КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ РЕТИНАЛЯ В ФОТОРЕЦЕПТОРНОМ БЕЛКЕ РОДОПСИНЕ

Бравая К.Б., Боченкова А.В., Немухин А.В.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, г.Москва

В работе исследованы факторы, влияющие на положение полосы максимума поглощения молекулы ретиналя - хромофорной группы зрительных пигментов, при переходе от раствора к белковому окружению. Полная оптимизация геометрических параметров молекулы ретиналя в фоторецепторном белке родопсине (~5,5 тысяч атомов) проводилась в рамках метода КМ/ММ. Установлено, что определяющим фактором влияния белкового окружения является изменение конформации хромофорной группы, приводящее к кардинальному изменению характера S0-S1 перехода.

В последнее время в связи с развитием вычислительной техники появилась возможность расчета больших биомолекулярных систем. Наиболее интересным представляется исследование различных ферментативных реакций, в частности, реакций ферментативного катализа. Примером таких реакций является фотоизомеризация молекулы ретиналя, которая в растворе является пикосекундной [1,2], в то время как в белке родопсине - фемтосекундной [3]. Большинство процессов зрительной рецепции основано на фотоизомеризации различных форм ретиналя при поглощении света в видимом диапазоне. Молекула ретиналя является сопряженной полиеновой цепочкой, содержащей шесть двойных связей. Ретиналь в 11-цис конфигурации в форме протонированного основания Шиффа является хромофором в фоторецепторном белке родопсине. Родопсин расположен в мембране палочек сетчатки глаза – фоторецепторных клеток, отвечающих за сумеречное зрение при низкой освещенности.

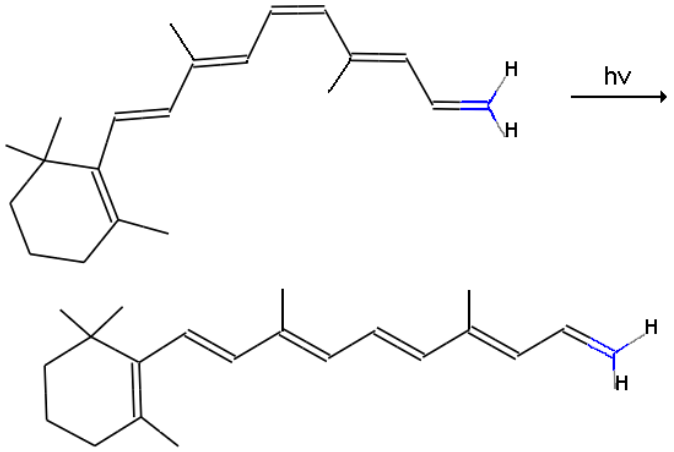

Рис.1.Схема фотоизомеризации ретиналя в форме протонированного основания Шиффа из 11-цис- в полностью транс-форму

Основание Шиффа ретиналя в протонированной форме образуется при взаимодействии молекулы 11-цис-ретиналя с аминокислотным остатком Lys296 полипептидной цепи родопсина. Полученный катион стабилизируется отрицательно заряженной карбоксильной группой аминокислотного остатка Glu113. Следует отметить, что в родопсине молекула протонированного основания Шиффа ретиналя имеет не плоскую, характерную для раствора, а скрученную спиралевидную конформацию.

При поглощении кванта света родопсином происходит возбуждение молекулы хромофора из основного (S_0) в первое возбужденное синглетное состояние (S_1), которое приводит к фотоизомеризации протонированного основания Шиффа ретиналя из 11-цис- в полностью транс-изомер (рис.1). Данная стадия является первой из каскада реакций фотоцикла родопсина, который в конечном итоге приводит к распаду родопсина на молекулу ретиналя и опсин через промежуточные интермедиаты: фоторородопсин, батородопсин, люминородопсин, метародопсин 1, метародопсин 2 [4].

Известно, что положению полосы максимума поглощения протонированного основания Шиффа ретиналя в растворе метанола соответствует длина волны λ=445 [4] нм, в то время как в родопсине - 498 нм [5]. Батохромный сдвиг в сторону увеличения длин волн в данном случае является следствием различного влияния окружения на молекулу ретиналя. Для исследования реакции фотоизомеризации ретиналя весьма важным является определение роли белкового окружения в родопсине, в том числе и влияние белкового окружения на положение полосы максимума поглощения ретиналя.

Мы выделяем следующие факторы, влияющие на положение полосы максимума поглощения ретиналя: влияние белкового окружения, проявляющееся в изменении конформации молекулы ретиналя относительно плоской структуры, а также возможное различное влияние стабилизирующего противоиона в растворе и в белке. Электростатические и поляризационные взаимодействия белкового окружения с молекулой ретиналя в основном и возбужденном состояниях в случае родопсина предполагаются незначительными, поэтому непосредственное исследование этого фактора остается за рамками данной работы.

Методы расчета и модельные системы.

Одними из современных быстроразвивающихся подходов теоретического моделирования свойств больших молекулярных систем являются комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), позволяющие явно учитывать взаимодействие реакционной системы с окружением. Основная идея этих методов заключена в комбинировании неэмпирических методов квантовой химии высокого уровня точности для моделирования электронной структуры центральной части системы с более экономичным описанием окружения в рамках классических подходов. Оптимизация геометрических параметров рассматриваемой системы, состоящей из молекулы ретиналя в основном электронном состоянии и мономерной субъединицы А фоторецепторного белка родопсина (~5,5 тысяч атомов), проводилась в рамках метода КМ/ММ в варианте модели «механического внедрения» с помощью разработанного эффективного алгоритма поиска стационарных точек на многомерных поверхностях потенциальной энергии. Квантовая подсистема состояла из молекулы ретиналя и стабилизирующего противоиона – карбоксильной группы аминокислотного остатка Glu113 (58 атомов). Все квантово-химические расчеты для системы в основном электронном состоянии проводились в приближении RHF/6-31G*, для классической подсистемы использовалась стандартная параметризация в рамках эмпирического молекулярно-механического силового поля AMBER. В качестве стартовой структуры для полной геометрической оптимизации молекулы ретиналя в белковом окружении (код структуры белка, полученной методом рентгеноструктурного анализа, в PDB банке - 1HZX) использовалась плоская модель, оптимизированная предварительно в отсутствии окружения. В рассмотрение включалась вся полиеновая цепочка ретиналя, а также β – иононовое кольцо.

В дальнейшем для исследования влияния различных факторов на положение полосы максимума поглощения ретиналя в найденных равновесных геометрических конфигурациях нами было выбрано три модельные системы протонированного основания Шиффа 11-цис-ретиналя, представленные на рис.2. Все три системы полностью включают полиеновую систему ретиналя, т.е. содержат шесть сопряженных двойных связей, однако не включают β

– иононовое кольцо. Суммарный заряд на молекуле протонированного основания Шиффа ретиналя везде принимался равным +1.

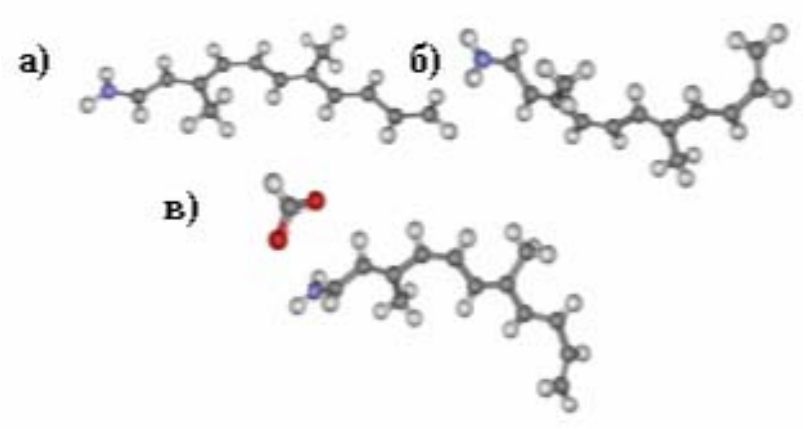

Рис. 2. Рассматриваемые модели молекулы ретиналя в форме протонированного основания Шиффа:

(а) плоская конформация, характерная для раствора;

(б) спиралевидная конформация в фоторецепторном белке родопсине; (в) спиралевидная конформация в фоторецепторном белке родопсине с учетом стабилизирующего противоиона карбоксильной группы аминокислотного остатка Glu113.

Для исследования влияния изменения конформации молекулы ретиналя использовались модели А и В. В случае В структура отвечает спиралевидной скрученной конформации, при этом нарушается сопряжение концевой N-C связи и C-C связи β-иононового кольца с общей π – системой.

Для исследования влияния противоиона на абсолютное положение максимума полосы поглощения в молекуле ретиналя была использована модель В2 (рис.2в). В данном случае к модели В был добавлен противоион в виде карбоксильной группы аминокислотного остатка Glu113 с зарядом –1.

Расчеты энергий $S_0 – S_1$ и $S_0 – S_2$ электронных переходов были выполнены в приближении CASSCF/6-31G*. В активное пространство было включено 12 орбиталей и 12 электронов. Учет энергии динамической электронной корреляции проводился в рамках метода MCQDPT/6-31G*.

Результаты

Влияние белкового окружения на конформацию молекулы ретиналя

При полной оптимизации геометрической конфигурации всей молекулы ретиналя, включающей β – иононовое кольцо, в изолированном состоянии была получена практически плоская геометрия ретиналя. При этом из плоскости сопряжения выходит двойная связь β – иононового кольца (рис. 3). При дальнейшей оптимизации полученной структуры с учетом белкового окружения при фиксированных координатах классической подсистемы была получена геометрия, хорошо согласующаяся с рентгеноструктурными данными (рис.4).

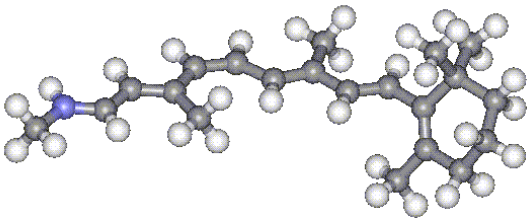

*Рис. 3 Конформация молекулы ретиналя в изолированном состоянии, полученная в рамках приближения RHF/6-31G**

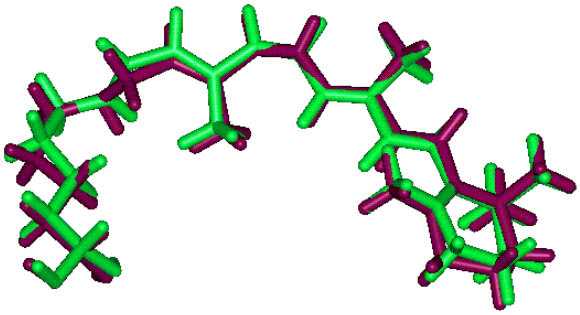

Рис. 4. Совмещение равновесной структуры молекулы ретиналя в родопсине (зеленая) с рентгеноструктурными данными (красная)

Влияние конформации молекулы ретиналя на положение полосы максимума поглощения

Для исследования влияния конформации молекулы ретиналя в форме протонированного основания Шиффа был проведен расчет энергии S_0 – S_1 перехода для моделей А (плоская конформация ретиналя) и В (скрученная конформация ретиналя). На рис. 5 представлены полученные в результате расчета для модели А натуральные МКССП орбитали, причем ведущие КФС для S_0 и S_1 состояний имеют заселенности на указанных орбиталях (2,0) и (1,1), соответственно. Видно, что в данном случае происходит электронный переход внутри одной π-подсистемы, делокализованной по всей системе сопряженных связей (ковалентный переход). В случае орбитали (2) электронная плотность немного смещена в сторону атома азота.

При анализе распределения заряда для модели А, оказалось, что в S_0 состоянии заряд более локализован, чем в S_1 состоянии.

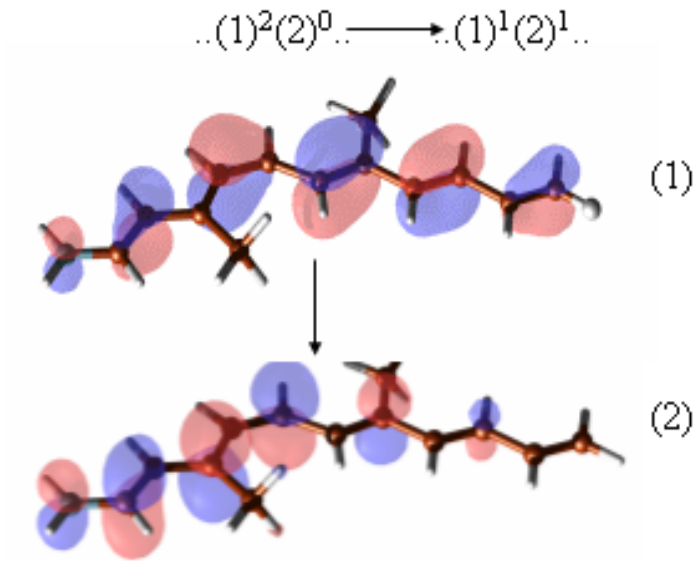

Рис. 5. Натуральные МКССП орбитали, характеризующие S_0 – S_1 переход для модели А

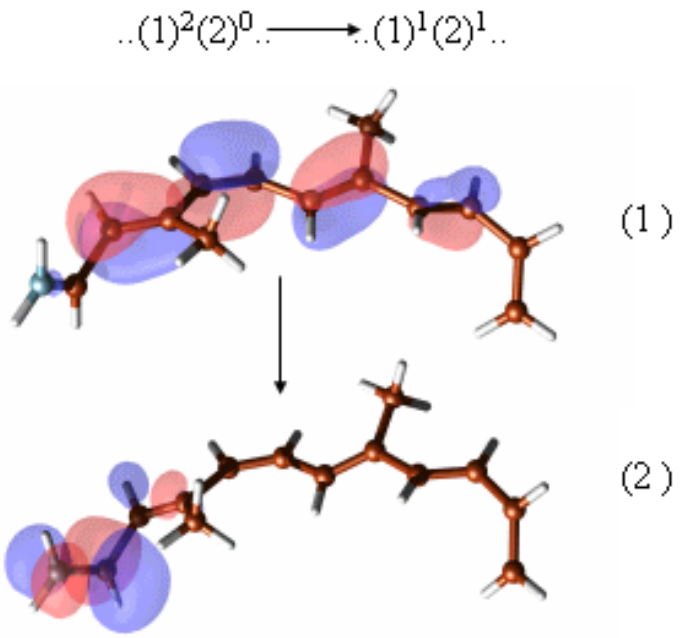

Рис.6. Натуральные МКССП орбитали, характеризующие S_0 – S_1 переход для модели B

Другая картина наблюдается в случае модели B, соответствующей скрученной конформации ретиналя. На рисунке 6 представлены МКССП натуральные орбитали, полученные для модели B, заселенность на которых для ведущих КФС в S_0 и S_1 состояниях равна (2,0) и (1,1), соответственно. В отличие от модели A, где наблюдался переход в рамках одной π-подсистемы, в данном случае переход происходит между двумя π-подсистемами, а именно с орбитали делокализованной по центральной π-подсистеме (1), на π^*-орбиталь связи N=C, выведенной из плоскости сопряжения (2).

При анализе распределения заряда, оказалось, что положительный заряд для S_0 состояния в значительной степени локализован. Для S_1 состояния наблюдается, соответственно, заметно большая делокализация заряда, чем для S_0.

Таким образом, изменение конформации протонированного основания Шиффа ретиналя приводит к изменению характера S_0 – S_1 перехода с ковалентного (в рамках одной π-подсистемы) в случае плоской геометрии на ионный (переход между двумя π-подсистемами) в случае скрученной геометрии ретиналя.

Учет только изменения конформации молекулы ретиналя приводит не только к качественному описанию причин сдвига, но и дает достаточно хорошее количественное описание сдвига полосы максимума поглощения протонированного основания Шиффа ретиналя. В табл. 1 представлены данные, полученные в результате расчета для моделей A и B.

Таблица 1. Рассчитанные значения энергии S0 – S1 перехода, нм

(МКССП с усреднением электронной плотности по двум состояниям)

	Модель A	Модель B	Сдвиг
Расчет	429	489	60
Эксперимент	445[1]	498[2]	53

[1]метанол; [2]родопсин

Таким образом, учет изменения геометрической конфигурации протонированного основания Шиффа ретиналя при переходе от раствора к белковому окружению приводит к

сдвигу полосы максимума поглощения ретиналя на 60 нм, что хорошо согласуется с экспериментальными данными. Следовательно, можно предположить, что изменение конформации молекулы ретиналя вносит определяющий вклад в смещение полосы максимума поглощения в сторону увеличения длин волн.

Учет влияния противоиона

В родопсине ретиналь в форме протонированного основания Шиффа стабилизируется отрицательно заряженной карбоксильной группой глутаминовой кислоты (Glu113). Присутствие противоиона может существенно влиять на положение энергетических уровней, а также может привести к изменению характера перехода.

Результаты, полученные при расчете S_0 – S_1 и S_0 – S_2 переходов в модели B2, приведены в табл. 2.

Таблица 2. Рассчитанные значения энергии S0 – S1 перехода в модели B и B2, нм (МКССП)

	S_0- S_1 переход[1]	S_0- S_2 переход [2]
Модель B	489 нм	312 нм
Модель B2 (с противоионом)	314 нм	262 нм

[1] *– расчет проводился с усреднением электронной плотности по состояниям S_0 и S_1;*

[2] *– расчет проводился с усреднением электронной плотности по S_0 и S_2 состояниям*

Видно, что добавление противоиона приводит к увеличению разницы энергий S_0 - S_1 перехода.

Подобное увеличение энергии возбуждения связано с различным влиянием противоиона на S_0 и S_1 состояния. В S_0 состоянии в отсутствии противоиона (модель B) положительный заряд в заметной степени локализован вблизи концевой связи N=C. (рис. 6). При добавлении противоиона, расположенного в непосредственной близости от атома азота, происходит стабилизация данного состояния. В то же время, для S_1 состояния ведущая КФС имеет заселенность 1 на π^*-орбитали, локализованной на связи N=C. Следовательно, добавление противоиона, расположенного на расстоянии ~3Å от атома азота, дестабилизирует S_1 состояние. Таким образом, разница энергий S_1 и S_0 увеличивается.

В результате расчетов было показано, что S_0 – S_1 переход, также как и в случае модели B имеет ионный характер, т.е. соответствует переходу между различными π - подсистемами.

Также был проведен расчет для более высоко лежащих энергетических синглетных уровней. Для модели B найдено, что S_2 состояние, также как и S_1, является ионным, т.е. соответствует переходу между различными π - подсистемами, в то время как для модели B2 состояние S_2 является ковалентным, т.е. соответствует переходу в рамках одной π-подсистемы. Данный результат также является следствием природы электронных состояний. Добавление противоиона, дестабилизирует состояния, соответствующие переходам на π^*-орбиталь, локализованную на связи N=C и стабилизирует состояния, соответствующие переходам в рамках одной π-системы, для которых характерна высокая локализация положительного заряда. Таким образом, добавление противоиона не приводит к изменению характера S_0 – S_1 и изменяет характер S_0 – S_2 перехода.

Выводы

В данной работе проведен анализ качественных причин сдвига положения максимума полосы поглощения молекулы ретиналя при переходе из раствора к белку. Было установлено, что определяющим фактором влияния белкового окружения, обладающего каталитическим действием, является изменение конформации хромофорной группы от плоской, характерной для раствора, к спиралевидной, что, в свою очередь, приводит к

кардинальному изменению характера S_0 – S_1 перехода. Предсказанный сдвиг максимума полосы поглощения хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Благодарности

Выражаем искреннюю признательность Грановскому А.А. и Ермилову А.Ю. за плодотворное обсуждение результатов.

Литература

1. *Kandori H., Sasabe H., Nakanishi K., Yoshizava T., Mizukami T., Shichida Y.//* J. Am. Chem. Soc. 1996. № 118. P. 1002 - 1005
2. *Kochendoerfer G. G., Mathies R. A.//* J. Phys. Chem. 1996. №. 100. P. 14526 - 14532
3. *Kandori H., Katsuta Y., Ito M., Sasabe H.//* J. Am. Chem. Soc. 1995. № 117. P. 2669 - 2670
4. *Кандори Х., Шичида И., Иошизава Т.//* Биохимия. 2001. № 66. С. 1483- 1498
5. *Freedman, K. A.; Becker, R. S.*// J. Am. Chem. Soc. 1986. № 108. P. 1245-1251
6. *Ferre N., Olivucci M.//* J. Am. Chem. Soc. 2003. № 125. P. 6868-6869