

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Т. Б. Фельдман^{а,б,1}, Х. Т. Холмуродов^{а,в,2}, М. А. Островский^{а,б,3}

^аОбъединенный институт ядерных исследований, Дубна

^бИнститут биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва

^вМеждународный университет природы, общества и человека «Дубна», Дубна

Методом компьютерного моделирования проведено сравнительное исследование молекулярной динамики родопсина, содержащего хромофорную группу (11-*цис*-ретиаль), и свободного опсина. Молекулярная динамика прослежена во временном интервале, равном 3000 пс; при этом получено и проанализировано $3 \cdot 10^6$ дискретных конформационных состояний родопсина и опсина. Продемонстрировано, что присутствие хромофорной группы в хромофорном центре опсина оказывает существенное влияние на ближайшее белковое окружение 11-*цис*-ретиала как в области β -иононового кольца, так и в области протонированной связи шиффова основания. На основании результатов моделирования обсуждается возможный внутримолекулярный механизм поддержания родопсина как G-белок-связывающего рецептора в неактивном состоянии, т. е. функция хромофора как эффективного лиганда-антагониста.

Based on the computer simulations a comparative analysis of molecular dynamics of the rhodopsin protein (with 11-*cis* chromophore retinal) and free opsin (without 11-*cis* chromophore retinal) is performed. Molecular dynamics calculations were traced within of time interval of 3000 ps, so that totally $3 \cdot 10^6$ discrete conformational states of the rhodopsin and free opsin were analyzed and compared. It was demonstrated that the inclusion and adaptation of chromophore retinal in the opsin site causes a considerable influence on the nearest protein pocket (surrounding 11-*cis* retinal chromophore), as well as on conformations of the beta-ionone ring and a protonated Schiff base regions. On the basis of the simulation results we discuss a possible intermolecular mechanism that kept rhodopsin as a G-protein-coupled receptor in an inactive state, i.e., for the chromophore retinal as a ligand-agonist stabilizing the inactive conformation of the rhodopsin.

PACS: 31.15.Qg; 82.53.Ps; 87.14.Ee; 87.15.-v

Родопсин — типичный представитель большого семейства G-белок-связывающих рецепторов (G-protein-coupled receptors — GPCR), играющих ключевую роль в регуляторных процессах живых организмов [1]. Сигнальные пути, регулируемые этими белками-рецепторами, определяют множество важнейших биологических процессов, включая процессы сенсорной рецепции, эндокринной регуляции и синаптической передачи.

¹E-mail: feldman@sky.chph.ras.ru

²E-mail: mirzo@jinr.ru

³E-mail: ostrovsky@sky.chph.ras.ru

Наиболее хорошо изученным является механизм фототрансдукции, запускаемый G-белок-связывающим рецептором — родопсином — в наружном сегменте зрительной клетки при поглощении им кванта света [2, 3]. Ключевое событие в механизме фототрансдукции — преобразовании, передаче и многократном усилении первичного светового сигнала — взаимодействие активированного светом родопсина с G-белком. Во всех других случаях, кроме фоторецепции, первой стадией каскада является связывание специфического лиганда, например, ароматической молекулы нейромедиатора или гормона с G-белок-связывающим рецептором, что и приводит к его вполне определенным конформационным перестройкам и переходу в активированное состояние [4]. В случае фототрансдукции стимулом, запускающим G-белковый каскад, служит не химическое вещество, а квант света. Это свойство и делает зрительный пигмент привлекательной моделью для изучения механизмов функционирования всего класса G-белок-связывающих рецепторов. В качестве лиганда в молекуле родопсина выступает его хромофорная группа (11-*цис*-ретиналь), которая расположена в гидрофобном «ядре» белковой части — в опсине. Именно хромофорная группа активирует родопсин, позволяя ему связаться с G-белком (в случае фототрансдукции этот белок получил название трансдуцина).

Таким образом, хотя общий принцип работы G-белкового каскада в случае фототрансдукции остается тем же самым, универсальным, особенность родопсина как G-белок-связывающего рецептора состоит в том, что в темновом состоянии его лиганд — 11-*цис*-ретиналь — выступает в качестве мощного, эффективнейшего антагониста, обеспечивающего пребывание родопсина в неактивном состоянии. Иначе говоря, конформационное состояние опсина таково, что вероятность его взаимодействия с G-белком сведена к минимуму, если вообще практически возможна. Тем самым создается ситуация и формируется механизм, предотвращающий «ложный» запуск процесса фототрансдукции.

Для физиологии зрения этот механизм имеет принципиальное значение. Действительно, поскольку палочка содержит огромное количество плотно упакованных и способных к активации молекул родопсина (примерно 10^9 молекул на палочку) и способна детектировать одиночный поглощенный квант света, то высокая эффективность 11-*цис*-ретиналя как лиганда-антагониста исключительно важна для обеспечения ее максимально низкого темнового теплового шума. Следствием же фотоизомеризации лиганда (11-*цис*-ретиналя) становятся конформационные изменения сначала его ближайшего белкового окружения, а затем и всей белковой части, в первую очередь гидрофильных петель и С-концевого пептида на цитоплазматической стороне мембраны. В свою очередь ретиналь, но уже не в 11-*цис*-, а в полностью-*транс*-изомерной форме, продолжая быть ковалентно связанным с белком, превращается из мощного антагониста в эффективнейшего агониста.

Активация «молчащего» в темноте родопсина происходит вследствие индуцированной светом *цис-транс*-изомеризации лиганда-антагониста, которая приводит к нарушению электростатических взаимодействий хромофора с окружающими его аминокислотными остатками, инициируя тем самым последовательные конформационные перестройки в опсине. В конечном счете эти перестройки и приводят к физиологической активации родопсина — появлению его способности связывать и активировать G-белок (трансдуцин).

Таким образом, в универсальной схеме работы G-белкового каскада лигандом-агонистом выступает в случае фототрансдукции полностью-*транс*-ретиналь.

Важно подчеркнуть, что и сам опсин (без хромофора) способен к взаимодействию с G-белком и его активации. Однако при этом активность безлигандного опсина составляет

всего 10^{-6} активности опсина, с которым связан лиганд-агонист — полностью-*транс*-ретиналь [5, 6]. Низкая, но все же имеющаяся активность безлигандного опсина входит составной частью в сложный молекулярный механизм световой адаптации фоторецепторной клетки (феномен так называемой *bleaching adaptation*).

Таким образом, в молекуле родопсина можно выделить, по крайней мере, три вида конформационных состояний опсина: i) темновое, когда хромофорная группа (11-*цис*-ретиналь) выступает в качестве мощного лиганда-антагониста, предотвращающего взаимодействие опсина с G-белком; ii) световое, мощно активированное, когда на одной из последних стадий фотолиза, а именно на стадии образования метародопсина II, полностью-*транс*-ретиналь выступает в качестве мощного агониста, эффективно способствующего взаимодействию опсина с G-белком; iii) световое, но в мизерной степени активированное, когда на конечной стадии фотолиза опсин теряет полностью-*транс*-ретиналь, и его хромофорное место остается «пустым».

В настоящей работе методами компьютерного моделирования удалось проанализировать молекулярную динамику двух состояний опсина — первого (темнового) и последнего (светового). Это стало возможным благодаря достигнутому за последние шесть лет прогрессу в определении третичной структуры родопсина. После многих неудачных попыток стало возможным, наконец, кристаллизовать мембранный белок родопсин и методом рентгеноструктурного анализа сначала с разрешением в $2,8 \text{ \AA}$ [7], а затем и с разрешением в $2,2 \text{ \AA}$ [8, 9] определить его трехмерную структуру. Однако следует отметить, что в результате кристаллизации молекулы родопсина происходят некоторые нарушения в электростатических взаимодействиях 11-*цис*-ретиналя с аминокислотными остатками, что может приводить к изменению пространственной конфигурации хромофора. Более того, пространственная модель молекулы родопсина, полученная методом рентгеноструктурного анализа, не дает точного описания пространственной конфигурации 11-*цис*-ретиналя в хромофорном участке [10, 11], а сама трехмерная организация молекулы родопсина в ее темновом кристаллическом состоянии представляет собой статическую картину. Метод молекулярной динамики позволяет описать динамику конформационного состояния молекулы родопсина: например, хромофора и его взаимодействия с окружающими аминокислотными остатками — или динамику других доменов молекулы, например, цитоплазматического и внутридисквого.

Установление третичной структуры родопсина в темновом состоянии послужило толчком для серии работ, в которых предпринимаются попытки установить внутримолекулярные механизмы и пути реагирования молекулы родопсина после поглощения ею кванта света [12–15].

В этой связи особый интерес представляет моделирование молекулярной динамики хромофора — 11-*цис*-ретиналя и его ближайшего белкового окружения. Речь при этом идет как о влиянии хромофорной группы на вполне определенные аминокислотные остатки его белкового окружения, так и, наоборот, о влиянии белкового окружения на хромофор. В настоящее время существует достаточно подробное описание хромофорного центра родопсина, а именно описание пространственного расположения 11-*цис*-ретиналя и его взаимодействия с окружающими его ближайшими аминокислотными остатками [2, 7–9, 16–18].

Такого рода описание может дать ключ как для понимания природы спектральной настройки зрительных пигментов, то есть молекулярных механизмов цветоразличения, так и для объяснения их уникальных фотохимических свойств. Что касается послед-

него, то для родопсина характерны невероятно высокая скорость фотоизомеризации 11-*цис*-ретинала (менее 200 фс) [19–21] и высокий квантовый выход (0,67) этой фотохимической реакции [22, 23]. До сих пор остается открытым вопрос, почему скорость фотоизомеризации 11-*цис*-ретинала как хромофорной группы родопсина почти на два порядка выше, чем скорость его изомеризации в растворе [24]. Роль белкового окружения в этом фотохимическом процессе не вызывает сомнения, однако молекулярные механизмы, лежащие в его основе, остаются не до конца понятыми.

О правомерности и прогностической пользе компьютерного моделирования в отношении родопсина свидетельствуют данные, полученные недавно с помощью метода ядерного магнитного резонанса [17, 25]. В этих работах подробно исследовалось взаимодействие 11-*цис*-ретинала с окружающими его аминокислотными остатками в хромофорном центре родопсина. Многие предположения, сделанные ранее на основании компьютерного моделирования молекулярной динамики хромофорного центра, нашли экспериментальное подтверждение в этих работах. Так, например, в работе [25] было подтверждено, что одним из основных событий, приводящих родопсин в физиологически активное состояние, являются конформационные перестройки в спиральных «тяжах» III и VI. В другой работе [17] были, например, подтверждены теоретические расчеты и экспериментальные результаты, согласно которым β -иононовое кольцо в 11-*цис*-ретинале как хромофорной группе скручено, то есть имеет непланарную по отношению к его полиеновой цепи конформацию.

В настоящей работе методом компьютерного моделирования проведен анализ молекулярной динамики как хромофорного центра родопсина, так и всего белка. При этом удалось проследить, какое влияние оказывает «встраивание» 11-*цис*-ретинала в хромофорный центр на его ближайшее белковое окружение. Компьютерное моделирование такого рода может быть полезным для более полного описания внутримолекулярных процессов, приводящих молекулу родопсина как G-белок-связывающего рецептора в физиологически активированное состояние.

МЕТОДЫ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Выбор исходной конфигурации зрительного пигмента был сделан по аналогии с другими известными работами по компьютерному моделированию [15, 26]. Была использована молекула родопсина из модели димера родопсина (код по базе данных PDB (Protein Data Bank) 1HZX, цепь A) (рис. 1, *a*) [7, 18]. Так как начальная конфигурация молекулы не являлась целостной (некоторые части PDB-файла были пусты), то до начала моделирования были проведены предварительные расчеты для определения полной третичной структуры молекулы родопсина. По первичной структуре родопсина [27] были найдены и минимизированы и встроены в исходную молекулу (PDB-файл «1HZX», цепь на рис. 1, *a*) с помощью программного пакета MOE для компьютерного моделирования биомолекул [28] недостающие фрагменты аминокислотных последовательностей 236–240 и 331–333.

Затем снова была проведена минимизация всей молекулы «1HZX» с уже встроенными недостающими фрагментами.

Температура системы поддерживалась постоянной (300 K) в течение трех миллионов шагов с помощью алгоритма Берендсена со временем релаксации термостата 0,2 пс [29].

Шаг интегрирования ньютоновских уравнений движения был выбран равным 1 фс, и таким образом общее время моделирования составило 3 нс.

Моделирование родопсина было проведено в водном растворе с использованием программного пакета AMBER5.0 (Parm94) [30–32] и его модифицированной версии AMBER7.0 (Parm96) для компьютера специального назначения MDGRAPE-2 [33, 34]. Были вычислены все атомно-молекулярные взаимодействия, траектории всех атомов и найдена структура всей молекулы родопсина.

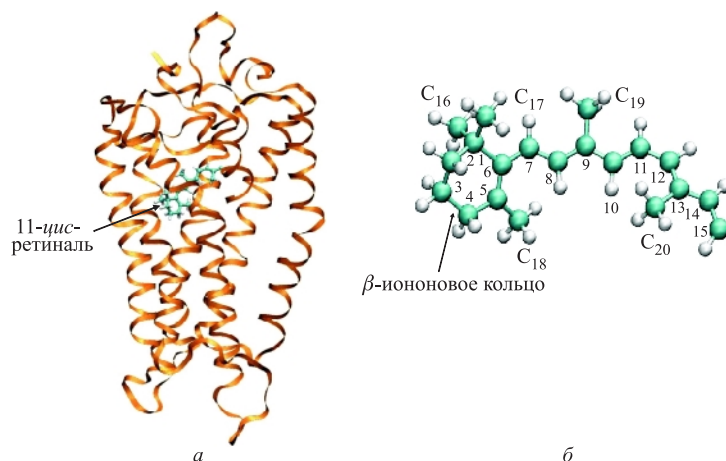


Рис. 1. а) Компьютерная модель молекулы родопсина (PDB-файл «1HZX»). Palczewski et al. 2000; Teller et al. 2001). 11-цис-ретиаль изображен в виде структурной формулы (вид сбоку). б) Молекула 11-цис-ретиаля с нумерацией всех атомов углерода. С16–С20 — метильные группы

При моделировании родопсина был применен метод атомно-силового поля Корнелла [35]. Энергетическое состояние системы или общий потенциал взаимодействия соответствовал равновесному положению системы, в котором силы притяжения уравновешивались силами отталкивания. Учитывались различные типы взаимодействий, вносящих вклад в стабилизацию структуры биомолекулы:

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{R}) = & \Sigma K_r (r - r_{eq})^2 \text{ — потенциал внутримолекулярных (валентных) связей;} \\
 & + \Sigma K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \text{ — потенциал угловых связей (вращений);} \\
 & + \Sigma K_\phi / 2 (1 + \cos [n\phi - \gamma]) \text{ — потенциал диэдральных (торсионных) вращений;} \\
 & + \Sigma [A_{ij} / R_{ij}^{12} - B_{ij} / R_{ij}^6] \text{ — потенциал невалентных (вандерваальсовых) взаимодействий;} \\
 & + \Sigma q_i q_j / e R_{ij} \text{ — электростатический потенциал.}
 \end{aligned}$$

Сольватация системы была проведена при помощи процедуры сольватации моделью TIP3P воды в заданном сферическом объеме [36]. Для расчета длин связей, включающих только атомы водорода, был использован стандартный метод SHAKE [37]. Для исследования динамики молекулы родопсина было изучено $3 \cdot 10^6$ состояний в интервале времени от $t = 0$ до $t = 3$ нс.

Аналогичные процедуры были проведены и для молекулы родопсина без хромофора. Была использована та же самая модель димера родопсина (PDB-файл «1HZX», цепь на рис. 1, а) [7, 18]. Однако в этом случае 11-цис-ретиаль при всех расчетах был исключен.

Таким образом, процесс моделирования был одинаков для всех расчетов опсина и родопсина [38, 39]. Был проведен сравнительный анализ конфигурации опсина и родопсина для одних и тех же моментов времени и в одних и тех же условиях окружающей среды в процессе их динамических изменений. Такое сравнение выполнялось для десятков сотен конфигураций (так называемая визуализация в реальном масштабе времени).

Исследование структурных изменений конформации родопсина проводилось не только для всей молекулы в целом, но и для отдельных ее фрагментов (альфа-спиралей, цитоплазматических и внутридискковых доменов и т. п.). Результаты моделирования и трехмерные изображения молекулы родопсина были проанализированы с помощью программных пакетов RasMol [40] и MOLMOL [41].

В работе представлены расчеты:

- среднеквадратичных отклонений от исходной конфигурации молекулы в начальный момент моделирования ($t = 0$) родопсина для любого временного интервала вплоть до 3 нс моделирования как молекулы в целом, так и ее отдельных фрагментов

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_i m_i \|r_{i,1} - r_{i,2}\|^2},$$

где RMSD — значение среднеквадратичных отклонений (Å); M — масса всей молекулы (белка родопсина) или выбранного фрагмента; m_i — масса данного i -го атома; $r_{i,1}$ — пространственное положение атома i в момент времени $t = 0$; $r_{i,2}$ — пространственное положение атома i в момент времени $t > 0$;

- межатомных расстояний d с координатами отдельных атомов i и j ,

$$D_1(x_1, y_1, z_1) = D_1(r_1) \text{ и } D_2(x_2, y_2, z_2) = D_2(r_2),$$

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2} = |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|$$

в выбранный момент времени t . То есть \mathbf{r}_1 и \mathbf{r}_2 — соответственно векторы пространственных положений атомов i и j в данный момент времени t (в интервале времени от $t = 0$ до $t = 3$ нс);

- торсионных углов поворотов для отдельных участков хромофора — 11-*цис*-ретиная (рис. 1, б). Угол A между прямыми D_1D_2 и D_3D_4 , направление которых определяется векторами $\mathbf{D}_1\mathbf{D}_2$ и $\mathbf{D}_3\mathbf{D}_4$, вычислялся по формуле

$$\cos A = \frac{d_{12}d_{34}}{|d_{12}||d_{34}|},$$

где

$$|d_{12}| = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

$$|d_{34}| = \sqrt{(x_4 - x_3)^2 + (y_4 - y_3)^2 + (z_4 - z_3)^2}.$$

То есть

$$\cos A = \frac{(x_2 - x_1)(x_4 - x_3) + (y_2 - y_1)(y_4 - y_3) + (z_2 - z_1)(z_4 - z_3)}{|d_{12}||d_{34}|},$$

где \mathbf{d}_{12} — вектор длины отрезка в начальный момент времени $t = 0$; \mathbf{d}_{34} — вектор длины этого же отрезка в момент времени $t > 0$; (в интервале времени до 3 нс).

Для метильных групп C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} и C_{20} в ретинале $|\mathbf{d}_{12}|$ — это длина отрезка (C_1 – C_{16}) — для C_{16} ; длина отрезка (C_1 – C_{17}) — для C_{17} ; длина отрезка (C_5 – C_{18}) — для C_{18} ; длина отрезка (C_9 – C_{19}) — для C_{19} ; длина отрезка (C_{13} – C_{20}) — для C_{20} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет динамики конформационных изменений в молекуле родопсина был проведен для двух состояний: 1) родопсина без хромофорной группы, т. е. для свободного опсина и 2) родопсина с 11-*цис*-ретиналем.

Известно, что 11-*цис*-ретиналь в темновом родопсине имеет непланарную, искаженную скрученную конформацию [17, 18]. Этим его конформационное состояние отличается от протонированного шиффоа основания ретиналя в растворе [10]. Роль белкового окружения в формировании такой конфигурации 11-*цис*-ретиналя в родопсине не вызывает сомнения. Однако молекулярные механизмы, заставляющие хромофор принять такую энергетически невыгодную конфигурацию, до сих пор остаются неясными. Результаты моделирования молекулярной динамики родопсина в темновом состоянии позволили построить модель адаптации 11-*цис*-ретиналя в хромофорном центре опсина в реальном масштабе времени. На основе анимационных картин, расчета изменений межатомных расстояний и торсионных углов поворотов для отдельных участков хромофора в течение 3 нс моделирования нами описана модель темновой адаптации ретиналя при встраивании его в опсин. Модель позволяет объяснить нахождение 11-*цис*-ретиналя в такой конфигурации, которая делает его стабильным и готовым к сверхбыстрой и эффективной фотоизомеризации.

Молекулярная динамика хромофорной группы — 11-*цис*-ретиналя. Результаты моделирования показали, что β -иононовое кольцо 11-*цис*-ретиналя в родопсине находится в 6-*S-цис*-конфигурации по отношению к полиеновой цепи. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными по рентгеноструктурному анализу [7, 9, 18], а также ЯМР-спектроскопии [17, 42].

При рассмотрении молекулярной динамики хромофора в течение 3 нс времени моделирования легко заметить, что происходит явное изменение пространственной конфигурации 11-*цис*-ретиналя. В течение короткого промежутка времени — примерно через 300–400 пс после начала моделирования — происходит, согласно нашим наблюдениям, поворот β -иононового кольца вокруг C6–C7-связи примерно на 60° относительно начальной конфигурации 11-*цис*-ретиналя (PDB-файл «1HZX», цепь на рис. 1, а [7, 18]) (рис. 2). Это согласуется с теоретическими и экспериментальными данными [15, 17], где указывается, что β -иононовое кольцо в темновом необлученном родопсине повернуто примерно на 50 – 65° относительно плоскости планарной структуры свободного 11-*цис*-ретиналя, что создает его напряженную скрученную конформацию. Из анализа кристаллической структуры родопсина, а также анимационных картин молекулярной динамики на начальном этапе моделирования видно, что плоскость β -иононового кольца 11-*цис*-ретиналя расположена практически перпендикулярно плоскости мембраны, а вся структура хромофора близка к планарной. Результаты моделирования показывают, что после поворота

β -иононового кольца его плоскость становится практически параллельной плоскости мембраны.

Можно предположить, что окружающие хромофор аминокислотные остатки «помогают» 11-*цис*-ретинолу или «заставляют» его принимать ту пространственную конфигурацию (возможно, это и есть молекулярный механизм физиологической регенерации зрительного пигмента), которая необходима молекуле родопсина, чтобы стать высокоэффективным триггером процесса фототрансдукции.

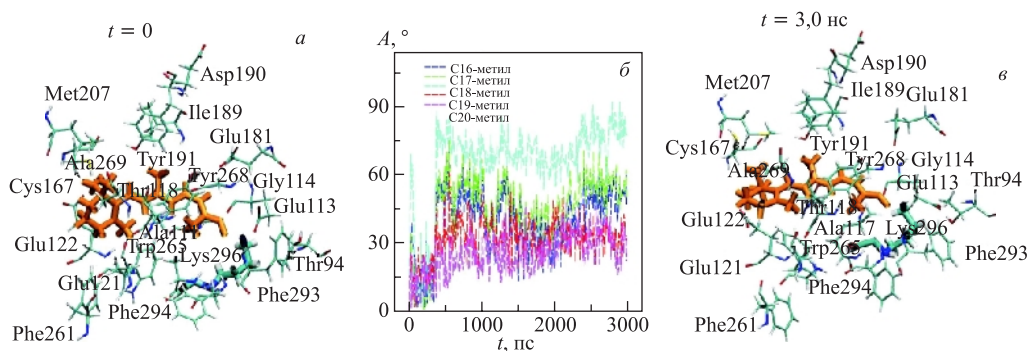


Рис. 2. Молекулярная динамика 11-*цис*-ретинола в хромофорном центре молекулы родопсина (конформационное состояние хромофора в начальный момент времени ($t = 0$) (а) и через 3 нс ($t = 3$ нс) (в)). б) Диаграмма торсионных углов поворотов пяти метильных групп (С16–С20) 11-*цис*-ретинола в течение 3 нс молекулярной динамики родопсина

Имеются также данные о том, что центральная область полиеновой цепи ретинола С10–С13 также имеет скрученную напряженную конфигурацию [43, 44]. Чтобы оценить степень «скрученности» различных участков ретинола, нами были вычислены торсионные углы поворотов метильных групп С16, С17 и С18 относительно их положения в начальный момент моделирования для оценки поворота плоскости β -иононового кольца, а также вычислены торсионные углы поворотов С19 и С20 для определения конформационных изменений в центральной части полиеновой цепи. На рис. 2 представлены диаграммы, отражающие углы поворотов пяти вышеуказанных метильных групп. Видно, что поворот всех этих метильных групп происходит довольно резко — в очень короткий временной промежуток (примерно в интервале 370–390 пс) и практически одновременно. Углы поворотов метильных групп в этом промежутке времени в среднем равны для С18-метильной группы — 75° , для С16 и С17 — 60° , для С19 — 40° и для С20 — 30° . Несмотря на то, что крутильные флуктуации этих групп имеют довольно большую амплитуду (в среднем около 20°), тем не менее, видно, что чем дальше метильная группа удалена от β -иононового кольца, тем меньше ее отклонение от начального состояния. Исходя из этого, можно предположить, что причиной скрученной искаженной конформации 11-*цис*-ретинола в темновом состоянии родопсина является поворот β -иононового кольца, влекущий за собой «скручивание» и полиеновой цепи ретинола.

Следует также отметить, что угол поворота С18-метильной группы самый большой. При этом крутильные осцилляции этой группы в начальный момент после встраивания хромофора в белок имеют большую амплитуду по сравнению с остальными. Можно,

следовательно, говорить о доминирующей роли этой группы как «рычага» в процессах «скручивания» 11-*цис*-ретиналя.

В работе [12] для всех тяжелых атомов ретиналя были рассчитаны возможные пространственные координаты, в пределах которых все атомы хромофора могут производить колебательные движения. Показано, что С18, действительно, может иметь наибольшую динамику флуктуаций среди пяти наиболее подвижных метильных групп, в числе которых С16, С17, С19 и С20 (атомы расположены в порядке убывания степени подвижности). Эти данные хорошо коррелируют с нашими расчетами, которые демонстрируют вполне реальную динамику движения метильных групп в ретинале.

Результаты расчетов торсионных углов поворотов С19- и С20-метильных групп хорошо согласуются с экспериментальными данными ЯМР-спектроскопии [45], где углы отклонения векторов С9–С19 и С13–С20 от оси, перпендикулярной фоторецепторной мембране, составляют приблизительно 42 и 30° соответственно.

Таким образом, результаты моделирования динамики хромофора хорошо коррелируют как с экспериментальными данными [7, 9, 16–18, 42], так и с теоретическими [12, 15, 46]. Они отчетливо указывают на то, что ретиналь в темновом родопсине имеет скрученную искаженную 11-*цис*-конфигурацию. Однако во всех этих работах поворот β -иононового кольца не сопоставляют с изменением конформации полиеновой цепи 11-*цис*-ретиналя, а именно ее центральной части С10–С13. В этих работах оба участка хромофора рассматриваются независимо друг от друга.

Полученные нами результаты моделирования позволяют предположить, что все процессы, связанные с изменением конфигурации 11-*цис*-ретиналя в процессе его темновой «адаптации» в хромофорном центре, имеют одну «отправную точку». Речь идет о С18-метильной группе. Ее максимальные, по сравнению с остальными метильными группами, крутильные флуктуации, вероятно, влекут за собой «скручивание» всей полиеновой цепи 11-*цис*-ретиналя.

Молекулярная динамика аминокислотных остатков в хромофорном участке. Оценка взаимодействия отдельных альфа-спиральных тяжей и принадлежащих им аминокислотных остатков с 11-*цис*-ретиналем была проведена в его двух наиболее важных областях — в области β -иононового кольца и в области протонированного шиффова основания — ковалентной связи с опсином (Lys296).

Для определения роли ближайших аминокислотных остатков, окружающих ретиналь в хромофорном участке и определяющих его конформационные перестройки за период в 3 нс от начала момента моделирования, нами были сделаны расчеты изменения межатомных расстояний между β -иононовым кольцом и расположенными рядом с ним аминокислотными остатками Trp265, Tyr268 и Leu266, Glu122 и His211, а также между атомом азота протонированной связи шиффова основания и Glu113, Glu181 и Ser186. Для оценки расстояния между любым тяжелым атомом аминокислотного остатка и β -иононовым кольцом использовали С6-атом β -иононового кольца, так как он имел наименьшую подвижность.

Молекулярная динамика Trp265, Tyr268, Leu266 и 11-цис-ретиналя в области β -иононового кольца. Известно, что *цис-транс*-изомеризация ретиналя в процессе физиологической активации родопсина инициирует изменение пространственной конфигурации Н-VI α -спирали. Считается, что эти изменения являются ключевыми в образовании активной формы зрительного пигмента, способного взаимодействовать с G-белком (трансдуцином) [12, 15, 16, 25, 26, 47]. Предполагается, что Н-VI α -спираль имеет самые

слабые взаимодействия с остальными α -спиралями [12], и поэтому она обладает наибольшей способностью к изменению подвижности в ходе фотолиза родопсина.

Также высказывается гипотеза, что в темновом состоянии родопсина 11-*цис*-ретинаяль, проявляя свойства лиганда-антагониста, стабилизирует динамику H-VI α -спирали, ограничивает ее подвижность и предотвращает спонтанную активацию родопсина в темноте [16]. Более того, поскольку механизм активации (изменение пространственного расположения H-VI α -спирали) считается универсальным для всего огромного семейства G-белок-связывающих рецепторов [4], возможно, что и внутримолекулярные механизмы их стабилизации в неактивном состоянии аналогичны таковым в родопсине.

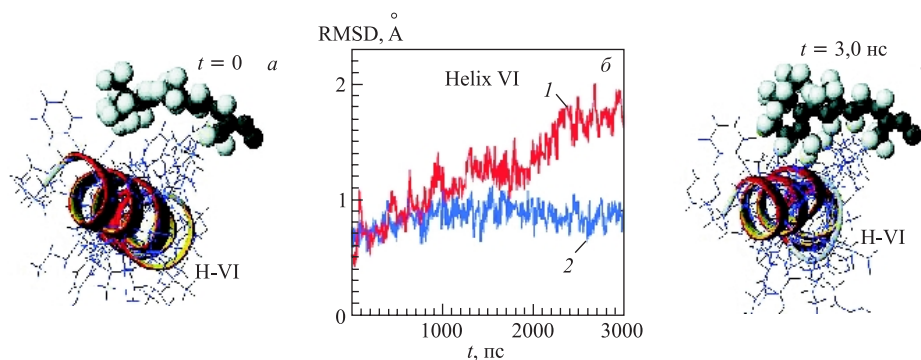


Рис. 3. Молекулярная динамика H-VI α -спирали и 11-*цис*-ретинаяля в начальный ($t = 0$) (а) и в конечный ($t = 3$ нс) (в) моменты моделирования. б) Кривые среднеквадратичных отклонений H-VI α -спирали от исходной конфигурации при моделировании молекулярной динамики молекулы в течение 3 нс. 1 — родопсин с хромофорной группой (11-*цис*-ретинаялем); 2 — опсин (родопсин без хромофорной группы)

Нами были проведены расчеты среднеквадратичных отклонений H-VI α -спирали для родопсина и свободного опсина (рис. 3). Результаты этих расчетов показали, что присутствие 11-*цис*-ретинаяля в белке сильно меняет динамику поведения этой спирали, а именно, инициирует ее конформационные изменения. Значения среднеквадратичных отклонений достаточно велики (более 1 Å), при этом расстояние между H-VI α -спиралью и 11-*цис*-ретинаялем уменьшается.

В этой связи была проанализирована молекулярная динамика аминокислотных остатков H-VI α -спирали, наиболее близко расположенных к 11-*цис*-ретинаялю, а именно Trp265, Tyr268 и Leu266. Известно, что β -иононовое кольцо 11-*цис*-ретинаяля в родопсине находится, в основном, в окружении ароматических аминокислотных остатков [7, 9, 18]. Считается, что «ароматический кластер» играет важную роль в сохранении скрученной, напряженной конфигурации 11-*цис*-ретинаяля в темновом неактивном состоянии пигмента [15, 16, 25, 48]. Основное внимание при этом уделяется Trp265, который находится на расстоянии около 3,8 Å от ретинаяля, вполне достаточном для возникновения сильных электростатических взаимодействий с хромофором [7, 16].

Считается, что, с одной стороны, β -иононовое кольцо блокирует движение Trp265, стабилизируя, таким образом, H-VI α -спираль и не давая темновому родопсину переходить в активное состояние, а с другой стороны, Trp265 стабилизирует энергетически

невыгодную скрученную конфигурацию β -иононового кольца. Phe261 и Tyr268, по мнению многих авторов, также играют важную роль в стабилизации β -иононового кольца, в определении спектральной чувствительности зрительных пигментов, а также в процессах активации родопсина [16, 49].

В настоящей работе был проведен анализ молекулярной динамики ароматических аминокислотных остатков Trp265, Tyr268 и Leu266 и рассчитана динамика изменения межатомных расстояний между этими аминокислотными остатками и β -иононовым кольцом 11-*цис*-ретинала (рис. 4, 5).

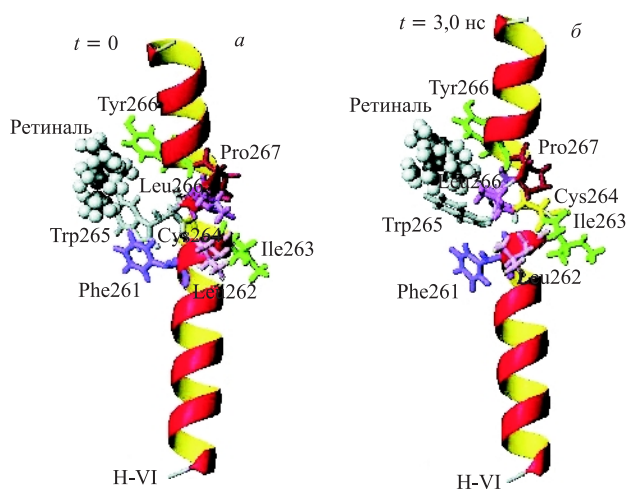


Рис. 4. Молекулярная динамика H-VI α -спирали и ее аминокислотных остатков, находящихся рядом с 11-*цис*-ретиналом, в начальный ($t = 0$) (а) и в конечный ($t = 3$ нс) (б) моменты моделирования. 11-*цис*-ретиаль изображен в виде шариков, аминокислотные остатки — жирных линий

Присутствие Leu266 в этой группе не случайно. При анализе анимационных файлов нами было отмечено необычное поведение этого аминокислотного остатка. В литературе практически не обсуждаются функциональные свойства Leu266 и его роль как в поддержании темного неактивного состояния родопсина, так и при его активации. Имеются данные, согласно которым Leu266 так же, как и Trp265, находится на очень близком расстоянии к β -иононовому кольцу [50].

Результаты моделирования показали, что Trp265 в течение «адаптации» 11-*цис*-ретинала в хромофорном участке становится ближе к β -иононовому кольцу примерно на 2 Å. Наименьшее расстояние между этими группами атомов составляет $\sim 3,8$ Å, что хорошо коррелирует с литературными данными. Динамика сближения носит скачкообразный характер в области 380 пс. Tyr268 также становится ближе к β -иононовому кольцу примерно на 1–2 Å. Характер сближения плавный по сравнению с Trp265, а сам процесс заканчивается примерно к 400 пс. Следует, однако, отметить, что при сближении Tyr268 с β -иононовым кольцом амплитуда флуктуаций на кривых межатомных расстояний становится меньше. Можно предположить, что электростатические силы взаимодействия между Tyr268 и β -иононовым кольцом уменьшают подвижность атомов обеих групп. На

рис. 4 видно, что по сравнению с начальным состоянием ($t = 0$) к 3 нс моделирования Trp265 и Tyr268 сильнее «обхватывают» 11-*цис*-ретинол с двух сторон, а их ароматические кольца становятся почти параллельными друг другу. Эти результаты хорошо коррелируют с представлением о роли этих ароматических аминокислот в стабилизации и удерживании хромофора в скрученной искаженной конфигурации.

На рис. 4 также видно резкое изменение положения Leu266. При рассмотрении динамики изменения межатомных расстояний между Leu266 и β -иононовым кольцом также хорошо заметно необычное поведение этого аминокислотного остатка (рис. 5). За 400 пс расстояние между Leu266 и β -иононовым кольцом уменьшается в среднем на 6 Å, а наименьшее расстояние между этими группами становится около 3,5 Å.

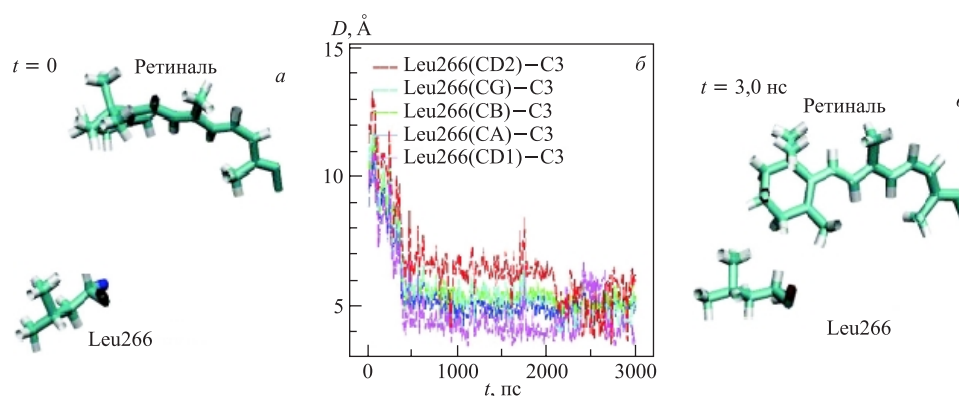


Рис. 5. Молекулярная динамика 11-*цис*-ретинола и Leu266 в молекуле родопсина в начальный ($t = 0$) (а) и конечный ($t = 3$ нс) (в) моменты моделирования. б) Диаграмма межатомных расстояний между различными атомами Leu266 и углеродным атомом C3 β -иононового кольца

Иными словами, между этими группами устанавливается сильная электростатическая связь. Следует отметить, что сближение Leu266 с β -иононовым кольцом начинает наблюдаться практически с нулевого момента моделирования, а к 400 пс этот процесс заканчивается, и при дальнейшем моделировании взаимное расположение этих групп атомов остается постоянным.

При рассмотрении анимационных файлов легко заметить, что изменение расстояния происходит в большей степени за счет поворота β -иононового кольца.

Что является движущей силой этого процесса, пока остается загадкой. Можно, однако, обсуждать функциональную роль такой конформационной перестройки. Например, предполагается, что Leu47 участвует в ориентации боковой цепи Lys296 вдоль длинной оси молекулы родопсина [16]. Возможно, Leu266 может также участвовать в переориентации и β -иононового кольца. На рис. 11 хорошо видно, что плоскость β -иононового кольца после его поворота (после 400 пс) располагается в одной плоскости с двумя симметричными метильными группами Leu266. В начальный же момент моделирования ($t = 0$) в расположении этих групп не наблюдается никакой симметрии.

Trp265 и Tyr268, по-видимому, в этом процессе выступают в роли «фиксаторов» этой конформационной перестройки. Причем если сопоставлять временные параметры молекулярной динамики этих аминокислотных остатков, то создается впечатление, что

процесс взаимодействия Leu266 с β -иононовым кольцом (360–400 пс) опережает процессы конформационных перестроек Trp265 (380 пс) и Tyr268 (до 500 пс).

Иными словами, можно предположить, что сначала происходит сближение β -иононового кольца с Leu266, а потом «фиксация» его с помощью Trp265 и Tyr268.

Молекулярная динамика Glu122, His211 и 11-цис-ретиналя в области β -иононового кольца. Известно, что H-III и H-V α -спирали участвуют в процессе активации родопсина [51]. Считается, что взаимодействие Glu122(H-III) и His211(H-V) и определяет подвижность этих α -спиралей. Этим аминокислотным остаткам уделяется также большое внимание из-за их близости к β -иононовому кольцу 11-цис-ретиналя. По данным рентгеноструктурного анализа [7] между этими аминокислотными остатками существует водородная связь. Иными словами, расстояние между ними должно быть порядка 3 Å. Действительно, моделирование динамики молекулы родопсина в отсутствие ретиналя подтвердило этот факт (рис. 6, а–в). Из рисунка видно, что наименьшее расстояние между

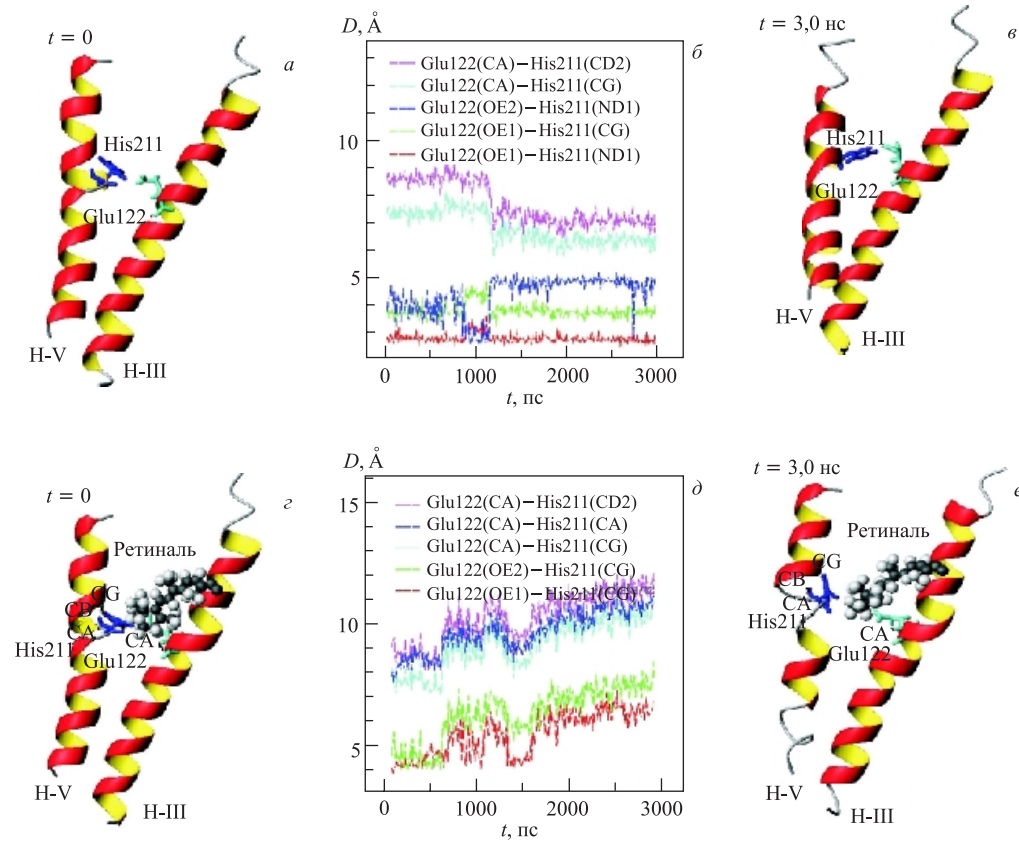


Рис. 6. Молекулярная динамика H-III(Glu122) и H-V(His211) α -спиралей: а–в) в опсине (родопсин без хромофорной группы); г–д) в родопсине с хромофорной группой (11-цис-ретиналем) в начальный ($t = 0$) (а, г) и конечный ($t = 3$ нс) (в, д) моменты моделирования. 11-цис-ретиналь изображен в виде шариков, аминокислотные остатки — в виде объемных структурных формул. б, д) Диаграммы изменения межатомных расстояний между различными атомами Glu122 и His211

этим аминокислотными остатками составляет 3 Å на протяжении всего времени моделирования. Это свидетельствует о том, что между Glu122 и His211 действительно существует устойчивая водородная связь.

Однако в случае моделирования динамики молекулы родопсина с 11-*цис*-ретиналем мы получили неожиданные результаты. В процессе «адаптации» ретиналя в течение 3 нс после начала моделирования происходит увеличение расстояния между Glu122 и His211 (рис. 6, *z-e*). Наименьшее расстояние между Glu122(OE1) и His211(ND1) увеличивается с 3 до 6–7 Å.

Иными словами, складывается впечатление, что водородная связь между Glu122 и His211 рвется, и инициатором этого процесса является, несомненно, 11-*цис*-ретинол. Следует отметить, что изменение расстояния происходит не плавно, а скачкообразно. Примерно через 580 пс после начала моделирования происходит заметное увеличение расстояния между различными атомами этих аминокислотных остатков.

Чтобы понять роль 11-*цис*-ретинола в этом процессе, нами были рассчитаны межатомные расстояния между этими аминокислотными остатками и атомом С6 β -иононового кольца. Анализ показал, что His211 не проявляет какой-либо заметной закономерной динамики в отношении β -иононового кольца. В то же время поведение Glu122, напротив, оказалось необычным. Сначала в интервале от 0 до 350 пс происходит его небольшое сближение с β -иононовым кольцом, затем Glu122 резко отталкивается от 11-*цис*-ретинола. Межатомные расстояния увеличиваются в среднем на 2 Å. Временная характеристика этого процесса дает основание предполагать, что причиной разрыва водородной связи между Glu122 и His211 (580 пс) является взаимодействие Glu122 и β -иононового кольца (350 пс).

Следует также отметить, что взаимодействие Glu122 и β -иононового кольца предшествует и повороту самого β -иононового кольца (370 пс). Иными словами, можно предположить, что Glu122 принимает активное участие в конформационных перестройках как самого ретиналя, так и его ближайшего окружения.

Результаты по молекулярной динамике Glu122 и His211 хорошо коррелируют с результатами теоретической работы [12], где были рассчитаны энергии взаимодействия аминокислотных остатков в хромофорном участке с 11-*цис*-ретиналем. Для His211 средняя энергия взаимодействия с β -иононовым кольцом составила $-7,6$ ккал/моль (т.е. эти группы довольно сильно притягиваются друг к другу), а для Glu122 она составила $+9,1$ ккал/моль (т.е. между β -иононовым кольцом и этим аминокислотным остатком существуют сильные силы отталкивания).

Следует отметить, что до сих пор нет единого мнения о механизмах взаимодействия Glu122 и His211 в молекуле родопсина. Так, например, в работах [7, 51, 52] утверждается, что взаимодействие Н-III и Н-V α -спиралей в родопсине происходит опосредованно, через образование водородной связи между Glu122 и His211.

При этом взаимодействия этих аминокислотных остатков рассматриваются либо в кристаллической структуре темнового родопсина [7, 52], либо на стадии образования метародопсина I [51].

В другой работе [53] утверждается, что водородная связь между Glu122 и His211 в темновом состоянии родопсина существует, но что она рвется между Н-III и Н-V α -спиралами при его активации. В любом случае, взаимодействие Glu122 и His211 определяет подвижность Н-III и Н-V α -спиралей, конформационные изменения которых при поглощении света приводят к физиологической активации родопсина. Результаты наших

расчетов показывают, что водородная связь между Glu122 и His211 нарушается в результате встраивания 11-*цис*-ретинала в хромофорный центр, т. е. уже в темновом, неактивном состоянии молекулы. Складывается впечатление, что 11-*цис*-ретиаль вследствие нековалентных взаимодействий с ближайшим белковым окружением как бы «раздвигает» Н-III и Н-V α -спирали и удерживает их в таком напряженном положении до момента поглощения кванта света. Можно предположить, что фотоизомеризация хромофора нарушает его электростатические взаимодействия с ближайшим белковым окружением, и фиксированные до этого Н-III и Н-V α -спирали начинают возвращаться в конформационное состояние, характерное для свободного опсина.

Это внутримолекулярное событие можно рассматривать как важный момент в процессе перехода хромофора как лиганда из состояния мощного антагониста в состояние эффективного агониста в молекуле G-белок-связывающего рецептора — родопсина.

Можно предположить, что это событие приводит к увеличению степени нестабильности всей системы, являясь, по-видимому, одной из предпосылок к готовности 11-*цис*-ретинала как хромофорной группы к сверхбыстрой и эффективной фотоизомеризации.

Таким образом, присутствие хромофора в опсине инициирует конформационные перестройки белкового окружения и, судя по всему, не только приводит молекулу родопсина в состояние «повышенной готовности» к фотоактивации, но и стабилизирует ее неактивное состояние.

Молекулярная динамика Glu113, Glu181, Ser186 и 11-цис-ретинала в области протонированной связи шиффова основания. Согласно классическим представлениям, Glu113 является противоионом протонированной связи шиффова основания в темноадаптированном родопсине [54–56]. Солевой мостик между этими группами стабилизирует взаимодействие Н-III и Н-VII α -спиралей. Считается, что нарушение этого взаимодействия может приводить к активации родопсина, то есть приобретению им способности активировать трансдуцин [57].

Однако с помощью метода рентгеноструктурного анализа [7–9] сравнительно недавно было обнаружено, что еще такой же аминокислотный остаток (Glu181) расположен фактически в самом хромофорном центре — на расстоянии 4 Å от атома углерода C12 полиеновой цепи 11-*цис*-ретинала, что достаточно близко к протонированной связи шиффова основания. Дело в том, что, согласно двумерной структуре родопсина, Glu181 находится во второй E-II петле внутрдискового гидрофильного домена, то есть достаточно далеко от хромофорного центра [27]. Поэтому раньше роль Glu181 как противоиона никогда не рассматривалась.

Еще в ранних работах (до рентгеноструктурного анализа) при изучении мутантных форм родопсина, где Glu113 был замещен на нейтральную аминокислоту, предполагалось, что противоионом может быть другой аминокислотный остаток, а не Glu113 [58, 59]. Недавно, при исследовании также мутантных форм родопсина было показано, что замена Glu181 на другую аминокислоту приводит к ослаблению стабильности протонированного шиффова основания [60].

Следует отметить, что и в хромофорном центре родопсина беспозвоночных на 181-й позиции также находится Glu, который представляет собой один из самых консервативных аминокислотных остатков в зрительных пигментах и, как недавно было показано, служит противоионом протонированного шиффова основания [61–63].

Мы провели сравнительный анализ молекулярной динамики взаимодействия Glu113 и Lys296 в родопсине и его апобелке — опсине, в котором протонированная связь шиффова основания между хромофором и Lys296 отсутствует.

На рис. 7, *a* хорошо видно, что в нулевой момент времени моделирования в опсине наименьшее расстояние между атомом азота ϵ -аминогруппы Lys296 и атомами кислорода карбоксильной группы Glu113 составляет примерно 3 Å. Однако через 1500 пс это расстояние увеличивается до 5,5 Å. Несмотря на то, что оба этих аминокислотных остатка противоположно заряжены, они не притягиваются друг к другу, как следовало бы ожидать, а расходятся.

Присутствие хромофорной группы существенно меняет молекулярную динамику Glu113 по отношению к Lys296. На рис. 7, *b* видно, что расстояние между атомами кислорода карбоксильной группы Glu113 и атомом азота протонированного шиффова основания в начальный момент моделирования составляет не 3,3 Å, как это показано методом рентгеноструктурного анализа в кристалле родопсина, а около 5 Å. Через 600 пс от начала моделирования оно скачкообразно увеличивается еще на 1,5 Å. В то же время атомы углерода и азота Glu113, образующие пептидные связи с другими аминокислотами, приближаются к атому азота шиффова основания примерно на 1,5 Å. Это означает, что отрицательно заряженная карбоксильная группа Glu113 отодвигается от связи шиффова основания, а сама Н-III α -спираль при этом к ней приближается.

Расхождение между данными рентгеноструктурного анализа, согласно которым расстояние между атомами кислорода карбоксильной группы Glu113 и атомом азота ϵ -аминогруппы Lys296 составляет порядка 3,3 Å, и молекулярного моделирования (расстояние порядка 6 Å) может объясняться динамическими процессами Н-III α -спирали, происходящими при «переходе» молекулы из статического кристаллического состояния в динамическое при температуре моделирования 300 К.

Мы провели также анализ молекулярной динамики Glu181 и Ser186, находящихся довольно близко к протонированному шиффову основанию. Как видно на рис. 8 и 9, в течение всего времени моделирования позиция Glu181 практически не меняется по отношению к 11-*цис*-ретиналу. Из диаграммы межатомных расстояний следует, что расстояние между Glu181 и атомом азота протонированного шиффова основания равно примерно 6 Å и совпадает с данными рентгеноструктурного анализа. Это расстояние достаточно велико, чтобы Glu181 мог выполнять функцию протонированного шиффова основания в родопсине в его темновом состоянии. По нашим данным, оно сопоставимо с расстоянием между атомом азота протонированного шиффова основания и атомом кислорода карбоксильной группы Glu113 (примерно 6 Å).

Мы также проанализировали динамику Ser186 за время моделирования 3 нс. На представленных диаграммах (рис. 9, *a–в*) видно, что гидроксильная группа Ser186 находится примерно на одинаковом расстоянии как от атома кислорода карбоксильной группы Glu181, так и от атома азота связи шиффова основания. Это расстояние равно приблизительно 3 Å. Можно предположить, что между Glu181 и шиффовым основанием устанавливается водородная связь опосредованно, через Ser186. Что касается Glu113, то из диаграмм межатомных расстояний (рис. 9, *a–в*) видно, что наименьшее расстояние между Glu113 и Ser186 равно приблизительно 8 Å, между Glu113 и Glu181 — приблизительно 10 Å, а между Glu113 и атомом азота протонированного шиффова основания — 6 Å. При рассмотрении трехмерного изображения видно, что Glu113, Glu181 (атомы кислорода ОЕ2 карбоксильных групп) и атом азота шиффова основания образуют

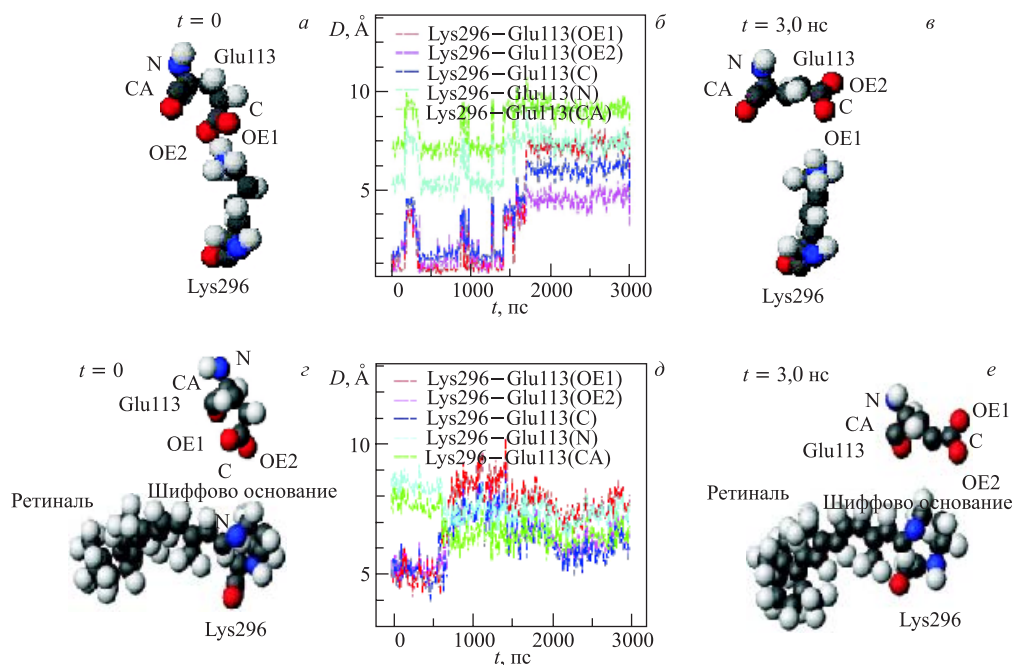


Рис. 7. Молекулярная динамика Glu113 и Lys296 в опсине (родопсин без хромофорной группы) (*a–b*) и в родопсине (*z–d*) в начальный ($t = 0$) (*a, z*) и конечный ($t = 3$ нс) (*b, d*) моменты моделирования. *b, d*) Диаграммы изменения межатомных расстояний между различными атомами Glu113 и атомом азота ϵ -аминогруппы Lys296. Атомы углерода обозначены серыми шариками, кислорода — красными, азота — синими, водорода — белыми

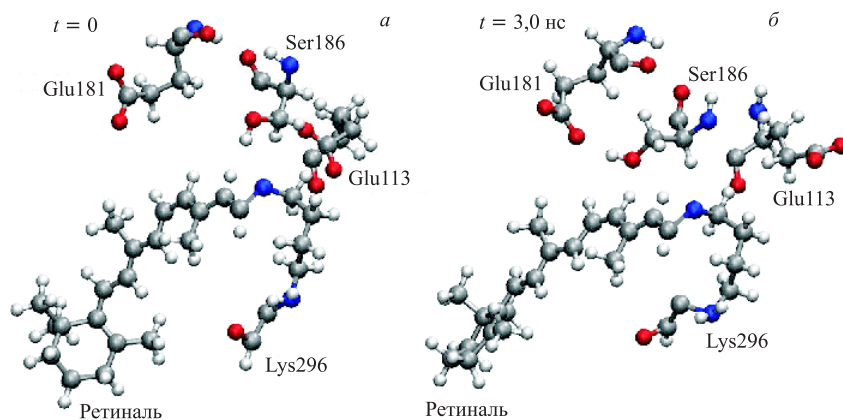


Рис. 8. Молекулярная динамика 11-*цис*-ретиная и аминокислотных остатков Glu113, Glu181, Ser186 в родопсине в начальный ($t = 0$) (*a*) и конечный ($t = 3$ нс) (*b*) моменты моделирования. Атомы углерода обозначены серыми шариками, кислорода — красными, азота — синими, водорода — белыми

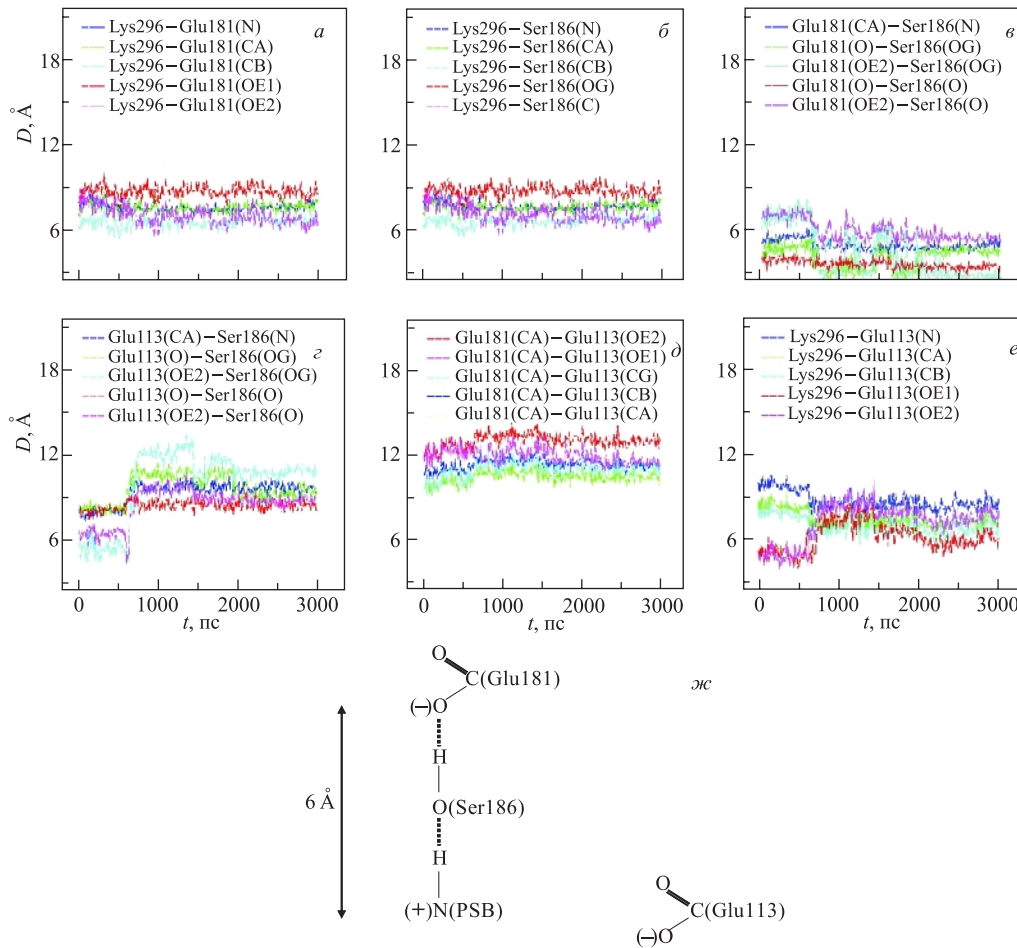


Рис. 9. *a-e*) Диаграммы изменения межатомных расстояний между различными атомами Glu181 и атомом азота протонированной связи шиффова основания (*a*), Ser186 и атомом азота протонированной связи шиффова основания (*б*), Glu181 и Ser186 (*в*), Glu113 и Ser186 (*г*), Glu113 и Glu181 (*д*), Glu113 и атомом азота протонированной связи шиффова основания (*е*). *ж*) Схема взаимодействия Glu181, Ser186, Glu113 и атома азота протонированной связи шиффова основания

треугольник, где Ser186 (а точнее, его гидроксильная группа) находится на отрезке, соединяющем Glu181 и атом азота (рис. 9, *ж*).

Таким образом, из нашей модели следует, что Glu181 и Ser186 могут вносить больший вклад в стабилизацию протонированного шиффова основания по сравнению с Glu113. Можно предположить, что отдаленное расположение Glu113 от атома азота шиффова основания (6 Å, а не 3,3 Å по данным рентгеноструктурного анализа) характерно для родопсина в его темновом состоянии. Пока Glu113 находится на большом расстоянии, ему трудно акцептировать протон шиффова основания, которое стабилизировано Glu181 и Ser186. Но как только происходит поглощение кванта света и, как следствие этого, перераспределение электронной плотности в изомеризованном ретинале, электростати-

ческие взаимодействия хромофора с белковым окружением нарушаются. Возможно, что при этом Glu113 и становится ближе к атому азота протонированной связи шиффоа основания. При этом непосредственное взаимодействие Glu113 с еще протонированным шиффовым основанием становится более сильным, чем взаимодействие последнего с Glu181, опосредованное через Ser186. В результате этого протон на стадии образования метародопсина II легко переходит к Glu113, который до этого находился в ионизированном состоянии [64, 65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с использованием методов компьютерного моделирования проведено сравнительное исследование молекулярной динамики родопсина, содержащего хромофорную группу (11-*цис*-ретиаль), и свободного опсина.

Несмотря на то, что в нашей модели родопсин, будучи мембранным белком, находится в водном окружении, его молекулярная динамика находится в хорошем соответствии с экспериментальными исследованиями [7, 18] и теоретическими моделями родопсина в липидном окружении [10, 12, 15].

Наши расчеты показали высокий уровень упорядоченности фрагментов N-концевой полипептидной цепи и внутридисковых петель по сравнению с цитоплазматическим доменом [66], что хорошо коррелирует с данными рентгеноструктурного анализа [7, 18]. Это также соответствует известным представлениям о важной роли внутридискового домена молекулы как ее стабилизатора в фоторецепторной мембране [67–69].

Известно также, что в темновом состоянии зрительного пигмента хромофор как лиганд-антагонист стабилизирует динамику H-VI α -спирали, ограничивает ее подвижность и предотвращает спонтанную активацию родопсина за счет сильных электростатических взаимодействий с Trp265 [7, 16]. Из нашей модели следует, что помимо Trp265 в предотвращении спонтанной активации родопсина участвуют еще Tyr268 и Leu266.

При рассмотрении молекулярной динамики самого хромофора (11-*цис*-ретиаля) в течение 3 нс моделирования нами показано, что происходит поворот β -ионового кольца вокруг C6–C7-связи примерно на 60° относительно начальной конфигурации 11-*цис*-ретиаля (PDB-файл «1HZX», цепь на рис. 1, а [7, 18]). Это согласуется с теоретическими и экспериментальными данными, согласно которым β -ионовое кольцо в темновом необлученном состоянии родопсина повернуто примерно на 50 – 65° относительно плоскости планарной структуры свободного 11-*цис*-ретиаля [15, 17].

Результаты наших расчетов торсионных углов поворотов C19- и C20-метильных групп полиеновой цепи 11-*цис*-ретиаля (40 и 30° соответственно) хорошо согласуются с экспериментальными данными ЯМР-спектроскопии, где углы отклонения векторов C9–C19 и C13–C20 от оси, перпендикулярной фоторецепторной мембране, составляют ~ 42 и $\sim 30^\circ$ соответственно [45].

Таким образом, предлагаемая нами модель не противоречит современным представлениям о конформации молекулы родопсина в темновом состоянии и хорошо согласуется с результатами многих экспериментальных и теоретических работ о его структуре и функциональных свойствах. Это позволяет аппроксимировать полученные результаты на молекулу родопсина *in vivo*. Более того, примененные нами методы компьютерного

моделирования дают возможность в реальном масштабе времени «наблюдать» конформационные перестройки при «адаптации» 11-*цис*-ретиная в опсине, т.е. в процессе физиологической регенерации родопсина. В результате этого хромофор инициирует в белке такие перестройки, которые приводят родопсин в состояние высокоэффективного светового рецептора (вспомним, что скорость и квантовый выход единственной фотохимической реакции в зрении — фотоизомеризации 11-*цис*-ретиная — исключительно высоки). Одновременно с этим хромофорная группа в родопсине выступает в качестве мощного лиганда-антагониста, эффективно предотвращающего опасность его спонтанного взаимодействия с G-белком (трансдуцином) в темноадаптированном состоянии зрительной клетки [5, 6, 16]. Так, например, в темновом состоянии родопсина происходит образование солевого мостика между Glu113 и Lys296. Разрыв этого мостика приводит к активации зрительного пигмента. Предотвращение же спонтанного разрыва в темноте достигается присутствием 11-*цис*-ретиная. Другим примером, где 11-*цис*-ретиная выступает в роли лиганда-антагониста, является стабилизация N-VI α -спирали за счет сильных электростатических взаимодействий 11-*цис*-ретиная с Trp265 [7, 16]. Считается, что β -иононовое кольцо хромофора блокирует движение Trp265, стабилизируя всю N-VI α -спираль и не давая темновому родопсину переходить в активное состояние. На примере нашей модели видно, что помимо Trp265 в этом процессе предотвращения спонтанной активации родопсина в темноте участвуют еще и Tyr268 с Leu266.

Результаты компьютерного моделирования имеют прогностическое значение. Так, например, методами направленного мутагенеза или иными способами было бы важно исследовать роль Leu266 в процессах стабилизации N-VI α -спирали и самого хромофора. В литературе таких сведений не имеется.

Иными словами, молекулярное моделирование, с одной стороны, дает возможность ставить конкретные задачи для последующей экспериментальной проверки, а с другой стороны, позволяет описывать в деталях сложные внутримолекулярные механизмы, которые сложно, а подчас и невозможно изучать экспериментальными методами.

Таким образом, в настоящей работе мы предприняли попытку компьютерного моделирования физиологических функций зрительного пигмента родопсина на внутримолекулярном уровне его организации. В частности, мы попытались рассмотреть внутримолекулярный механизм регенерации родопсина, в ходе которого молекула зрительного пигмента приобретает уникальные фотохимические свойства как белок-фоторецептор и одновременно, будучи G-белок-связывающим рецептором, находится в темноте в неактивном состоянии и практически неспособна к взаимодействию с G-белком. Оба эти функциональных свойства родопсина принципиально важны для осуществления нормального физиологического процесса в темноадаптированной зрительной клетке — процесса фототрансдукции.

Работа была выполнена при поддержке компьютерными техническими средствами Лаборатории вычислительной астрофизики Института физических и химических исследований, РИКЕН, Япония (Computational Astrophysics Laboratory (CAL) of the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Japan). Мы благодарим Лабораторию за компьютерное время, предоставленное для работы на суперкомпьютере и компьютере специального назначения MDGRAPE-2 с целью проведения расчетов молекулярной динамики белковых молекул. Авторы благодарны директору Лаборатории профессору Toshikazu Ebisuzaki за поддержку программных лицензионных продуктов и компьютеров MDGRAPE-2.

Работа была поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Теоретическое и экспериментальное изучение природы химической связи и механизмов важнейших химических реакций и процессов» (Программа № 1 ОХНМ РАН), грантом РФФИ № 05-04-49945, программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Физиологические механизмы регуляции внутренней среды и организации поведения живых систем».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mirzadegan T. et al.* // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 2759–2767.
2. *Hubbell W.L. et al.* // *Adv. Protein Chem.* 2003. V. 63. P. 243–290.
3. *Okada T. et al.* // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 318–324.
4. *Gether U., Kobilka B.K.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 17979–17982.
5. *Buczylko J. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 20621–20630.
6. *Melia T.J. Jr. et al.* // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 3182–3191.
7. *Palczewski K. et al.* // *Science*. 2000. V. 289. P. 739–745.
8. *Liang Y. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 21655–21662.
9. *Okada T. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 342. P. 571–583.
10. *Sugihara M. et al.* // *Biochemistry*. 2002. V. 41. P. 15259–15266.
11. *Singh D. et al.* // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 4201–4204.
12. *Crozier P.S. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 493–514.
13. *Imamoto Y. et al.* // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 6257–6262.
14. *Liu R.S.H., Colmenares L.U.* // *Proc. of Nat. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 14639–14644.
15. *Saam J. et al.* // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 3097–3112.
16. *Menon S.T., Han M., Sakmar T.P.* // *Physiol. Rev.* 2001. V. 81. P. 1659–1688.
17. *Salgado G.F.J. et al.* // *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 12819–12828.
18. *Teller D.C. et al.* // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 7761–7772.
19. *Haran G. et al.* // *J. Phys. Chem. A*. 1999. V. 103. P. 2202–2207.
20. *Kandori H. et al.* // *Chem. Phys. Lett.* 2001. V. 334. P. 271–276.
21. *Peteanu L.A. et al.* // *Proc. of Nat. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 11762–11766.
22. *Dartnall H.* // *Vision Res.* 1968. V. 8. P. 339–358.
23. *Kim J.E., Tauber M.J., Mathies R.A.* // *Biophys. J.* 2003. V. 84. P. 2491–2501.

24. *Kandori H. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 2669–2670.
25. *Spooner P. J. R. et al.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 343. P. 719–730.
26. *Röhrig U. F., Guidoni L., Rothlisberger U.* // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 10799–10809.
27. *Овчинников Ю. А. и др.* // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8, № 10. С. 1424–1427.
28. MOE (Molecular Operating Environment). <http://www.chemcomp.com>; used within 2002–2003, by license of CAL RIKEN.
29. *Berendsen H. J. C. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.
30. *Case D. A. et al.* AMBER 5. Univ. of California. 1997.
31. *Pearlman D. A. et al.* // Comp. Phys. Commun. 1995. V. 91. P. 1–41.
32. *Ponder J. W., Case D. A.* // Adv. Prot. Chem. 2003. V. 66. P. 27–85.
33. *Narumi T. et al.* // Mol. Simulation. 1999. V. 21. P. 401–408.
34. *Narumi T. et al.* // Proc. of the 5th Intern. Conf. on Signal Processing. Beijing, 2000. P. 575–582.
35. *Cornell W. D. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 5179–5197.
36. *Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926–935.
37. *Ryckaert J. P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C.* // J. Comp. Phys. 1997. V. 23. P. 327–341.
38. *Холмуродов Х. Т. и др.* // ЭЧАЯ. 2003. Т. 34, вып. 2. С. 474–515.
39. *Kholmurodov K., Ebisuzaki T.* // ICMS-CSW2004. Tsukuba, 2004. V. C4. P. 9–11.
40. *Sayle R. A., Milner-White E. J.* // Trends in Biochem. Sci. 1995. V. 20. P. 374–376.
41. *Koradi R., Billeter M., Wüthrich K.* // J. Mol. Graphics. 1996. V. 4. P. 51–55.
42. *Han M., Smith S. O.* // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 1425–1432.
43. *Verdegem P. J. et al.* // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 11316–11324.
44. *Lin S. W. et al.* // J. Phys. Chem. 1998. V. 102. P. 2787–2806.
45. *Grobner G. et al.* // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 201–204.
46. *Yamada A. et al.* // Photochem. Photobiol. 2004. V. 79. P. 476–486.
47. *Janz J. M., Farrens D. L.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 55886–55894.
48. *Creemers A. F. et al.* // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 9101–9106.
49. *Jager S.* // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 11804–11810.
50. *Nakanishi K. et al.* // Biophys. Chem. 1995. V. 56. P. 13–22.
51. *Beck M., Sakmar T. P., Siebert F.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 7630–7639.
52. *Fahmy K. et al.* // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 10206–10210.

248 *Фельдман Т. Б., Холмуродов Х. Т., Островский М. А.*

53. *Patel A. B. et al. // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101, No. 27. P. 10048–10053.*
54. *Nathans J. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 937–942.*
55. *Sakmar T. P., Franke R. R., Khorana H. G. // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 8309–8313.*
56. *Zhukovsky E. A., Oprian D. D. // Science. 1989. V. 246. P. 928–930.*
57. *Robinson P. R. et al. // Neuron. 1992. V. 9. P. 719–725.*
58. *Rao V. R., Oprian D. D. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1996. V. 25. P. 287–314.*
59. *Sakmar T. P. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1998. V. 59. P. 1–34.*
60. *Yan E. C. Y. et al. // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 3620–3627.*
61. *Terakita A., Yamashita T., Shichida Y. // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 14263–14267.*
62. *Terakita A. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 284–289.*
63. *Ota T. et al. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 2845–2851.*
64. *Jager F. et al. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 10878–10882.*
65. *Kuwata O. et al. // Biochemistry. 2001. V. 66. P. 1588–1608 (in Russian).*
66. *Холмуродов Х. Т., Фельдман Т. Б., Островский М. А. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2005. Т. 91. С. 1377–1397.*
67. *Cha K., Reeves P. J., Khorana H. G. // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 3016–3021.*
68. *Liu X., Garriga P., Khorana H. G. // Proc. of Nat. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4554–4559.*
69. *Janz J. M., Fay J. F., Farrens D. L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 16982–16991.*

Получено 29 января 2007 г.