

P19-2008-117

Т. Б. Фельдман<sup>1,2</sup>, Х. Т. Холмуродов<sup>1</sup>, М. А. Островский<sup>1,2</sup>,  
М. Г. Хренова<sup>3</sup>, А. В. Немухин<sup>2,3</sup>

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ  
ХРОМОФОРНОЙ ГРУППЫ, 11-ЦИС-РЕТИНАЛЯ,  
В РОДОПСИНЕ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО  
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Направлено в журнал «Биофизика»

---

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва

<sup>3</sup>Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Фельдман Т. Б. и др.

P19-2008-117

Изучение конформационного состояния хромофорной группы, 11-*cis*-ретинала, в родопсине методами компьютерного молекулярного моделирования

Методом компьютерного моделирования проведено сравнительное исследование молекулярной динамики родопсина, содержащего хромофорную группу (11-*cis*-ретинал), и свободного опсина. Молекулярная динамика прослежена во временном интервале 3 нс; при этом проанализировано  $3 \cdot 10^6$  дискретных конформационных состояний родопсина и опсина. Продемонстрировано, что присутствие фотопоглощающей группы в хромофорном кармане опсина оказывает существенное влияние на ближайшее белковое окружение 11-*cis*-ретинала как в области  $\beta$ -иононового кольца, так и в отдаленных областях родопсина (цитоплазматической и внутридискровом пространстве). 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.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2008

Feldman T. B. et al.

P19-2008-117

Studies on Conformational States of the Chromophore Group, 11-*cis*-Retinal, in Rhodopsin by Computer Molecular Simulation Methods

Based on computer simulation methods a comparative study of molecular dynamics of rhodopsin, which contains a chromophore (11-*cis*-retinal) group, and a free opsin has been performed. Molecular dynamics has been traced up within 3 ns time interval; thereby  $3 \cdot 10^6$  discrete conformational states of rhodopsin and opsin were compared and analyzed. It is demonstrated that the presence of a light absorbing group (11-*cis*-retinal) in opsin's chromophore pocket has a considerable influence on the protein neighborhood, surrounding of 11-*cis*-retinal from beta-ionone ring region, as well as on the distant (cytoplasmic and extracellular) regions. From the simulation results we discuss the molecular mechanism that assumes rhodopsin as a G-protein coupled receptor in the inactivated state functioning as an efficient ligand antagonist.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2008

## ВВЕДЕНИЕ

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.

Наиболее хорошо изученным является механизм фототрансдукции, запускаемый G-белок-связывающим рецептором — родопсином — в наружном сегменте зрительной клетки при поглощении им кванта света [2, 3]. Ключевым событием в механизме фототрансдукции (преобразование, передача и многократное усиление первичного светового сигнала) является взаимодействие активированного светом родопсина с G-белком. Во всех других случаях, кроме фоторецепции, первой стадией каскада является связывание специфического лиганда, например, пахучей 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 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*-ретиная как лиганда-антагониста исключительно важна для обеспечения ее максимально низкого темнового теплового шума. Следствием же фотоизомеризации лиганда (11-*цис*-ретиная) 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 (трансдукции).

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 как составная часть 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 Å [7], а затем и с разрешением в 2,2 Å [8, 9] определить его трехмерную структуру. Однако следует отметить, что в результате кристаллизации молекулы родопсина происходят некоторые нарушения в электростатических взаимодействиях 11-*цис*-ретинала 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*-ретинала в хромофорном участке [10, 11], а сама трехмерная организация молекулы родопсина в ее темновом кристаллическом состоянии представляет собой статическую картину. Метод моделирования 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 внутридискового.

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 связи с этим особый интерес представляет моделирование молекулярной динамики хромофора 11-*цис*-ретинала 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*-ретинала 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, т. е. молекулярных механизмов цветоразличения, так и для объяснения их уникальных фотохимических свойств. Что касается последнего, 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 понятными.

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, является конформационная перестройка в спиральных «тяжах» III и VI. В другой работе [17] были, например, подтверждены теоретические расчеты и экспериментальные результаты, согласно которым  $\beta$ -иононовое кольцо в 11-*цис*-ретинале как хромофорной группе скручено, т.е. 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 (PDB-файл «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 недостающие фрагменты аминокислотных последовательностей 236–240 и 331–333 и встроены в исходную молекулу (PDB-файл «1HZX», цепь A) с помощью программного пакета MOE для компьютерного моделирования биомолекул [28].

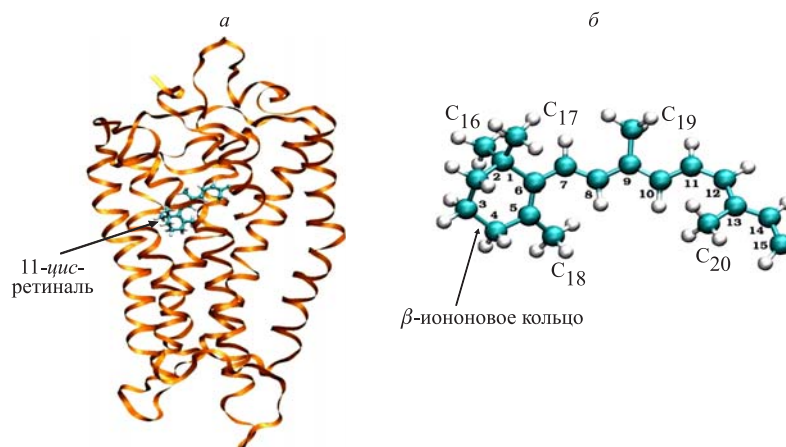


Рис. 1. *a*) Компьютерная модель молекулы родопсина (PDB-файл «1HZX», Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001). 11-*цис*-ретинол изображен в виде структурной формулы (вид сбоку). *б*) Молекула 11-*цис*-ретинола с нумерацией всех атомов углерода. C<sub>16</sub>–C<sub>20</sub> — метильные группы

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

Температура системы поддерживалась постоянной (300 К) 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 3000 пс.

Моделирование родопсина было проведено в водном растворе с использованием программного пакета AMBER5.0 (Parm 94) [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.

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:

$U(\mathbf{R}) = \sum K_r (r - r_{eq})^2$  — потенциал внутримолекулярных (валентных) связей;

$+\Sigma K_{\theta} (\theta - \theta_{\text{eq}})^2$  — потенциал угловых связей (вращений);  
 $+\Sigma K_{\phi}/2 (1 + \cos [n\phi - \gamma])$  — потенциал дигедральных (торсионных) вращений;  
 $+\Sigma [A_{ij}/R_{ij}^{12} - B_{ij}/R_{ij}^6]$  — потенциал невалентных (вандерваальсовых) взаимодействий;  
 $+\Sigma q_i q_j / e R_{ij}$  — электростатический потенциал.

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  $t = 3000$  пс.

Аналогичные процедуры были проведены и для молекулы родопсина без хромофора. Была использована та же самая модель димера родопсина (PDB-файл «1HZX», цепь A) [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 внутридисковых 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 следующие расчеты:

- среднеквадратичных отклонений от исходной конфигурации молекулы в начальный момент моделирования ( $t = 0$ ) родопсина для любого временного интервала вплоть до 3000 пс 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  $t$ . Здесь  $\mathbf{r}_1$  и  $\mathbf{r}_2$  — соответственно векторы пространственных положений атомов  $i$  и  $j$  в данный момент времени  $t$  (в интервале времени от  $t = 0$  до  $t = 3000$  пс);

- 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  $\mathbf{D}_3 \mathbf{D}_4$ , вычислялось по формуле

$$\cos A = \frac{\mathbf{d}_{12}\mathbf{d}_{34}}{|\mathbf{d}_{12}||\mathbf{d}_{34}|},$$

где

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

$$|\mathbf{d}_{34}| = \sqrt{(x_4-x_3)^2+(y_4-y_3)^2+(z_4-z_3)^2},$$

т. е.

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

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*-ретиная в темновом родопсине имеет непланарную, искаженную, скрученную конформацию [17, 18]. Этим его конформационное состояние отличается от протонированного шиффова основания

ретиная в растворе [10]. Роль белкового окружения в формировании такой конфигурации 11-*цис*-ретиная в родопсине не вызывает сомнения. Однако молекулярные механизмы, «заставляющие» хромофор принять такую энергетически «невыгодную» для раствора или газовой фазы конфигурацию, до сих пор остаются неясными. Результаты моделирования молекулярной динамики родопсина в темновом состоянии позволили построить модель адаптации 11-*цис*-ретиная 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 3000 пс моделирования нами описана модель темновой «адаптации» ретиная при встраивании его в опсин. Модель позволяет объяснить нахождение 11-*цис*-ретиная в такой конфигурации, которая делает его стабильным и готовым к сверхбыстрой и эффективной фотоизомеризации.

**Молекулярная динамика хромофорной группы — 11-*цис*-ретиная.** Результаты моделирования показали, что  $\beta$ -иононовое кольцо 11-*цис*-ретиная 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 3000 пс времени моделирования легко заметить, что происходит явное изменение пространственной конфигурации 11-*цис*-ретиная. В течение короткого промежутка времени, примерно через 300–400 пс после начала моделирования, происходит, согласно нашим наблюдениям, поворот  $\beta$ -иононового кольца вокруг связи  $C_6-C_7$  примерно на  $60^\circ$  относительно начальной конфигурации 11-*цис*-ретиная (PDB-файл «1HZX», цепь А [7, 18]) (рис. 2). Это согласуется с теоретическими и экспериментальными данными [15, 17], где указывается, что  $\beta$ -иононовое кольцо в темновом необлученном родопсине повернуто примерно на  $50-65^\circ$  относительно плоскости планарной структуры свободного 11-*цис*-ретиная, что создает его напряженную скрученную конформацию. Из анализа кристаллической структуры родопсина, а также анимационных картин молекулярной динамики на начальном этапе моделирования отчетливо видно, что плоскость  $\beta$ -иононового кольца 11-*цис*-ретиная расположена практически перпендикулярно плоскости мембраны, а вся структура хромофора близка к планарной. Результаты моделирования показывают, что после поворота  $\beta$ -иононового кольца его плоскость становится практически параллельной плоскости мембраны.

Можно предположить, что окружающие хромофор аминокислотные остатки «помогают» 11-*цис*-ретиною 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.

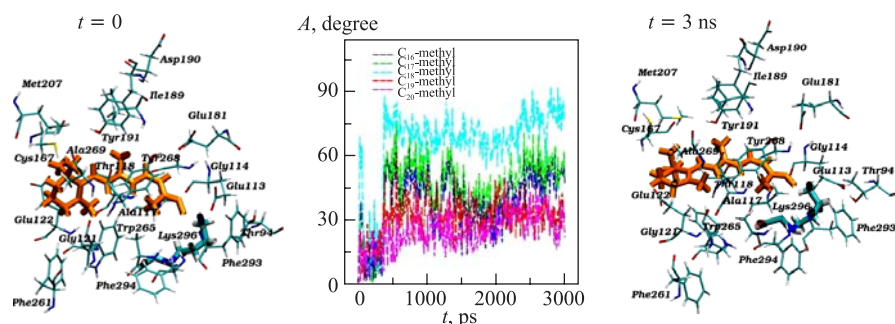


Рис. 2. Молекулярная динамика 11-*цис*-ретиная в хромофорном центре молекулы родопсина (конформационное состояние хромофора в начальный момент времени ( $t = 0$ ) и через 3000 пс ( $t = 3$  нс)). В центре представлена диаграмма торсионных углов поворотов пяти метильных групп ( $C_{16} - C_{20}$ ) 11-*цис*-ретиная в течение 3000 пс молекулярной динамики родопсина

Имеются также данные о том, что центральная область полиеновой цепи ретиная  $C_{10} - C_{13}$  также имеет скрученную напряженную конфигурацию [43, 44]. Чтобы оценить степень «скрученности» различных участков ретиная, нами были вычислены торсионные углы поворотов метильных групп  $C_{16}$ ,  $C_{17}$  и  $C_{18}$  относительно их положения в начальный момент моделирования для оценки поворота плоскости  $\beta$ -ионового кольца, а также вычислены торсионные углы поворотов  $C_{19}$  и  $C_{20}$  для определения конформационных изменений в центральной части полиеновой цепи. На рис. 2 представлены диаграммы, отражающие углы поворотов пяти вышеуказанных метильных групп. Отчетливо 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 метильной группы  $C_{18}$  —  $75^\circ$ , для  $C_{16}$  и  $C_{17}$  —  $60^\circ$ , для  $C_{19}$  —  $40^\circ$  и для  $C_{20}$  —  $30^\circ$ . Несмотря на то, что крутильные флуктуации этих групп имеют довольно большую амплитуду (в среднем около  $20^\circ$ ), тем не менее отчетливо видно, что, чем дальше метильная группа удалена от  $\beta$ -ионового кольца, тем меньше ее отклонение от начального состояния. Исходя из этого можно предположить, что причиной скрученной искаженной конформации 11-*цис*-ретиная в темновом состоянии родопсина является поворот  $\beta$ -ионового кольца, влекущий за собой «скручивание» и полиеновой цепи ретиная.

Следует также отметить, что угол поворота метильной группы  $C_{18}$  самый большой. При этом крутильные осцилляции этой группы в начальный момент

после встраивания хромофора в белок имеют ббольшую амплитуду по сравнению с остальными. Можно, следовательно, говорить о доминирующей роли этой группы как «рычага» в процессах «скручивания» 11-*цис*-ретиная.

В работе [12] для всех тяжелых атомов ретиная были рассчитаны возможные пространственные координаты, в пределах которых все атомы хромофора могут производить колебательные движения. Показано, что C<sub>18</sub> действительно может иметь наибольшую динамику флуктуаций среди пяти наиболее подвижных метильных групп, в числе которых C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub> и C<sub>20</sub> (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 метильных групп C<sub>19</sub> и C<sub>20</sub> хорошо согласуются с экспериментальными данными ЯМР-спектроскопии [45], где углы отклонения векторов C<sub>9</sub>–C<sub>19</sub> и C<sub>13</sub>–C<sub>20</sub> от оси, перпендикулярной фоторецепторной мембране, составляют приблизительно 42 и 30° соответственно.

Таким образом, результаты моделирования динамики хромофора хорошо коррелируют как с экспериментальными [7, 9, 16–18, 42], так и с теоретическими [12, 15, 46] данными. 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*-ретиная, а именно ее центральной части C<sub>10</sub>–C<sub>13</sub>. 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*-ретиная в процессе его темновой «адаптации» в хромофорном центре, имеют одну «отправную точку». Речь идет о метильной группе C<sub>18</sub>. Ее максимальные, по сравнению с остальными метильными группами, крутильные флуктуации, вероятно, влекут за собой «скручивание» всей полиеновой цепи 11-*цис*-ретиная.

Нами были проведены также расчеты среднеквадратичных отклонений N-VI α-спирали для родопсина и свободного опсина. Результаты этих расчетов показали, что присутствие 11-*цис*-ретиная в белке сильно меняет динамику поведения этой спирали, а именно, инициирует ее конформационные изменения.

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.

**Оценки сдвига полосы поглощения  $S_0-S_1$  хромофора при конформационных превращениях родопсина.** Поскольку оптическая спектроскопия представляет собой важнейший метод экспериментального исследования активации родопсина, мы оценили сдвиг в положении максимума полосы поглощения, отвечающего электронному переходу  $S_0-S_1$  между основным и первым возбужденным синглетными состояниями хромофорной группы, возникающий вследствие изученных конформационных превращений родопсина. Мы сравнивали конформационные состояния хромофора в белке в начальный момент времени ( $t = 0$ ) и через 3 нс ( $t = 3$  нс), проанализированные выше методом молекулярной динамики. Основное внимание было уделено характерному изменению структуры, связанному с наблюдаемым поворотом плоскости  $\beta$ -иононового кольца.

Точный расчет положения оптической полосы поглощения 11-*цис*-ретиналя в виде протонированного основания Шиффа в темной форме родопсина был проведен ранее комбинированным методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) [47]. Согласие рассчитанного (511 нм) и экспериментального (500 нм) значений для максимума полосы поглощения уникально для теоретических работ по моделированию спектров биологических хромофоров в конденсированных средах, однако для достижения подобной точности необходимы крайне ресурсоемкие затраты. В данной работе был применен прием, основанный на сравнительном анализе структур и спектров.

Во-первых, мы оценили энергии вертикальных переходов  $S_0-S_1$  для трех модельных систем: а) для квантовой подсистемы, геометрия которой была оптимизирована в работе [47] методом КМ/ММ (значение двугранного угла  $C_5 = C_6-C_7 = C_8$ , определяющего плоскость  $\beta$ -иононового кольца, равно  $-52^\circ$ ); б) для такой же квантовой подсистемы, но с измененным значением двугранного угла  $C_5 = C_6-C_7 = C_8$  (равным  $-20^\circ$ , как в конформации  $t = 0$ ); в) для квантовой подсистемы с углом  $C_5 = C_6-C_7 = C_8$ , равным  $+11^\circ$ , как в конформации  $t = 3$  нс. В модельную квантовую подсистему (всего 89 атомов) помимо молекулы хромофора были включены боковые цепи аминокислотных остатков белка Glu113, Glu181, Ser186, пептидная связь, образованная Ala292 и Phe293 (а именно атомы C, O, N), и три молекулы воды, участвующие в образовании стабилизирующих водородных связей и в экранировании заряда на основании Шиффа (рис. 3). Расчеты были проведены неэмпирическим методом конфигурационного взаимодействия с учетом однократных возбуждений (КВ1) с использованием базиса cc-pVDZ по программе PC GAMESS [48]. Результаты привели к следующим значениям энергий возбуждения: 4,12 эВ для системы а); 3,95 эВ для системы б); 3,91 эВ для системы в).

Во-вторых, мы экстраполировали полученные величины энергий возбуждения в интересующих нас конформациях  $t = 0$  и  $t = 3$  нс в расчете на

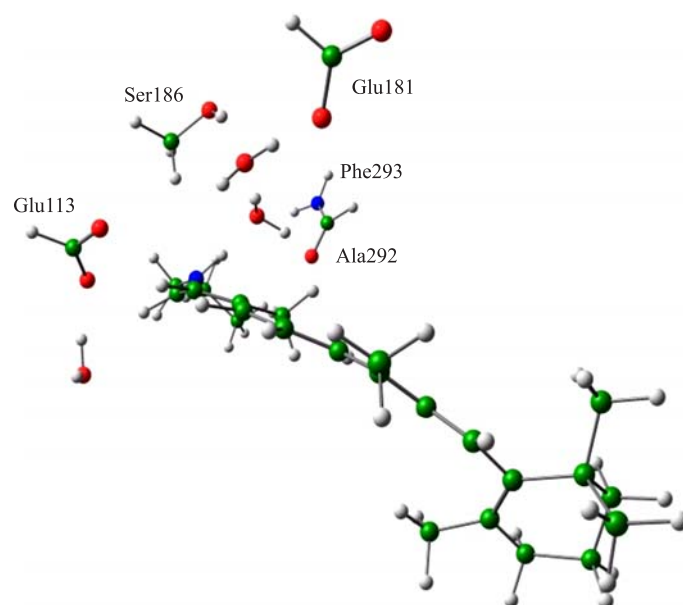


Рис. 3. Модельная система для квантовых расчетов энергий электронного возбуждения: включены молекулярные группы хромофора, боковых цепей аминокислотных остатков Glu113, Glu181, Ser186, пептидная связь, образованная аминокислотными остатками Phe293 и Ala292, и три молекулы воды

квантовые оценки более высокого уровня теории, чем использованный здесь метод КВ1. Опорной системой в данном случае являлась модельная система а), для которой известно [47] точное значение энергии возбуждения 2,43 эВ (или 511 нм).

Таким образом, мы оценили положения максимумов полос поглощения в конформационных состояниях  $t = 0$  и  $t = 3$  нс как 549 и 559 нм соответственно. Следовательно, изученные методом молекулярной динамики в 3-наносекундном интервале конформационные изменения в структуре родопсина должны сопровождаться сдвигом на 10 нм в оптическом спектре поглощения белка.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что в нашей модели родопсин, будучи мембранным белком, расположен 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 [49], что хорошо коррелирует с данными рентгеноструктурного анализа [7, 18]. Это также находится в соответствии с известными представлениями о важной роли внутридискового домена молекулы как ее стабилизатора в фоторецепторной мембране [50–52].

Известно также, что в темновом состоянии зрительного пигмента хромофор как лиганд-антагонист стабилизирует динамику H-VI  $\alpha$ -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 Trp268 и Leu266.

При рассмотрении молекулярной динамики самого хромофора (11-*цис*-ретиная) в течение 3000 пс моделирования нами показано, что происходит поворот  $\beta$ -иононового кольца вокруг связи C<sub>6</sub>–C<sub>7</sub> примерно на 60° относительно начальной конфигурации 11-*цис*-ретиная (PDB-файл «1HZX», цепь A [7, 18]). Это коррелирует с теоретическими и экспериментальными данными, согласно которым  $\beta$ -иононовое кольцо в темновом необлученном состоянии родопсина повернуто примерно на 50–65° относительно плоскости планарной структуры свободного 11-*цис*-ретиная [15, 17].

Результаты наших расчетов торсионных углов поворотов метильных групп C<sub>19</sub> и C<sub>20</sub> полиеновой цепи 11-*цис*-ретиная (40 и 30° соответственно) хорошо согласуются с экспериментальными данными ЯМР-спектроскопии, где углы отклонения векторов C<sub>9</sub>–C<sub>19</sub> и C<sub>13</sub>–C<sub>20</sub> от оси, перпендикулярной фоторецепторной мембране, составляют приблизительно 42 и 30° 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*-ретиналя. Другим примером, где 11-*цис*-ретиналь выступает в роли лиганда-антагониста, является стабилизация N-VI  $\alpha$ -спирали за счет сильных электростатических взаимодействий 11-*цис*-ретиналя с Trp265 [7, 16]. Считается, что  $\beta$ -иононое кольцо хромофора блокирует движение Trp265, стабилизируя всю N-VI  $\alpha$ -спираль и не давая темновому родопсину переходить в активное состояние. На примере нашей модели отчетливо видно, что помимо Trp265 в этом процессе предотвращения спонтанной активации родопсина в темноте участвуют еще и Trp268 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  $\alpha$ -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 трудно, 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 компьютерных технических средств 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 предоставленное компьютерное время для работы на суперкомпьютере и компьютере специального назначения MDGRAPE-2 для проведения расчетов молекулярной динамики белковых молекул. Авторы благодарны директору лаборатории профессору Toshikazu Ebisuzaki за поддержку программных лицензионных продуктов и компьютеров MDGRAPE-2 с общей производительностью 25 Терафлопс.



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), РФФИ, гранты № 05-04-49945, № 07-03-00059, программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Физиологические механизмы регуляции внутренней среды и организации поведения живых систем».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Mirzadegan T. et al.* // *Biochem.* 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.* // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 15259–66.
11. *Singh D. et al.* // *Biochem.* 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.* // *Biochem.* 1996. V. 35. P. 6257–6262.
14. *Liu R. S. H., Colmenares L. U.* // *Proc. Natl. 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.* // *Biochem.* 2004. V. 43. P. 12819–12828.
18. *Teller D. C. et al.* // *Biochem.* 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. Natl. 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.* // Biochem. 2002. V. 41. P. 10799–10809.
27. *Овчинников Ю. А. и др.* // Биоорган. химия. 1982. Т. 8, № 10. С. 1424–1427.
28. MOE. 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. University 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.* // Molecular Simulation. 1999. V. 21. P. 401–408.
34. *Narumi T. et al.* // Proc. 5th Int. 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. Comput. 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.* // Biochem. 1995. V. 34. P. 1425–1432.
43. *Verdegem P. J. et al.* // Biochem. 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. *Bravaya K. B. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2007, V. 129. P. 13035–13042.
48. *Granovsky A. A.* URL <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>
49. *Холмуродов Х. Т., Фельдман Т. Б., Островский М. А.* // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2005. Т. 91. С. 1377–1397.
50. *Cha K., Reeves P. J., Khorana H. G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 3016–3021.
51. *Liu X., Garriga P., Khorana H. G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4554–4559.
52. *Janz J. M., Fay J. F., Farrens D. L.* // J. Biological Chem. 2003. V. 278. P. 16982–16991.

Получено 11 августа 2008 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 02.10.2008.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,25. Уч.-изд. л. 1,57. Тираж 220 экз. Заказ № 56332.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)