



Institute of Physics, CAS

太赫兹波对钾离子通道蛋白二级结构影响的分子动力学模拟 孙远昆 郭良浩 王凯程 王少萌 宮玉彬 Molecular dynamics simulation of effect of terahertz waves on the secondary structure of potassium channel proteins Sun Yuan-Kun Guo Liang-Hao Wang Kai-Cheng Wang Shao-Meng Gong Yu-Bin 引用信息 Citation: Acta Physica Sinica, 70, 248701 (2021) DOI: 10.7498/aps.70.20211725 在线阅读 View online: https://doi.org/10.7498/aps.70.20211725 当期内容 View table of contents: http://wulixb.iphy.ac.cn

您可能感兴趣的其他文章 Articles you may be interested in 专题:太赫兹生物物理

太赫兹波对钾离子通道蛋白二级结构 影响的分子动力学模拟^{*}

孙远昆 郭良浩 王凯程 王少萌 宫玉彬†

(电子科技大学电子科学与工程学院(示范性微电子学院),微波电真空器件国家级重点实验室,成都 610054)

(2021年9月16日收到; 2021年10月12日收到修改稿)

钾离子通道在神经细胞动作电位复极过程中起着重要作用. 钾离子通道蛋白种类繁多, 钾离子通道允许 钾离子特异性穿过细胞膜, 从而维持神经细胞静息电位. 离子通道蛋白的二级结构决定其功能特性, 皮秒尺 度内二级结构的波动会对离子通道蛋白的功能, 即离子通过速率有很大的影响. 本文使用分子动力学模拟方 法, 模拟施加不同幅值的 53.7 THz 的太赫兹波对真实 KcsA 钾通道蛋白二级结构和钾离子通过速率的影响. 研究发现, 在 53.7 THz 的太赫兹波的作用下, KcsA 钾通道蛋白中α螺旋数量减少, β 折叠以及卷曲数量增加. 此外, 53.7 THz 的太赫兹波能够加速钾离子通过 KcsA 钾通道. 本文从蛋白质的二级结构分析太赫兹波对钾 离子通道蛋白的影响, 为太赫兹波和生物功能分子相互作用之间提供了新的观察角度.

关键词:钾通道,蛋白二级结构,钾离子速率,共振吸收 **PACS**: 87.10.Tf, 87.14.ep, 87.15.bd, 87.50.U-

DOI: 10.7498/aps.70.20211725

1 引 言

钾离子通道广泛分布于神经、血管、血液等的 细胞中,在调节细胞,尤其是神经细胞的膜电位和 兴奋性中起重要作用^[1-4].电压门控 K+通道是典 型的电压门控通道,是最大的钾通道基因家族,是 神经元兴奋性的关键调节因子^[5-7].人体中的电压 门控钾离子通道包括 40 个不同的基因编码,分为 12 个亚科,从 Kv1 到 Kv12. 哺乳动物电压门控钾 通道是由围绕离子传导孔的 4 个相同 α 亚基组成 的四聚体结构,其中每个亚基有 6 个 α 螺旋跨膜 结构域 (S1—S6),选择性过滤器由 S5 和 S6 之间 的回路形成,其中 S1—S4 序列对于通道电压感应 和门控至关重要^[5].

太赫兹波对研究生物系统的重要性在于其频 率对应于脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)

和蛋白质等生物功能分子的构象振荡范围,以及其 量子能量与氢键和范德瓦耳斯力等分子间相互作 用的能量重合,作用于生物分子上的太赫兹波和生 物分子内部可能发生非线性共振,导致其构象和 功能发生剧烈变化,从而对生物系统产生非热效 应[8-13].因此,太赫兹波有望具有广泛的潜在生物 医学和安全相关应用.已有研究表明,太赫兹波和 细胞内移动离子的相互作用主要是电作用^[14].太 赫兹波能够影响膜蛋白的功能从而对生理过程进 行调制.研究发现,太赫兹波通过和离子通道蛋白 某些基团形成共振,影响离子通过速率,进而影响 生物体的记忆以及感知等功能[15-18]. 太赫兹波还 可通过引起碱性磷酸酶的结构发生变化从而影响 其活性^[19]. 太赫兹波会引发各种细胞反应, 例如改 变基因表达模式、改变基因组的结构和完整性以及 影响细胞骨架的组装过程^[20-22]. 近年来, 有研究报 道了太赫兹波对细胞内遗传物质的影响.太赫兹波 能够通过与弱氢键相连的嘌呤振动之间形成共振,

* 国家自然科学基金 (批准号: 61921002) 和国家自然科学基金委国家基础科学中心 (批准号: 61988102) 资助的课题.

© 2021 中国物理学会 Chinese Physical Society

[†] 通信作者. E-mail: ybgong@uestc.edu.cn

破坏碱基对之间的氢键,从而大大加速 DNA 的解 螺旋速度^[23].太赫兹波还可通过影响细胞内 Zn²⁺ 离子的局部浓度变化来影响基因表达^[24].上述研 究表明,具有特定频率的太赫兹波会对生物功能分 子产生影响,分布在细胞膜上的离子通道蛋白是太 赫兹波的潜在分子靶标.此外,在模拟太赫兹波对 生物功能分子的调制过程中,大多使用仅包含主要 基团的近似结构,且对太赫兹波作用过程中离子通 道蛋白二级结构的变化知之甚少.本文采用分子动 力学方法,模拟太赫兹波对真实钾离子通道的作 用,并分析在此过程中钾离子通道蛋白二级结构的 变化,从而为太赫兹波和钾离子通道蛋白作用的动 力学关系提供新的视角.

本文分析了太赫兹波对钾离子通道蛋白二级 结构的影响, 计算不同幅值太赫兹波作用下钾离子 通道蛋白氢键网络的变化, 以研究太赫兹波对蛋白 质内部氢键的影响. 此外, 计算了不同幅值太赫兹 波作用下钾离子通道蛋白各种二级结构的数目, 统 计分析太赫兹波对各种二级结构的变化趋势的影 响, 结果表明, 太赫兹波对蛋白质二级结构的影响 主要体现在 α螺旋、β折叠和卷曲这 3 种二级结 构. 最后, 计算了不同幅值太赫兹波作用下, 钾离 子通过钾离子通道的速率.

2 钾离子通道蛋白四聚体结构模型 与分子动力学计算方法

2.1 钾离子通道蛋白四聚体结构

从蛋白质结构数据库 (RCSB PDB) 中获得钾 离子通道蛋白 KcsA 的单体结构,并使用 VMD 将 其转化成四聚体结构.在计算前,用 CHARMMGUI 网站补全原始结构中缺失的残基,并用 VMD 检查 补齐后的四聚体结构.如图 1(a) 所示, KcsA 通道 结构包含1个胞内门,将细胞质和充满水的空腔分 开,这个门是由4个TM2螺旋的羰基末端聚集 在一起形成束交叉从而收缩通往孔道区的通道. 图1(b)是从正前方观察到的KcsA通道结构,图 中黄颜色为β折叠,紫色为α螺旋,β折叠和α螺 旋之间通过卷曲连接.

2.2 分子动力学模拟体系的构建

如图 1(c) 所示,将钾离子通道蛋白的四聚体 结构正确嵌入二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 膜中, 并用 SPC 水填充整个盒子^[25].为了模拟真实的生 理环境,在模拟体系中加入 0.15 mmol 的 KCl,对 应于模拟体系中含有 315 个 K⁺和 331 个 Cl⁻.为 了充分限制蛋白质和磷脂的位置,在模拟之前,先 进行 400 ps 的预平衡.之前的研究表明,钾离子通 道中负责钾离子特异性传输的基团是羰基,羰基自 发的振动频率为 53.7 THz^[16].因此,在模拟盒子中 应用 53.7 THz 的太赫兹波从上表面垂直入射,模 拟的时间步长为 2 fs.

从图 1(a) 和图 1(b) 可以看到, KcsA 过滤器 有向内朝向孔中心的骨架羰基氧, 以协调通过的钾 离子, 从而取代它们的溶剂化水. 已有研究表明, 钾离子通道的孔区域通过氢键网络固定在恰当的 位置^[26].

蛋白质内或蛋白质与溶剂分子之间的氢键网 络的动态波动通过平均氢键对的相关函数 [*C_{hb}*(τ)] 来表征^[27]:

$$C_{hb}\left(\tau\right) = \frac{\left\langle hb_{i}\left(\tau\right) \cdot hb_{i}\left(0\right)\right\rangle}{\left\langle hb_{i}\left(0\right)^{2}\right\rangle}$$

式中 *t* 时刻特定氢键 *i* 的存在函数是 0 或 1 (*hb*(τ) = [0,1]). 在分析中,氢键是使用几何标准定义的,即 质心距离小于 3.5 Å, O…H 的距离小于 2.6 Å, HO



图 1 (a) KcsA 四聚体结构 (从上往下); (b) KcsA 四聚体结构 (从前往后); (c) 钾离子通道模型

Fig. 1. (a) KcsA tetramer structure (from top to bottom); (b) KcsA tetramer structure (from front to back); (c) potassium channel model.

和 O 之间的角度小于 30°. 蛋白质系统中其他弱相 互作用 (范德瓦耳斯力、静电等) 被识别为近似截 止距离内的接触.

二级结构,如 α 螺旋和 β 折叠,是以骨架氢 键、骨架原子、Cα 原子等连接^[26].氢键和任何分子 相互作用一样,在短距离内很强并在无穷远处不断 减小为零.为了计算方便,氢键被视为阶跃函数. 氢键的判定标准有能量准则、电子结构准则、几何 准则等,其中能量准则和电子结构准则的计算量 大,不易实现^[27].在本文的计算中,使用几何标准 对氢键进行定义,氢键是由氢原子-施体-受体所成 角度的截断值与施体-受体之间距离的截断值共同 决定的.OH和 NH 被作为氢键施体,O 总是作为 氢键受体,N 默认为受体,以便对 KcsA 四聚体中 的氢键网络和各种二级结构进行区分.

3 不同强度太赫兹波对体系氢键网络的 影响

钾离子通道蛋白质在脂质膜的复杂环境中起 作用,蛋白质原子不仅彼此相互作用并与水相互作 用,还和周围脂质分子的原子相互作用.氢键可在 蛋白质中氨基酸的残基内起作用,是蛋白质三维结 构稳定性和灵活性的驱动力之一,对于膜蛋白的组 装、结构和功能至关重要^[28]. 天然膜环境中的膜蛋 白不像在晶体结构中所观察到的是静态的,相反, 它们是动态的.理论和实验的研究结果都表明,蛋 白质二级结构中发生的皮秒时间尺度的波动对蛋 白质的功能有很大影响^[29-31]. 分子动力学模拟允 许我们通过重建溶剂化膜蛋白的生理脂质膜环境 扩展实验的观察范围,从而研究原子细节的动力 学[32]. 计算了不同幅值的太赫兹波辐射下钾离子 通道蛋白氢键网络中氢键的数量,结果如图2所 示. 可以看出: 随着时间的增加, 氢键数量开始缓 慢增加,经过800ps后,氢键数量趋于稳定.随着 太赫兹波幅值从 0 增加到 0.5 V/nm, 稳定后的氢 键网络中的氢键数量在减少,且随着幅值的增大, 减少趋势越来越明显,下文也可以得出氢键数量的 改变主要是由钾通道蛋白质中二级结构的数目变 化引起的,氢键的数量对蛋白质的稳定性具有重要 作用,氢键数量减少说明此时蛋白质的稳定性变 弱, 钾离子通道蛋白的构象容易发生改变, 进而影 响通道中钾离子通过速率.



图 2 太赫兹波强度不同时钾离子通道蛋白中氢键的变化 Fig. 2. Changes of hydrogen bonds in potassium channel proteins at different terahertz intensities.

4 不同强度太赫兹波对钾离子通道 蛋白二级结构的影响

二级结构允许简单描述蛋白质的复杂三维结构. 分子动力学软件 Gromacs 采用 DSSP 程序将 通过 X 射线晶体学或核磁共振确定的原子坐标转 换为供体和受体之间的主链氢键, 然后将重复键合 模式转换为螺旋、片和匝等类别, 进一步可细分为 α 螺旋、卷曲、 β 折叠、 β 桥、弯曲、转角、回折等二 级结构. 本文计算了在不同幅值太赫兹波作用下钾 离子通道蛋白二级结构 (总数 = α 螺旋 + β 折叠 + β 桥 + 转角)的变化趋势. 如图 3 所示, 在经过近 700 ps 的稳定后, 钾离子通道蛋白的二级结构数目 也趋于稳定, 从图 3 可以看出, 当外加太赫兹速时, 钾离子通道蛋白二级结构数目比不加太赫兹电磁



图 3 太赫兹波强度不同时钾离子通道蛋白中二级结构 数目的变化

Fig. 3. Changes in the number of secondary structures in potassium channel proteins under different terahertz intensities. 波时多,外加太赫兹电磁波会影响蛋白质二级结构 的变化从而影响其功能.并且在外加太赫兹波幅值 为 0.2 V/nm 时,钾离子通道蛋白二级结构的数目 增加最多,此时我们认为是钾离子通道蛋白和太赫 兹波形成频率和幅值匹配才造成钾离子通道蛋白 结构变化显著.

蛋白质的二级结构又可进一步分为α螺旋、 β折叠、卷曲和转角等结构. α螺旋是蛋白质肽链 主链骨架借助氢键卷曲形成的一种周期性螺旋结 构, α 螺旋跨膜结构域的相互作用和动力学在膜蛋 白的折叠、组装和功能中起着重要作用[33-35]. 氢键 是 α 螺旋稳定的主要次级键,当氢键破坏时, α 螺 旋构象即被破坏.借助 VMD, 我们发现 α 螺旋主 要集中于 S5 和 S6 的孔道处,即包围了钾离子通 道最窄的地方.不同幅值的太赫兹波作用下α螺 旋的变化趋势如图 4 所示, 可以看出, 在体系平衡 后,外加太赫兹波时,钾离子通道蛋白中α螺旋的 数目要比未加太赫兹波时少,并且外加太赫兹波的 幅值增大时,对应的α螺旋的数目也在缓慢减小. 因为太赫兹波的能量极低,不能直接破坏共价键, 只能通过共振形式破坏氢键.图4中的结果表明, 太赫兹波会破坏钾离子通道蛋白中 α 螺旋中的氢 键,使其数目减少.



图 4 太赫兹波强度不同时钾离子通道蛋白中α螺旋数 目的变化

Fig. 4. Changes in the number of α -helices in potassium channel protein under different terahertz intensities.

β折叠是由两条以上肽链或同一条肽链之间 的不同部分平行或反平行排列形成股,股与股之间 通过氢键固定,氢键主要在股间.β折叠主要存在 于S1—S4序列,影响通道电压感应和门控.不同 幅值的太赫兹波作用下β折叠的变化趋势如图5 所示,可以看出,外加太赫兹波时的β折叠数量比 未加太赫兹波时多.说明太赫兹波可能会促进不同 肽链之间或同一条肽链之间不同部分形成新的 β折叠,也有可能是太赫兹波导致部分α螺旋展开 形成β折叠.从图4和图5可知,太赫兹波造成 α螺旋减少,β折叠增多.β折叠往往含有较多的非 极性残基,并埋在蛋白质内部形成疏水核心,而 α螺旋通常是两性的,亲水面位于表面,疏水一侧 朝向蛋白质内部.α螺旋的减少和β折叠的增多会 导致钾离子通道中疏水核的暴露和亲水面的减少, 从而影响钾离子通过速率.



图 5 太赫兹波强度不同时钾离子通道蛋白中β折叠数目 的变化

Fig. 5. Changes in the number of β -sheet in potassium channel protein under different terahertz intensities.

卷曲通过主链间的氢键或主链与侧链间的氢 键稳定其构象,其是柔性的,可以使肽链改变走向, 且有利于连接结构相对刚性的 α螺旋和 β 折叠. 从图 6 可以看出,外加太赫兹波时钾离子通道蛋白 中的卷曲数目减少,并且在外加太赫兹波幅值为 0.2 V/nm 时,卷曲的数目变化最大,此时蛋白质 的构象变化可能最大.



图 6 太赫兹波强度不同时钾离子通道蛋白中卷曲数目 的变化

Fig. 6. Changes in the number of coil in potassium channel protein under different terahertz intensities.

5 不同强度太赫兹波对离子通过速率的 影响

钾离子通过钾通道的速率对于调节神经细胞 的静息电位和动作电位至关重要,并且钾离子通道 对一些疾病起着调节作用,是治疗的新靶点.本文 分别计算了无太赫兹电场、太赫兹电场强度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 V/nm 情况下钾离子通过电压门 控钾离子通道的速率,从图7可知,最开始随着外 加太赫兹波幅值的增大, 钾离子通过钾离子通道的 速率也随之增大,但是当幅值增加到 0.3 V/nm 及 以上时, 钾离子通过的速率不再增加, 我们推测已 经达到了钾离子通道的饱和,这是由于孔道蛋白分 子不是电中性的,其对通过的钾离子具有一定的电 吸引,限定了它的最大运输速度.并且从图 4-图 6 可知,当外加太赫兹波的幅值为 0.2 V/nm 时,对 应的二级结构变化最大,但是此时的钾离子通过速 率却没有达到最大.静电分析表明,当钾离子沿着 狭窄的孔道穿过膜时它必须穿过一个能量闸,太赫 兹波除了和钾离子通道蛋白中的羰基形成共振外, 还对模拟盒子中的钾离子有库仑力的作用,两者共 同作用使钾离子快速通过钾离子通道.



图 7 太赫兹波强度不同时钾离子通过钾离子通道的数目 Fig. 7. Number of potassium ions passing through potassium channels under different intensities of terahertz.

6 结 论

本文采用分子动力学的方法模拟了太赫兹波 对真实钾离子通道蛋白二级结构的影响,以及太赫 兹波对钾离子通过钾离子通道的影响.基于 DSSP 程序,统计了在不同幅值太赫兹波的作用下, 钾离 子通道蛋白主要二级结构皮秒时间尺度随时间的 波动.结果表明,太赫兹波的作用下,α螺旋的数 目减少,β折叠、卷曲等二级结构的数目有小幅增 加.特别是卷曲数目的改变表明了钾离子通道蛋白 构象在太赫兹作用下发生了改变.太赫兹波还能够 促进钾离子通过钾离子通道.开始阶段随着外加太 赫兹波幅值的增加,钾离子通过速率也跟着增加, 当增加到 0.3 V/nm 及以上时,钾离子的通过速率 不再变化,这主要是由于已经达到了钾离子通道的 饱和.本文的研究为理解太赫兹波和离子通道蛋白 集体振动的关系提供了一个新的视角.

参考文献

- [1] Nelson M T, Quayle J M 1995 Am. J. Physiol. 268 C799
- Faraci F M, Sobey C G 1996 Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23 1091
- [3] Orias M 1998 Medicina 58 429
- [4] Johnston J, Forsythe I D, Kopp-Scheinpflug C 2010 J. Physiol. 588 3187
- [5] Yellen G 2002 Nature 419 35
- [6] Guan D, Lee J C F, Higgs M H, Spain W J, Foehring R C 2007 J. Neurophys. 97 1931
- [7] Guan D, Armstrong W E, Foehring R C 2013 J. Physiol. 591 4807
- [8] Zhu Z, Cheng C, Chang C, Ren G, Zhang J, Peng Y, Han J, Zhao H 2019 Analyst 144 2504
- [9] Zhou J, Liu S G 2014 Modern Applied Physics 5 85 (in Chinese) [周俊, 刘盛纲 2014 现代应用物理 5 85]
- [10] Michele J C, Piero U 2021 Chem. Phys. 155 075102
- [11] Sizov F 2017 SPQEO 20 273
- [12] Li N, Peng D L, Zhang X J, Shu Y S, Zhang F, Jiang L, Song B 2021 Nano Res. 14 40
- [13] Wilmink G J, Grundt J E 2011 J. Infrared Millimeter Terahertz Waves 32 1074
- [14] Bo W F, Guo L H, Yang Y, Ma J L, Wang K C, Tang J C, Wu Z, Zeng B Q, Gong Y B 2020 *IEEE Access* 8 10305
- [15] Li Y M, Chang C, Zhu Z, Sun L, Fan C H 2021 JACS 143 4311
- [16] Liu X, Qiao Z, Chai Y M, Zhu Z, Wu K J, Ji W L, Li D G, Xiao Y J, Mao L Q, Chang C, Wen Q, Song B, Shu Y S 2021 *PNAS* 118 e2015685118
- [17] Zhang J X, He Y, Liang S S, Liao X, Li T, Qiao Z, Chang C, Jia H B, Chen X W 2021 Nat. Commun. 12 2730
- [18] Zhu Z, Chen C, Chang C, Song B 2021 ACS Photonics 8 781
- [19] Zhang X X, He M X, Chen Y, Li C, Zhao J W, Wang P F, Peng X 2019 Chin. Phys. B 28 128702
- [20] Alexandrov B S, Rasmussen K Ø, Bishop A R, Usheva A, Rodriguez G 2011 *Biomed. Opt. Express* 2 2679
- [21] Yamazaki S, Harata M, Ueno Y, Tsubouchi M, Konagaya K, Ogawa Y, Isoyama G, Otani C, Hoshina H 2020 Sci. Rep. 10 9008
- [22] Yamazaki S, Harata M, Idehara T, Konagaya K, Yokoyama G, Hoshina H, Ogawa Y 2018 Sci. Rep. 8 9990
- [23] Wu K J, Qi C H, Zhu Z, Wang C L, Song B, Chang C 2020 J. Phys. Chem. Lett. 11 7002
- [24] Takehiro T, Reiko S, Shiho T, Ken-Ichiro K, Hideki H 2020 Opt. Lett. 45 6078

- [25] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, Impey R W, Klein M L 1983 J. Chem. Phys. 79 926
- [26] Biggin P C, Smith G R, Shrivastava I, Choe S, Sansom M S P 2001 BBA-Biomemberanes 1510 1
- [27] Berendsen H J C, Spoel D V D, Drunen R V 1995 Comput. Phys. Commun. 91 43
- [28] Parker M J, Sessions R B, Badcoe I G, Clarke A R 1996 Fold Des. 1 145
- [29] Zhou H X, Wlodek S T, McCammon J A 1998 PNAS 95 9280
- [30] Barron L D, Hecht L, Wilson G 1997 Biochemistry 36 13143
- [31] Fischer S, Smith J C, Verma C S 2001 J. Phys. Chem. B 105 8050
- [32] Leach A R 2001 Molecular Modelling: Principles and Applica tions (2nd Ed.) (Harlow: Pearson Education Ltd.) pp20–30
- [33] Rath A, Johnson R M, Deber C M 2007 Pept. Sci. 88 217
- [34] Moore D T, Berger B W, DeGrado W F 2008 Structure 16 991
- [35] Matthews E E, Zoonens M, Engelman D M 2006 Cell 127 447

SPECIAL TOPIC—Terahertz biophysics

Molecular dynamics simulation of effect of terahertz waves on the secondary structure of potassium channel proteins^{*}

Sun Yuan-Kun Guo Liang-Hao Wang Kai-Cheng Wang Shao-Meng Gong Yu-Bin[†]

(National Key Laboratory of Science and Technology on Vacuum Electronics, School of Electronic Science and Engineering (National Exemplary School of Microelectronics), University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

(Received 16 September 2021; revised manuscript received 12 October 2021)

Abstract

Potassium channels play an important role in repolarizing the nerve cell action potentials. There are many types of potassium channel proteins, and potassium channels allow potassium ions to specifically pass through the cell membrane, thereby maintaining the resting potential of nerve cells. In this paper, molecular dynamics simulation method is used to simulate the effects of 53.7 THz terahertz wave with different amplitudes on the secondary structure of KcsA potassium channel protein and the potassium ions rate. It is found in this study that under the action of the 53.7 THz terahertz wave, the number of alpha helices in KcsA potassium channel protein decreases, and the number of beta sheets and the number of coils increase. In addition, the 53.7 THz terahertz waves on potassium channel proteins are analyzed through the secondary structure of proteins, and a new perspective for the interaction between terahertz waves and biological functional molecules is presented as well.

Keywords: potassium channel, protein secondary structure, potassium ion rate, resonance absorptionPACS: 87.10.Tf, 87.14.ep, 87.15.bd, 87.50.U-DOI: 10.7498/aps.70.20211725

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61921002) and the National Basic Science Center of National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61988102).

[†] Corresponding author. E-mail: ybgong@uestc.edu.cn