



Országos Tudományos Diákköri Konferencia 2012

Szelektív iontranszport számítása póruson keresztül a Nernst-Planck egyenlethez csatolt Lokális Egyensúlyi Monte Carlo szimulációval

Készítette: Kovács Róbert
Vegyésszmérnök mesterképzés, I. évfolyam

Témavezető: Dr. Boda Dezső

Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Intézeti Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. Diffúziós transzport	3
1.2. Ioncsatornák	4
1.3. A Ca-csatorna bemutatása	8
1.4. A Ca-csatorna korábbi vizsgálatai	11
1.5. A diffúzó vizsgálatára alkalmas módszerek	14
2. Modell	17
3. Módszer	19
3.1. Lokális Egyensúlyi Monte Carlo szimulációk	19
3.2. Az iterációs technika	22
4. Eredmények	25
4.1. A diffúziós együtthatók meghatározása	26
4.2. A tömbfázis méretétől való függés	28
4.3. Az elemi cellák méretének hatása	30
4.4. Az átmeneti tartomány méretének hatása	32
4.5. Na^+ vs. Ca^{2+} móltörtkísérlet	34
4.6. Feszültség-áram karakterisztika	37
5. Összefoglalás	40
Irodalomjegyzék	42

Jelölésjegyzék

AMFE	Anomális móltörtfüggés, (<i>Anomalous Mole Fraction Effect</i>)
BD	Brown-dinamika
CSC	Töltés-térfogat versengés, (<i>Charge Space Competition</i>)
DFT	Sűrűségfunkcionál-elmélet, (<i>Density Functional Theory</i>)
DMC	Dinamikus Monte Carlo
GCMC	Nagykanonikus Monte Carlo
ICC	Indukált töltésszámítási módszer, (<i>Induced Charge Computation</i>)
INP	Integrált Nernst-Planck
LEMC	Lokális Egyensúlyi Monte Carlo
MC	Monte Carlo
MSA	Gömbi közelítés módszere, (<i>Mean Spherical Approximation</i>)
NP	Nernst-Planck
PB	Poisson-Boltzmann
PET	Poli-etilén-tereftalát
PM	Primitív modell
PNP	Poisson-Nernst-Planck
RyR	Rianodin Receptor

1. fejezet

Bevezetés

1.1. Diffúziós transzport

A dolgozatban egy pórus, mint termodinamikai rendszer vizsgálatával foglalkozunk. Fontos tisztázni az alapvető fogalmakat, amelyek a rendszer viselkedésének pontos megértéséhez szükségesek. Időbeli viselkedés szempontjából egy termodinamikai rendszer lehet időben állandó vagy változó. Időben állandó rendszer lehet egyensúlyban, vagy stacionárius állapotban. A magukra hagyott nemegyensúlyi termodinamikai rendszerek mindig az egyensúly elérésére törekednek, melynek során az intenzív állapotjelzői (pl. kémiai potenciál) állandóvá válnak. Amennyiben az intenzív állapotjelzők (hőmérséklet, nyomás, kémiai potenciál) térbeli eloszlása nem homogén, a rendszerben a kiegyenlítőds folyamatok indulnak el. Ez az extenzív mennyiségek áramlását idézi elő. A folyamatokat, melynek során energia, anyag, töltés, vagy valamilyen más extenzív jellegű mennyiség az egyik helyről egy másikra jut, transzportfolyamatoknak nevezzük. Ezen rendszereknél alapvető fontosságú az extenzív mennyiség árama, és az áramot létrehozó termodinamikai hajtóerő. Amennyiben nem vagyunk nagyon távol az egyensúlytól, ezen két mennyiség között lineáris összefüggés van. Stacionárius áramlás akkor alakul ki, ha a rendszerben időbeli változások nem következnek be. Ehhez természetesen mesterségesen fenntartott a hajtóerő szükséges.

A transzportfolyamatok történhetnek például membránon keresztül. A membrán lehet biológiai (sejtfal) vagy technológiai egység. A biológiai esetet később részletesen ismertetem.

A membrántranszportnak, mint folyamatnak, fontos felhasználási területe a zeolitok ipari alkalmazása. Ezekben az ásványokban molekulárisan kötött víz van jelen, melyet hevítéssel el lehet távolítani, a vízmolekulák helyén pedig mikropórusok, lyukak alakulnak ki. Így a zeolit molekulaszűrőként viselkedik, a jellemző lyukméretnél nagyobb ionokat, vagy molekulákat visszatartja, a kisebbeket befogadja. Zeolitok alkalmazása a mindennapi életben is megszokott, legyen szó vízlágyításról, szénhidrogén elválasztásról, szaghatás csökkentésről, vagy akár az emberi szervezet immunerősítő hatásáról.

Hasonló elven működő anyagi rendszer az aktív szén is. A felhasználási lehetőségek a

szén nem szelektív adszorbeáló képességén alapulnak, mivel a felülettel érintkező fluid fázis molekuláit magához kapcsolja. Annál könnyebben köti magához a szén a molekulát minnél nagyobb a molekulásúlya. A szénvegyület aktív helyeinek növelésével lehetséges az adszorbeálás hatásfokának fokozása, mivel ezeken a helyeken telítetlen szénatomhoz kapcsolódhat a belépő molekula. Általános eljárás az aktív helyek számának növelésére a túlhevített vízgőzös kezelés. Ezenkívül lehetséges a kémiai (pl. foszforsavas) reagáltatás, mely során a kiindulási anyag „elszenesedik”. Az aktív szén alkalmas szag- és ízanyagok eltávolítására, gázelegyek összetevőinek szétválasztására.

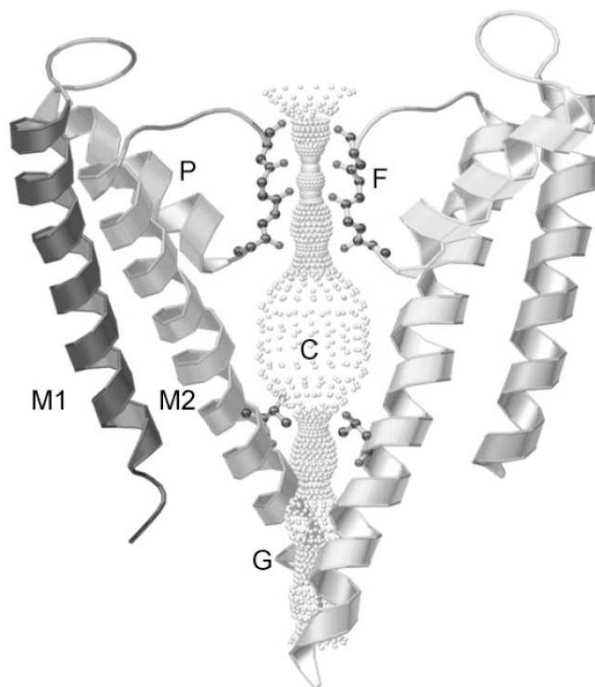
A fenti esetben a membránt egy porózus anyag alkotja. Egy másik esetben a membrán maga impermeábilis (pl. a lipidréteg a biológiai membránok esetében), amiben az ionok vagy molekulák számára áteresztő nanopórusok helyezkednek el (pl. az ioncsatornák a biológiai membránok esetében). A nanopórusokat elő lehet állítani mesterséges módon, amik a transzportfolyamatok alkalmazási lehetőségének szempontjából fontos szerepet tölthetnek be, így széleskörű kutatások tárgyát képezik. Alkalmasak pl. egyenirányításra, ami miatt logikai áramkörök alapegységeként használhatóak. A szintetikus nanopórusok előállítása lehetséges például egy PET (poli-etilén-tereftalát) fólia nehézionokkal történő bombázásával. Ezután savas kezeléssel a fólián kialakított szűk pórust kitágítják, melynek eredményeként stabil kúp alakú nanopórust kapunk, mely legszűkebb részén körülbelül 50 Å átmérőjű.¹

Hasonló geometriájú természetes nanopórus az ioncsatorna is. Méretük kisebb (4-20 Å átmérő és pár 10 Å hosszúság), mint a mesterségesen előállítható nanopórusoké. Ezenkívül elmondható, hogy a szűk geometria, valamint az elektromos töltés jelenléte miatt rendkívül ionszelektívek.

1.2. Ioncsatornák

Az élő szervezetben megtalálható természetes nanopórusok, azaz ioncsatornák mintául szolgálnak a nanopóruson keresztül lezajló transzport jelenségének megértéséhez. Mivel a sejtek kettős lipidréteggel vannak elhatárolva a környezetüktől, ahhoz hogy működőképeseek legyenek, szükség van egy átjáróra, melyen keresztül a fiziológiailag fontos ionok (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) vándorolni tudnak.

Az ioncsatornák szerkezetére vonatkozó információink meglehetősen szűkösek, tudniillik a felépítésüket az őket alkotó aminosavak sorrendje határozza meg. A részletes aminosavsorrend meghatározása mindennapos feladat. Azt azonban, hogy az aminosavlánc milyen három dimenziós szerkezetbe tekeredik fel, nem egyszerű meghatározni, amennyiben a fehérje nagyon nagy. Membránfehérjék (ebbe az osztályba tartoznak az ioncsatornák) esetén a feladat különösen nehéz, mivel bonyolult a fehérjét kristályosítani. Ellenpélda az 1.1 ábrán látható káliumcsatorna, mely kikristályosítható, és szerkezete röntgendiffrakciós technikával meghatározható.



1.1. ábra. A KcsA Kálium-csatorna sematikus szerkezete Doyle és *mtsai*.² röntgendiffrakciós mérései alapján (forrás: Tieleman és *mtsai*.³). A betűk jelentése a következő: F: szelektív szűrő, C: vízzel töltött üreg, P: a szűrőt határoló leágazás („*P-loop*”), G: „*gate*”, M1, M2: α -hélixek.

Egy ioncsatorna jellemzően két állapotban lehet: nyitott vagy zárt. Nyugalmi állapot esetén a membránban található legtöbb ioncsatorna zárt helyzetben van. Ahhoz hogy iontranszport indulhasson meg, általában szükséges egy külső inger ami a csatornát nyitja. Ez általában elektromos vagy kémiai jel, illetve mechanikai hatás (mint például a hallószervben lévő receptorsejtek esetében). Zárt állapotban a csatornában nincs anyagtranszport.

Az ioncsatornák fő csoportját képezik a feszültségvezérelt ioncsatornák, amelyeknek zárt vagy nyitott állapota a membránpotenciál megváltozásától függ. Ilyen esetben egy elektromos ingerület, azaz akciós potenciál hatására nyit ki a csatorna. Ebbe a csoportba tartozik a kutatócsoport által vizsgált kalcium- és nátriumcsatorna is (Ca- és Na-csatorna).

Az ioncsatornák másik legfontosabb tulajdonsága az ionokra vonatkoztatott szelektivitás. Ez azt jelenti, hogy ha a csatornák egy bizonyos ionra szelektívek, ezt az iont nagyobb mennyiségben engedik át mint a többit. Fontos megjegyezni, hogy a szelektivitás minden esetben csak valószínűségi jellegű koncepció, valamint hogy szelektivitásról csak nyitott állapotú csatorna esetében beszélünk. A jelenséget, melyet csak legalább két különböző ion jelenlétében tapasztalunk, két oldalról lehet megközelíteni: egyensúlyi illetve dinamikai szelektivitást definiálhatunk.

Egyensúlyi szelektivitás. Egyensúlyi szelektivitásról akkor beszélünk amikor a rendszerünkben lévő ionok eltérő valószínűséggel kötődnek meg egy kötőhelyen. A kötőhely értelmezése kétféle lehet, egyrésztől beszélhetünk két molekularész kémiai kapcsolódásáról, amelyet kémiai kötésnek nevezünk. Ilyenkor a lezajló kémiai reakció az asszociáció (kapcsolódás) - disszociáció (kapcsolat megbontása) mechanizmussal analóg módon értelmezhető. Azonban az ioncsatorna kötőhelyei fizikai erő segítségével lokalizálják az iont. Ebben az esetben a kötőhelynek a térben való definiálása meglehetősen szubjektív.

Esetünkben az ioncsatorna azt a részét tekintjük kötőhelynek, ahol az ionok koncentrációja jóval nagyobb mint a tömbfázis ionkoncentrációja (ez a szelektív szűrő). Tömbfázisnak nevezzük a csatornával kapcsolatban álló, konstans ionkoncentrációval és kémiai potenciállal rendelkező nagy méretű térrészt. Jellemzően egy ioncsatorna két tömbfázissal áll kapcsolatban, és (külső elektromos tér hiányában) a két különböző ionkoncentráció indukálja a csatornán keresztüli iontranszportot. Egyensúlyban az ion kötőhelyre vonatkozó kötődésének lehetősége a következő egyenlettel jellemezhető:^{4,5}

$$\ln \left(\frac{c^\alpha(\mathbf{r})}{c^\alpha(\mathbf{B})} \right) = - \frac{\mu^{\alpha,\text{EX}}(\mathbf{r}) - \mu^{\alpha,\text{EX}}(\mathbf{B})}{kT} = - \frac{\Delta\mu^{\alpha,\text{EX}}(\mathbf{r})}{kT}. \quad (1.1)$$

A $c^\alpha(\mathbf{r})$ a kötőhely közelében, míg a $c^\alpha(\mathbf{B})$ a tömbfázisban mért koncentráció értéket jelenti (az α típusú ionra). Az egyenletben szereplő $\Delta\mu^{\alpha,\text{EX}}(\mathbf{r})$ érték pedig a csatornában és a tömbfázisban mért többlet kémiai potenciál különbségét adja meg. További paraméter a Boltzmann-állandó és a hőmérséklet szorzata (kT). Ez az egyenlet azt fejezi ki, hogy a kötőhelyen egy adott ion akkor kötődik meg a tömbfázisbeli koncentrációnál nagyobb mennyiségben, ha egy energetikai előny erre lehetőséget ad. Az kalciumcsatornák esetében pl. a szelektív szűrőben negatív töltésű aminosavak találhatók, ami miatt a csatorna kationokra szelektív lesz. A kérdés az, hogy kalciumra vagy nátriumra.

Ez tulajdonképpen egy szelektív adszorpció, ami egyensúlyi esetben is fennáll, ezért nevezük ezt egyensúlyi szelektivitásnak. Az egyensúlyi szelektivitás azonban értelmezhető nem-egyensúlyi esetre is. Ilyenkor egyszerűen ki kell számolni, mennyi ion tartózkodik a kötőhelyen.

Dinamikai szelektivitás. Az ioncsatornák esetében a dinamikai szelektivitást az ionok fluxusainak (egységnyi idő alatt átáramló anyagmennyiség) hányadosával értelmezzük. Mivel a kísérleti adatokból csak az ioncsatornában folyó teljes elektromos áramról van információnk, modellezési feladatot jelent két ion fluxusának szétválasztása. Ha feltesszük, hogy a transzport diffúzióval játszódik le a csatornán keresztül, az értelmezést az empirikus Nernst-Planck (NP) összefüggés felírásával szükséges kezdenünk:

$$-kT\mathbf{j}^\alpha(\mathbf{r}) = D^\alpha(\mathbf{r})c^\alpha(\mathbf{r})\nabla\mu^\alpha(\mathbf{r}), \quad (1.2)$$

ahol

$$\mu^\alpha(\mathbf{r}) = \mu_c^\alpha(\mathbf{r}) + q^\alpha \Phi(\mathbf{r}) \quad (1.3)$$

az elektrokémiai potenciál. A $\mathbf{j}^\alpha(\mathbf{r})$ az α -adik ionra vonatkozó áramsűrűség, $D^\alpha(\mathbf{r})$ a diffúziós együttható, $c^\alpha(\mathbf{r})$ a koncentráció és $\nabla\mu^\alpha(\mathbf{r})$ az elektrokémiai potenciál gradiense, azaz a termodinamikai hajtóerő. Az 1.3 egyenlet jobb oldali két tagját felfoghatjuk mint az elektrokémiai potenciált meghatározó kémiai ($\mu_c^\alpha(\mathbf{r})$) és elektromos ($q^\alpha\Phi(\mathbf{r})$) munkát, mely ahhoz szükséges, hogy egy iont vákuumból adott $\mathbf{r}$ pozícióba hozzuk. (q^ϕ az ϕ típusú ion töltése, $\Phi(\mathbf{r})$ pedig az átlagos elektromos potenciálprofil). Az 1.3 egyenletben bemutatott elektrokémiai potenciál ($\mu^\alpha(\mathbf{r})$) tagjai csak formális úton választhatóak szét. Ha azonban $\Phi(\mathbf{r})$ meghatározható a szimuláció során, a $\mu_c^\alpha(\mathbf{r})$ mennyiség kifejezhető a 1.3 egyenletből, ha $\mu^\alpha(\mathbf{r})$ -t ismerjük.

A csatornán folyó teljes elektromos áram:

$$I = \sum_{\alpha} q^\alpha J^\alpha, \quad (1.4)$$

ahol J^α pedig a z irányú, $A(z)$ keresztmetszeten keresztül haladó teljes fluxus az adott α típusú ionra:

$$J^\alpha = \int_{A(z)} \mathbf{j}^\alpha \cdot \mathbf{n}_z da = \int_{A(z)} (j^\alpha)_z da. \quad (1.5)$$

Boda és mtsai. korábbi szimulációikban^{6–15} egyensúlyi Monte Carlo (MC) szimulációkkal dolgoztak, a fluxust közvetlenül nem számolták. Hogy mégis tudjanak a csatornán át folyó áramra következtetéseket levonni az eredményeikből, a következő eljárást javasolták. Feltették, hogy a membrán két oldalán ugyanolyan összetételű elektrolit található, és hogy a potenciálkülönbség a membrán két oldala között ($\Delta\Phi$) kicsi. Mivel tudjuk hogy a csatornán keresztüli csak z irányban történik transzport, feltehetjük hogy az elektrokémiai potenciál sugárirányban (r) konstans. Ugyanezt a feltételezés alkalmazva a diffúziós állandókra, az NP egyenletnek a keresztmetszet feletti integrálásával a rendszer teljes fluxusát kapjuk meg (a csatorna forgásszimmetriáját kihasználva):

$$-kTJ^\alpha = D^\alpha(z) \frac{d\mu^\alpha(z)}{dz} \int_0^{R(z)} c^\alpha(r, z) 2\pi r dr = D^\alpha(z) \frac{d\mu^\alpha(z)}{dz} n^\alpha(z), \quad (1.6)$$

ahol $R(z)$ a csatorna sugara z -ben és $n^\alpha(z)$ az ionok tengelymenti vonalsűrűsége (egységnyi z szakaszra eső ionok száma). Ezután leosztunk $D^\alpha(z)n^\alpha(z)$ -vel és a jobb oldal tömbfázisától a bal oldal tömbfázisáig integrálunk:

$$-kTJ^\alpha \int_{z_L}^{z_R} \frac{dz}{D^\alpha(z)n^\alpha(z)} = \int_{z_L}^{z_R} d\mu^\alpha(z) = \mu^\alpha(z_R) - \mu^\alpha(z_L) = q^\alpha \Delta\Phi. \quad (1.7)$$

Ez az integrált Nernst-Planck (INP) egyenlet. Az utolsó átalakításnál felhasználtuk, hogy a két tömbfázisban ugyanolyan összetételű elektrolitok vannak jelen (a μ_c^α kémiai potenciálok

megegyeznek). Ekkor az ionok árama csak a $\Delta\Phi$ miatt jelenik meg. Ha feltesszük, hogy a csatorna sokkal nagyobb ellenállású, mint a tömbfázis, akkor elegendő a csatornára integrálni ($z_L = -H/2$ és $z_R = H/2$, ahol H a csatorna hossza). Feltéve továbbá, hogy a diffúziós együttható a csatornában állandó, akkor a fluxus kifejezhető:

$$J^\alpha = -\frac{D^\alpha q^\alpha \Delta\Phi}{kT} \left(\int_{-H/2}^{H/2} \frac{dz}{n^\alpha(z)} \right)^{-1} = -\frac{D^\alpha q^\alpha \Delta\Phi}{kT} \eta^\alpha, \quad (1.8)$$

ahol

$$\eta^\alpha = \left(\int_{-H/2}^{H/2} \frac{dz}{n^\alpha(z)} \right)^{-1}. \quad (1.9)$$

Látható, hogy ez a kifejezés csak az egyensúlyi szimulációból kapott ionra jellemző koncentrácioprofiltól függ. A fluxus tehát részben attól függ, hogy mennyi részecske van jelen (η^α), részben attól, hogy ezek mennyire mozgékonyak (D^α). Ez utóbbi az NP egyenletben egy illeszthető paraméter, mivel a D^α értékéről a csatornában nem tudunk semmit, így azt kísérleti adatokhoz vagy más szimulációs eredményekhez illeszthetjük.

A dinamikai szelektivitás tehát leírható a következő egyenlettel:

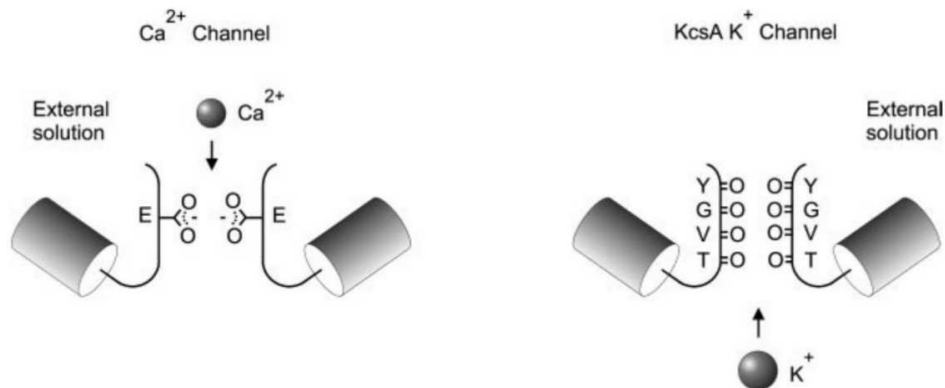
$$\frac{J^\alpha}{J^\beta} = \frac{q^\alpha}{q^\beta} \frac{D^\alpha}{D^\beta} \frac{\eta^\alpha}{\eta^\beta}. \quad (1.10)$$

1.3. A Ca-csatorna bemutatása

A dolgozatban a kalciumcsatornán keresztül folyó transzport részletes vizsgálata a célunk. A kalciumcsatornáknak pl. az idegrendszer működésében és az izomösszehúzódás generálásában van alapvető szerepe. Az idegvégződésnél található Ca-csatorna az idegroston (axon) keresztül érkező elektromos ingerület hatására kinyit, és neurotranszmittereket szabadít fel. Így a két idegrost között az információ kémiai formában halad, majd a másik axonon elektromos ingerületté alakul vissza.

Amikor ez az elektromos jel az izomszövethez ér, nyitja az izomsejt membránjában lévő L-típusú Ca-csatornákat, amiken keresztül Ca^{2+} ionok áramolnak a sejtbe. Ezek az ionok nyitják a szarkoplazmatikus retikulum (ez egy tárolórekesz a sejtben, ami Ca^{2+} -ionokat tárol) membránjában lévő Ryanodin Receptor (RyR) Ca-csatornákat, amik nagy mennyiségben engednek Ca^{2+} -ionokat a sejtbe. Ezek a Ca^{2+} -ionok generálják aztán az izomösszehúzódást.

A dolgozatban egy modellcsatornával foglalkozunk, amit Boda és *mtsai*.⁶⁻¹⁵ fejlesztettek ki, és ami az L-típusú és a RyR Ca-csatornának egyaránt jó modellje lehet attól függően, hogy hogy választjuk meg a modell paramétereit (pl. a pórus sugarát). A csatorna vizsgálatához először bemutatom a legfontosabb kísérleteket, melyek alapján következtetni lehet a rendszer viselkedésére. Ezután bemutatom a Ca-csatorna leírására létező legfontosabb modelleket, és a választott modellt részletesen elemzem. A modell megoldásához megfelelő módszert választok



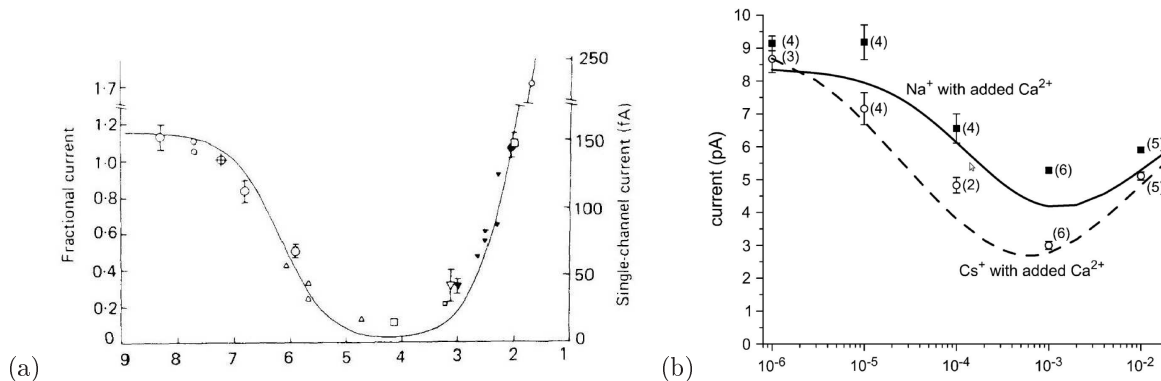
1.2. ábra. Sematikus vázlat két ioncsatornáról, bal oldalon a Ca-csatorna, amelynek oldalláncai belógnak a szűrőbe, jobb oldalon a K-csatorna, amelynek estében a karbonil-csoportok oxigénjei határolják a szűrőt.¹⁶

ki, és az részletesen bemutatom a módszer működését, az eredmények függését a különböző modell-paraméterektől, és végül a Ca vs. Na szelektivitásra vonatkozó eredményeinket.

A csatorna szerkezete. Mivel a Ca-csatornák részletes szerkezetét nem ismerjük, a szimulációs vizsgálathoz valamilyen egyszerű modellre van szükség, ami viszont tartalmazza mindazon ismereteket, amiket tudunk a csatornáról. A K-csatorna és egyéb csatornák ismert szerkezete azt mutatja, hogy az ioncsatorna fehérjéje α -hélixek formájában helyezkedik el a membránban. Ezek alakítják ki a hidrofil pórust, amely lehetővé teszi az ionok transzportját. Amit tudunk továbbá, az az, hogy a szelektív szűrőben milyen aminosavak találhatók. Az aminosavakon található oldalláncok a Ca-csatorna esetében a pórus közepe felé néznek, és pont ezek az oldalláncok határozzák meg az ioncsatorna szelektivitását (lásd. 1.2 ábra). A Ca-csatorna esetében az oldalláncok glutaminsavak (E), melyből összesen 4 darab (EEEE) található a szűrőben. Az oldalláncok végén karboxilcsoportok (COO^-) helyezkednek el, melyek kis pH-n deprotonált formában vannak jelen. Így összesen $-4e$ töltéssel rendelkezik a szelektív szűrő (e az elemi töltés), emiatt pozitív töltésű kationok bekötődése előnyben részesített, azaz kationszelektív a rendszer.

A kísérletek általában a csatornán át folyó áram mérésén alapulnak. Ehhez szükség van arra, hogy a csatornát tartalmazó membrán két oldalán különböző összetételű, koncentrációjú elektrolit legyen jelen és arra hogy ebben a két elektrolitban elektródákat helyezzünk el.

A mérés történhet olyan egyszerű módon is, hogy egy sejtbe mikroelektrodát dugnak és vizsgálják az elektródán keresztül folyó áramot. Másik lehetőség, ha egy fallal határolt, két tömbfázist tartalmazó rendszert analizálunk. A mérőcellában két térrészt egy fal választ el egymástól, amin kicsi lyuk van. A lyukra egy membránréteget „festenek”, amihez külső tér hatására az ioncsatornák közel diffundálnak, majd beleépülnek a membránba maguktól, mivel az a minimum energiájú állapot. A két térrészbe elektródákat helyezve a mérőcella készen áll.

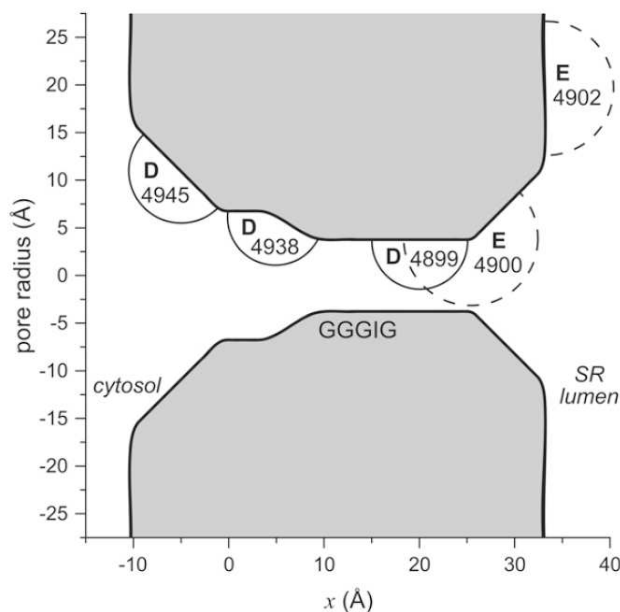


1.3. ábra. (a) Almers és McCleskey^{17,18} AMFE kísérlete. (b) Dirk Gillespie AMFE szimulációs eredménye, a 1.4 ábrán látható modell felhasználásával. A méréseket Meissner és mtsai. végezték. (A baloldali ábra abszcisszáján az adagolt Ca^{2+} negatív logaritmus, a jobb oldalién az adagolt koncentráció látható.)

A kalciumcsatornákra vonatkozó mérések közül a legjellemzőbb az anomális móltörtfüggés („*Anomalous Mole Fraction Effect*”, AMFE) jelensége. A legismertebb mérési eredmény Almers és McCleskey^{17,18} nevéhez fűződik, amit az L-típusú Ca-csatornára végeztek el. Mindkét oldalon 32 mM-os NaCl oldat helyezkedik el, a bal oldalon pedig gyakorlatilag nincs Ca^{2+} . A jobb oldalhoz ezután folyamatosan adagolnak CaCl_2 -ot és mérik a jobboldali tömbfázisban lévő Ca^{2+} koncentráció függvényében a csatornán át folyó áramot. A kísérleti eredmény az 1.3a ábrán látható.

Az abszcissza reprezentálja a sejten kívüli térrészhez adagolt Ca^{2+} koncentrációjának negatív 10-es alapú logaritmusát. A koncentráció függvényében vizsgáljuk a sejtbe irányuló áram nagyságát. A bal oldalról elindulva, azaz 10^{-9} M-os Ca^{2+} koncentráció esetén jellemzően a csatornában lévő Na^+ ionok szolgáltatják az áramot. Ha növelni kezdjük a Ca^{2+} -ion koncentrációját a kísérleti elrendezés jobb oldalán, a Ca^{2+} ionok blokkolni kezdik a Na^+ -ionok áramát. IC_{50} -nek azt az adagolt Ca^{2+} koncentrációt nevezzük, amikor a mért áram, a Ca^{2+} nélküli rendszerhez viszonyított áramnak éppen a fele. Ebben a kísérletben 10^{-6} M-os Ca^{2+} koncentrációnál látható az IC_{50} érték. Ha a blokkolás jelensége után tovább adagoljuk a divalens iont, az áram egy minimum után újra nő; azt az áramot feltehetően már a Ca^{2+} ionok vezetik. A jelenség magyarázata, hogy $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-6}$ M koncentráció körül a szűrőben a Ca^{2+} -ion kiszorítják a szűrőből a Na^+ -ionokat. Ekkor a Na^+ már nem vezet, a Ca^{2+} meg még nem vezet, mivel nagyon kicsi a koncentrációja a tömbfázisban.

Az AMFE jelensége nem csak az L-típusú, hanem a RyR Ca-csatornára is észlelhető.^{4,19} A 1.3b ábra mutatja ugyanezt a jelenséget a RyR Ca-csatorna esetében. Ezeket a mérési adatokat Dirk Gillespie javaslatára Meissner és mtsai. határozták meg. A következő szakaszban bemutatandó Ca-csatorna modellt használva Dirk Gillespie számtalan kísérleti görbét megfelelően reprodukált és a 1.3b ábrán látható AMFE-görbét azelőtt kapta számításokkal, mielőtt azokat mérésekkel igazolták volna.



1.4. ábra. Dirk Gillespie CSC mechanizmusra épülő RyR Ca-csatorna modellje.^{4, 19}

Gillespie és Boda¹³ azért tulajdonított nagy jelentőséget az AMFE jelenségének, mert az ioncsatorna-közösségben elfogadott elképzelés volt az, hogy az AMFE-jelenség esetén az ionok egymás után libasorban haladnak keresztül a szűk póruson vagy a csatornán. Ezt az elképzelést Gillespie és *mtsai*. cáfolták L-típusú kalcium csatornára¹³ és szintetikus nanopórusra¹ egyaránt. Itt fontos tényező a csatorna átmérője, mivel a kezdeti elképzelések szerint csak szűk helyen alakulhat ki a móltörtfüggés jelensége. A RyR Ca-csatorna ezzel szemben nagy átmérőjű pórus, nem is beszélve a szintetikus nanopórusról, ahol szintén észlelhető az AMFE jelensége.

Összehasonlítva az L-típusú (Almers és McCleskey) valamint a RyR (Dirk Gillespie) kalcium csatorna AMFE eredményeit, fontos különbségeket vehetünk észre. Látható hogy az L-típusú csatorna esetén az áram kisebb Ca^{2+} -koncentrációnál kezd el csökkenni, valamint hogy a görbe minimum értéke is kisebb. Ezen különbségek a csatornák eltérő viselkedéséből adódnak. Az L-típusú csatorna kisebb átmérőjű és jóval szelektívebb, mint a RyR Ca-csatorna.

1.4. A Ca-csatorna korábbi vizsgálatai

A legkorábbi elméletekben^{17, 18, 20–22} a reakciókinetika klasszikus differenciál egyenleteit használták. Ezekben a csatornán át haladó ion számára potenciálhegyeket és völgyeket feltételeztek, amikhez különböző szabadentalpia-értékeket rendeltek. Ezekből az Eyring-egyenlet segítségével sebességi állandókat kaptak és a szabadentalpia-értékeket úgy választották, hogy visszakapják a kísérleti értékeket. Ezt a módszert számos kritika érte,^{23, 24} de mindenképpen

elmondható, hogy a formalizmus használhatósága erre a komplex rendszerre megkérdőjelezhető.

A számítógépek számítási teljesítményének növekedésével párhuzamosan lehetővé vált az ioncsatornák mikroszkópikus szintű modellezése és ennek statisztikus mechanikai módszerekkel történő vizsgálata.

A Ca-csatornát először Corry és *mtsai*.^{25–28} vizsgálták egy olyan modell alapján, ami hasonlít a mi modellünkhöz abból a szempontból, hogy az oldószermolekulákat implicit módon, egy dielektromos közeg formájában vették figyelembe, míg a csatorna pórusal rendelkező elnagyolt objektum volt. A pórus alakját a K-csatornához való feltételezett hasonlóság (homológia) alapján alkották meg. A nagy különbség a mi modellünkhöz képest az, hogy a szelektív szűrő negatív részecskéit nem a szelektív szűrőbe helyezték, hanem a pórust körülvéő fehérjén belülre (a „falba”). A modell vizsgálatához a Brown-dinamika (BD)²⁹ szimulációs módszert használták. Ezzel módszerrel nem voltak képesek 18 mM Ca^{2+} -koncentrációnál kisebb koncentrációkra értékelhető eredményeket kapni, ezért egy definiálatlan extrapolációs módszerrel mikromólos Ca^{2+} -koncentrációra következtettek és csodák csodájára megkapták az Almers-McCleskey-kísérlet mikromólos Ca^{2+} -blokkját. Boda és *mtsai*.³⁰ erősen bírálták ezt az eljárást, és megmutatták, hogy a modell nem képes a mikromólos Ca^{2+} vs. Na^+ szelektivitást reprodukálni. Ennek elsődleges oka az, hogy a pórus üres, a Ca^{2+} ionok nincsenek versengésre kényszerítve a Na^+ ionokkal a szelektív szűrőben rendelkezésre álló szűk helyért.

Egy másik módszer, ami rokon az ebben a dolgozatban használt módszerrel a Poisson-Boltzmann (PB) és Nernst-Planck (NP) házasításából képzett Poisson–Nernst–Planck (PNP) elmélet. Ebben az NP-egyenletet oldják meg. Látható a 1.2 egyenletből, hogy az NP-egyenlet megoldásához szükség van mind a koncentrációprofilra, mind az elektrokémiai potenciálprofilra. Szükség van tehát ezen két mennyiségre, de oly módon, hogy a közöttük fennálló viszony megfeleljen a statisztikus mechanika törvényeinek. A PNP elmélet az ionokat pontszerűnek feltételezi (tehát ideális oldatot alkotnak) és a $c^\alpha(\mathbf{r}) \leftrightarrow \mu^\alpha(\mathbf{r})$ -összefüggést a Boltzmann-eloszlás szolgáltatja. Ez egy hatékony és jól működő módszer, de a Ca-csatorna vizsgálatára sajnos nem alkalmas, mivel itt az ionok mérete és a Boltzmann-eloszlás által le nem írt ionkorrekciók rendkívül fontosak. A PNP módszer jól működött viszont a már említett szintetikus nanopórusokra.^{31–34}

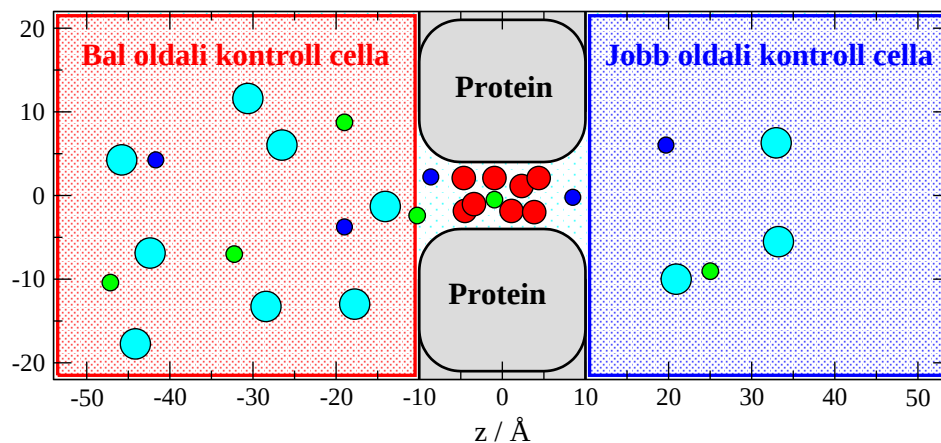
Wolfgang Nonner és Bob Eisenberg 2000-ben vetették fel azt az ötletet,³⁵ hogy a szelektív szűrő aminosav-oldalláncai végén lógó COO^- csoportok viszonylag sok helyet foglalnak el a szelektív szűrőben és azon belül viszonylag flexibilisen mozoghatnak. Ez ráadásul (Corry és *mtsai*. modelljével ellentétben) összhangban van azzal a biofizikusok által elfogadott ténnyel, hogy az aminosavak oldalláncai belógnak a szelektív szűrőbe (ld. 1.2 ábra). Nonner és Eisenberg tehát azt a leegyszerűsített modellt javasolták, hogy a COO^- csoport két oxigénjét modellezzük két $-1/2e$ töltésű ionnal ($\text{O}^{1/2-}$), amik a szűrőben ($r < R$, $|z| < H/2$) szabadon mozoghatnak, de azt nem hagyhatják el. Ezeket az oxigénionokat, ugyanúgy, ahogy a

többi iont, töltött merevgömbökkel modellezték, amik egy ϵ dielektromos állandójú közegben „úszkálnak”. Ez az elektrolitok implicit oldószeres, ún. Primitív modellje (PM). Ebben a dolgozatban is ezt használjuk. Kezdetben a „*Mean Spherical Approximation*” (MSA) elmélettel számolták a PM tulajdonságait, és azt találták, hogy abban az esetben, ha a Ca^{2+} ionoknak az $\text{O}^{1/2-}$ ionok miatt zsúfolt szelektív szűrőben kell versenyeznie a Na^+ ionokkal a szűkösen rendelkezésre álló helyért, akkor jelentős Ca^{2+} vs. Na^+ szelektivitás érhető el. A jelenség magyarázatára megalkották az ún. „*Charge Space Competition*” (CSC) mechanizmust, miszerint a Ca^{2+} hatékonyabban tudja semlegesíteni az $\text{O}^{1/2-}$ ionok töltését, mint a Na^+ , mivel kb. ugyanannyi helyet elfoglalva kétszer annyi töltést szolgáltat. Az ionok töltésének és méretének tehát egyaránt fontos szerep jut ebben a mechanizmusban.

Témavezetőm 2000-ben kapcsolódott be ezekbe a kutatásokba Monte Carlo (MC) szimulációkkal.⁶⁻⁹ Azt a modellt, amit ebben a dolgozatban is használunk, 2006-ban javasolták.¹⁰⁻¹² 2008-ban vezették be az INP-egyenletet és reprodukálták az Almers-McCleskey kísérletet.¹³ Később több más kísérletet is sikeresen reprodukáltak legalábbis kvalitatív módon.^{14,15} Mind-ezen vizsgálatokban az a közös, hogy egyensúlyi nagykanonikus MC (GCMC) szimulációkat használtak, és csak a korábban ismertetett INP-egyenleten keresztül vontak le következtetéseket a transzporttulajdonságokra. Az mindenesetre világossá vált ezekből a tanulmányokból, hogy a CSC mechanizmus jól működik és hogy a GCMC szimulációk jól tudják kezelni az olyan elektrolit-elegyeket, ahol az egyik komponens nagyon kicsi koncentrációban van jelen ($< 10^{-5}$ M). Ezeknek a vizsgálatoknak a fő tárgya az L-típusú Ca-csatorna volt.

Dirk Gillespie az RyR Ca-csatornára rendelkezésre álló nagy mennyiségű kísérleti információ alapján egy hasonló modellt alkotott a RyR Ca-csatornára^{4,19,36} (ld. 1.4 ábra). Ezzel a modellel nagyon sok kísérleti adatot képes volt reprodukálni, köztük a korábban említett AMFE jelenséget (ld. 1.3b ábra). Az általa használt módszertan azonban különbözött a Boda és *mtsai.* által használttól. Az NP-egyenletet használta a csatorna egy egydimenziósra redukált modelljére, a koncentráció és az elektrokémiai potenciál közötti viszony leírására azonban nem a Boltzmann-eloszlást használta (ahogy a PNP-elmélet), hanem egy általa továbbfejlesztett sűrűségfukcionál-elméletet („*Density Functional Theory*”, DFT). Ez az elmélet elég pontosan reprodukálja a szimulációs adatokat, hátránya, hogy csak egy dimenzióban használható. Gillespie eredményei rámutattak az NP-egyenlet hatékonyságára és arra, hogy a $c^\alpha(z) \leftrightarrow \mu^\alpha(z)$ viszony leírására egy fejlettebb statisztikus mechanikai módszert kell használni.

Az NP-elmélet, bár egyszerűen és hatékonyan használható, nem ad számot a rendszer belső dinamikájáról. Az ionok mozgékonyaságára vonatkozó információk a diffúziós együtthatóban, mint egy külső, illeszthető paraméterben vannak elrejtve. Felmerült tehát az igény, hogy egy közvetlen dinamikai szimulációs módszerrel (mint pl. a BD) is megvizsgálják ezt a Ca-csatorna modellt. Rutkai és *mtsai.*³⁷ a Dinamikus Monte Carlo (DMC) módszert választották erre a célra. Ez a módszer az MC-elmozdítást használja a valódi dinamikai lépések utánzására. A módszer a BD szimulációkkal szemben előnyökkel és hátrányokkal egyaránt rendelkezik.



1.5. ábra. Rutkai és *mtsai.* által alkalmazott szimulációs módszer geometriája a Ca-csatorna tanulmányozására.³⁹

Könnyebb vele pl. merevgömb-maggal rendelkező rendszereket szimulálni és könnyen implementálható. Nem alkalmas viszont valódi trajektóriák szimulálására és csak relatív fluxusok meghatározására alkalmas.

Rutkai és *mtsai.*³⁷ a Ca-csatornára alkalmazták a módszert, míg Csányi és *mtsai.*³⁸ a Na-csatornára. Rutkai és *mtsai.* közvetlen dinamikai módszerrel igazolták azokat az eredményeket, amiket Boda és *mtsai.*^{13–15} egyensúlyi GCMC szimulációkkal és az INP-egyenlettel kaptak. Megmutatták, hogy a Ca-csatornában az egyensúlyi Ca^{2+} vs. Na^{+} szelektivitás erősebb, mint a dinamikai szelektivitás, azaz habár a szelektív szűrő nagy affinitással köti a Ca^{2+} -ot a Na^{+} -mal szemben, de ez a Ca^{2+} nem vesz részt a vezetésben, mivel kicsi a Ca^{2+} ionok mozgékonyága. Ebben a dolgozatban megismétljük Rutkai és *mtsai.* egyik móltört-kísérletét és a saját módszerünkkel igazoljuk az eredményeiket.

1.5. A diffúzó vizsgálatára alkalmas módszerek

A diffúzió olyan anyagtranszport, amely során a különböző fajtájú részecskék egymástól függetlenül transzportálódnak, impulzuscserre tehát nincs köztük. A diffúziót töltetlen részecskék ideális oldata esetén Fick I. törvénye írja le, míg töltött részecskék akár nem ideális oldata (elektrolitok) esetén az NP-egyenlet (ld. 1.2 egyenlet) érvényes. Ezek az egyenletek csak az anyagmegmaradást tartalmazzák, az impulzusmegmaradás figyelembe vételéhez a hidrodinamika egyenleteit kell alkalmaznunk.

A diffúzió vizsgálatához tehát alapvetően kétféle módszer áll rendelkezésünkre: használhatjuk az NP-egyenletet, vagy közvetlenül szimulálhatjuk a transzportot. Az első esetben csak diffúziót vizsgálhatunk, tehát fel kell tenni, hogy a transzport valóban diffúzió. A második esetben a szimulációval elvileg hidrodinamikai, impulzus által csatolt transzportot is

tanulmányozhatunk.

Az NP-egyenlet használata esetén a fő feladat, hogy a vizsgált rendszerben összefüggést találjunk az NP-egyenletben található mennyiségek között. Míg a diffúziós állandóra tömbfázisban mérési adatokkal rendelkezünk, pórusokban illetve membránokban általában nem ismerjük az értékét. Ezért a $D^\alpha(\mathbf{r})$ függvényt illeszthető paraméterként kezelhetjük és értékét mérési vagy direkt szimulációs eredményekhez illeszthetjük. Gillespie, Boda és munkatársaik^{4, 13–15, 19} korábbi munkáikban az első utat követték. Mi ebben a dolgozatban DMC szimulációs eredményekhez illesztjük a diffúziós állandó értékét. A tény, hogy a $D^\alpha(\mathbf{r})$ értékét illeszteni kell, az NP-egyenlet egyik fő hátrányát jelenti.

A másik két mennyiség, amit ki kell számolnunk az NP-egyenlet használatához, az a koncentráció ($c^\alpha(\mathbf{r})$) és az elektrokémiai potenciál ($\mu^\alpha(\mathbf{r})$). Mint már említettem, ezen két mennyiség meghatározására az irodalomban két módszert használtak. Az egyik a PB-elmélet, ami az ionokat ponttöltések ideális oldataként kezeli. Ez jelenti fő hátrányát olyan esetekben, mint a Ca-csatorna, ahol az oldat a csatornában nyilvánvalóan nem ideális. Az PB-elmélettel lezárt NP-egyenletet az irodalomban PNP-elméletnek nevezik, én itt NP+PB elméletként fogok hivatkozni rá. Gillespie^{4, 19} egy sűrűségfukcionál-elméletet használt, amivel már nem-ideális oldatokat is le lehet írni. Fő hátránya, hogy csak egydimenziós esetben használható. Gillespie a DFT/PNP jelölést alkalmazta, én NP+DFT elméletként fogok hivatkozni rá.

Mindkét elméletet sikerrel alkalmazták olyan esetekben, amik beleestek az elméletek alkalmazhatósági tartományába. Felmerült azonban az igény, hogy használjunk egy olyan statisztikus mechanikai módszert, ami 3 dimenzióban is használható bármilyen rendszerre. Ez természetesen valamilyen szimulációs módszer, alkalmasint a MC szimulációs módszer. A baj csak az, hogy az MC módszert elvileg csak egyensúlyi rendszerekre lehet használni. Boda és Gillespie⁴⁰ vetették fel az ötletet, hogy alkalmazzuk a GCMC módszert lokálisan olyan elemi cellákra, amelyekben feltesszük, hogy a rendszer lokális egyensúlyban van (Lokális Egyensúlyi Monte Carlo (LEMC) módszer). Minden ilyen cellában feltételezzük az elektrokémiai potenciál valamely értékét, majd ezeket az értékeket használva az elemi cellákra külön-külön GCMC szimulációkat hajtunk végre. A módszer vadonatúj, és az eddigi tesztelések során hatékonynak bizonyult. Ebben a dolgozatban tovább teszteljük a módszert a Ca-csatorna esetére. A módszerre az NP+LEMC jelölést használjuk.

A közvetlen szimulációs módszerek (a BD és DMC módszereken kívül ide tartoznak a molekuláris dinamikai és Langevin dinamikai szimulációs módszerek) a részecskék mozgását és a rendszer dinamikai viselkedését közvetlenül vizsgálják. Ezekben a módszerekben a dinamikai rendszer két kontrollcella^{41, 42} között helyezkedik el (ld. 1.5 ábra). A kontrollcellákban GCMC szimulációkkal biztosítjuk az eltérő koncentrációkat, ez biztosítja a transzport hajtóerejét. Természetesen ezenkívül egy külső feszültséget is „rá lehet kötni” a rendszerre.

Ezeknek a módszereknek a nagy előnye, hogy nincs szükség a diffúziós együttható illesztésére, mert a dinamikát közvetlenül szimuláljuk. Hátrányuk az, hogy ritka esemény lehet az,

hogy egy ion „bekóvályog” a pórusba, különösen kis koncentrációk esetén. Ez tulajdonképpen egy fontos motivációja volt az LEMC módszer kifejlesztésének. Ha az ion nem hajlamos bemenni a pórusba, helyezzük be oda, mégpedig megfelelő valószínűséggel. Mi ez a valószínűség? Ha lokális egyensúlyt feltételezünk, akkor ez a valószínűség nyilvánvaló: a GCMC módszer részecskebehelyezési lépésének elfogadási valószínűsége meghatározható, a helyi kémiai potenciál használatával. Az LEMC módszernek dinamikai szimulációkhoz való csatolására irányuló kutatások jelenleg is folynak a kutatócsoportban Kristóf Tamás, Ható Zoltán és Boda Dezső részvételével.

Ebben a dolgozatban én az NP+LEMC módszert fogom használni. A dolgozat célja kettős. Mivel az NP+LEMC módszer új, szükség van a különböző esetekben való tesztelésére. A dolgozatban ezt a tesztelést a Ca-csatorna esetére végezzük el. Másrészt céлом a Ca-csatorna vezetési és szelektivitási mechanizmusára vonatkozó következtetések levonása.

2. fejezet

Modell

Mielőtt a módszerre rátérnék, részletesen bemutatom az általunk használt modellt (ld. 2.1 ábra). A membrán elválasztja egymástól a bal és a jobb oldali tömbfázisokat. A membránba beépülve helyezkedik el a fehérje, amin keresztül vezet a csatorna az egyik tömbfázisból a másikba. A rendszer a csatorna középvonalára szimmetrikus, a tengely körül megforgatva kapjuk az 2.1b ábrán látható fánk-modellt.

A szelektív szűrőbe (a csatorna középső, henger alakú része) a karboxil csoportokat modellezendő, 8 darab $-0.5e$ töltéssel rendelkező, $2.8 \text{ \AA}$ átmérőjű merev gömböt (oxigéniont) helyeztünk el. Ezek az $O^{1/2-}$ -ionok nem hagyhatják el a csatornát, azonban a szűrőn belül szabadon mozoghatnak. A negatív töltésű ionok segítségével biztosítjuk a csatorna negatív töltését.

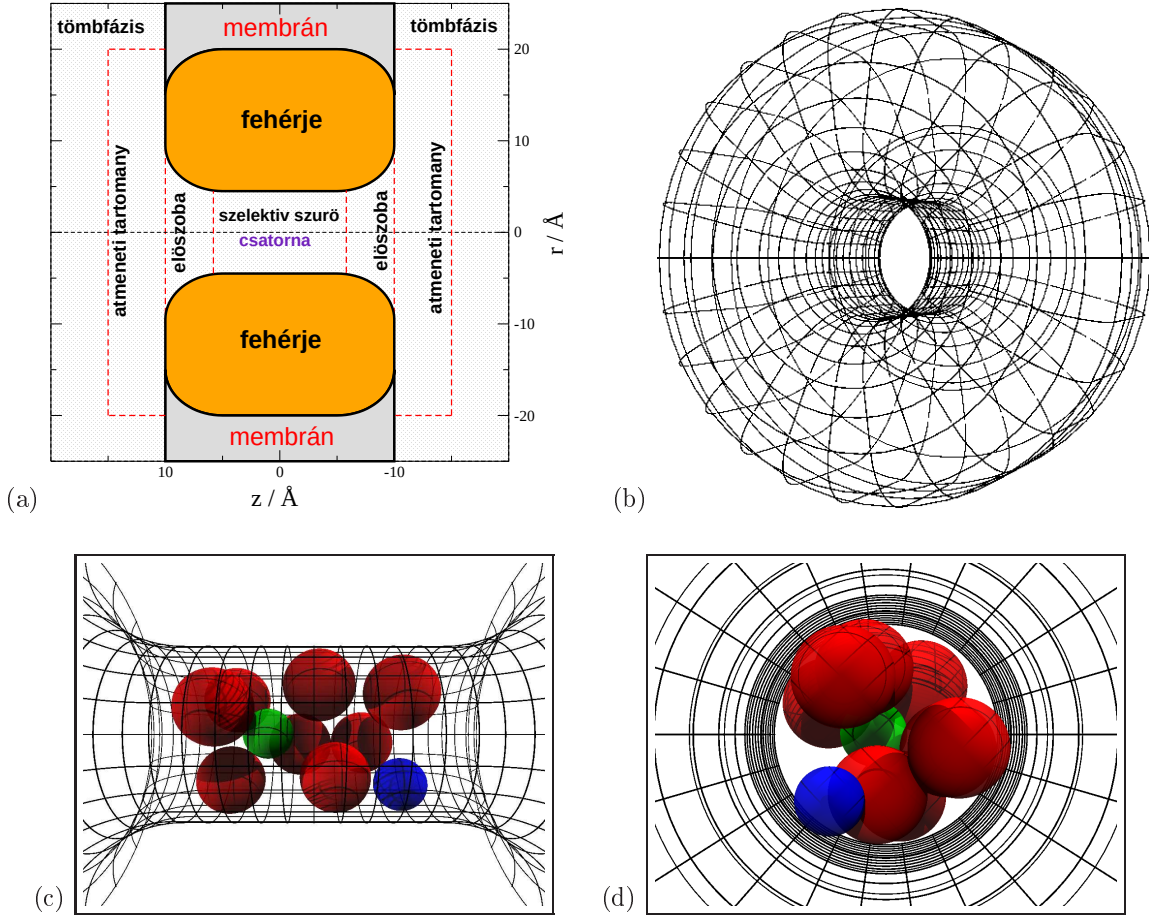
A tömbfázisokban lévő különböző ionkoncentrációk miatt alakul ki lényegében a csatornán keresztüli transzport. A szelektív szűrő és a tömbfázis között foglal helyet az általunk előszobának nevezett térrész (lásd 2.1a ábra).

A rendszerben lévő ionokat az elektrolitok primitív modelljével (PM) definiáljuk. Ez a modell az ionokat töltött merevgömbnek, azaz véges mérettel rendelkező részecskéknek tekinti. Az ionok oldószerben foglalnak helyet, melyet folytonos dielektromos állandójú közeggel (ϵ) modellezünk. Esetünkben az oldószer és a csatorna dielektromos állandója megegyezik ($\epsilon = 78.5$), ugyanis így elkerülhető a polarizációs töltések kialakulása a csatorna falán. Ezeknek a polarizációs töltéseknek a számolása rendkívül időigényes.⁴³ Mivel ebben a munkában a transzportot számoló módszer (NP+LEMC) tesztelése és elemzése a célunk, a bonyolultabb modell használatától eltekintünk.

Az ionok, mint töltött merevgömbök közötti kölcsönhatást leíró párpotenciál:

$$u(r) = \begin{cases} \infty & \text{for } r < R^\alpha + R^\beta \\ \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{q^\alpha q^\beta}{r} & \text{for } r \geq R^\alpha + R^\beta \end{cases} \quad (2.1)$$

ahol r a két ion távolsága, R^α az ion sugara, q^α a töltése. Az ionok töltése ponttöltés és a



2.1. ábra. (a) Az ioncsatorna általunk használt modellje. A központi henger alakú rész reprezentálja a szelektív szűrőt. Ezt a forgástengely körül megforgatva kapjuk a (b) ábrán látható farsangi fánkot, amiben a $8 \text{ O}^{1/2-}$ -iont elhelyezve a (c) és (d) ábrákon látható pillanatfelvételeket kapjuk.

gömbök közepén helyezkedik el. Az egyenlet első sora a merevgömb-potenciált adja, ami az ionok átlapolódását tiltja. A második sor a Coulomb-potenciál ami az ionok közepén lévő ϵ -nal árnyékolt ponttöltések közötti kölcsönhatást adja. Ennek a látszólag egyszerű modellnek a segítségével reprodukálni lehetett az elektrolitok aktivitási együtthatójának nem-monoton koncentrációfüggését.⁴⁴

A csatorna fala nem hordoz töltést, így nincs a fal és az ionok között fellépő vonzó jellegű kölcsönhatás, azonban ahogy az ionok átlapolódása is tiltva van a rendszerben, azok a membránba illetve a fehérjébe nem léphetnek be.

A rendszerben 4-féle ion van jelen: a korábban már említett oxigénion ($R^{\text{O}^{1/2-}} = 2.8 \text{ \AA}$), a klór ($R^{\text{Cl}^-} = 1.81 \text{ \AA}$) mint monovalens anion, a nátrium, mint monovalens kation ($R^{\text{Na}^+} = 0.95 \text{ \AA}$) és a kalcium, mint divalens kation ($R^{\text{Ca}^{2+}} = 0.99 \text{ \AA}$).

3. fejezet

Módszer

Mint a bevezetőben már említettem, az NP-egyenlet lezárásaként összefüggést kell találni a koncentráció és az elektrokémiai potenciál között: $c^\alpha(\mathbf{r}) \leftrightarrow \mu^\alpha(\mathbf{r})$. Erre a célra az LEMC szimulációs módszert használjuk. Ebben a módszerben az elemi cellákat nagykanonikus sokaságú (nyitott) rendszereknek tekintjük, és GCMC szimulációkat alkalmazunk rájuk. A módszer bemenete tehát az elektrokémiai potenciál, míg kimenete a koncentráció. Ha a számolt mennyiségeket behelyettesítjük az NP-egyenletbe, a fluxus számítható. Ennek a fluxusnak ki kell azonban elégíteni az anyagmegmaradás törvényét, azaz a kontinuitási egyenletet:

$$\nabla \mathbf{j}^\alpha(\mathbf{r}) = 0. \quad (3.1)$$

Nincs semmi garancia azonban arra, hogy az általunk választott $\mu^\alpha(\mathbf{r})$ -profil és az ebből számolt $c^\alpha(\mathbf{r})$ -profil, illetve az ezekből számolt fluxussűrűség ezt teljesíti. Ezért egy iterációs módszert kell alkalmazni, amelyben az elektrokémiai potenciált addig változtatjuk, amíg a kontinuitási egyenlet nem teljesül.

A következőkben bemutatom az LEMC módszert és az iterációs technikát.

3.1. Lokális Egyensúlyi Monte Carlo szimulációk

A molekuláris szimulációs módszereket olyan nagy részecskeszámú rendszerekben használjuk, ahol ismerjük a mikroszkopikus szintű tulajdonságokat, azaz a molekulák között ható erőket illetve potenciálokat. Az MC módszer általános leírása számtalan helyen megtalálható,^{45,46} én itt most csak röviden vázolom a módszert.

Az MC módszer egy sztochasztikus szimulációs eljárás, amelyben a konfigurációs tér mintavételezésére statisztikai eljárást alkalmazunk. Egy egyensúlyban lévő makroszkopikus rendszer a mikroállapotok sokaságának adott arányú megvalósulása. A fontosság szerinti mintavételezés (*"importance sampling"*) során a konfigurációs térből vett mintáinkat nem egyenletesen sorsoljuk, hanem a valószínűbb állapotokat nagyobb valószínűséggel válogatjuk be a mintába.

A Metropolis-mintavételezés során egy tetszőlegesen kiválasztott részecskét véletlenszerűen sorsolt új pozícióba mozgatunk, kiszámítjuk a mozgatás energiaváltozását (ΔU), majd a mozgatást egy jól definiált kritérium alapján elutasítjuk vagy elfogadjuk. Ha a művelet végrehajtása után a rendszer energiája csökkent, elfogadjuk a lépést. Ha nem csökkent, akkor a mozdtást a $p = \exp(-\Delta U/kT)$ valószínűséggel fogadjuk el. Az alkalmazott sokaságtól függenek a használt MC-lépések. Állandó nyomáson pl. térfogatváltoztatást végzünk. A fent leírt részecskeelmozdítás mindig megjelenik, de az LEMC módszer esetében kissé módosult formában. Ezeket a szimulációs lépéseket úgy tervezik meg, hogy kielégüljön a mikroszkopikus reverzibilitás feltétele.

A gyakorlatban a szimulációt egy adott geometriájú cellában végezzük. A határfelületi effektusok elkerülése végett egy kis mintát periodikusan reprodukálunk a tér azon irányában, amely irányban a rendszer homogén. Ha tömbfázist szimulálunk, akkor pl. a tér mindhárom irányába ezt az ún. periodikus határfeltételt alkalmazzuk. Ha egy inhomogén rendszert vizsgálunk, mint ahogy mi tesszük, a periodicitást csak a tér azon dimenzióiban alkalmazzuk, amelyekben a rendszer homogén.

Egy (általában véletlenszerűen előállított) kezdeti állapotból indulunk ki, ami nem feltétlenül van az egyensúlyi állapot közelében. Ezért általában egy egyensúlyba hozatali periódusra van szükség és ezután következik a szimuláció azon része, amire az átlagolást elvégezzük.

A GCMC eljárás esetén a komponensek kémiai potenciáljait (μ^α) rögzítjük a rendszerben (egyensúlyban ez mindenhol ugyanaz). Ekkor a részecskemozgatások mellett új MC lépések végrehajtása szükséges. Mivel a részecskék száma fluktuál, a részecskék mennyiségét véletlenszerűen változtatnunk kell. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy időnként egy véletlenszerűen kiválasztott helyre behelyezünk egy részecskét, illetve időnként egy véletlenszerűen kiválasztott részecskét eltávolítunk. Ezeket a lépéseket szintén jól meghatározott valószínűségekkel fogadjuk el, amikben az energiaváltozás mellett a kémiai potenciál szerepel. Elektrolitok esetére a módszer leírása Valleau és Cohen klasszikus publikációjában található.⁴⁷

Az LEMC módszer esetén a rendszer nincs egyensúlyban, ezért az elektrokémiai potenciál a térben változik. A gyakorlatban a szimulációs cellát kis $\mathcal{D}_i$ elemi cellákra osztjuk, amelyeknek a térfogata V_i . Egy-egy ilyen elemi cellában az elektrokémiai potenciál μ_i^α . Egy ion eltávolításának illetve hozzáadásának a valószínűsége $\min\left(1, p_{i,\chi}^\alpha(\mathbf{r})\right)$, ahol

$$p_{i,\chi}^\alpha(\mathbf{r}) = \frac{N_i^\alpha! V_i^\chi}{(N_i^\alpha + \chi)!} \exp\left(-\frac{\Delta U(\mathbf{r}) - \chi \mu_i^\alpha}{kT}\right). \quad (3.2)$$

Ebben az egyenletben N_i^α az α típusú ionok száma az i elemi cellában a hozzáadás/eltávolítás előtt, $\Delta U(\mathbf{r})$ a rendszer energiaváltozása az $\mathbf{r}$ pozícióba való inzertálás/eltávolítás során, és $\chi = \pm 1$ ionbehelyezésre ill. eltávolításra. Amennyiben egy iont egy $\mathbf{r}$ pozícióból $\mathbf{r}'$ pozícióba

mozgatunk, akkor ez a Boltzmann-faktor a következőképpen írható fel:

$$p_{i \rightarrow j}^\alpha(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \exp \left(-\frac{\Delta U(\mathbf{r}, \mathbf{r}') - (\mu_j^\alpha - \mu_i^\alpha)}{kT} \right), \quad (3.3)$$

az elektrokémiai potenciálok különbségét tehát ki kell vonni, ha két különböző elektrokémiai potenciálú cella között mozgatunk, ezzel szemben ugyanis munkát kell végezni.

Ezekben az egyenletekben a ΔU energiaváltozás nem csak az ionok közötti kölcsönhatásokat, hanem a külső elektromos térrel való kölcsönhatást $q^\alpha \Phi^{\text{appl}}(\mathbf{r})$ is tartalmazza. A külső potenciál a $\nabla^2 \Phi^{\text{appl}}(\mathbf{r}) = 0$ Laplace egyenlet megoldása, amit a rendszerre előírt elektrosztatikus peremfeltétel mellett oldunk meg. Ez általában az, hogy az egyik tömbfázisban Φ^L , míg a másik tömbfázisban Φ^R potenciált írunk elő a megoldási tartomány felszínén (Dirichlet peremfeltétel). Így biztosítjuk a rendszerre kapcsolt feszültséget, ami az ionok számára a koncentrációkülönbségen kívül extra hajtóerőként szerepel.

A Laplace-egyenlet megoldását úgy kapjuk, hogy kiszámítjuk a rendszer határfelületén az indukált töltéseket. A határfelületen pontosan olyan töltések indukálódnak, amik a kívánt $\Phi^{\text{appl}}(\mathbf{r})$ potenciált keltik a felületen belül. Az indukált töltések számítására az ICC („*Induced Charge Computation*”) módszert^{10, 43, 48} használtuk. Ha megvannak ezek az indukált töltések, akkor a potenciál az elemi cellák középpontjaiban a Coulomb-törvényből egyszerűen számítható.

A két tömbfázisban a két elektrokémiai potenciált írjuk elő peremfeltételként: $\mu^{\alpha,L}$ és $\mu^{\alpha,R}$. Ezeket úgy számoljuk ki, hogy meghatározzuk a $\mu_c^{\alpha,L}$ és $\mu_c^{\alpha,R}$ kémiai potenciálokat, majd ezekhez hozzáadjuk a külső térrel való kölcsönhatásokat:

$$\mu^{\alpha,L} = \mu_c^{\alpha,L} + q^\alpha \Phi^L \quad (3.4)$$

$$\mu^{\alpha,R} = \mu_c^{\alpha,R} + q^\alpha \Phi^R. \quad (3.5)$$

A $\mu_c^{\alpha,L}$ és $\mu_c^{\alpha,R}$ kémiai potenciálokat a Malasics és *mtsai.* által kidolgozott Adaptív GCMC (A-GCMC) módszerrel határoztuk meg.^{49, 50}

A koncentrációt kétféleképpen számolhatjuk. Az egyik módszer a megszokott, amikor kiszámítjuk az ionok átlagos számát egy elemi cellában és ezt osztjuk a cella térfogatával. Ehelyett sokkal hatékonyabb, ha a Widom-féle tesztreszcseke módszert használjuk fel,^{51, 52} ami potenciáeloszlás-tételként („*Potential Distribution Theorem*”) is ismeretes.^{53, 54} Eszerint a többlet kémiai potenciál, mint a rendszer egy mérhető termodinamikai állapotjelzője, számítható a következő módon:

$$e^{-\mu_i^{\alpha,\text{EX}}/kT} = \left\langle e^{-\Delta U_i^\alpha/kT} \right\rangle, \quad (3.6)$$

ahol ΔU_i^α egy véletlenszerűen sorsolt pozícióba helyezett α típusú tesztreszcseke energiája. Amennyiben ezt az inzertálást az i -edik elemi cellába végeztük (az LEMC szimuláció részecs-

kebehelyezése kiválóan alkalmas erre a célra, így extra számolást ez a lépés nem igényel), akkor az eljárást a lokális egyensúly feltételezésével erre a cellára hajtjuk végre. A többlet kémiai potenciált kifejezhetjük a

$$\mu_i^\alpha = kT \ln c_i^\alpha + \mu_i^{\alpha, \text{EX}} \quad (3.7)$$

egyenletből (ekkor a többlet tag tartalmaz minden, a $kT \ln c_i^\alpha$ -n túli tagot, a külső térrel való kölcsönhatást is), és beírjuk a 3.6 egyenletbe, akkor a koncentráció az i . elemi cellára kifejezhető:

$$c_i^\alpha = \left\langle e^{-\Delta U_i/kT} \right\rangle e^{\mu_i^\alpha/kT}. \quad (3.8)$$

Ellenőriztük, hogy ez a módszer az LEMC szimuláció esetében is működik: az 3.8 egyenlet ugyanazt az eredményt szolgáltatja, mint a szokásos, az ionok számlálásán alapuló módszer, csak sokkal pontosabban. Ennek az a magyarázata, hogy ha egy elemi cellában kicsi a koncentráció, akkor az, hogy ott egy iont találunk, ritka esemény. Az ionok számlálásán alapuló technika ezért tehát rossz statisztikával dolgozik. A 3.8 egyenlet szerint ellenben minden részecskebehelyezésnél számolunk ΔU_i^α energiát, ami minden behelyezésnél hozzájárul a mintavételezéshez.

3.2. Az iterációs technika

Az LEMC szimulációból a diszkretizált μ_i^α elektrokémiai potenciál értékekhez diszkretizált c_i^α koncentrációértékeket számolunk. Ezeket az NP-egyenletbe helyettesítve nem biztos, hogy olyan fluxust kapunk, ami kielégíti a kontinuitási egyenletet. Ezért egy iterációs módszerrel változtatjuk az elektrokémiai potenciált, amíg a 3.1 egyenlet igazsá nem válik.

Az iterációs mechanizmus a kontinuitási egyenlet integrálján alapul, melynek során a térfogatra vonatkoztatott integrált felületi integrállá alakítjuk át:

$$0 = \int_{\mathcal{D}_i} \nabla \cdot \mathbf{j}^\alpha(\mathbf{r}) dV = \oint_{\mathcal{S}_i} \mathbf{j}^\alpha(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) da, \quad (3.9)$$

ahol $\mathcal{S}_i$ jelöli a $\mathcal{D}_i$ térfogatelemet körbevevő zárt felületet, $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ a kifelé mutató normálvektor a felület $\mathbf{r}$ pontjában. Az $\mathcal{S}_i$ felületet felosztjuk olyan $\mathcal{S}_{ij}$ felületelemekre, amelyek mentén a $\mathcal{D}_i$ elemi cella határos a $\mathcal{D}_j$ elemi cellával. Feltesszük, hogy ezeken a felületelemeken a koncentráció, az elektrokémiai potenciál gradiense, a diffúziós együttható és a fluxus konstans. Ezeket az értékeket a $\hat{c}_{ij}^\alpha$, $\nabla \hat{\mu}_{ij}^\alpha$, $\hat{D}_{ij}^\alpha$ és $\hat{\mathbf{j}}_{ij}^\alpha$ szimbólumokkal jelölöm. A koncentrációt és az elektrokémiai potenciál gradiensét numerikusan, lineáris interpolációval számoljuk a térfogatelemek középpontjában felvett értékek felhasználásával. Ekkor az integrál helyébe a zárt felületet alkotó felületelemekre való összegzés lép:

$$0 = \sum_{j, \mathcal{S}_{ij} \in \mathcal{S}_i} \hat{\mathbf{j}}_{ij}^\alpha \cdot \mathbf{n}_{ij} a_{ij}, \quad (3.10)$$

ahol a_{ij} az $\mathcal{S}_{ij}$ felületelem felülete.

A következőkben bemutatom az iterációs algoritmus felépítését.

(1) A fent leírt módon meghatározzuk az elektrokémiai potenciált a megoldási tartomány felületén, majd a megoldási tartomány belsejében, azaz az elemi cellák középpontjaiban valamilyen alkalmas interpolációval (erről a részleteket ld. Boda és Gillespie cikkében⁴⁰) meghatározzuk az elektrokémiai potenciálok kezdő értékeit: $\mu_i^\alpha[1]$ (szögletes zárójelben azt jelölöm, hogy hányadik iterációról van szó).

(2) Következő lépésként LEMC szimulációt hajtunk végre az összes térfogategységre, amelyekben ezeket az elektrokémiai potenciálokat használjuk inputként. A szimulációkból az elemi cellákban (illetve azok középpontjaiban) kapott koncentrációkat $c_i^\alpha[1]$ -gyel jelölöm.

(3) A következő iterációs lépés elektrokémiai potenciáljait ($\mu_i^\alpha[2]$) azzal a feltételezéssel kapjuk, hogy a $c_i^\alpha[1]$ koncentrációval és ezzel a $\mu_i^\alpha[2]$ elektrokémiai potenciállal (helyesebben, az ezekből interpolált $\hat{c}_{ij}^\alpha$ és $\nabla \hat{\mu}_{ij}^\alpha$ értékekkel) számolt fluxus kielégíti a kontinuitási egyenletet. Az ezekkel az értékekkel felírt NP egyenletet helyettesítve $\hat{\mathbf{j}}_{ij}^\alpha$ helyébe a 3.10 egyenletben, egy általános $[n] \rightarrow [n+1]$ iterációra azt kapjuk, hogy:

$$0 = \sum_{j, \mathcal{S}_{ij} \in \mathcal{S}_i} \hat{D}_{ij}^\alpha \hat{c}_{ij}^\alpha[n] \nabla \hat{\mu}_{ij}^\alpha[n+1] \cdot \mathbf{n}_{ij} a_{ij}. \quad (3.11)$$

Mivel a $\nabla \hat{\mu}_{ij}^\alpha[n+1]$ értékek lineáris interpolációval állnak elő a $\mu_i^\alpha[n+1]$ értékekből (és hasonlóan a $\hat{c}_{ij}^\alpha[n]$ a $c_i^\alpha[n]$ értékekből), a 3.11 egyenlet egy N lineáris egyenletből álló egyenletrendszert alkot, amit felírhatunk mátrixegyenlet formában, és ahol $\mu_i^\alpha[n+1]$ az ismeretlen mennyiség. A megoldás standard numerikus matematikai módszerekkel történik (LU dekompozíció⁵⁵).

(4) Az iterációból kapott $\mu_i^\alpha[n+1]$ elektrokémiai potenciál értékeket használjuk a következő iterációban az LEMC szimuláció bemeneteként. Ezek a szimulációk szolgáltatják a $c_i^\alpha[n+1]$ koncentrációkat a következő iterációra, amikből az 3.11 egyenlet felhasználásával újabb elektrokémiai potenciálok számolhatók, és ezt így folytatjuk, amíg a konvergenciát el nem érjük.

Tökéletes konvergencia nem érhető el azért, mert a szimulációk mindig csak valamilyen statisztikus hibán belül adják meg az eredményeket. Emiatt az eredmények egy adott tartományon belül fluktuálnak. Ez a tartomány szűkebb, ha hosszabb szimulációkat futtatunk. Tapasztalataink szerint célravezetőbb rövidebb szimulációkat futtatni, de többet iterálni, és az iterációkra átlagolni. Ez a futóátlag szolgáltatja a végeredményt.

Azt tapasztaltuk viszont, hogy abban az esetben, amikor a rendszerben nagy a hajtóerő (pl. nagy koncentrációkülönbség vagy nagy külső elektromos tér), az egyszerű NP+LEMC iterációs lépésekkel nem tudjuk a konvergenciát biztosítani. A rendszer nem találja meg a megoldást, általában különböző minimumhelyek között „ugrál” a megoldás. Ilyenkor szükség

van egy keverési paraméterre (β^α), amelyet az alábbiak szerint használunk az iterációban:

$$\mu_i^{\alpha, \text{MIX}}[n+1] = \beta^\alpha \mu_i^{\alpha, \text{CAL}}[n+1] + (1 - \beta^\alpha) \mu_i^{\alpha, \text{MIX}}[n]. \quad (3.12)$$

Tehát az $[n+1]$ -edik lépésben az α -adik ionra vonatkozó kevert elektrokémiai potenciált úgy állítjuk elő, hogy valamilyen arányban belekeverjük az 3.11 egyenletből számolt $\mu_i^{\alpha, \text{CAL}}[n+1]$ és az eredeti (az előző iterációban használt és már ott keveréssel kapott) $\mu_i^{\alpha, \text{MIX}}[n]$ értékeket. Látható, hogy $\beta^\alpha = 1$ esetén az eredeti, keverés nélküli iterációról van szó, és minél kisebb β^α , annál többet keverünk bele az eredeti elektrokémiai potenciálból. Ekkor lassabb, de biztosabb lesz a konvergencia.

4. fejezet

Eredmények

A szimulációkat Linux operációs rendszer alatt végeztük el. A program Fortran programozási nyelven íródott, amit a mai napig sokan használnak matematikai és mérnöki problémák megoldására. Az átlag futási idő 3 és 6 óra között volt, de akadtak olyan eredmények (kis méretű elemi cella esetén) ahol 12-16 órát számolt a program.

Munkánk során az oldószer dielektromos állandója $\epsilon = 78.5$, míg a hőmérsékletet $T = 298.15$ K volt. A szelektív szűrő sugara $R = 4$ Å, hossza $H = 10$ Å volt. Az előszobákat határoló falak görbületi sugara 5 Å volt, a membrán teljes szélessége tehát 20 Å. Mono- (Na^+) és divalens (Ca^{2+}) kationokat és monovalens (Cl^-) aniont tartalmazó oldatokat, azaz NaCl és CaCl_2 sókat használtunk.

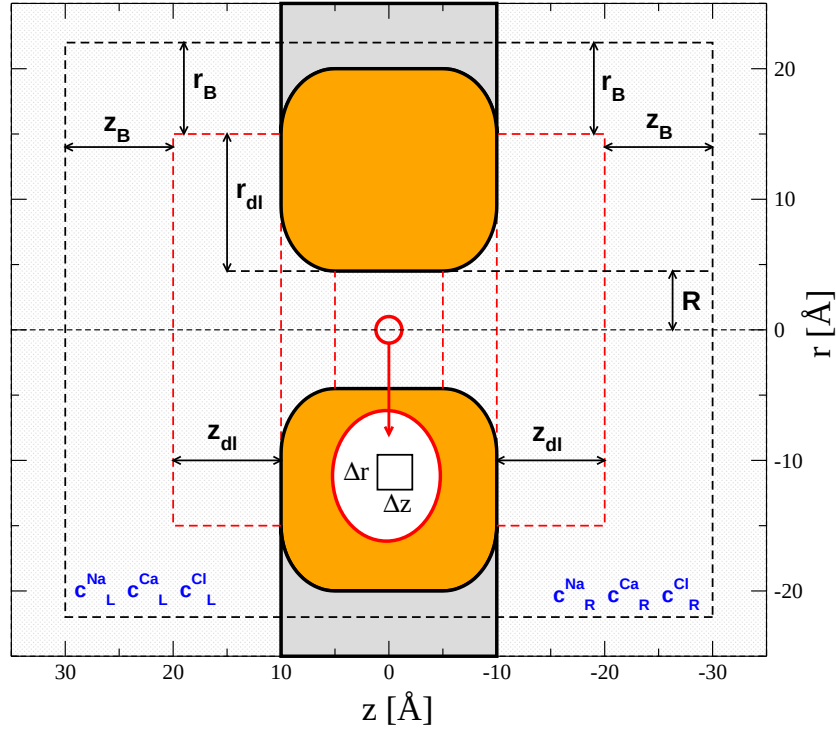
A Rutkai és *mtsai*.³⁹ által elvégzett móltörtkísérletben a kationok koncentrációjának összege a bal oldalon mindig 100 mM:

$$c_{\text{L}}^{\text{Na}^+} + c_{\text{L}}^{\text{Ca}^{2+}} = c_{\text{L}}^{\text{TOT}} = 100 \text{ mM} \quad (4.1)$$

A kationokhoz tartozó anion mennyiséget pedig úgy adjuk meg, hogy töltéssemleges legyen a bal oldali tömbfázis. A jobb oldali tömbfázisban az ionkoncentrációkat a baloldali értékeknek az 1/3-ára állítottuk be: $c_{\text{R}}^{\alpha} = (1/3)c_{\text{L}}^{\alpha}$. A kalciumra vonatkoztatott móltört így:

$$x^{\text{Ca}^{2+}} = \frac{c_{\text{L}}^{\text{Ca}^{2+}}}{c_{\text{L}}^{\text{TOT}}} = \frac{c_{\text{R}}^{\text{Ca}^{2+}}}{c_{\text{R}}^{\text{TOT}}} \quad (4.2)$$

A szimulációs cella részletesebb rajza a 4.1 ábrán látható. A szimulációs cella véges, egy henger által határolt tartomány. Ezen belül az NP-egyenlet megoldási tartománya egy még kisebb henger. Ezen megoldási tartományon kívül egy r_{B} és z_{B} paraméterekkel jellemzett tömbfázis helyezkedik el. A megoldási tartomány nagyobb, mint a csatorna, egy z_{d1} és r_{d1} paraméterekkel jellemzett átmeneti tartomány található a csatorna és a megoldási tartomány határfelülete között. A megoldási tartományt 2 dimenzióban $\Delta z \times \Delta r$ nagyságú négyzetekre osztjuk fel ($\Delta z = \Delta r$), ami 3 dimenzióban megforgatva négyzet keresztmetszetű gyűrűkké



4.1. ábra. A szimulációhoz és az NP-egyenlet megoldásához használt rendszer főbb geometriai paramétereit és a tömbfázist alkotó ionok rögzített koncentrációit (kék betűk). A szimulációkat a teljes, a z_B , r_B paraméterekkel jellemzett tömbfázist is tartalmazó cellára futtattuk. Az NP-egyenletet az ezt a tömbfázist nem, de az z_{dl} , r_{dl} paraméterekkel jellemzett átmeneti tartományt tartalmazó térrészre oldottuk meg.

alakul. Ezeknek a paramétereknek a hatását részletesen megvizsgálom a dolgozatban.

4.1. A diffúziós együtthatók meghatározása

A DMC szimulációkkal ellentétben a mi modellünk esetén a diffúziós együtthatók bemeneti paraméterek. A Rutkai és mtsai.³⁹ által végzett szimulációk információt nyújtanak a két kation fluxusának hányadosáról. Ez a dinamikai szelektivitás, az a szám, amit reprodukálni kívánunk.

A diffúziós együttható profilját a következőképpen konstruáljuk meg. A csatornán kívül ($|z| > 10$ Å) az értékük állandó, és a kísérleti tömbfázisú adatoknak felel meg:

- $D_B^{\text{Ca}^{2+}} = 7.92 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}},$
- $D_B^{\text{Na}^+} = 1.33 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}.$

A szelektív szűrőn belül ($|z| < 5$ Å) is konstans az érték, ez az illeszthető paraméter (D_F^α).

$\alpha^{\text{Na}^+} \backslash \alpha^{\text{F}}$	15	10	5	2	1
34	0.423	0.573	1.005	1.595	2.026
10	0.351	0.460	0.619	0.809	0.926
3	0.276	0.299	0.366	0.411	0.446
1	0.194	0.208	0.227	0.248	0.262

4.1. táblázat. A kationok fluxusaránya ($J_z^{\text{Ca}^{2+}}/J_z^{\text{Na}^+}$) különböző α^{Na^+} és α^{F} értékeknél $x^{\text{Ca}^{2+}}$ móltört esetén. A DMC érték 1.64.

Ezen két tartomány között (az előszobában, $5 < |z| < 10$ Å) lineárisan interpolálunk a D_{F}^{α} és D_{F}^{α} értékek között.

A csatornán belüli értékekre némi támpontunk akad. Gillespie^{4,19} a RyR Ca-csatornára vonatkozó kísérleti adatokhoz illesztve a következő értékeket kapta:

- $D_{\text{F}}^{\text{Ca}^{2+}} = 2.75 \cdot 10^{-12} \frac{m^2}{s},$
- $D_{\text{F}}^{\text{Na}^+} = 3.92 \cdot 10^{-11} \frac{m^2}{s}.$

ahol B a tömbfázisra, míg F a filterre vonatkozó érték. A Cl^- -nak a diffúzió szempontjából elhanyagolható a szerepe (a csatornában lévő oxigén ionok negatív töltése miatt gyakorlatilag zérus a klór koncentrációja a szelektív szűrőben). Az ezekkel az értékekkel futtatott szimulációk eredménye azonban nem egyezett a DMC szimulációk eredményével.

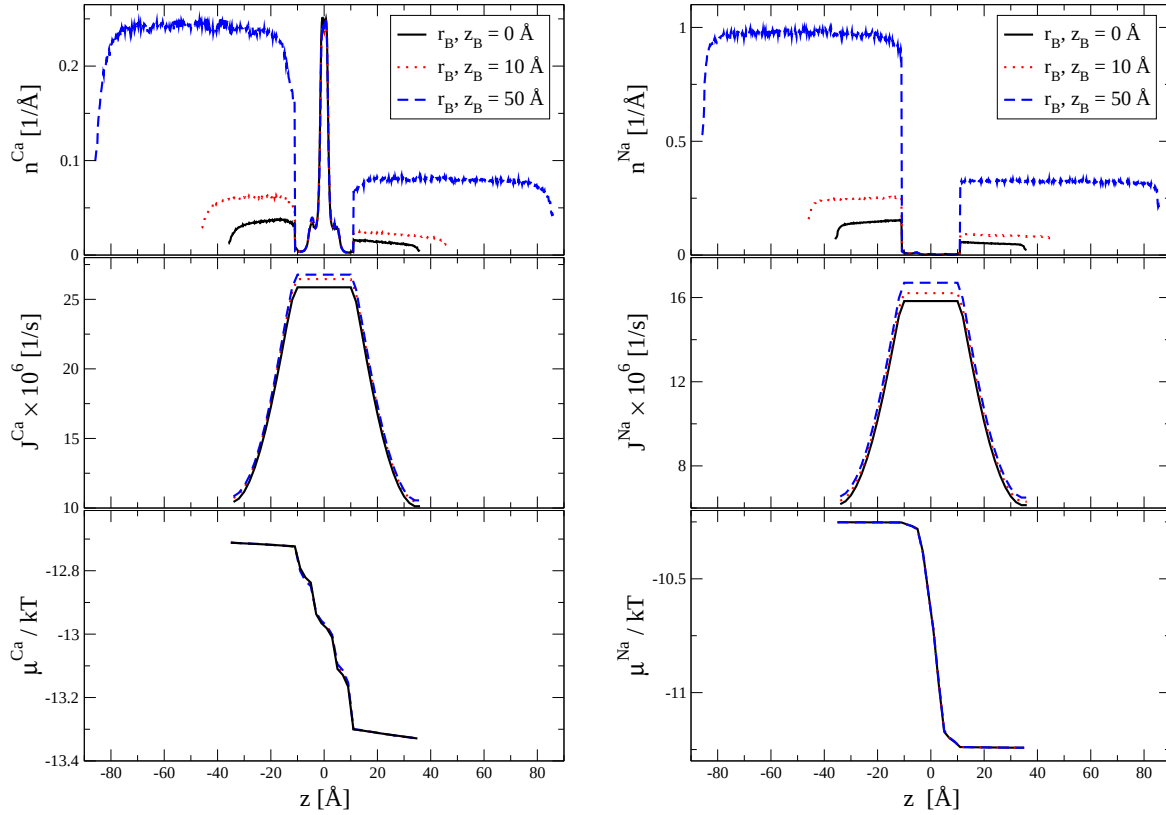
Az illesztéshez kiválasztottuk az $x^{\text{Ca}^{2+}} = 0.2$ móltört-értéket és a következő paramétereket változtattuk:

$$\alpha^{\text{Na}^+} = \frac{D_{\text{B}}^{\text{Na}^+}}{D_{\text{F}}^{\text{Na}^+}} \quad \text{és} \quad \alpha^{\text{F}} = \frac{D_{\text{F}}^{\text{Na}^+}}{D_{\text{F}}^{\text{Ca}^{2+}}} \quad (4.3)$$

Az első paraméter tehát azt adja meg, hogy mennyivel nagyobb a Na^+ tömbfázisbeli diffúziós együtthatója a szűrő-belinél. A második paraméter azt adja meg, hogy mennyivel nagyobb a Na^+ diffúziós együtthatója a szűrőben a Ca^{2+} -énál. Gillespie adatainak kb. az $\alpha^{\text{Na}^+} \approx 34$ és $\alpha^{\text{F}} \approx 8$ értékek felelnek meg.

Ezen adatokból kiindulva változtattuk ezeket a paramétereket (lásd 4.1 táblázat), és vizsgáltuk az NP+LEMC módszerrel kapott $J_z^{\text{Ca}^{2+}}/J_z^{\text{Na}^+}$ fluxusarányokat. A DMC szimulációkkal kapott fluxusarány 0.2-es móltörtre: 1.64.

Eredményként azt kaptuk, hogy 0.2-es móltört esetén az $\alpha^{\text{Na}^+} = 34$, és $\alpha^{\text{F}} = 2$ paraméterek használatával hasonlít a legjobban a kationok fluxusaránya. Az $\alpha^{\text{F}} = 2$ érték kisebb mind a Gillespie^{4,19} által kapott 8-as értéknél, mind a Boda és mtsai.^{13,14} által feltételezett 10-es értéknél. Az eltérés magyarázata további vizsgálatokat igényel, itt most mi elfogadjuk ezt az értéket. Ettől a ponttól kezdve a diffúziós együtthatókat lerögzítjük a $D_{\text{F}}^{\text{Na}^+} = D_{\text{B}}^{\text{Na}^+}/34$ és $D_{\text{F}}^{\text{Ca}^{2+}} = D_{\text{B}}^{\text{Ca}^{2+}}/(2 \cdot 34)$ értékeken.

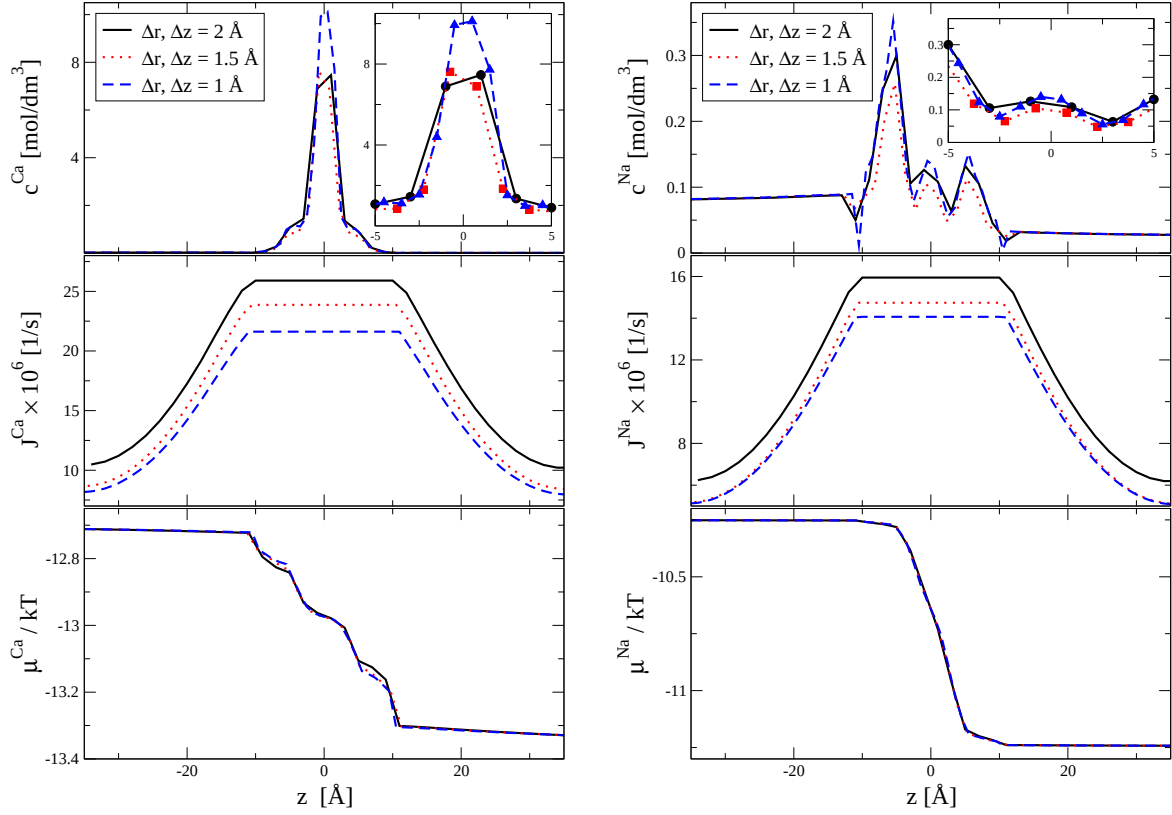


4.2. ábra. Az tömbfázis méretének hatása. Fekete vonallal jelöltük a tömbfázis nélküli esetet, piros pontokkal a 10 Å és kék szaggatott vonallal az 50 Å méretű tömbfázist. ($z_{\text{dl}} = 26 \text{ Å}$, $r_{\text{dl}} = 20 \text{ Å}$, $\Delta r = \Delta z = 2 \text{ Å}$, $x^{\text{Ca}^{2+}}$)

4.2. A tömbfázis méretétől való függés

A teljes szimulációs cella nem egyezik meg a NP egyenlet megoldási tartományával, ami a csatornából és az átmeneti tartományból áll (lásd 4.1 ábra). A szimulációs cella NP-tartományon kívül eső részének (tömbfázisú tartomány) hatását vizsgáljuk meg (paraméterek: z_B, r_B), különös tekintettel arra kérdésre, hogy szükség van-e rá egyáltalán. A különböző $z_B = r_B$ értékekre kapott eredményeinket mutatja a 4.2 ábra. A korábban lerögzített 0.2-es móltört kiválasztása azért volt fontos mert ebben az esetben van Na^+ - és Ca^{2+} -fluxus is a csatornában, így mindkét kation szempontjából tanulmányozható a rendszer. Ha külön nem jelzem, akkor a továbbiakban minden ábra erre a móltörré vonatkozik.

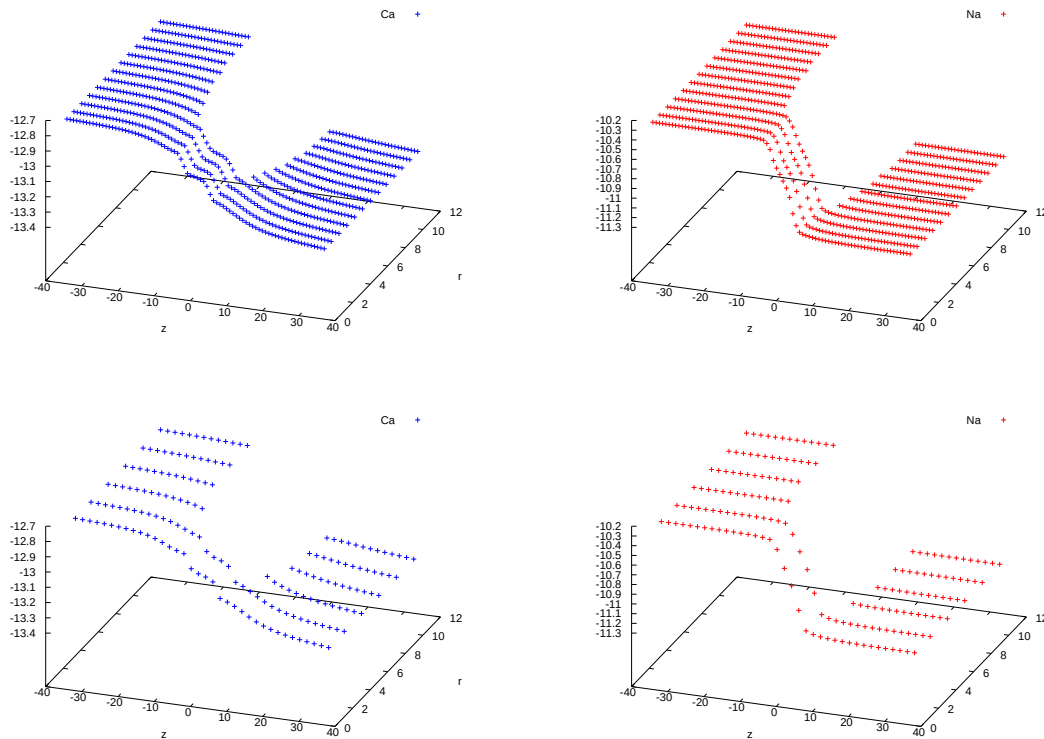
A 4.2 ábra alapján valóban szükség van a tömbfázisú tartományra (elsősorban a fluxusok pórusbeli értékén látszik ez). Ha ugyanis az NP egyenlet megoldási tartománya a szimulációs cella, akkor a cellát határoló merev fal határolja az NP-tartományt is. Ilyenkor határfelületi jelenséget tapasztalunk; jelen esetben az ionok jobban vonzzák egymás, mint a fal az ionokat, az ionkoncentráció tehát csökken a fal közelében. Ez azt eredményezi, hogy kisebb fluxust



4.3. ábra. Az elemi cellák méretének ($\Delta z = \Delta r$) hatása. Fekete vonallal jelöltük a 2 Å -ös elemi cella méretet, piros pontokkal az 1.5 és kék szaggatott vonallal az 1 Å nagyságú cellát. ($z_{\text{dl}} = 26 \text{ Å}$, $r_{\text{dl}} = 20 \text{ Å}$, $r_{\text{B}} = z_{\text{B}} = 10 \text{ Å}$).

számolunk az NP tartomány határán, ami „továbbgyűrűzik” a teljes megoldási tartományra, és a csatornában is kisebb lesz a fluxus a kellenél.

Érdemes pár szót ejteni a fluxusprofil alakjáról is. A középső ábra a fluxussűrűség z -komponensének az integrálját ábrázolja, azaz a z -irányba folyó teljes fluxust. Mivel a csatornában sugárirányban (r) nincs fluxus, nem juthat ki anyag, azaz konstansnak kell lennie az anyagmegmaradás miatt a csatorna keresztmetszetére integrált fluxusnak. A csatornán kívül azonban sugárirányban is elhagyhatják a részecskék a rendszert (ld. 4.11 ábra), ezért csökken a z -komponens a csatornától távolodva. Fontos, hogy ezek után, amikor fluxusról beszélünk, a csatornában lévő konstans értékre gondolunk, mert az a teljes fluxus. Az előbb említett indokok alapján tehát szükség van a tömbfázisra. Mostantól a szimulációk során 10 Å méretűt fogunk használni.



4.4. ábra. Az elektrokémiai potenciálprofil felülete az z, r sík felett, különböző elemi cella felbontás esetén (0.8 Å: felső sor, 2 Å: alsó sor). Bal oldal: Ca^{2+} , jobb oldal: Na^{+} .

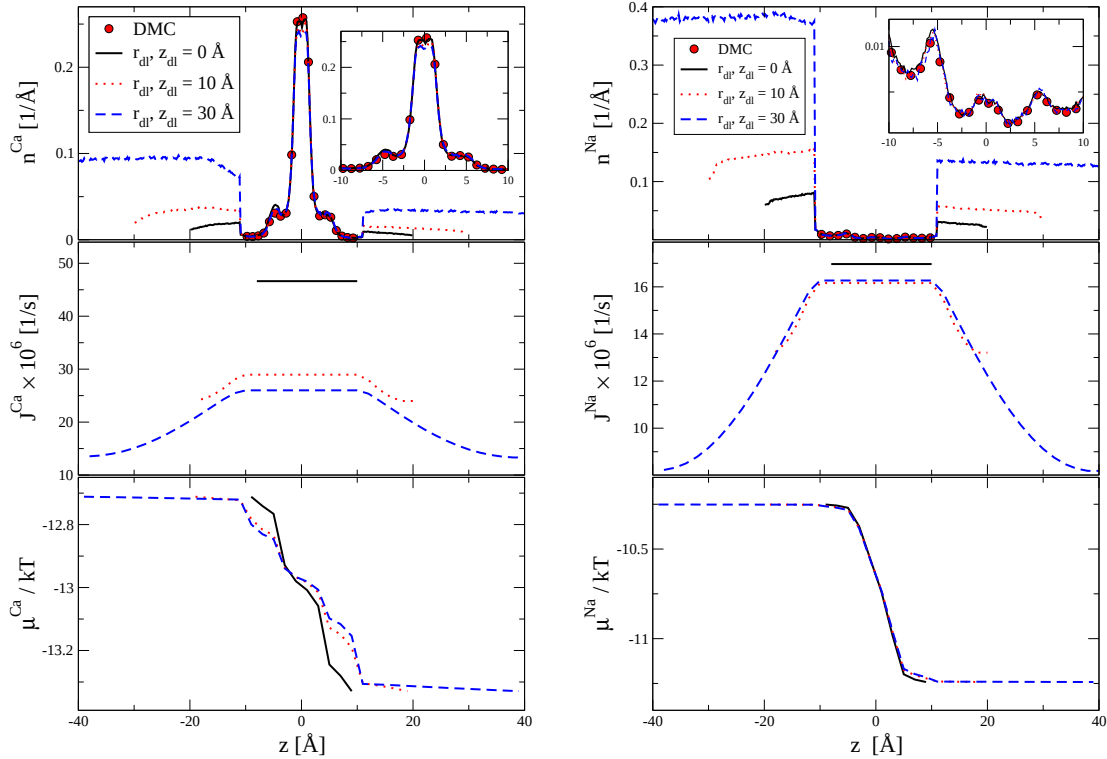
4.3. Az elemi cellák méretének hatása

Az NP egyenletet numerikusan oldjuk meg, melyhez egy rácsot használunk (ld. 4.1 ábra) Mint minden numerikus problémánál, a felbontás itt is hatással van az eredményeinkre. Egy durva beosztás gyorsabb számolást tesz lehetővé, ami az eredmények pontosságának rovására megy, és vice versa. A 4.3 ábra különböző $\Delta z = \Delta r$ értékekre mutatja az eredményeket.

$\Delta z = \Delta r$	$J_z^{\text{Ca}^{2+}} / 10^6 \text{ s}^{-1}$	$J_z^{\text{Na}^{+}} / 10^6 \text{ s}^{-1}$	$J_z^{\text{Ca}^{2+}} / J_z^{\text{Na}^{+}}$
2.0	2.59	1.60	1.62
1.5	2.39	1.47	1.62
1.0	2.16	1.41	1.54
0.8	2.31	1.42	1.63

4.2. táblázat. A kationok fluxusxa és fluxusaránya különböző $\Delta z = \Delta r$ értékeknél $x^{\text{Ca}^{2+}}$ móltört esetén.

A koncentrációprofilokat megvizsgálva azt láthatjuk, hogy a felbontás finomításával több részletet nyerünk, de alapvetően ugyanolyan viselkedést tapasztalunk: hasonló a görbék alakja. Az elektrokémiai potenciál profilok is szemmel láthatóan hasonlóak, de ne felejtjük el, hogy a



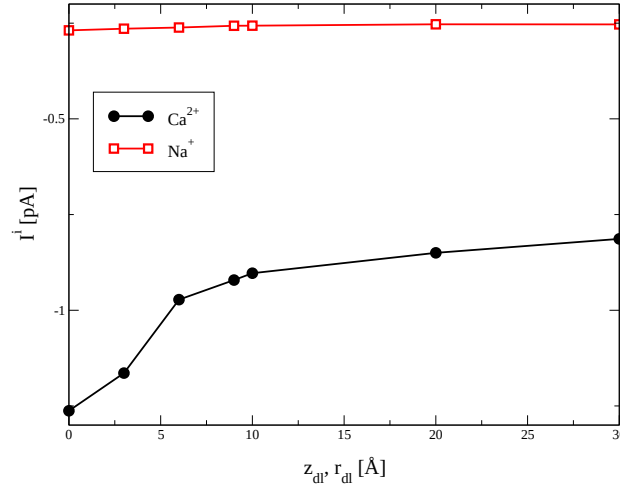
4.5. ábra. Az átmeneti tartomány hatása. Piros pontokkal jelöltük a DMC szimulációval kapott eredményt, fekete vonallal az átmeneti tartomány nélküli esetet, piros pontokkal a 10, kék szaggatott vonallal a 30 Å méretű átmeneti tartományt. A belső diagramok az előszobára és a szelektív szűrőre fókuszálnak. ($\Delta\Phi = 0$ mV, $z_B = r_B = 10$ Å, $\Delta r = \Delta z = 2$ Å).

transzport hajtóereje az elektrokémiai potenciál gradiense, mely esetben a potenciál értékében lévő kis hibák vagy eltérések felerősödhetnek. Mindez azt eredményezi, hogy a fluxus elég érzékenyen függ a beosztás felbontásától.

A Na^+ fluxusán látszik hogy a beosztás finomításával konvergál az eredmény. A Ca^{2+} esetén már nem ilyen jó a helyzet. Szerencsére a bennünket leginkább érdeklő mennyiség nem az abszolút áram, hanem a relatív áram (dinamikai szelektivitás). Mivel a felbontás finomítása mindkét ionra hasonlóan hat, a dinamikai szelektivitásra kisebb a hatása. A 4.2 táblázat mutatja a konkrét adatokat.

A 4.4 ábra az elektrokémiai potenciál z, r sík feletti felületét mutatja különböző felbontások esetén. Míg nagy felbontás esetén (0.8 Å, felső ábrák) részletes képet kapunk az elektrokémiai potenciálról, a cellaméret növelésével kevesebb pontunk van, de azok (legalábbis szemre) ugyanolyan felületet rajzolnak ki. Nem kell persze vizuális összehasonlításra szorítkoznunk: a fluxus nagysága számszerű információt szolgáltat arról, hogy megfelelő-e a felbontás.

Megjegyzem, hogy a 4.4 ábrán láthatóhoz hasonló felületek keresztmetszet felett való átlagolásából kaptuk a csak z -től függő profilokat minden esetben. A 4.3 ábrán látható z -függő



4.6. ábra. Az átmeneti tartomány méretének hatása az ionokfluxusokra.

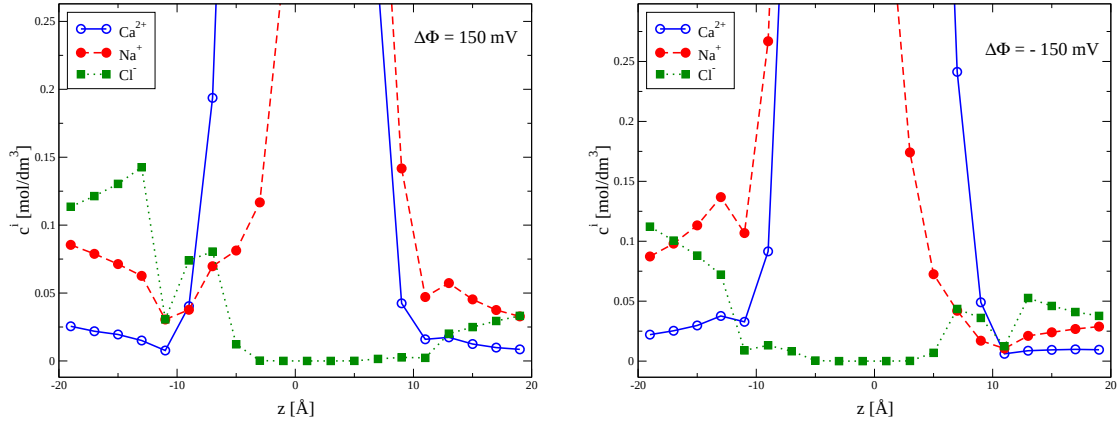
elektrokémiai potenciál profilok pl. a 4.4 ábrán látható (z, r) -függő profilok r -szerinti átlagolásával álltak elő.

A probléma megoldása az lenne, ha a csatornában nagyobb felbontású ráccsal dolgoznánk, mint a csatornán kívül. Ezzel úgy tudnánk a fontos tartományban növelni a felbontást, hogy a nagy térfogatú térrészben fölöslegesen nem végzünk számításokat. A program további fejlesztése ilyen irányba folyik. A továbbiakban, mivel csak kvalitatív következtetések levonása a célunk, és nem törekszünk abszolút pontosságra, 2 Å felbontással dolgozunk.

4.4. Az átmeneti tartomány méretének hatása

Az átmeneti tartomány egy másik fontos geometriai jellemző: így nevezzük azt a tartományt, ami a csatorna és a tömbfázis között helyezkedik el (ld. 4.1 ábra). Ez a tartomány azért fontos, mert egyrészt ennek is van ellenállása (hogypontosan mekkora, az a diffúziós együtthatótól és a koncentrációtól függ), másrészt ebben a tartományban elektromos kettősrétegek alakulnak ki, amennyiben a rendszerre külső feszültséget kapcsolunk.

Ezek a kettősrétegek rendkívül fontosak abból a szempontból, hogy ők felelősek a külső feszültség semlegesítéséért. A kettősrétegekben pozitív és negatív töltések halmozódnak fel, és létrehoznak egy ellenteret, ami a külső potenciál ellen hat. Az ionok (a kettősrétegek) potenciálja és a külső potenciál együtt határozza meg a teljes potenciált. A külső potenciál viszonylag egyenletesen változik a teljes NP-tartományban, ez ugyanis a Laplace-egyenlet megoldása, amikor az ionok nincsenek jelen. Mivel azonban a csatorna a legnagyobb ellenállású tartomány, a potenciálesés nagyobb része a csatornában megy végbe, míg a tömbfázisban kevésbé változik a potenciál (ld. 4.13 ábra). Ezt a csatornában gyorsan, a csatornán kívül lassan változó potenciálprofil tehát az ionok és a külső potenciál együtt hozzák létre.



4.7. ábra. A membrán jobb és bal oldalán megjelenő kettősrétegek illusztrációja $\Delta\Phi = \pm 150$ mV esetén.

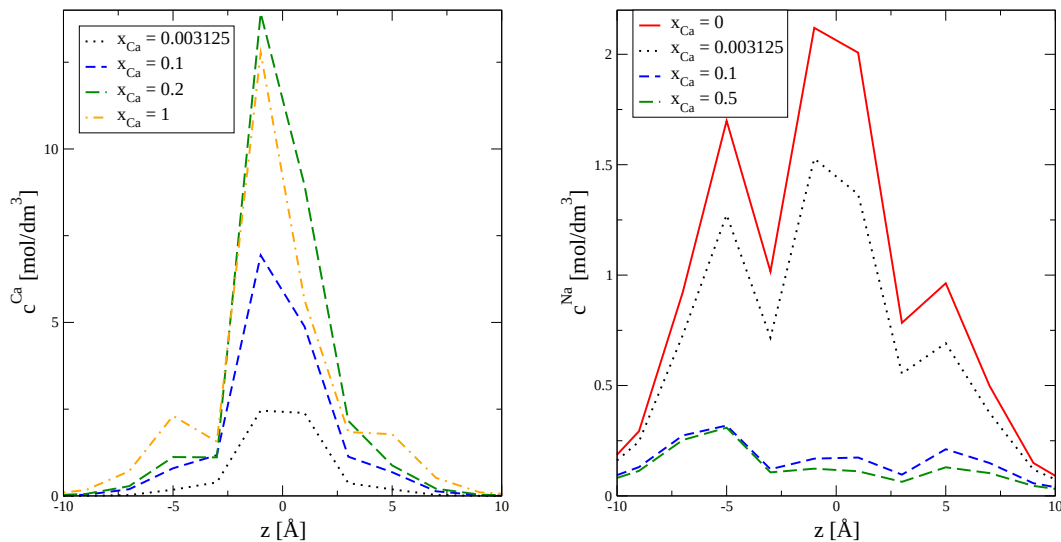
Azért van szükség az átmeneti tartományokra, hogy „teret adjunk” a kettősrétegek. Ez egy diffúz réteg, ami benyúlik a tömbfázisba, de hogy milyen messze, az az ionkoncentrációtól függ. Kisebbségi koncentráció esetén nagyobb mértékű benyúlást tapasztalhatunk (ld. Debye-féle árnyékolási hossz, ami fordítottan függ a koncentráció gyökétől).

A 4.7 ábrán szemügyre vehetjük ezeket a kettősrétegeket $\Delta\Phi = \pm 150$ mV esetén. Ezek extrém nagy feszültségek abból a célból, hogy jobban látszódnak a kettősrétegek. A $\Delta\Phi = 150$ mV esetén a membrán bal oldalán negatív töltés, míg a jobb oldalán pozitív töltés halmozódik fel. A bal oldalon az anionok profilja nő a membrán mellett, míg a kationprofilok csökkennek. Ez egy negatív töltésű kettősrétegnek felel meg. A jobb oldalon fordított a helyzet.

Látszik az is, hogy az NP-tartomány nem elég széles ezeknél a nagy feszültségeknél. A tartomány határán elvileg az ionkoncentrációknak a tömbfázis-beli értékekhez kellene tartani és a rendszernek semlegesnek kéne lenni. Ez ebben az esetben láthatóan nem teljesül. Minél nagyobb tehát a feszültség, annál nagyobb z_{dl} és r_{dl} értékekkel kell dolgoznunk.

Az ionok koncentrációprofiljaira kis hatással van a vizsgált paraméter (ld. 4.5 ábra), mivel ezeket elsősorban a csatornában lévő lokális kölcsönhatások (az ionoknak egymással, az ionoknak a pórus falával illetve az oxigénekkel való kölcsönhatása) határozzák meg. Nem csoda, hogy a DMC-profilokkal való egyezés kiváló. Az elektrokémiai potenciálprofilokra jobban hatnak ezek a paraméterek, ami a fluxusprofilokban is megmutatkozik. Látszik hogy az átmeneti tartomány nélküli eredmények nem pontosak, de a tartomány növelésével konvergáló eredményt kapunk (4.5 ábra). Hasonló következtetéseket vonhatunk le, ha -20 mV feszültséget kapcsolunk a rendszerre (az eredményeket nem mutatom, a 4.5 ábrához hasonló görbéket kapunk).

Innentől fogva a $z_{dl} = 26$ Å és $r_{dl} = 20$ Å értékeket használjuk, mivel ekkora átmeneti tartomány már elegendő a kettősrétegek befogadására, és megszűnik a rendszer ezen paramétertől való függése.



4.8. ábra. A kationok koncentrációja az előszobában és a szelektív szűrőben, különböző kalcium móltörtök esetén.

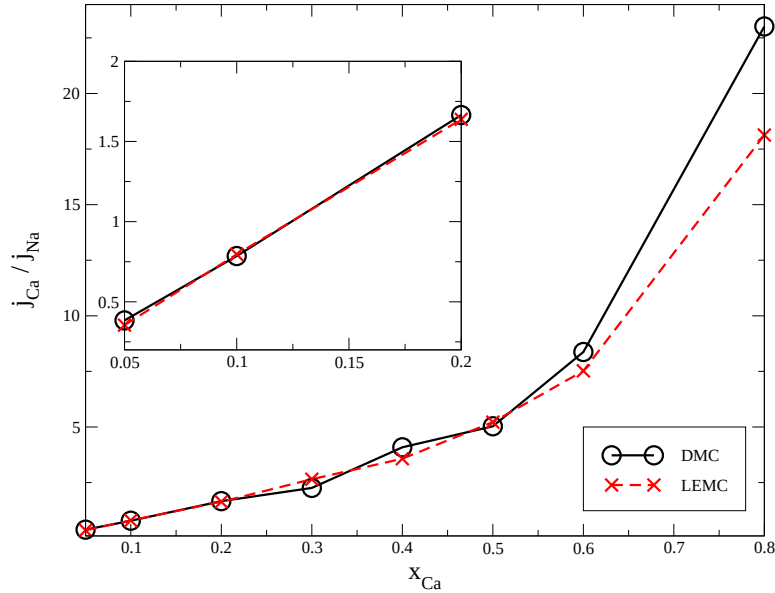
4.5. Na⁺ vs. Ca²⁺ móltörtkísérlet

Miután a rendszer paramétereit lerögzítettük, végrehajtottuk ugyanazt a móltörtkísérletet, amit Rutkai és *mtsai*.³⁹ számoltak DMC szimulációval. A 4.8-4.11 ábrákon látható eredményeket kaptuk.

Összhangban Boda és *mtsai*. egyensúlyi GCMC⁶⁻¹⁵ és Rutkai és *mtsai*.³⁹ DMC vizsgálataival, azt tapasztaljuk hogy ha a tömbfázisban a Ca²⁺-ot kicseréljük Na⁺-ra, ez a csere a csatornában is végbemegy. Ez az esemény azonban már nagyon kicsi móltörtnél végbemegy, azaz a Ca²⁺ már akkor kiszorítja Na⁺-ot a szelektív szűrőből, amikor még a tömbfázisban viszonylag kis mennyiségben van jelen (kb. $x^{\text{Ca}^{2+}} \approx 0.003$ móltörtnél). Elmondhatjuk tehát, hogy ami az egyensúlyi szelektivitást illeti, a modelleszatorna erősen Ca²⁺ vs. Na⁺ szelektív. Más szavakkal: a szelektív szűrőnek, mint kötőhelynek, nagy a Ca²⁺-affinitása. Ennek alapvetően a CSC mechanizmus a magyarázata: eszerint az ionok térfogatukkal és töltésükkel is versenyeznek az elfoglalt területért, és mivel a kalcium ugyanakkora térfogatban kétszer akkora töltést képvisel, a szelektív szűrő negatív töltését hatékonyabban tudja semlegesíteni.

Eredményeink rámutatnak az NP+LEMC módszer azon előnyére, hogy nagyon kicsi Ca²⁺-koncentráción (millimólos) is gond nélkül használható. A DMC szimulációval csak nagyon hosszú futtatások árán lehetett 0.05-nél kisebb móltörtre megfelelő statisztikát elérni.³⁹ Az idézett cikk 3. ábráján arra a pontra, ahol a Ca²⁺-Na⁺ csere végbemegy, csak extrapolálni lehet, és valahol $x_{\text{Ca}} < 10^{-2}$ értéknél történik meg az ionok cseréje.

A mi módszerünknek az a nagy előnye a DMC szimulációkkal szemben, hogy a kis Ca²⁺ koncentrációkra való szimulációnak nincs semmi akadálya. Dinamikus szimulációknál, kis



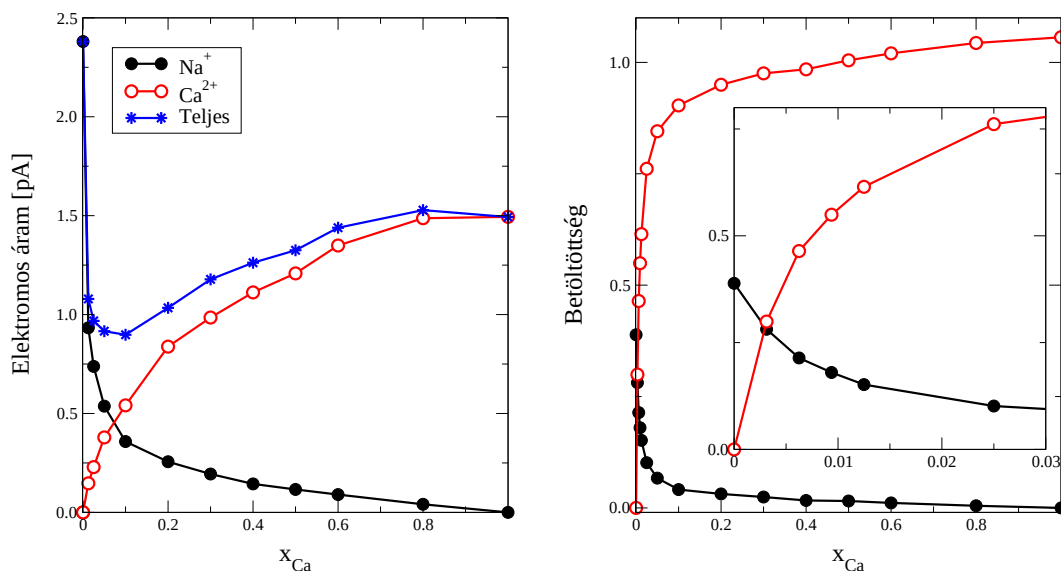
4.9. ábra. A Ca^{2+}/Na^{+} fluxusarány (dinamikai szelektivitás) a Ca^{2+} -móltört függvényében. Fekete körök jelölik a DMC-vel kapott eredményeket, piros x-ek pedig az NP+LEMC módszer eredményeit. A belső diagram a kis móltört-tartományra fókuszál.

koncentráció esetén, kevés az olyan esemény, hogy egy Ca^{2+} bekerül a szűrőbe. Mi az NP egyenlettel számoljuk a fluxust, a koncentrációkat pedig GCMC szimulációkkal határozzuk meg, ami kis koncentráción is jól működik.

A dinamikai szelektivitás (fluxusarány) a 4.9 ábrán látható. Látszik hogy körülbelül 0.13-as móltörtnél lesz a fluxusarány 1, azaz akkor váltanak a fluxusok. Ez jóval nagyobb, mint amit a betöltöttség-aránynál tapasztaltunk (4.10 ábra alsó diagramja). A modell tehát kevésbé Ca^{2+} -szelektív amennyiben dinamikai szelektivitás szempontjából elemezzük, mint amikor egyensúlyi szelektivitásról beszélünk. A szűrő jobban köti a Ca^{2+} -ot mint amennyire a csatorna vezeti a Ca^{2+} -ot.

Ezt a jelenséget Rutkai és mtsai.³⁹ DMC szimulációkkal már részletesen elemezték, és Boda és mtsai.¹³ is magyarázattal szolgáltak az INP egyenlet alapján (ld. 1.7 egyenlet). Eszerint a szelektív szűrőnek nagy az affinitása a Ca^{2+} -ra, tehát a Ca^{2+} -ionok már egészen kis móltörtnél is kiszorítják az Na^{+} -ot a szelektív szűrőből. Ennél a kis móltörtnél azonban a Ca^{2+} nem vezet, részben azért, mert kicsi a koncentrációja a tömbfázisban és az előszobában, azaz a filteren kívül, másrésztől kevésbé mozgékony mint a Na^{+} . Ennek az az oka, hogy a Ca^{2+} -ionokat az $O^{1/2-}$ -ionok kétszer olyan erősen vonzzák, mint a Na^{+} -ionokat, ezért kétszer akkora erővel akadályozzák őket a mozgásukban.

A DMC-vel való egyezés jónak nevezhető (lásd 4.9 ábra). Azzal hogy a diffúziós együtthatókat beállítottuk 0.2-es Ca^{2+} -móltörtre, az ezekkel a diffúziós együtthatókkal számolt eredmények a teljes móltörttartományban reprodukálják az DMC fluxusarányt. Csak nagy kon-



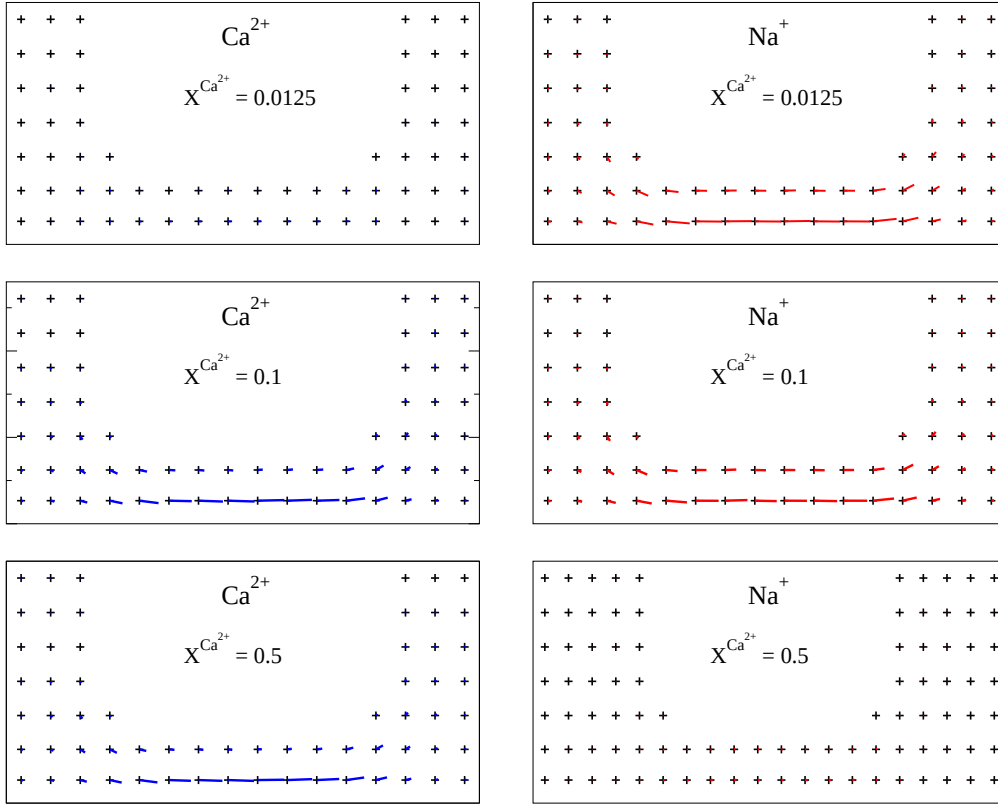
4.10. ábra. A felső diagramon a kationok áramának (illetve azok összegének) móltört szerinti változása látható. Az alsó ábrán az egyes kationoknak a csatornára vonatkoztatott betöltöttsége a móltört függvényében való változása látható. A kicsi ábra a kis móltörtökre fókuszál.

centráció esetén tapasztalunk némi eltérést, feltehetőleg a Na^+ -fluxusban lévő bizonytalanság hatása felerősödik, mivel osztunk vele.

A 4.10 ábra mutatja hogy ebben a rendszerben is észlelhető az anomális móltörtfüggés jelensége. Ahogy a Ca^{2+} móltörtjét növeljük, a Na^+ -áram meredeken csökken azzal együtt hogy a Na^+ -betöltöttség is gyorsan csökken a csatornában.

A kalcium áram folyamatosan nő az adagolt Ca^{2+} függvényében, de nem annyira meredeken, mint a Na^+ esetében. A középső móltörttartományban ezért jön létre egy a teljes áramra vonatkoztatott minimum érték (4.10 ábra, kék csillaggal jelölve). Lényegében ugyanazt a jelenséget tapasztaljuk, mint Almers és McCleskey kísérletnél^{17,18} az L-típusú Ca-csatornára (1.3a ábra), illetve a Gillespie-Meissner kísérletnél^{4,19} a RyR Ca-csatornára (1.3b ábra). Ami azt illeti, a görbe meglehetősen hasonlít a RyR Ca-csatorna esetében kapott AMFE-görbéhez, ami azt jelzi, hogy a modellünk inkább a RyR csatornához áll közelebb: nagyobb átmérőjű és kevésbé szelektív, mint az L-típusú Ca-csatorna.

A 4.11 ábra szemléletesen mutatja be a fluxusok, mint vektormennyiségek megváltozásának jelenségét különböző kalcium móltörtök esetén. A + jelek az elemi cellák középpontjait jelzik, a pálcikák pedig a j^{α} vektort reprezentálják. A pálcika hossza arányos az áramsűrűség abszolút értékével. A pálcika iránya a vektor irányát jelzi. Amikor kis mennyiségű Ca^{2+} -ot adunk a rendszerhez, a nátrium ionok fluxusa jelentős, míg a kalciumé közel zérus (az ábra felső része). Ha a Ca^{2+} -móltörtöt 0.1-nek választjuk (az ábra középső része) már mindkét kation mozog és látható módon egy irányba, balról jobbra, azaz a kisebb koncentrációjú hely felé. Amikor a bal



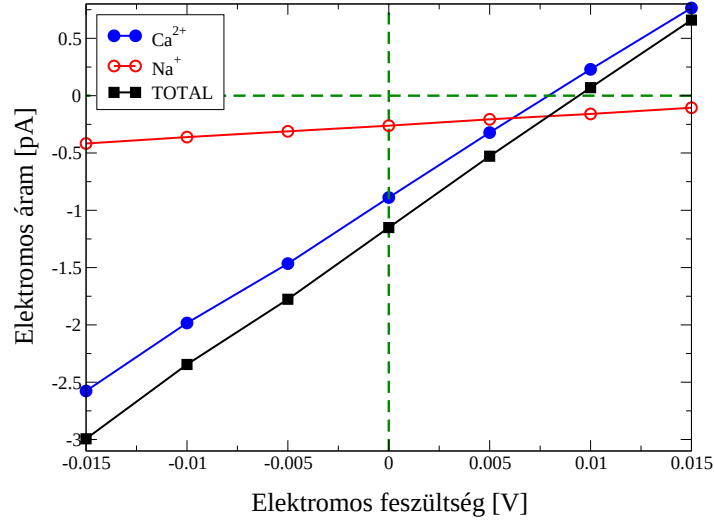
4.11. ábra. A Ca^{2+} és a Na^+ fluxusát, mint vektormennyiséget reprezentáló ábrák különböző kalcium-móltörtek esetén.

oldalon fele-fele arányban helyezzük el a kationokat, a nátrium-fluxus gyakorlatilag megszűnik (az ábra alsó diagrampárja).

Látható, hogy az ionfluxus nem „oldalról”, a z -tengely mentén érkezik be a csatornába, hanem a csatorna/membrán fala mentén oldalról. Ez meglepőnek tűnhet, de a magyarázata egyszerű. Ha extra töltés van jelen a rendszerben, az a felületeken helyezkedik el. A tömbfázis közepe (a falaktól távol) igyekszik töltésszemleges lenni. Ez arra is magyarázatul szolgál, miért kapunk más eredményt, ha csak egy-dimenziós ráccsal dolgozunk (r -dimenzióban csak egy beosztás van, azaz csak a z -dimenzióban osztjuk fel rétegekre a cellát). Ez a beosztás elfedi az r -irányú fluxusra vonatkozó információkat.

4.6. Feszültség-áram karakterisztika

Ha külső feszültséget alkalmazunk a rendszeren, a potenciálkülönbség extra hajtóerőt gyakorol az ionokra a koncentrációkülönbségen felül. Pozitív potenciál a koncentrációgradienssel szemben dolgozik, míg a negatív potenciál azt erősíti. Létezik egy feszültségérték, mikor ez a két hatás éppen kioltja egymást, azaz amikor a potenciálgradiensből és a koncentrációgradiensből



4.12. ábra. A különböző ionok által hordozott és a teljes elektromos áram a rendszerre kapcsolt feszültség függvényében.

adódó hajtóerőkből létesített töltésfluxusok egyenlőek és ellenkező előjelűek. Tehát ebben az esetben az áram zérus. Ezt a feszültséget nevezzük reverziós potenciálnak a biofizikában, és Nernst-potenciálnak a fizikai kémiában.

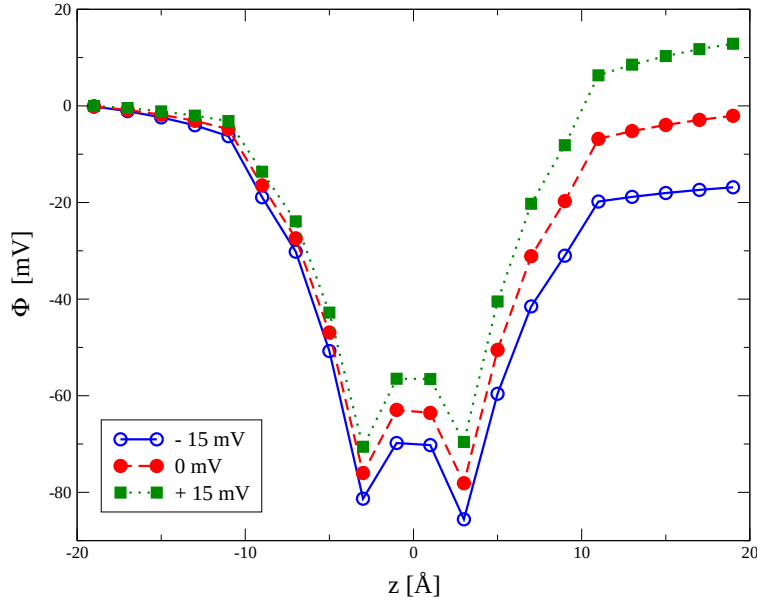
Abban a feszültségtartományban, amit ebben a dolgozatban vizsgálunk, a feszültség-áram karakterisztika lineáris. Később megvizsgáljuk a problémát egy nagyobb feszültségtartományban is, de ehhez jóval nagyobb átmeneti tartományt kell használnunk.

A 4.12 ábrán a rendszerre adott feszültség függvényében ábrázoljuk a kationok által külön-külön generált és a teljes áramot. A Nernst-potenciál nagyon közel esik a Ca^{2+} Nernst-potenciáljához (ezt az ábrán az a pont jelzi, ahol a Ca^{2+} -áramot jelölő görbe metszi az abszcisszát), ami jelzi, hogy a csatorna inkább kalciumra szelektív, legalábbis a vizsgált összetétel esetén ($x^{\text{Ca}^{2+}} = 0.2$). A Nernst-egyenletből ugyanis definiálható külön-külön a két kationra a Nernst-potenciál:

$$\Delta\phi = \frac{1}{q^\alpha} \Delta\mu_c^\alpha = \frac{1}{q^\alpha} (kT \ln a^{\alpha,\text{R}} - kT \ln a^{\alpha,\text{L}}) = \frac{1}{q^\alpha} kT \ln \frac{a^{\alpha,\text{R}}}{a^{\alpha,\text{L}}}. \quad (4.4)$$

Látható, hogy az egyenlet jobb oldalán az aktivitások arányának logaritmus szerepel. Az aktivitásban szerepel a többlet kémiai potenciál, illetve az aktivitási tényező. Ha nem vennénk figyelembe a többlet kémiai potenciált, csak a koncentráció-arányt tartalmazná a logaritmus, ami a Nernst-egyenlet széles körben ismert alakja, de fontos hangsúlyozni, hogy csak ideális oldatokban érvényes.

Ha tehát a csatorna tökéletesen Ca^{2+} -szelektív lenne, akkor az áram-feszültség ($I - \Delta\Phi$) görbe pont a Ca^{2+} Nernst-potenciáljánál metszené az abszcisszát. Ha tökéletesen Na^{+} -



4.13. ábra. Az átlagos elektromos potenciál a feszültség különböző értékeire $x^{\text{Ca}^{2+}} = 0.2$ móltörtre.

szelektív lenne, akkor a Na^+ Nernst-potenciáljánál lenne a teljes áram zéruspontja. Mivel a Ca^{2+} -éhoz van közel, a csatorna inkább Ca^{2+} -szelektívnek mondható. A gyakorlatban biofizikában így ellenőrzik, hogy mire szelektív a vizsgált csatorna.

A 4.13 ábra az átlagos elektromos potenciál profilját mutatja a feszültség három különböző értékére. Az elektromos potenciált úgy számítottuk a szimuláció során, hogy a behelyezett ionokat tesztöltéseknek kezeltük, kiszámítottuk az inzertált ion helyén a potenciált, és ezeket minden elemi cellára átlagoltuk. Látható, hogy a potenciálnak minimuma van az ioncsatornában. Ennek az az oka, hogy a kationok helyszűke miatt nem képesek teljes mértékben semlegesíteni az $\text{O}^{1/2-}$ -ionokat a csatornán belül, ezért a csatorna nettó töltése negatív marad.

A jobb oldalon az átlagos potenciálnak elvileg reprodukálnia kellene az inputként megadott feszültség-értéket. Ez azonban nem teljesül, mivel túlságosan kis méretű az átmeneti tartomány. Az ábra azt is illusztrálja, hogy miként áll elő a teljes potenciál az ionok által keltett és a teljes potenciál összegeként. A zérus külső potenciálhoz tartozó piros görbe jelöli a csak az ionok által produkált potenciált. Amikor külső elektromos teret alkalmazunk, a $\Phi_{\text{appl}}(z)$ külső potenciál erre szuperponálódik.

5. fejezet

Összefoglalás

Ebben a dolgozatban Boda és Gillespie⁴⁰ által kifejlesztett NP+LEMC módszert alkalmaztuk egy modell Ca-csatornán keresztül folyó iontranszport vizsgálatára. Ez a módszer az empirikus NP egyenletet oldja meg oly módon, hogy az egyenletben szereplő koncentrációt és elektrokémiai potenciált az LEMC szimulációs módszerrel állítja elő. Ehhez a rendszert elemi cellákra bontjuk fel és mindegyikben lokális egyensúlyt feltételezünk. Ennek a feltételezésnek a jogossága vita tárgya, az mindenesetre elmondható, hogy a feltételezésre épülő módszertan jól működik. Az NP egyenletben szereplő harmadik mennyiség, a diffúziós együttható, az ionok mozgékonyágát leíró külső, illeszthető paraméter.

Röviden összefoglalom, hogy mi ennek a módszernek az előnye/hátránya más, az iontranszport vizsgálatára alkalmas módszerekhez képest.

Előnyök és hátrányok az NP+PB (PNP) módszerhez képest:

- Fő előnye a mi módszerünknek, hogy az ionok nem csak pontszerűek lehetnek, így bármilyen molekuláris modellre alkalmazható, ami figyelembe veszi az ionok véges méretét és az ionok közötti korrelációkat.
- Előnye még az hogy az NP+PB módszer esetén egy plusz iterációt be kell építeni az eljárásba, ami a Poisson-egyenlet teljesülését biztosítja. Az NP+LEMC módszer esetében erre nincs szükség, mert az LEMC szimulációkból eleve olyan mennyiségeket számolunk, amik összhangban állnak az elektrosztatika törvényeivel. A szimuláció minden konfigurációjára teljesül ugyanis a Poisson-egyenlet, így az átlagokra is.
- Az NP+LEMC módszer legfontosabb hátránya a nagy számítási igény, ugyanis szimulálni kell minden egyen iterációs lépésben. Nagy sűrűségeken a részecskebehelyezés akadályokba ütközhet.

Előnyök és hátrányok az NP+DFT módszerhez képest:

- A módszerünk fő előnye, hogy három dimenzióban alkalmazható bármilyen molekuláris modellre, míg Gillespie DFT módszere csak töltött merev gömbök esetén használható.
- A DFT ezenkívül csak egy dimenzióban áll rendelkezésre, míg a szimuláció bármely 3D-s modellre alkalmazható.
- Az NP+DFT módszer az NP+PB-hez hasonlít olyan szempontból, hogy itt is szükség-szerű a Poisson-egyenlet teljesítése, ami plusz iterációs lépést jelent.
- További előnye a mi módszerünknek véleményem szerint, hogy a szimulációs technika könnyebben implementálható, mint a Gillespie által használt DFT.
- A probléma 1D-re való redukálása miatt a DFT gyorsabban szolgáltat eredményt, mint a NP+LEMC.

Előnyök és hátrányok a DMC (és más közvetlen dinamikai szimulációs) módszerhez képest:

- Az NP+LEMC módszer a hatékonyabb és a gyorsabb, mivel a módszer ionbehelyezéseket végez, így alacsony koncentráció esetén is kerülnek ionok a csatornába, Így millimólnál kisebb koncentrációjú tömbfázis esetén is praktikusán működik.
- A módszerünk előnye hogy ismerjük az NP egyenletben lévő mennyiségeket (pl. a hajtóerőt), amiről a direkt szimulációk nem adnak számot.
- Az LEMC módszer csak a konfigurációs teret mintavételezi, a dinamikáról csak egy empirikus transzportegyenlet ad számot, míg a dinamikai szimulációs esetében az ionok mozgását közvetlenül szimulálják.
- A DMC módszer előnye, hogy a diffúziós állandó nem bemeneti paraméter, hanem a szimuláció a dinamikát közvetlenül szolgáltatja.
- Az LEMC módszer esetén a peremfeltételeket korrekt módon tudjuk kezelni, mivel a módszer ezt inherens módon tartalmazza.

A Ca-csatornára vonatkozó konkrét eredményeinket illetően fontosnak érzem annak kiemelését, hogy ez a módszer is rámutat arra, hogy világosan különbséget kell tennünk az egyensúlyi és dinamikai szelektivitások között. A szelektivitáson sokszor azt értik, hogy a versengő speciesek közül melyik kötődik meg nagyobb valószínűséggel valahol (kötőhely, felület, anyagi rendszer). A technológiai szempontból viszont sokszor fontosabb a szelektivitásnak egy olyan értelmezése, amikor azt nézzük hogy a rendszer a versengő speciesek közül melyiket engedi át nagyobb mennyiségben (membránok). Az olyan szűk pórusokban mint a Ca-csatorna előfordulhat, hogy az egyik fajta szelektivitás a másik ellen hat. Jelen esetben például a szelektív szűrőbe erősen kötődő kalciumot éppen ez a szoros kötődés akadályozza a transzportban.

Jövőbeli terveink között szerepel a program további optimalizálása abból a célból, hogy nagyobb pórusok (pl. szintetikus nanopórusok) vizsgálatára is alkalmas legyen.

Irodalomjegyzék

- [1] D. Gillespie, D. Boda, Y. He, P. Apel, and Z.S. Siwy. Synthetic nanopores as a test case for ion channel theories: The anomalous mole fraction effect without single filing. *Biophys. J.*, 95(2):609–619, 2008.
- [2] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. L. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360):69–77, 1998.
- [3] D. P. Tieleman, P. C. Biggin, G. R. Smith, and M. S. P. Sansom. Simulation approaches to ion channel structure-function relationships. *Q. Rev. Biophys.*, 34(4):473–561, 2001.
- [4] D. Gillespie. Energetics of divalent selectivity in a calcium channel: The Ryanodine Receptor case study. *Biophys. J.*, 94:1169–1184, 2008.
- [5] D. Boda, J. Giri, D. Henderson, B. Eisenberg, and D. Gillespie. Analyzing the components of the free energy landscape in a calcium selective ion channel by Widom’s particle insertion method. *J. Chem. Phys.*, 134(5):055102, 2011.
- [6] D. Boda, D. D. Busath, D. Henderson, and S. Sokolowski. Monte Carlo simulations of the mechanism for channel selectivity: The competition between volume exclusion and charge neutrality. *J. Phys. Chem. B*, 104(37):8903–8910, 2000.
- [7] D. Boda, D. Henderson, and D. D. Busath. Monte Carlo study of the effect of ion and channel size on the selectivity of a model calcium channel. *J. Phys. Chem. B*, 105(47):11574–11577, 2001.
- [8] D. Boda, D. Henderson, and D. D. Busath. Monte Carlo study of the selectivity of calcium channels: improved geometrical model. *Mol. Phys.*, 100(14):2361–2368, 2002.
- [9] D. Boda, D. D. Busath, B. Eisenberg, D. Henderson, and W. Nonner. Monte Carlo simulations of ion selectivity in a biological Na channel: Charge-space competition. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4(20):5154–5160, 2002.

- [10] D. Boda, M. Valiskó, B. Eisenberg, W. Nonner, D. Henderson, and D. Gillespie. The effect of protein dielectric coefficient on the ionic selectivity of a calcium channel. *J. Chem. Phys.*, 125(3):034901, 2006.
- [11] D. Boda, M. Valiskó, B. Eisenberg, W. Nonner, D. Henderson, and D. Gillespie. Combined effect of pore radius and protein dielectric coefficient on the selectivity of a calcium channel. *Phys. Rev. Lett.*, 98(16):168102, 2007.
- [12] D. Boda, W. Nonner, M. Valiskó, D. Henderson, B. Eisenberg, and D. Gillespie. Steric selectivity in Na channels arising from protein polarization and mobile side chains. *Biophys. J.*, 93(6):1960–1980, 2007.
- [13] D. Gillespie and D. Boda. The anomalous mole fraction effect in calcium channels: A measure of preferential selectivity. *Biophys. J.*, 95(6):2658–2672, 2008.
- [14] D. Boda, M. Valiskó, D. Henderson, B. Eisenberg, D. Gillespie, and W. Nonner. Ion selectivity in L-type calcium channels by electrostatics and hard-core repulsion. *J. Gen. Physiol.*, 133(5):497–509, 2009.
- [15] M. Malasics, D. Boda, M. Valiskó, D. Henderson, and D. Gillespie. Simulations of calcium channel block by trivalent ions: Gd^{3+} competes with permeant ions for the selectivity filter. *Biochim. et Biophys. Acta - Biomembranes*, 1798(11):2013–2021, 2010.
- [16] W. A. Sather and E. W. McCleskey. Permeation and selectivity in calcium channels. *Ann. Rev. Physiology*, 65:133–159, 2003.
- [17] W. Almers, E. W. McCleskey, and P. T. Palade. Non-selective cation conductance in frog muscle membrane blocked by micromolar external calcium ions. *J. Physiol.*, 353:565–583, 1984.
- [18] W. Almers and E. W. McCleskey. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J. Physiol.*, 353:585–608, 1984.
- [19] D. Gillespie, L. Xu, Y. Wang, and G. Meissner. (De)constructing the ryanodine receptor: Modeling ion permeation and selectivity of the calcium release channel. *J. Phys. Chem. B*, 109(32):15598–15610, 2005.
- [20] B. Hille and W. Schwarz. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J. Gen. Physiol.*, 72(4):409–442, 1978.
- [21] T. Begenisich. Molecular properties of ion permeation through sodium channels. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 16(1):247–263, 1987.
- [22] P. Hess and R. W. Tsien. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature*, 309(5967):453–456, 1984.

- [23] W. Nonner and B. Eisenberg. Ion permeation and glutamate residues linked by Poisson-Nernst-Planck theory in L-type calcium channels. *Biophys. J.*, 75(3):1287–1305, 1998.
- [24] W. Nonner, D. P. Chen, and B. Eisenberg. Progress and prospects in permeation. *J. Gen. Physiol.*, 113(6):773–782, 1999.
- [25] S. Kuyucak, M. Hoyles, and S. H. Chung. Analytical solutions of Poisson’s equation for realistic geometrical shapes of membrane ion channels. *Biophys. J.*, 74(1):22–36, 1998.
- [26] S. H. Chung, T. W. Allen, M. Hoyles, and S. Kuyucak. Permeation of ions across the potassium channel: Brownian dynamics studies. *Biophys. J.*, 77(5):2517–2533, 1999.
- [27] B. Corry, S. Kuyucak, and S. H. Chung. Tests of continuum theories as models of ion channels. II. Poisson-Nernst-Planck theory versus Brownian dynamics. *Biophys. J.*, 78(5):2364–2381, 2000.
- [28] B. Corry, T. Vora, and S. H. Chung. Electrostatic basis of valence selectivity in cationic channels. *Biophys. Biochem. Acta*, 1711:72–86, 2005.
- [29] G. Moy, B. Corry, S. Kuyucak, and S. H. Chung. Tests of continuum theories as models of ion channels. I. Poisson-Boltzmann theory versus Brownian dynamics. *Biophys. J.*, 78(5):2349–2363, 2000.
- [30] D. Boda, W. Nonner, D. Henderson, B. Eisenberg, and D D. Gillespie. Volume exclusion in calcium selective channels. *Biophys. J.*, 94(9):3486–3496, 2008.
- [31] Z. S. Siwy, M. R. Powell, A. Petrov, E. Kalman, C. Trautmann, and R. S. Eisenberg. Calcium-induced voltage gating in single conical nanopores. *Nano Lett.*, 6(8):1729–1734, 2006.
- [32] Z. S. Siwy, M. R. Powell, E. Kalman, R. D. Astumian, and R. S. Eisenberg. Negative incremental resistance induced by calcium in asymmetric nanopores. *Nano Lett.*, 6(3):473–477, 2006.
- [33] D. Constantin and Z. S. Siwy. Poisson-Nernst-Planck model of ion current rectification through a nanofluidic diode. *Phys. Rev. E*, 76(4):041202, 2007.
- [34] M. R. Powell, L. Cleary, M. Davenport, K. J. Shea, and Z. S. Siwy. Electric-field-induced wetting and dewetting in single hydrophobic nanopores. *Nature Nanotechnology*, 6(12):798–802, 2011.
- [35] W. Nonner, L. Catacuzzeno, and B. Eisenberg. Binding and selectivity in L-type calcium channels: A mean spherical approximation. *Biophys. J.*, 79:1976–1992, 2000.

- [36] D. Gillespie, J. Giri, and M. Fill. Reinterpreting the anomalous mole fraction effect: The Ryanodine receptor case study. *Biophys. J.*, 97(8):2212–2221, 2009.
- [37] G. Rutkai and T. Kristóf. Dynamic Monte Carlo simulation in mixtures. *J. Chem. Phys.*, 132(10):124101, 2010.
- [38] É. Csányi, D. Boda, D. Gillespie, and T. Kristóf. Current and selectivity in a model sodium channel under physiological conditions: Dynamic Monte Carlo simulations. *Biochim. et Biophys. Acta - Biomembranes*, 1818(3):592–600, 2012.
- [39] G. Rutkai, D. Boda, and T. Kristóf. Relating binding affinity to dynamical selectivity from dynamic Monte Carlo simulations of a model calcium channel. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(14):2179–2184, 2010.
- [40] D. Boda and D. Gillespie. Steady state electrodiffusion from the Nernst-Planck equation coupled to Local Equilibrium Monte Carlo simulations. *J. Chem. Theor. Comput.*, 8(3):824–829, 2012.
- [41] G. S. Heffelfinger and F. van Swol. Diffusion in Lennard-Jones fluids using dual control volume grand canonical molecular dynamics simulation (DCV-GCMD). *J. Chem. Phys.*, 100(10):7548, 1994.
- [42] M. Lísal, J. K. Brennan, W. R. Smith, and F. R. Siperstein. Dual control cell reaction ensemble molecular dynamics: A method for simulations of reactions and adsorption in porous materials. *J. Chem. Phys.*, 121(10):4901, 2004.
- [43] D. Boda, D. Gillespie, W. Nonner, D. Henderson, and B. Eisenberg. Computing induced charges in inhomogeneous dielectric media: Application in a Monte Carlo simulation of complex ionic systems. *Phys. Rev. E*, 69(4):046702, 2004.
- [44] J. Vincze, M. Valiskó, and D. Boda. The nonmonotonic concentration dependence of the mean activity coefficient of electrolytes is a result of a balance between solvation and ion-ion correlations. *J. Chem. Phys.*, 133(15):154507, 2010.
- [45] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford, New York, 1987.
- [46] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding molecular simulations*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [47] J. P. Valleau and L. K. Cohen. Primitive model electrolytes 1. Grand canonical Monte-Carlo computations. *J. Chem. Phys.*, 72(11):5935–5941, 1980.

- [48] D. Boda, D. Gillespie, B. Eisenberg, W. Nonner, and D. Henderson. *Ionic Soft Matter: Novel Trends in Theory and Applications*, volume 206 of *NATO Science Series: II: Mathematics, Physics and Chemistry*, chapter The Induced Charge Computation Method and its Application in Monte Carlo Simulations of Inhomogeneous Dielectric Systems, pages 19–44. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005.
- [49] A. Malasics, D. Gillespie, and D. Boda. Simulating prescribed particle densities in the grand canonical ensemble using iterative algorithms. *J. Chem. Phys.*, 128(12):124102, 2008.
- [50] A. Malasics and D. Boda. An efficient iterative grand canonical Monte Carlo algorithm to determine individual ionic chemical potentials in electrolytes. *J. Chem. Phys.*, 132(24):244103, 2010.
- [51] B. Widom. Some topics in the theory of fluids. *J. Chem. Phys.*, 39(11):2808–2812, 1963.
- [52] B. Widom. Structure of interfaces from uniformity of the chemical potential. *J. Stat. Phys.*, 19:563–574, 1978.
- [53] J. L. Jackson and L. S. Klein. Potential distribution method in equilibrium statistical mechanics. *Phys. Fluids*, 7(2):228–231, 1964.
- [54] T. L. Beck, M. E. Paulaitis, and L. R. Pratt. *The Potential Distribution Theorem and Models of Molecular Solutions*. Cambridge University Press, Cambridge, 2006.
- [55] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, , and B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2nd edition, 1992.