیه‌ای، تیلیم و برنسن مشاهده کردند که آب درون حفرات بسیار آرایش‌یافته هستند و رفتاری بسیار متفاوت از توده آب از خود نشان می‌دهند^[18]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط تیلیم صورت گرفت میان‌کنش بین لیپید- پروتئین OmpF درون یک دولایه POPE با جزییات بررسی و مشاهده شد که حضور پروتئین‌های غشا، خصوصیات از دولایه لیپیدی مثل پارامترهای نظم لیپیدی و ضخامت غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد^[19]. مطالعات بعدی شبیه‌سازی تریمر در یک دولایه DMPC توسط رابرتسون و تیلیم با به‌کارگیری میدان الکتریکی با شدت‌های مختلف بود که به بررسی نقش لوپ L3 در جایگاه انقباضی حساس به ولتاژ در OmpF می‌پرداخت^[12]. در این مطالعات برخی اثرات وابسته به ولتاژ مشاهده شد اما علی‌رغم پیشرفت‌های آزمایش‌های اخیر، اساس مولکولی "دریچه ولتاژی" همچنان ناشناخته باقی مانده است^[20]. شبیه‌سازی‌های OmpF در دولایه DMPC، در غلظت یک‌مولار پتاسیم‌کلرید در زمان بیشتر از ۵ نانوثانیه امکان مطالعه مستقیم توزیع یونی در حفرات را امکان‌پذیر کرده است. همان‌گونه که از این حفرات انتخاب‌گر کاتیونی انتظار می‌رود، مشاهده شده است که K^+ دارای تمایل بیشتری برای جای‌گیری درون حفرات نسبت به Cl^- دارد. شبیه‌سازی‌ها همچنین آشکار کرده است که یون پتاسیم می‌تواند

نامتقارن، خروج یون‌ها از یک طرف جعبه شبیه‌سازی و وارد شدن آن از سمت دیگر جعبه است که شیب غلظت یونی را به هم می‌ریزد. برای رفع این مشکل از روش‌های مختلفی مانند به‌کارگیری میدان الکتریکی ثابت یا به‌کارگیری خلا استفاده شده است [22]. در این تحقیق از شبیه‌سازی غشا به‌صورت دولایه دوقلو استفاده شده است که می‌توان غشا را با به‌کارگیری شرایط مرزی بررسی نمود در این روش سه قسمت مجزا برای یون‌ها وجود دارد: دو طرف جعبه دارای غلظت یونی یکسان و قسمت وسط دارای غلظت یونی متفاوت است زیرا خروج یک یون از یک سمت و ورودش به سمت دیگر روی اختلاف غلظت یونی تأثیر نمی‌گذارد. برای این کار از خروجی پروتئین در غشا (خروجی شبیه‌سازی پیشین) که به‌مدت ۵۰ نانوثانیه به تعادل رسیده است، استفاده شد. هدف تحقیق حاضر بررسی اسیدهای آمینه موثر در عبور یون و مکانیزم عبور یون‌ها از کانال بود. به همین منظور دو کپی از غشا ایجاد شد. غلظت یونی نامتقارن یک مولار و ۰/۱ مولار به دو طرف غشا اضافه شد. در مورد کپی اول سیستم، به سمت اول غشا غلظت یک مولار و به سمت دوم غشا غلظت ۰/۱ مولار اضافه شد. در مورد کپی دوم نیز به سمت اول غشا غلظت ۰/۱ مولار و به سمت دیگر غلظت یک مولار اضافه شد. به عبارت ساده‌تر ما دو سیستم مشابه هم داریم که غلظت‌های یونی اضافه‌شده به آن عکس هم‌دیگر هستند. سپس فایل‌های مربوط به دو سیستم پس از تغییر موقعیت محور Z تبدیل به یک فایل نهایی شدند. اکنون سیستم نهایی خود شامل دو سیستم به معنی دو پروتئین درون دو غشای دولایه و دو غلظت یونی نامتقارن (البته به‌صورت سه بخش یونی مجزا) است این سیستم دارای ۱۰۰۸ مولکول لیپید و ۳۸۰۷۴ مولکول آب و ۱۷۴۴ یون پتاسیم و ۱۷۴۴ یون کلر و ۲۴ یون سدیم است. فایل آماده‌شده وارد مراحل بعدی شبیه‌سازی یعنی بهینه‌سازی انرژی و به تعادل رساندن سیستم یعنی مراحل NVT به‌مدت یک نانوثانیه و NPT به‌مدت ۱۰ نانوثانیه شد. در مرحله نهایی به‌مدت ۱۰۰ نانوثانیه رفتار سیستم مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱) سیستم را بدون مولکول‌های آب نشان می‌دهد که غلظت یونی در قسمت میانی غشا یک مولار و در دو طرف غشا ۰/۱ مولار است.

یافته‌ها

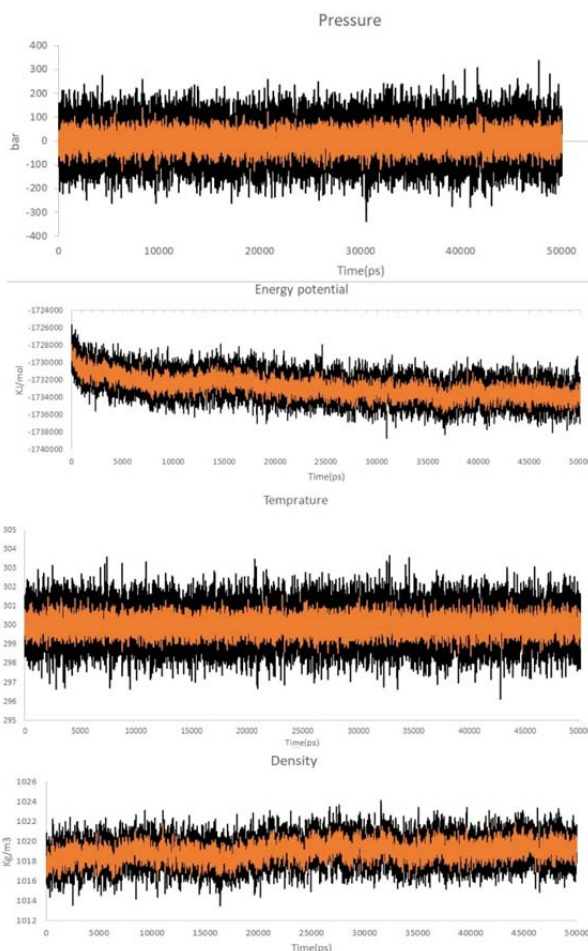
هدف از این شبیه‌سازی بررسی روند انتقال یون‌ها و تأثیر جهت‌گیری کانال در راستای شیب غلظت و همچنین نقش اسیدهای آمینه موثر در کانال در روند انتقال یون بود. در مرحله آنالیز نتایج، علاوه بر آنالیزهای مربوط به پکیج گروماکس از سرور Porewalker (<http://www.ebi.ac.uk/thornton->

به‌طور مستقل از درون حفره‌ها عبور کند، اما یون‌های کلر تنها زمانی مجاز به عبور از درون حفره هستند که یون‌های پتاسیم که بار مخالف دارند؛ حضور داشته باشند [21].

با توجه به تحقیقات صورت گرفته در مورد پروتئین OmpF در این تحقیق به بررسی اعمال شیب غلظت در دو طرف غشای سلولی و همچنین بررسی عبور یون از پروتئین در راستای شیب غلظت می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از پکیج گروماکس ۵ برای شبیه‌سازی استفاده شده است. در مرحله اول پروتئین OmpF (PDB id: 2omf) داخل غشای دولایه لیپیدی از جنس POPC، با ۵۱۲ لیپید که قبلاً به‌مدت ۵۰ نانوثانیه به تعادل رسیده بود (نمودار ۱)، قرار داده شد و بعد از ساخته شدن جعبه با ابعاد ۷.۷*۱۲*۱۳، مولکول‌های آب اضافه شدند، برای خنثی‌سازی ۱۲ یون سدیم به جعبه شبیه‌سازی اضافه شد. مرحله NVT در دمای ۳۰۰ درجه کلوین به‌مدت یک نانوثانیه و NPT به‌مدت ۱۰ نانوثانیه در فشار یک اتمسفر انجام شد. سپس مرحله نهایی تولید داده‌ها به‌مدت ۵۰ نانوثانیه انجام شد. در این شبیه‌سازی توابع نیرو GROMOS96 53A6 به کار رفت.



نمودار ۱) نمودارهای مربوط به فشار، انرژی، دما و چگالی مربوط به شبیه‌سازی اولیه که به‌مدت ۵۰ نانوثانیه انجام شد.

ایجاد یک سیستم دوقلو برای حفظ شرایط مرزی مرحله اصلی کار بود. یکی از مشکلات شبیه‌سازی در حضور غلظت‌های یونی

بین هر ۴ فریم مشترک و اسیدهای آمینه G131, Y124 و G119 در دو فریم انتهایی مشترک هستند.

جدول ۱) لیست اسیدهای آمینه موثر درون حفره برگرفته شده از نرم افزار Caver	
پروتئین شماره یک فریم ابتدایی	R82, Y102, Y106, G110, T112, L115, P116, E117, F118, G119, D121, T122, A123, R132
پروتئین شماره یک فریم انتهایی	Y14, K16, R82, Y102, T112, P116, E117, F118, D121, T122, A123, Y124, S125, G131, R132
پروتئین شماره دو فریم ابتدایی	R82, Y102, Y106, G110, T112, L115, P116, E117, F118, G119, D121, T122, A123, R132
پروتئین شماره دو فریم انتهایی	V105, Y106, D107, A108, L109, G110, Y111, T112, E117, F118, G119, D121, T122, A123, Y124, D127, F128, V130, G131, R132, R168, Q213, T234, A237, T238, T254, D256, S278

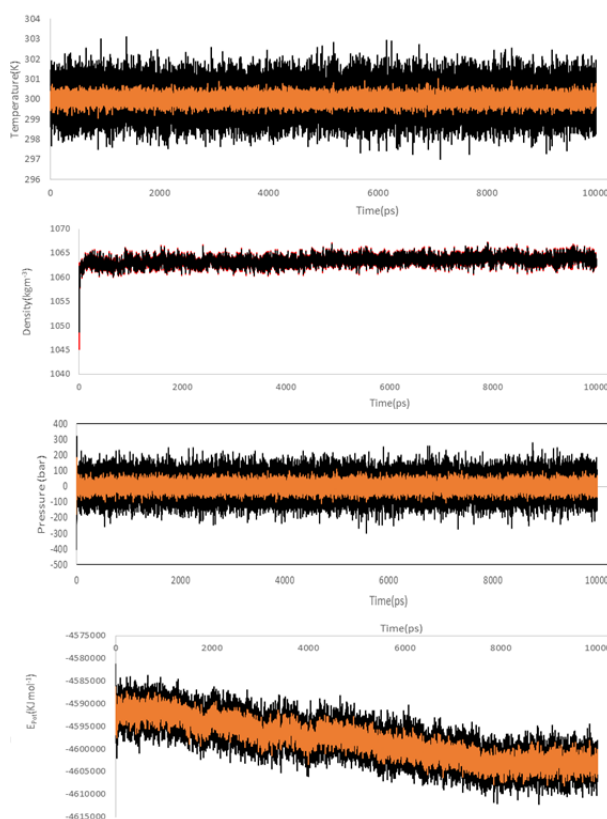
در آنالیز دیگر توسط نرم افزار Caver مقدار شعاع گلوگاه و همین طور اسیدهای آمینه موثر در گلوگاه نیز مشخص شده است: همان گونه که از جدول ۲ استنباط می شود برای پروتئین شماره یک و شماره دو در فریم ابتدایی به ترتیب ۸ و ۷ اسید آمینه در تشکیل گلوگاه نقش دارند که در ۷ اسید آمینه با هم مشترک هستند. از این ۸ اسید آمینه در پروتئین شماره ۱، ۵ اسید آمینه حضورشان در گلوگاه در فریم انتهایی حفظ می شود. ولی در پروتئین شماره دو به واسطه بسته شدن کانال در حین شبیه سازی ساختار کانال و گلوگاه کاملاً تغییر کرده و فقط یک اسید آمینه به صورت مشترک با فریم ابتدایی مشاهده می شود.

جدول ۲) اسیدهای آمینه موثر در گلوگاه و مقدار شعاع گلوگاه در پروتئین های یک و دو

پروتئین / فریم	شعاع ناحیه گلوگاه	اسیدهای آمینه موثر در گلوگاه
شماره ۱		
ابتدایی	۰/۹۱	۱۰۶, ۱۱۲, ۱۱۷, ۱۱۸, ۱۱۹, ۱۲۲, ۱۲۳, ۱۳۲
انتهایی	۱/۸۱	۸۲, ۱۰۶, ۱۱۷, ۱۲۲, ۱۲۳, ۱۲۴, ۱۳۲
شماره ۲		
ابتدایی	۱/۱۸	۱۰۶, ۱۱۲, ۱۱۷, ۱۱۸, ۱۲۲, ۱۲۳, ۱۳۲
انتهایی	۰/۹۶	۱۰۶, ۱۰۹, ۱۱۰, ۱۲۴, ۱۳۰

در آنالیز دیگری که توسط وب سرور Porewalker انجام می شود محور حفره به وسیله مسیر قرمز رنگ مشخص می شود. در پروتئین های غشایی، کانال غشا متناسب با صفحه غشا و موازی با دسته ساختارهای بتا، بخش حفره پروتئین را می سازد [23]. محور اصلی پروتئین غشایی توسط موقعیت عناصر ساختارهای دوم مشخص می شود. همان گونه که از تصاویر مشخص است در پروتئین شماره دو در انتهای شبیه سازی محور حفره در اثر تغییرات ساختاری پروتئین از یک سو بسته می شود و از کانال شماره دو که دقیقاً در جهت عکس کانال یک نسبت به غلظت است هیچ یونی عبور نمی کند که این پدیده دقیقاً به جهت گیری کانال بستگی دارد. در مطالعه ای که توسط کوتزبر و همکاران روی پروتئین KcsA صورت گرفته است به شیوه ای مشابه جهت گیری پروتئین ها در دولایه لیپیدی دوقلو (به صورت موازی) نشان داده است که دو کانال جهت میدانی را که دریافت می کنند عکس همدیگر است [25]. در این شبیه سازی هم موازی بودن جهت کانال ها با یکدیگر منجر به بسته شدن یکی از کانال ها می شود که در خلاف جهت شیب غلظت قرار گرفته که در اینجا پروتئین شماره دو است (شکل ۲).

نرم افزار PoreWalker/Software/Server استفاده شد که برای این کار دو فریم ابتدایی (در ثانیه صفر) و انتهایی (۱۰۰ نانوثانیه) ساختارها استخراج شده و فایل ها در سرور مذکور [23] بارگذاری شدند که این وبسایت اطلاعاتی در مورد رزیدوهای موثر در انتقال یون و تصویری از مسیر عبوری یون ها در اختیار ما می گذارد. سپس مقایسه تغییرات این دو پروتئین در طول شبیه سازی انجام شد. همان گونه که در نمودار ۲ که مربوط به نمودارهای دما، فشار، چگالی و پتانسیل دیده می شود سیستم از نظر تمامی عوامل ذکر شده پایدار است و تغییرات کاملاً در محدوده طبیعی دیده می شود و هیچ گونه نوسان شدیدی در سیستم دیده نمی شود که این خود نشان دهنده پایداری سیستم است که با توجه به این مورد، بررسی عوامل دیگر در چنین شرایطی کاملاً درست است. در نمودار ۲، داده ها با نمودار سیاه رنگ و متوسط داده ها با نمودار نارنجی مشخص شده است.

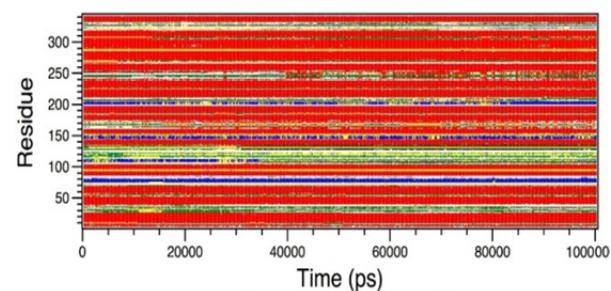


نمودار ۲) به ترتیب دما، فشار و انرژی پتانسیل برای سیستم در کل شبیه سازی

در مرحله بعد آنالیزهای تکمیلی روی فریم های ابتدایی و انتهایی از هر پروتئین انجام شد. در مبحث آنالیز اسیدهای آمینه موثر درون حفره از نرم افزار Caver 30 [24] برای این محاسبه استفاده شد این نرم افزار می تواند به صورت پلاگین نرم افزار Pymol یا به صورت نرم افزار مستقل مورد استفاده قرار گیرد.

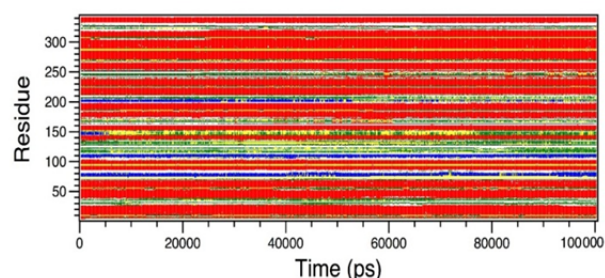
همان گونه که از جدول ۱ مشخص است لیست اسیدهای آمینه برای پروتئین شماره یک و شماره دو در فریم ابتدایی شبیه سازی عیناً یکسان است که در انتهای شبیه سازی و در اثر اعمال شیب غلظت و همچنین تغییرات ساختاری پروتئین ها، اسیدهای آمینه موثر نیز کاملاً تغییر کرده اند. بین لیست استخراج شده G131, G132, Y124, A123, T122, T112, D121, F118, E117 و Y106

Secondary structure



شکل ۳) نمودار ساختار دوم برای پروتئین شماره یک در ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی

Secondary structure

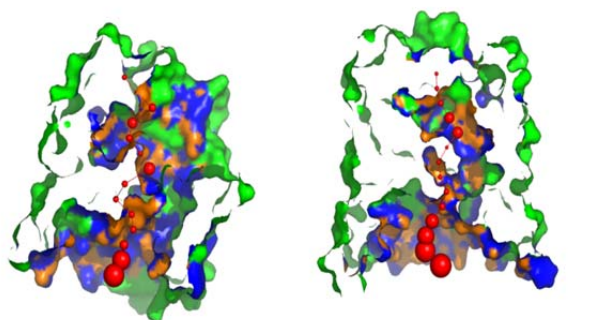


شکل ۴) نمودار ساختار دوم برای پروتئین شماره ۲ در ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی

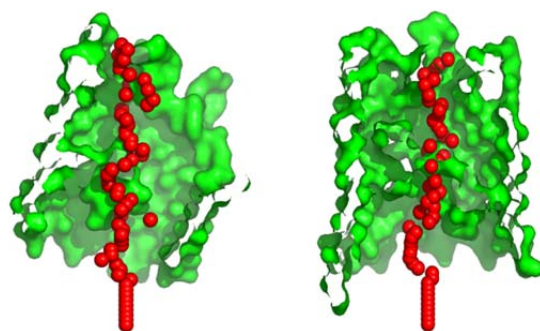
طبق جدول ۱ و از میان اسیدهای آمینه موثر درون حفره در پروتئین اول در بازه لوپ L3 که نقش در باز و بسته شدن کانال دارند (این لوپ شامل اسیدهای آمینه بین ۱۰۰-۱۳۰ است) ۱۹ اسید آمینه با شماره ۱۰۰ تا ۱۳۰ وجود دارد و در مورد پروتئین شماره دو، ۲۲ اسید آمینه از این بخش در لیست اسیدهای آمینه موثر در درون حفره هستند. در نمودار مربوط به ساختارهای ثانویه (شکل ۳) مربوط به پروتئین اول در بازه اسیدهای آمینه ۱۰۰-۱۱۰ تبدیل آلفاهلیکس به خم دیده می‌شود که می‌تواند توجیحی برای عبور یون‌ها به دلیل تغییر ساختار باشد، در صورتی که در پروتئین دوم (شکل ۴) در بازه اسیدهای آمینه ۱۱۰-۱۳۰، ساختار آلفاهلیکس به همان شکل بدون تغییر باقی می‌ماند که این نیز به علت بسته بودن کانال با توجه به جهت‌گیری در راستای شیب غلظت است.

همان‌طوری که در شکل ۵ مشاهده می‌شود اسیدهای آمینه و اتم‌های موثر اسیدهای آمینه مربوطه درون حفره کانال به ترتیب با رنگ آبی و رنگ نارنجی نمایش داده می‌شوند. همان‌طور که در فریم انتهایی از پروتئین دوم نشان داده شده است در منطقه گلوگاهی هیچ اسید آمینه و اتمی به عنوان ایفاکننده نقش درون حفره مشخص نشده‌اند که این خود نیز می‌تواند دلیل دیگری بر بسته شدن کانال دوم باشد. در آنالیز دیگری شکل داخلی کانال (شکل ۶) با استفاده از دو نوع ساختار شماتیک نمایش داده می‌شود که شامل موارد زیر هستند:

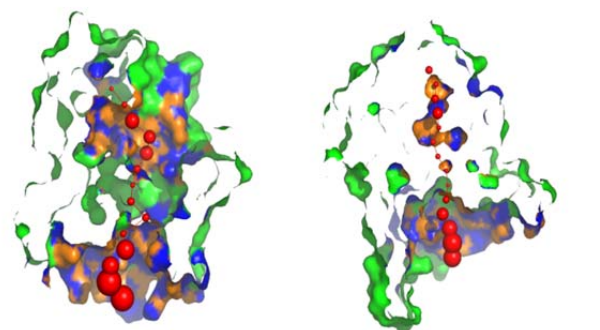
۱) مخروط‌های کوتاه که در نواحی از کانال است که ابعاد به شکل خطی تغییر می‌کند و ۲) سیلندرها که نواحی با ابعاد یکسان را نمایش می‌دهد. این آنالیز نمایش می‌دهد که شکل داخلی کانال در این دو پروتئین متفاوت است.



(A) پروتئین شماره یک فریم ابتدایی (B) پروتئین شماره یک فریم انتهایی



(A) پروتئین شماره یک فریم نخست (B) پروتئین شماره یک فریم انتهایی



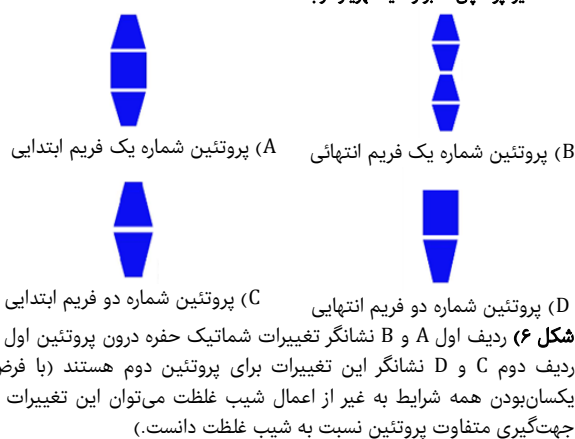
(C) پروتئین شماره دو فریم ابتدایی (D) پروتئین شماره دو فریم انتهایی

شکل ۵) آنالیز نمایش اسیدهای آمینه با رنگ آبی و اتم‌های درون حفره با رنگ نارنجی (ردیف اول مربوط به پروتئین اول A و B و ردیف دوم C و D مربوط به پروتئین دوم است).

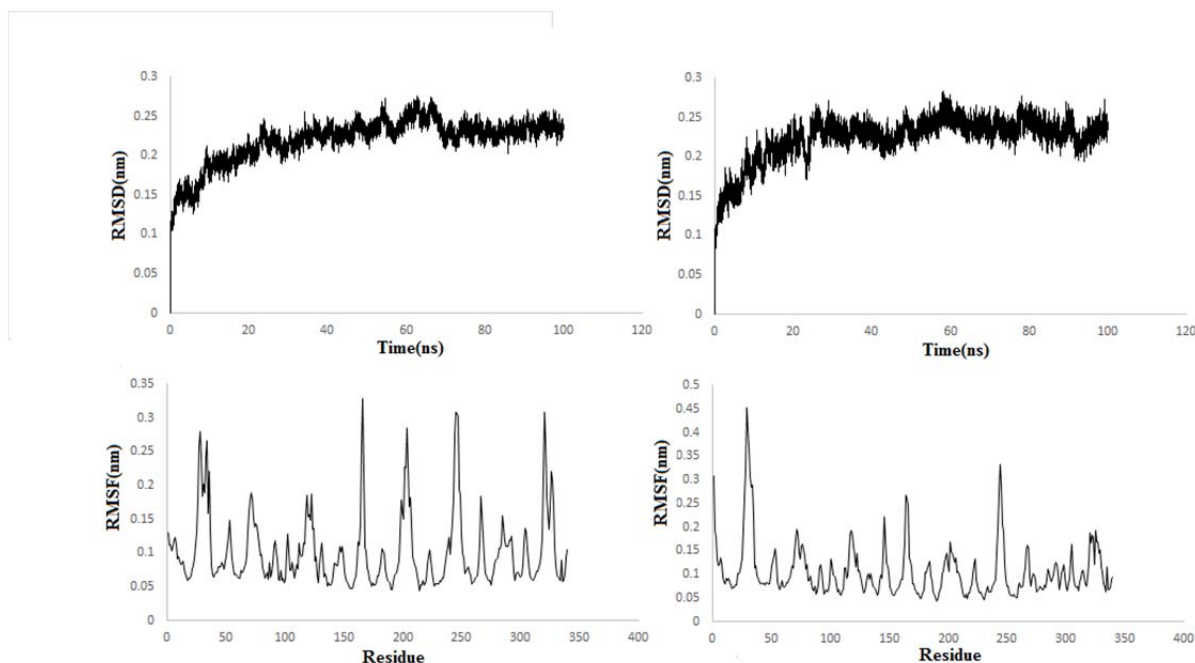
(D) پروتئین شماره دو فریم انتهایی (C) پروتئین شماره دو فریم ابتدایی
شکل ۶) در شکل A محور حفره درون کانال در فریم نخست در پروتئین شماره یک و در شکل B همین محور در درون فریم انتهایی در پروتئین شماره یک مشخص شده است. در شکل C محور حفره در فریم نخست پروتئین شماره دو و در شکل D در فریم انتهایی پروتئین شماره دو مشخص شده که در انتها بسته شده است.

در مرحله بعدی با بررسی نمودارهای مربوط به RMSD و RMSF (نمودارهای ۳ و ۴) برای دو پروتئین متوجه یکسان بودن برخی قسمت‌ها و متفاوت بودن در برخی نواحی می‌شویم که با توجه به این که هر دو پروتئین یکسان هستند و تنها تفاوت آنها جهت‌گیری نسبت به شیب غلظت یونی متفاوت است، دلیل این تفاوت‌ها نیز آشکار است. در بررسی RMSD و با میانگین‌گیری از تمامی این اعداد برای هر دو پروتئین، مقدار میانگین RMSD برای پروتئین شماره یک ۰/۲۱۹۵۵ نانومتر (۲/۱ آنگستروم) و برای پروتئین دوم ۰/۲۲۳۵۹ نانومتر (۲/۲ آنگستروم) است.

با توجه به نوسانات شدید ساختاری اسیدهای آمینه و پیک‌های این نمودارها به بررسی هر کدام از این اسیدهای آمینه و محل آنها درون ساختار پروتئین می‌پردازیم (جدول ۳).



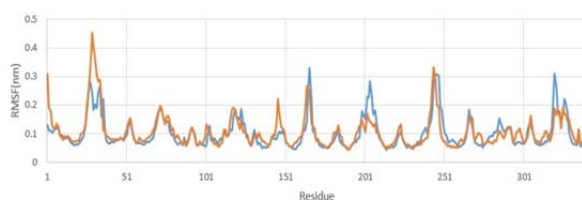
شکل ۶: ردیف اول A و B نشانگر تغییرات شماتیک حفره درون پروتئین اول و ردیف دوم C و D نشانگر این تغییرات برای پروتئین دوم هستند (با فرض یکسان بودن همه شرایط به غیر از اعمال شیب غلظت می‌توان این تغییرات را جهت‌گیری متفاوت پروتئین نسبت به شیب غلظت دانست).



نمودار ۳: نمودارهای RMSD و RMSF؛ دو نمودار سمت چپ مربوط به پروتئین اول و دو نمودار سمت راست مربوط به پروتئین دوم است.

و اسیدهای آمینه درگیر در نوسانات در پروتئین شماره دو متفاوت از پروتئین شماره یک هستند. اسید آمینه G119 در هر دو پروتئین دارای نوسان بسیار زیاد است که با توجه به محل قرارگیری اسید آمینه G119 که در محل لوپ L3 بوده و در منطقه حفاظت‌شده PEEGG واقع شده است که بخش مشترک بین اسید آمینه ۱۱۶-۱۲۰ در تمامی خانواده پورین است، انتظار چنین نقشی را از این اسید آمینه می‌توان داشت [12].

آنالیز دیگری که در راستای بررسی بسته‌بودن کانال انجام شد نقشه چگالی دوبعدی تعداد مولکول‌های آب درون جعبه شبیه‌سازی (شکل ۷) در کل زمان شبیه‌سازی است. میزان چگالی آب در راستای Z به صورت گرادیان رنگی نشان داده شده است و به خوبی نشان می‌دهد که در پروتئین بالا که نشانگر پروتئین ۲ است در محل گلوگاه میزان چگالی آب بسیار پایین است در صورتی که در پروتئین ۱ چگالی آب به نسبت بیشتر است و در مقایسه با نقشه چگالی یون در این دو ناحیه (شکل ۸) می‌توان بیان نمود که چگالی یون در این دو ناحیه نیز منطبق بر چگالی حضور آب است به صورتی که می‌توان گفت ما شاهد جریان آب و یون از کانال براساس شیب غلظت یون هستیم.



نمودار ۴: نمایش RMSF دو پروتئین؛ نمودار آبی مربوط به پروتئین اول و نمودار نارنجی مربوط به پروتئین دوم است.

جدول ۳: لیست و موقعیت اسیدهای آمینه دارای بیشترین نوسان در دو پروتئین در طول شبیه‌سازی

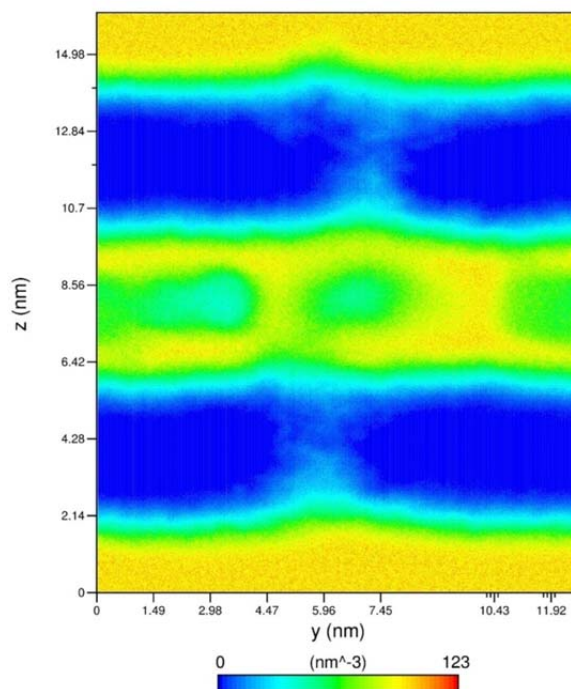
پروتئین شماره یک	پروتئین شماره دو
A28(L1), G34(L1), G72(L2), G119(L3), A123(L3), A166(L4), P204(L5), K244(L6), D266(T7), G285(L7), K305(T8), S320(L8), G327(L8)	A1(BETA), E29(L1), G34(L1), N52(T2), G72(L2), T77(L2), D92(T3), N101(BETA), G119(L3), G146(T4), D164(L4), A202(L5), K244(L6), G268(T7), K305(T8), N322(L8), G325(L8)

در مورد پروتئین شماره یک و دو نمودار RMSF مقداری متفاوت است با وجود پیک‌های مشابه، پیک‌های متفاوت نیز دیده می‌شود

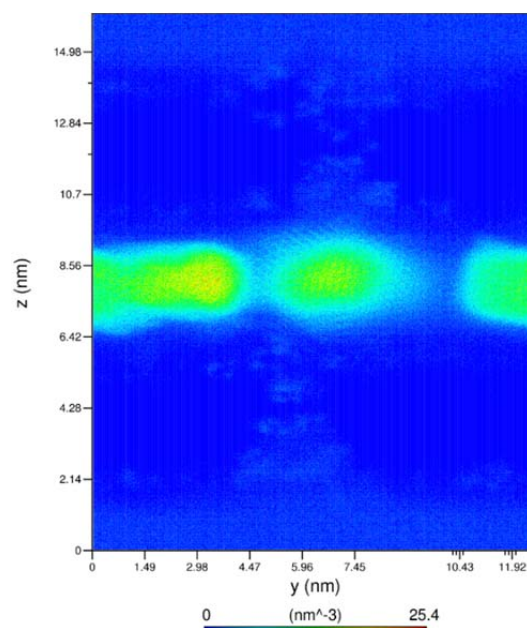
توسط پروتئین OmpF پروتئین‌ها به‌صورت موازی درون سیستم قرار گرفته‌اند که پس از ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی رفتار کانال‌ها و تغییرات آنها مورد بررسی قرار گرفت.

پروتئین OmpF دارای ۱۶ ساختار بتا غیرموازی و ۸ پیچ کوتاه و همچنین ۸ لوپ کوتاه است که از این ۸ لوپ‌های خارج سلولی (لوپ‌های ۱، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸) با هم به‌طور جزئی ورودی کانال را می‌بندند و لوپ ۳ در منطقه گذرگاهی یا انقباضی نقش ایفا می‌کند^[11, 26]. در نتایج اولیه و با مشاهده عبور یون مشخص شد که مسیر عبور یون برای پروتئین دوم کاملاً بسته شده است و برای پروتئین اول مسیر کاملاً باز است. آنالیز بعدی نتایج نشان داده ساختار دوم نیز برای پروتئین‌ها تا حدودی متفاوت از یکدیگر است به‌نحوی که در بازه ۱-۱۰ از اسیدهای آمینه در پروتئین ۱ تبدیل پیچ به خم را به‌صورت دائمی مشاهده می‌کنیم ولی در مورد پروتئین شماره دو در همین بازه این دو ساختار در طول مدت شبیه‌سازی به هم تبدیل می‌شوند و در پروتئین شماره یک در بازه اسیدهای آمینه ۱۰-۱۱ تبدیل آلفاهلیکس به خم دیده می‌شود در صورتی که در پروتئین دوم ساختار آلفاهلیکس به همان شکل بدون تغییر باقی می‌ماند. در مطالعاتی که توسط ایجاد جهش و آزمایشات تجربی روی پروتئین OmpF انجام شده لیستی از اسیدهای آمینه کلیدی در این پروتئین شامل E126، E127، R132، E121، E107، E117، D113، Y106، Y102، R82 و R42 تهیه شده است^[12] که در شبیه‌سازی که توسط رابرتسون و همکاران در دمای ۳۰۰ درجه کلوین و به‌کارگیری میدان الکتریکی و در دو حالت حضور و عدم حضور غلظت نمکی ۰/۵ مولار پتاسیم کلرید روی پروتئین OmpF صورت گرفته، نوسانات شدید در اسیدهای آمینه P116، G120 و G119 گزارش شده است^[12] در مطالعه دیگری که توسط فیلی و همکاران با روش‌های ایجاد جهش و مطالعه تئوری براونین دینامیک مولکولی در غلظت نمک یک میلی‌مولار سدیم کلرید انجام شده است به بررسی نقش اسیدهای آمینه D74، R82، R42، E117، D133، G131 و V18 در عبوردهی یون‌ها درون کانال می‌پردازد^[32]. در تحقیقی که توسط روکس و همکاران^[21] روی پروتئین OmpF در شرایط یک‌مولار متقارن از پتاسیم کلرید در دو طرف غشا و به‌مدت ۵ نانوثانیه برای درک بهتر نفوذپذیری انتخابی این کانال انجام شد، اسیدهای آمینه R270، D221، K219، E181، R140، R270، K16، E62، K46 و D97 و R140 به‌عنوان اسیدهای آمینه کلیدی معرفی شدند. در این تحقیق که برای اولین بار دو پروتئین OmpF در دو جهت‌گیری مختلف نسبت به شیب یونی در یک جعبه شبیه‌سازی قرار داده شدند و شرایط شبیه‌سازی بسیار مشابه با شرایط سلولی بوده، اسیدهای آمینه جدیدی شناسایی شدند که در مطالعات قبلی به آنها پرداخته نشده بود که از آن جمله اسیدهای آمینه A123، T122، D121، G119، F118 و T112 است. در بررسی نمودارهای مربوط به نوسانات و با برهم‌انداختن دو نمودار متوجه پیک‌های مشترک در هر دو نمودار پروتئین شماره یک و پروتئین شماره دو می‌شویم که خود گویای نقش موثر این اسیدهای آمینه در عبوردهی یون‌ها می‌تواند باشد.

این پیک‌های مشترک که نشانگر نوسانات شدید اسید آمینه و انعطاف‌پذیری آنها است مربوط به اسید آمینه‌های A123، G119، D92، G72، S53 و G34 است. علاوه بر این پیک‌های متفاوت و متمایز از یکدیگر نیز در نمودار RMSF نیز مشاهده می‌شود به‌طور مثال نوسانات اسیدهای آمینه S320 و P204 (L5 و L8) در پروتئین شماره یک، بسیار شدید هستند در حالی که در پروتئین



شکل ۷) نقشه چگالی آب در راستای محور Z در طول شبیه‌سازی است.



شکل ۸) نقشه چگالی یون‌ها در راستای محور Z در طول شبیه‌سازی است.

بحث و نتیجه‌گیری

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در راستای بررسی صحیح‌تر شرایط سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از چالش‌های محققان به‌کارگیری شرایطی مطابق با شرایط سلولی در راستای نتایج دقیق‌تر است^[6]، از آن جمله به‌کارگیری شرایط مرزی را می‌توان نام برد که با وجود یک سیستم در یک جعبه شبیه‌سازی سخت است. در این راستا راهکارهایی مانند به‌کارگیری میدان الکتریکی^[27-30] می‌تواند کارساز باشد. یکی دیگر از روش‌های مورد استفاده برای شبیه‌سازی بدون وجود میدان، استفاده از دو سیستم برای شبیه‌سازی^[31] در یک جعبه است. در این مورد پروتئین می‌تواند به دو صورت در جعبه قرار بگیرد پروتئین‌ها می‌توانند به‌صورت موازی یا غیرموازی باشند^[25] در این روش در راستای بررسی جهت‌دار بودن انتقال یونی

منابع

- 1- Mori T, Miyashita N, Im W, Feig M, Sugita Y. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(7 Pt B):1635-51.
- 2- Housden NG, Hopper JTS, Lukoyanova N, Rodriguez-Larrea D, Wojdyla JA, Klein A, et al. Intrinsically disordered protein threads through the bacterial outer-membrane porin OmpF. *Science*. 2013;340(6140):1570-4.
- 3- Patel DS, Wu EL, Klebba PE, Im W. Molecular Dynamics simulation studies of interactions of E. coli-K12 with OmpF in outer membranes: Effects of LPS structures on monoclonal antibodies binding. *Biophys J*. 2015;108(2 Suppl 1):249A.
- 4- Khalili-Araghi F, Gumbart J, Wen PC, Sotomayor M, Tajkhorshid E, Schulten K. Molecular dynamics simulations of membrane channels and transporters. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(2):128-37.
- 5- Ash WL, Zlomislic MR, Oloo EO, Peter Tieleman D. Computer simulations of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2004;1666(1-2):158-89.
- 6- Gumbart J, Wang Y, Aksimentiev A, Tajkhorshid E, Schulten K. Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(4):423-31.
- 7- Im W, Roux B. Ions and counterions in a biological channel: A molecular dynamics simulation of OmpF porin from *Escherichia coli* in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. *J Mol Biol*. 2002;319(5):1177-97.
- 8- Benz R, Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria, review on bacterial porins. *Eur J Biochem*. 1988;176(1):1-19.
- 9- Jap BK, Walian PJ. Biophysics of the structure and function of porins. *Q Rev Biophys*. 1990;23(4):367-403.
- 10- Nikaido H. Transport across the bacterial outer membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 1993;25(6):581-9.
- 11- Cowan SW, Garavito RM, Jansonius JN, Jenkins JA, Karlsson R, König N, et al. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure*. 1995;3(10):1041-50.
- 12- Robertson KM, Tieleman DP. Molecular basis of voltage gating of OmpF porin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(5):517-23.
- 13- Dutzler R, Rummel G, Albertí S, Hernández-Allés S, Phale P, Rosenbusch J, et al. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*. 1999;7(4):425-34.
- 14- Benz R, Schmid A, Hancock RE. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J Bacteriol*. 1985;162(2):722-7.
- 15- Saint N, Lou KL, Widmer C, Luckey M, Schirmer T, Rosenbusch JP. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20676-80.
- 16- Suenaga A, Komeiji Y, Uebayasi M, Meguro T, Saito M, Yamato I. Computational observation of an ion permeation through a channel protein. *Biosci Rep*. 1998;18(1):39-48.
- 17- Tieleman DP, Berendsen HJ. A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated

شماره دو نوسانات بسیار کمتر است. نوسان مربوط به اسیدهای آمینه ۱۹-۳۳ (L1) در پروتئین دوم دارای یک پیک بسیار بزرگ است که در پروتئین شماره یک به شکل دو پیک با شدت کمتر وجود دارد یا در پروتئین شماره دو پیک مربوط اسید آمینه ۱۴۵-۱۵۱ (T4) وجود دارد که در پروتئین شماره یک دیده نمی‌شود. با توجه به هم‌پوشانی غالب پیک‌ها در نمودارهای دو پروتئین، اختلافاتی مانند وجود پیک‌های واضحی در اسید آمینه ۲۹ (L1) و اسید آمینه ۱۴۶ (T4) و اسید آمینه شماره ۱ (ساختار بتا) و مقایسه با همین منطقه در پروتئین شماره یک می‌توان نتیجه گرفت که شاید این سه منطقه نقش بیشتری در بسته شدن کانال دارند و این نوسانات شدید می‌توانند متاثر از وجود نقش عملکردی آن ناحیه در بسته شدن کانال باشد که در پروتئین دیگر به علت بازبودن مسیر عبوری یون‌ها این نوسانات ضروری نیست. به طور عکس می‌توان در مورد پیک‌های متفاوت در پروتئین شماره ۱ صحبت کرد که مربوط به اسید آمینه ۲۰۴ (L5) و اسید آمینه ۳۲۰ (L8) است که می‌توان به نقش مهم این قسمت‌ها در انتقال یونی صحبت نمود که پیش‌تر شاید چندان بر آن تاکید نشده است با توجه به مشاهده این پیک‌ها در پروتئین شماره یک که از لحاظ انتقال یونی فعال است و مقدار کمتر نوسان این اسیدهای آمینه در پروتئین شماره دو می‌توان به این نتیجه رسید که لوپ L5 و لوپ L8 می‌توانند در فرایند انتقال یونی از غشا و از این کانال بسیار موثر باشند.

با توجه به یکسان بودن کلیه عوامل برای هر دو پروتئین (به غیر از جهت‌گیری آنها نسبت به شیب غلظت یونی) می‌توان به این نتیجه رسید که پروتئین OmpF پروتئینی جهت‌دار در انتقال یون‌ها است و قرارگیری خاصی که در آن جهت‌گیری، در جهت شیب غلظت درست نباشد منجر به بسته شدن کانال و عدم انتقال یون می‌شود که خود نیز می‌تواند یک مکانیزم برای ممانعت در راستای از دست دادن یون‌ها در جهت معکوس برای باکتری را شامل شود. در مطالعات نسترویچ و همکاران^[20]، گزارش شده که جهت کانال در عبور یون‌ها بسیار مهم است. در طبیعت پروتئین OmpF به شکل پروتئین شماره یک در غشا قرار گرفته است^[33] که با توجه به بسته شدن کانال شماره دو، جهت‌گیری پروتئین شماره یک را می‌توان به عنوان جهت‌گیری درست پیشنهاد داد.

پروتئین شماره یک در جهت‌گیری درست (همان‌گونه که در سلول قرار دارد) درون جعبه شبیه‌سازی قرار گرفته و با توجه به غلظت ده برابر یون‌های پتاسیم در خارج سلول، شرایط شبیه‌سازی عیناً شبیه سلول در نظر گرفته شده است که همان‌گونه نتایج نشان می‌دهد تنها در این پروتئین انتقال یونی مشاهده می‌شود و در پروتئین شماره دو هیچ نوع عبور یونی دیده نشده است. علاوه بر عبور یون، تغییرات ساختاری، نمودارهای نوسانات اسیدهای آمینه نیز برای دو پروتئین در مدت شبیه‌سازی متفاوت بود که خود گواه دیگری بر ایجاد تغییرات در راستای عبور یون در ساختار کانال است و با توجه به شرایط شبیه‌سازی اسیدهای آمینه جدیدی را که در باز و بسته بودن کانال و همچنین در عبور یون نقش دارند پیشنهاد شد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تابیدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سمیرا پولکچی صابر (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۵۰٪)؛ سیدشهریار عرب (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪) **منابع مالی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

- simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(7 Pt B):1741-52.
- 26- Ionescu SA, Lee S, Housden NG, Kaminska R, Kleanthous C, Bayley H. Orientation of the OmpF porin in planar lipid bilayers. *Chembiochem*. 2017;18(6):554-62.
- 27- Pezeshki S, Chimere C, Bessonov AN, Winterhalter M, Kleinekathöfer U. Understanding ion conductance on a molecular level: An all-atom modeling of the bacterial porin OmpF. *Biophys J*. 2009;97(7):1898-906.
- 28- Delemotte L, Dehez F, Treptow W, Tarek M. Modeling membranes under a transmembrane potential. *J Phys Chem B*. 2008;112(18):5547-50.
- 29- Gumbart J, Khalili Araghi F, Sotomayor M, Roux B. Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012;1818(2):294-302.
- 30- Roux B. The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophys J*. 2008;95(9):4205-16.
- 31- Sachs JN, Crozier PS, Woolf TB. Atomistic simulations of biologically realistic transmembrane potential gradients. *J Chem Phys*. 2004;121(22):10847-51.
- 32- Phale PS, Philippsen A, Widmer C, Phale VP, Rosenbusch JP, Schirmer T. Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry*. 2001;40(21):6319-25.
- 33- Niramitrannon J, Sansom MS, Pongprayoon P. Why do the outer membrane proteins OmpF from *E. coli* and OprP from *P. aeruginosa* prefer trimers? simulation studies. *J Mol Graph Model*. 2016;65:1-7.
- palmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys J*. 1998;74(6):2786-801.
- 18- Tieleman DP, Berendsen HJ, Sansom MS. An alamethicin channel in a lipid bilayer: Molecular dynamics simulations. *Biophys J*. 1999;76(4):1757-69.
- 19- Tieleman DP, Forrest LR, Sansom MS, Berendsen HJ. Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, influenza M2, and alamethicin systems: Molecular dynamics simulations. *Biochemistry*. 1998;37(50):17554-61.
- 20- Nestorovich EM, Rostovtseva TK, Bezrukov SM. Residue ionization and ion transport through OmpF channels. *Biophys J*. 2003;85(6):3718-29.
- 21- Im W, Roux B. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: A theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J Mol Biol*. 2002;322(4):851-69.
- 22- Khalili Araghi F, Ziervogel B, Gumbart JC, Roux B. Molecular dynamics simulations of membrane proteins under asymmetric ionic concentrations. *J Gen Physiol*. 2013;142(4):465-75.
- 23- Pellegrini-Calace M, Maiwald T, Thornton JM. PoreWalker: A novel tool for the identification and characterization of channels in transmembrane proteins from their three-dimensional structure. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(7):e1000440.
- 24- Petrek M, Otyepka M, Banás P, Kosinová P, Koca J, Damborský J. CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:316.
- 25- Kutzner C, Köpfer DA, Machtens JP, De Groot BL, Song C, Zachariae U. Insights into the function of ion channels by computational electrophysiology