Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Teorinės fizikos katedra

Karolis Jasinevičius

PRADINIŲ BAKTERIORODOPSINO FOTOCIKLO BŪSENŲ RETINALIO MOLEKULĖS MODELIAVIMAS

Pagrindinių studijų baigiamasis darbas

Energetikos fizikos studijų programa

Studentas	Karolis Jasinevičius
Darbo vadovas	doc. dr. Mindaugas Mačernis
Recenzentas	dr. Kęstutis Aidas
Katedros vedėjas	prof. habil. dr. Leonas Valkūnas

Vilnius 2017

Turinys

Įvadas 3

1.Teorinis įvadas 5

1.1. Pagrindinės būsenos struktūra 5
1.2. Retinalio izomerizacijos procesas 6
1.3. K būsenos struktūra 7
1.4. L būsenos struktūra 9
1.5. Šifo bazės deprotonavimas 10
1.6. Tolimesni fotociklo etapai 11

2.Skaičiavimo teorija 13

2.1. Tankio funkcionalo teorija (DFT) 13
2.2. ONIOM metodas 14

3.Skaičiavimo metodika 15

4.Rezultatai 18

4.1. Retinalio struktūra BR ir L fotociklo būsenose 18
4.2. Retinalio energijos paviršiai 21
4.3. Sužadintos būsenos retinalio modeliavimas 27

Pagrindiniai rezultatai ir išvados 30

Literatūra 31

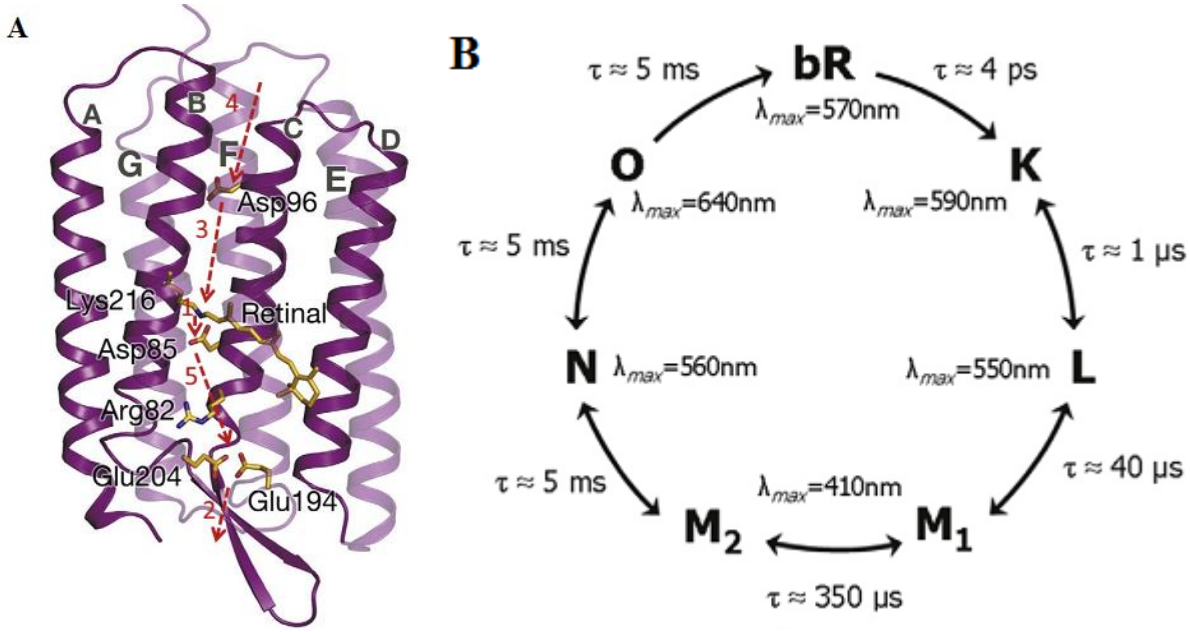
Summary 34

Santrauka 36

Įvadas

Modernių biotechnologinių įrenginių, tokių kaip spalvai jautrių jutiklių, dirbtinių tinklainės implantų, šviesos baterijų veikimas remiasi rodopsino baltymų optinėmis ir elektrinėmis savybėmis [1,2]. Fotoaktyvių rodopsinų veikimui tirti jau ilgą laiką yra naudojama modelinė sistema – bakteriorodopsino baltymas. Tai yra paprasčiausia iš visų žinomų šviesa varomų protonų pompų, kuri buvo aptikta prieš beveik keturis dešimtmečius *Halobacterium salinarum* bakterijų purpurinėse membranose [1].

Bakteriorodopsino baltymą sudaro septynios transmembraninės spiralės, žymimos raidėmis A-G, tarp kurių yra chromoforas – retinalio molekulė, kovalentiškai susijungusi su lizino (Lys216) grupe per protonuotą Šifo bazę (žr. 1A pav.). Chromoforo sužadinimas šviesa inicijuoja fotociklą, kuris apima kelias tarpines būsenas, žymimas raidėmis J, K, L, M, N ir O, po kurių bakteriorodopsinas grįžta į pradinę BR būseną (žr. 1B pav.) [3].



1 pav. A: Bakteriorodopsino struktūra. B: Bakteriorodopsino fotociklo schema [1]

Kadangi baltymo atliekama funkcija yra glaudžiai susijusi su jo struktūra, buvo atlikta daug tyrimų, siekiant išsiaiškinti bakteriorodopsino pagrindinės būsenos bei sekančių fotociklo tarpinių būsenų tikslias struktūras. Baltymų Duomenų Banke (PDB) šiuo metu yra 84 rentgeno spindulių difrakcijos, 6 elektronų difrakcijos ir 3 NMR bakteriorodopsino struktūros [1]. Šių struktūrų dėka, pagrindinės protono pernašos mechanizmo savybės yra gerai žinomos. Po fotono sugerties, kuri inicijuoja bakteriorodopsino fotociklą, chromoforas yra sužadinamas ir įvyksta jo izomerizacija ties

C_{13}=C_{14} dvigubu ryšiu, esančiu prie Šifo bazės [4]. Kituose fotociklo žingsniuose, protonuota Šifo bazė atiduoda savo protoną į išorinę membranos pusę, o vėliau ji vėl pasiima protoną iš citoplazminės pusės. Taigi, protonas yra iš esmės pumpuojamas iš ląstelės vidaus į išorę kiekvieno ciklo metu. Paskutiniame fotociklo žingsnyje chromoforas izomerizuojasi atgal į pradinę *all-trans* konfigūraciją [4].

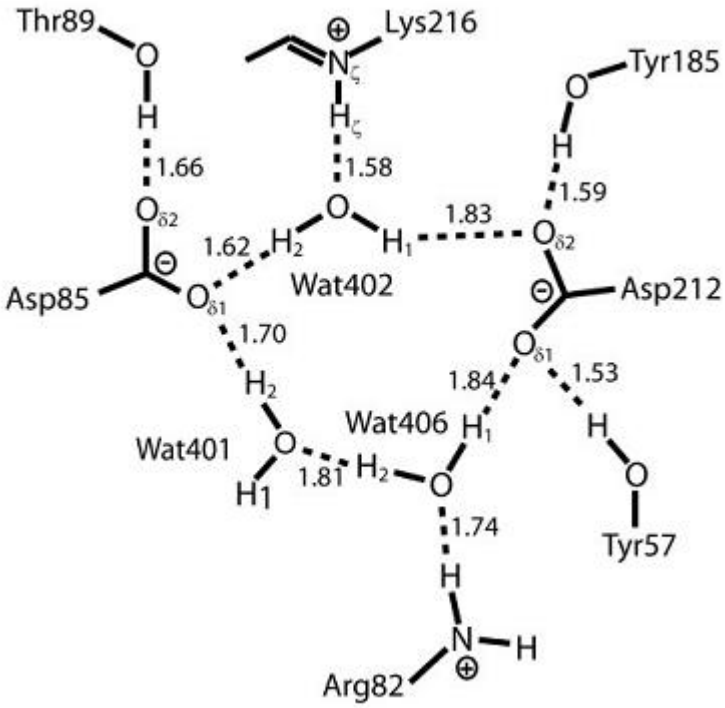
Tačiau nepaisant visų turimų žinių apie bakteriorodopsino struktūrą ir jo fotociklą, detalizuoti protono pernašos mechanizmą yra sudėtinga. Visų pirma, iš rentgeno kristalografijos duomenų turimos ankstyvųjų fotociklo būsenų struktūros turi reikšmingų skirtumų [5, 6]. Kadangi L→M fotociklo metu įvykstantis Šifo bazės deprotonavimas yra paprastai įvardijamas kaip esminis žingsnis protono pernašos procesui [6], teisingos retinalio ir baltymo aplinkos struktūros nustatymas prieš šį žingsnį yra ypač svarbus, nes nuo struktūros priklauso ir pradinis protono pernašos kelias. Kitas svarbus aspektas yra skaičiavimų tikslumas. Pavyzdžiui, šviesa sužadinto retinalio izomerizacijos modeliavimai yra atlikti naudojant *ab initio* aprašymą tik retinalio aktyviojo centro daliai, o tai gali įnešti tam tikrų netikslumų [7]. Tuo tarpu tokie kvantinės chemijos metodai, kaip tankio funkcionalo teorija (DFT), panaudojant superkompiuterių resursus, šiuo metu leidžia modeliuoti ir dideles molekulines struktūras, kaip retinalį bakteriorodopsino baltyme.

Šio darbo tikslas yra naudojantis DFT metodika sumodeliuoti retinalio molekulės pagrindinės ir sužadintos būsenų struktūras pradiniame bakteriorodopsino fotocikle, nustatyti baltymo aplinkos įtaką šioms struktūroms ir suskaičiuoti jų energijos paviršius. Pagrindiniai darbo uždaviniai: atlikti BR ir L būsenų retinalio struktūrų geometrijos optimizaciją ir nustatyti, kurių baltymo dalių įtaka yra didžiausia šių būsenų struktūrai. Suskaičiuoti optimizuotos geometrijos struktūrų pagrindinių ir sužadintų būsenų energijos paviršius ir iš jų minimumų nustatyti ir gauti stabilias struktūras. Atlikti sužadintosios būsenos BR retinalio struktūros geometrijos optimizaciją.

1.Teorinis įvadas

1.1. Pagrindinės būsenos struktūra

Pagrindinės būsenos (BR) bakteriorodopsino trimatės atominės struktūros detalus vaizdas yra nustatytas iš turimų 1.9 Å [8] ir 1.55 Å [9] skyros rentgeno kristalografijos duomenų. Baltymo aktyvusis centras yra sudarytas iš teigiamo krūvio Šifo bazės, neigiamo krūvio Asp85 ir Asp212 karboksilato anijonų bei tarp jų esančios stipriai surištos vandens molekulės (W402). Įvykus bakteriorodopsino fotoaktyvacijai, retinalio atomai, esantys aktyviojo centro aplinkoje, patiria gana reikšmingus perstatymus, tuo tarpu didžioji dalis polieninės grandinės ir β-jonono žiedas, esantys toliau nuo aktyviojo centro, yra mažiau mobilūs ir lieka savo vietose. Pagrindinėje būsenoje šie atomai yra laikomi aplink esančių 12-os struktūrinių grupių, įskaitant Trp182, esančio arti retinalio *13-methyl* grupės citoplazminėje pusėje [10].



2 pav. BR būsenos vandenilinių ryšių tinklo topologija prie aktyviojo centro. Brūkšniuotos linijos žymi galimus vandenilinius ryšius. Atstumai nurodyti angstremais (Å).[11]

Didelės skyros struktūriniai duomenys taip pat rodo, jog išorinės membranos pusės regione esančios septynios vandens molekulės, kartu su Asp85, Asp212, Thr89, Trp86, Tyr83, Tyr57, Tyr185, Arg82, Glu194, Glu204 ir Ser193 struktūrinėmis grupėmis suformuoja trimatį vandenilinių ryšių tinklą,

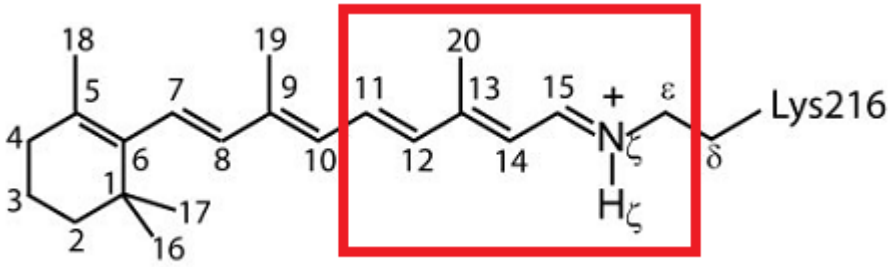
kuris siekia nuo Šifo bazės iki paviršiaus [5]. Šio vandenilinių ryšių tinklo dalis, esanti netoli aktyviojo centro, yra parodyta 2 pav. Šifo bazės N-H krūvio dipolis, nukreiptas į išorinę membranos pusę, sudaro vandenilinį ryšį su vandens molekule W402 [10]. Ši molekulė, savo ruožtu, sudaro vandenilinius ryšius su Asp85 grupės $O_{\delta 1}$ atomu, kuris bus protonuojamas perėjimo iš L į M būseną metu, ir su Asp212 $O_{\delta 2}$ atomu, kuris, kaip manoma, išlieka jonizuotas viso fotociklo metu (su galima išimtimi O→BR perėjimo metu). BR būsenoje W402 sukuria polinę aplinką teigiamo krūvio Šifo bazei ir neigiamo krūvio karboksilato deguonies atomams Asp85 ir Asp212 grupėse ir stabilizuoja šių dalių joninę būseną. $O_{\delta 1}$ atomas iš Asp85 taip pat sudaro vandenilinį ryšį su W401 vandens molekule, kuri yra sujungta su Arg82 grupės NH per W406 vandens molekulę (kuri taip pat sudaro vandenilinį ryšį su $O_{\delta 1}$ iš Asp212). Kita vandenilinių ryšių grandinė jungia Asp212 $O_{\delta 1}$ su Arg82 NH per Tyr57 grupės OH ir W407 vandens molekulę (neparodyta 2 pav.). Pagrindinėje bakteriorodopsino būsenoje Asp85 ir Asp212 karboksilato anijonai taip pat yra papildomai stabilizuojami sudarydami vandenilinius ryšius per jų $O_{\delta 2}$ atomus su atitinkamai Thr89 ir Tyr185 struktūrinėmis grupėmis [10].

1.2. Retinalio izomerizacijos procesas

Retinalio izomerizacijos proceso efektyvumas, ryšių selektyvumas ir dinamika stipriai priklauso nuo jo aplinkos, tačiau konkreti baltymo aplinkos rolė buvo vienas iš ilgai neatsakytų klausimų [7]. Kadangi retinalio chromoforas turi polieninę grandinę, yra net keletas dvigubų ryšių ties kuriais galėtų įvykti izomerizacija [7]. Homogeniškoje tirpalo aplinkoje *all-trans* retinalio izomerizacijos produktai yra *9-cis, 11-cis* ir *13-cis* konformerai su atitinkamai 0,02, 0,14 ir 0,01 kvantinėmis išeigomis [12]. Tačiau bakteriorodopsine retinalio izomerizacijos išeiga yra daug didesnė (apie 0,6). Be to, šiuo atveju izomerizacija yra selektyvi – jos produktas yra *13-cis* konformeras [13]. Nuo aplinkos taip pat priklauso ir izomerizacijos proceso sparta - bakteriorodopsine sparta yra didesnė negu tirpale arba bakteriorodopsino mutantuose [7].

Viename iš atliktų tyrimų retinalio izomerizacijos dinamika buvo modeliuojama naudojant *ab initio* QM/MM molekulių dinamikos (MD) simuliacijas su trumpo chromoforo modeliu (tik C_{11}-C_{ε} atomai buvo aprašomi kvantinės mechanikos lygmenyje (žr. 3 pav.)) [7]. Simuliacijos parodė, kad po sužadinimo šviesa retinalis išlieka *all-trans* konfigūracijos iki maždaug t = 130 fs, kuomet pasisukimas ties C_{13}=C_{14} dvigubu ryšiu pradeda keistis. Dvisienio kampo vertei pasiekus maždaug 90°, susukta konformacija išlieka stabili tol, kol izomerizacijos trajektorija eina sužadintos būsenos S_1 paviršiumi [7]. Neužpildytos pagrindinės būsenos S_0 energija sukantis C_{13}=C_{14} ryšiui staigiai kyla ir

priartėja prie S_1 būsenos energijos ties 90° pasisukimu, ties kuriuo įvyksta dažni elektronų perėjimai. Po perėjimo į S_0 būseną, stipriai susukta konformacija greitai relaksuoja į plokščią formą – į *13-cis* produktą (t.y. J būseną) arba atgal į *all-trans* (BR būseną) [7].



3 pav. *all-trans* retinalio cheminė struktūra. Raudoname stačiakampyje yra apibrėžtos trumpo chromoforo modelio ribos.

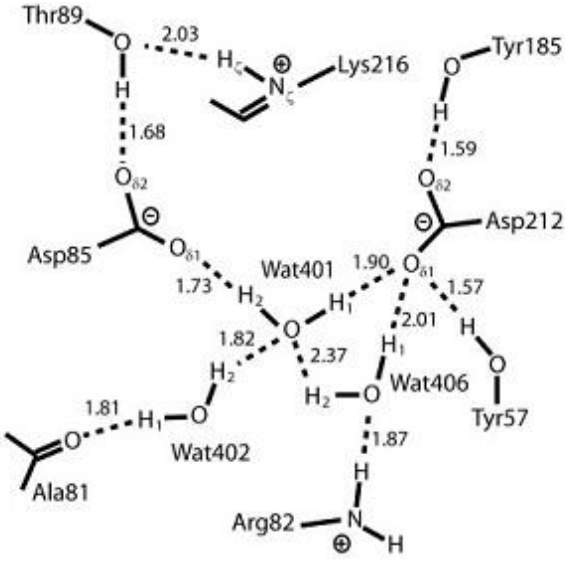
Simuliacijas pakartojus be baltymo aplinkos, buvo gaunami du izomerizacijos keliai - aplink C_{15}=N_ζ ryšį bet kuria kryptimi. Konkrečią kryptį lemdavo kambario temperatūroje retinalio patiriamos didelės šiluminės fluktuacijos sužadinimo šviesa metu. Vadinasi, baltymo aplinka užblokuoja alternatyvius izomerizacijos kelius ir nukreipia trajektoriją į izomerizaciją, reikalingą sistemos biologinei funkcijai atlikti, t.y., bakteriorodopsino atveju - C_{13}=C_{14} ryšio izomerizaciją [7]. Izomerizacijos ties C_{13}=C_{14} ryšiu kryptis (pagal ar prieš laikrodžio rodyklę), lemtų dvi galimas Šifo bazės N-H ryšio kryptis – link Asp85 arba Asp212, tačiau visais atvejais sukimosi kryptis yra link Asp212, kas buvo pastebėta ir kitų autorių [11]. Šis izomerizacijos krypties selektyvumas taip pat yra nulemtas baltymo aplinkos. Iš pagrindinės būsenos struktūrinių duomenų yra žinoma, kad Šifo bazės N-H ryšys net ir šioje būsenoje yra šiek tiek pakreiptas link Asp212, o tai rodo, kad baltymo aplinkos jėgų kryptis yra palankesnė izomerizacijai link Asp212 [4,11]. Yra parodyta, jog šį nuokrypį pagrindinėje būsenoje daugiausia lemia chromoforo sąveika su Trp86 ir Šifo bazės N-H sąveika su W402 vandens molekule [4].

1.3. K būsenos struktūra

Po izomerizacijos susidaręs pagrindinės būsenos *13-cis* konfigūracijos retinalis atitinka J fotociklo būseną, kuri per 3 ps pereina į K būseną. Tai yra pirmoji tarpinė fotociklo būsena, kurią galima „sugauti“ užšaldžius. Turimi rentgeno kristalografijos duomenys apie K būsenos struktūrą yra prieštaringi. 2,10 Å skyros struktūroje [14] retinalis yra *13-cis* konfigūracijos ir beveik be deformacijų.

Šifo bazės N-H ryšio kryptis yra pasikeitusi iš išorinės į citoplazminę membranos pusę. Taip pat šioje struktūroje vandens molekulė W402 yra dingusi, o atstumas tarp Asp85 ir Šifo bazės yra sumažėjęs. Tuo tarpu 1,43 Å skyros K būsenos struktūra [15] duoda visiškai kitokį vaizdą. Šiuo atveju retinalis yra stipriai deformuotas, tačiau visi pokyčiai yra apriboti segmente tarp C_{13} ir N_ζ atomų, o baltymo atomai nėra reikšmingai pajudėję. Didesnės retinalio deformacijos lemia tai, kad N-H ryšys nepersiorientuoja link citoplazminės pusės, tačiau jo kryptis šiek tiek pasikeičia. Vandens molekulė W402 yra likusi toje pačioje vietoje, tačiau jos vandenilinis ryšys su Šifo baze yra susilpnėjęs, dėl sumažėjusio N-H-O kampo nuo 147° iki 115°. Panašios struktūros K būsena (su nepradingusia W402 molekule) buvo gauta ir iš kitokiais metodais užaugintų kristalų [5].

Prieštaravimus tarp kristalografinių duomenų kai kurie autoriai yra linkę aiškinti dviejų viena po kitos einančių būsenų, žymimų K ir KL, egzistavimu, kurios buvo stebėtos regimosios, FTIR ir rezonansinės Ramano spektroskopijos matavimais. Taip pat buvo atliktas ir šių būsenų modeliavimas MD simuliacijomis bei QM/MM skaičiavimais [11]. Gautoje K būsenoje, retinalis yra stipriai deformuotas Šifo bazės regione, o Šifo bazės N-H ryšio kryptis yra nukreipta link Asp212. Tuo tarpu KL būsenoje, chromoforas išlieka deformuotas, tačiau N-H ryšys persiorientuoja link Asp85 ir sudaro vandenilinį ryšį su Thr89 [11]. K būsenoje vandenilinių ryšių tinklo topologija išlieka daugmaž identiška BR būsenos topologijai. Tuo tarpu K→KL perėjimo metu įvyksta reikšmingi vandenilinių ryšių persitvarkymai (4 pav.). W402 vandens molekulė yra dislokuojama dėl vandenilinio ryšio su Šifo baze nutrūkimo. KL būsenos vandenilinių ryšių tinklo topologija yra artima gautai iš 2,10 Å skyros rentgeno kristalografijos duomenų ir gali paaiškinti, kur yra dingusi W402 molekulė kristalografiniuose duomenyse [11].



4 pav. Vandenilinių ryšių tinklo topologija KL būsenoje [11]

K ir KL būsenų modelis taip pat leidžia geriau suprasti sugerto fotono energijos saugojimo mechanizmus ankstyvuosiuose fotociklo etapuose. K būsenoje sugerta energija yra laikoma retinalio deformacijos ir susilpnėjusių sąveikų tarp Šifo bazės ir aplinkinių grupių forma. K→KL perėjime chromoforas dalinai relaksuoja ir formuoja stipresnes elektrostatines sąveikas su aplinka. Ši relaksacija inicijuoja vandenilinių ryšių tinklo persitvarkymą, o tai yra esminis žingsnis protono pernašos procesui vėlesniuose fotociklo etapuose [11].

1.4. L būsenos struktūra

Vieningo sutarimo apie L būsenos struktūrą taipogi nėra, kadangi egzistuojantys kristalografiniai modeliai turi reikšmingų skirtumų. Tai yra viena iš priežasčių, kodėl nėra iki galo suprastas bakteriorodopsino protono pernašos mechanizmas, kadangi L→M reakcijos metu įvykstantis Šifo bazės deprotonavimas ir po jo sekantis anijoninio Asp85 protonavimas, yra kritinis žingsnis protono pernašos procese [6]. Čia bus trumpai apžvelgti 4 skirtingi L būsenos modeliai.

A modelyje, gautame iš 2,1 Å skyros kristalografijos duomenų [16], Šifo bazės N-H ryšys yra nusisukęs nuo W402 vandens molekulės į citoplazminį, hidrofobišką regioną [6]. Šiame modelyje W402 molekulė yra dingusi, bet dėl C spiralės susilenkimo link G spiralės, Asp85 yra priartėjęs prie Šifo bazės, o jo vandenilinis ryšys su Thr89 yra nutrauktas [5].

B modelyje, gautame iš 1,62 Å skyros kristalografijos duomenų [17], yra matoma tik nedidelė dalis pokyčių, stebimų A modelyje. Beveik visi šiek tiek toliau nuo retinalio esančių atomų poslinkiai yra mažesni už 0,2 Å [5]. Vandens molekulės W402 padėtis šiame modelyje yra šiek tiek pasislinkusi, tačiau Šifo bazės N-H ryšys yra pasisukęs link šios molekulės, todėl tarp jų yra atkuriamas vandenilinis ryšys, kuris buvo nutrūkęs K būsenoje. Taigi, šiame modelyje Asp85 protonavimas vyksta per W402 [6].

C modelyje, gautame iš 2,4 Å skyros kristalografijos duomenų [18], Šifo bazė yra pasisukusi į citoplazminę pusę, kartu su W402 molekule, ir vandenilinis ryšys tarp jų yra nenutraukiamas. W402 perėjimas į kitą retinalio pusę yra galimas dėl Leu93 grupės pasisukimo, kuris atlaisvina vietą citoplazminėje pusėje. Šiame modelyje protono kelias link Asp85 nebus tiesus ir gali eiti per Thr89 [6].

D modelis, kuris bus naudojamas ir skaičiavimams šiame darbe, yra gautas iš 1,53 Å skyros rentgeno kristalografijos duomenų [6]. Tai yra naujausias iš nagrinėjamų modelių ir iš anksčiau paminėtų modelių yra artimiausias B modeliui, tačiau su tam tikrais skirtumais. Du dvigubi ryšiai tarp C_{13} ir N_{ζ} atomų yra pastebimai pasisukę į tą pačią pusę (priešingai nei B modelyje) ir maždaug tokiu

pačiu dydžiu, lyginant su BR struktūra. Dėl šios priežasties, N-H ryšio kryptis lieka link išorinės pusės ir vandenilinis ryšys su W402 vandens molekule nenutrūksta, nepaisant apie 0.3 Å padidėjusio atstumo tarp jų. C_{14}-C_{15} ryšys yra nepasisukęs, o N_ζ-C_ε ryšys yra pasisukęs į priešingą pusę nei dvigubieji ryšiai maždaug 109°. Tai lemia, kad Lys216 grandinės dalis, esanti toliau C_ε atomo yra pasisukusi ta pačia kryptimi kaip ir BR būsenoje [6]. Regione tarp Šifo bazės ir išorinio paviršiaus, dalis struktūrinių grupių, dalyvaujančių protono pernašos procese (Arg82, Glu194), yra pasislinkę. Taigi, jų judesiai, stebimi M būsenoje, prasideda dar L būsenoje [6].

Turimi L būsenos nekristalografiniai duomenys taip pat neleidžia susiformuoti vieningai nuomonei, kuris modelis yra tiksliausias. FTIR O-H juostos rodo, kad Šifo bazė sudaro vandenilinį ryšį su vandens molekule citoplazminiame regione, kas atitinka tik C modelį [6]. FTIR C=N juostos, matomos L būsenos spektre, rodo, kad Šifo bazės ir W402 vandenilinis ryšys atsinaujina, kas atitinka B, C, D modelius [6]. NMR rezultatai numato C_{13}=C_{14} ir C_{15}=N_ζ dvigubų ryšių pasisukimus, atitinkančius modelį B, tačiau teoriniai skaičiavimai tokių pasisukimų neleidžia [6].

1.5. Šifo bazės deprotonavimas

Dėl didelės L būsenos struktūrų įvairovės egzistuoja daug modelių, nusakančių galimą Šifo bazės deprotonavimo/Asp85 protonavimo mechanizmą L→M perėjimo metu. Visų pirma, pradinės protono pernašos mechanizmas priklausys nuo to, ar Šifo bazės N-H ryšys L būsenoje yra nukreiptas į citoplazminę, ar išorinę pusę. Antra, protono pernaša gali būti tiesioginė, arba per tarpinius struktūrinius elementus, kaip Thr89 ar W402 vandens molekulę, kuri skirtinguose L būsenos modeliuose gali būti skirtingose vietose, arba būti išvis dingusi [19].

Jeigu Šifo bazės N-H ryšys L būsenoje yra nukreiptas į išorinę pusę, tuomet Šifo bazės protonas bus sąlyginai arti Asp85 $O_{\delta 1}$ atomo, ir L→M reakcijoje Asp85 galėtų būti protonuojamas tiesiogiai, jeigu W402 vandens molekulės nėra. Jeigu W402 L būsenoje vis dar yra, tuomet Asp85 galėtų būti protonuojamas per koordinuotą reakciją, kurios metu Šifo bazės protonas yra perduodamas W402, o vienas iš vandens molekulės protonų yra perduodamas Asp85 [10]. Protonas iš Šifo bazės visada nukeliauja į Asp85, nepaisant to, kad tiek Asp85, tiek ir Asp212 yra maždaug vienodu atstumu nuo Šifo bazės. Šis pernašos krypties selektyvumas gali būti aiškinamas FTIR matavimų duomenimis, iš kurių matyti, kad L būsenoje W402 vandens molekulės sudaro stiprų vandenilinį ryšį su Asp85 [20]. Tuo tarpu M būsenoje W402 sudaro stiprų vandenilinį ryšį su Asp212, kas padaro Asp85 protonų akceptoriumi. Dauguma turimų L ir M būsenų rentgeno kristalografijos struktūrų patvirtina šį ryšių

pasikeitimą, kadangi W402 molekulė L būsenoje yra arčiau Asp85, o M būsenoje – arčiau Asp212 grupės [20].

Jeigu Šifo bazės N-H ryšys L būsenoje yra nukreiptas į citoplazminę pusę, tuomet egzistuoja 3 labiausiai tikėtini pernašos mechanizmai [19]. Pirmasis iš jų, yra tiesioginis protono perdavimas iš Šifo bazės į Asp85. Atstumas tarp jų yra didelis (apie 4 Å), tačiau jis sutrumpėja iki ~2,5 Å dėl retinalio sukimosi ir Asp85 pasislinkimo protono pernašos metu. Šio pernašos kelio energinis barjeras yra 12,3 kcal/mol [19]. Antrasis siūlomas pernašos mechanizmas yra per Thr89 grupę, su 13,6 kcal/mol energiniu barjeru. Šifo bazės protonas koordinuotos reakcijos metu yra perduodamas Thr89, kuris tuo pačiu metu perduoda vieną iš savo protonų Asp85 [19]. Trečiasis siūlomas mechanizmas, turintis 11,5 kcal/mol energinį barjerą yra sudarytas iš kelių etapų. Visų pirma, Šifo bazė atsisuka atgal į išorinę pusę, tada protonas pereina į Asp212 grupę, kuri galiausiai perduoda šį protoną per W402 vandens molekulę į Asp85 [19]. Visų trijų aprašytų pernašos kelių energiniai barjerai sutampa skaičiavimų paklaidos ribose ir yra artimi eksperimentinei vertei (~13 kcal/mol), todėl skaičiavimų autoriai neatmeta galimybės, jog bakteriorodopsinas gali naudoti visus tris pernašos kelius. Tokiu būdu padidėtų fotociklo atsparumas nepalankioms aplinkos sąlygoms, kurioms esant dar galėtų veikti bent vienas iš trijų pernašos kelių [19].

Dar vienas įvairių autorių siūlomas Asp85 protonavimo mechanizmas yra galimas tuo atveju, kai N-H krūvio dipolis yra nukreiptas į citoplazminę pusę [10]. Šis dipolio persiorientavimas gali destabilizuoti NH^+/$Asp85^-$/$Asp212^-$ krūvių trikampį. Tai lemtų, kad Asp85 pasiimtų protoną iš W402 vandens molekulės, o likęs mobilus hidroksido anijonas būtų nustumtas į citoplazminę pusę dėl neigiamo Asp212 karboksilato stūmos bei dėl teigiamos Šifo bazės traukos, iš kurios hidroksidas tada atplėštų protoną. Vadinasi, bakteriorodopsinas galėtų veikti kaip hidroksido jonų pompa, panašiu principu kaip halorodopsinas pumpuoja Cl^- jonus iš membranos išorės į vidų [10].

1.6. Tolimesni fotociklo etapai

M būsenoje įvyksta Šifo bazės deprotonavimas ir Asp85 protonavimas, tačiau taip pat yra išlaisvinamas protonas į išorinį membranos paviršių. Manoma, kad protonas yra išlaisvinamas iš protonuotos Glu204 grupės, iš komplekso, kurį sudaro Glu204 ir Glu194 arba iš vandens molekulių, esančių netoli Arg82, Glu204 ir Glu194 grupių. Protono išlaisvinamas yra susijęs su protonuotos Arg82 grupės pasislinkimu tolyn nuo protonuoto Asp85 link Glu204/Glu194 poros [5].

Sekantis fotociklo žingsnis yra Šifo bazės reprotonavimas, tačiau prieš tai Šifo bazės ryšiai turi pakeisti savo kryptį, tam, kad reprotonavimas įvyktų ne iš Asp85, o iš Asp96 ir būtų gaunama teisinga bakteriorodopsino protonų pernašos kryptis (iš citoplazminės į išorinę pusę). Tai yra užtikrinama dviem etapais: a) Šifo bazės persiorientavimu iš išorinės į citoplazminę pusę $M_1 \rightarrow M_2$ reakcijos metu ir b) Asp85 pK_a padidėjimu $M_2 \rightarrow M_2'$ reakcijos metu. Pirmasis etapas nukreipia Šifo bazę palankia kryptimi protono pernašai iš Asp96, o antrasis užtikrina, kad neįvyks atgalinis protonavimas iš Asp85 [5].

$M_2' \rightarrow N$ reakcijos metu protonuota Asp96 grupė perduoda savo protoną Šifo bazei. Kad pernaša galėtų įvykti, reikia, kad Asp96 pK_a sumažėtų nuo maždaug 11 iki ne didesnio nei Šifo bazės (apie 8) [5]. Taip pat yra reikalingas pernašos kelio sukūrimas gana hidrofobiškame citoplazminiame regione. Eksperimentinės ir teorinės žinios rodo, jog šiuos du reikalavimus gali patenkinti tik vanduo citoplazminiame regione [5]. Iš M_2 būsenos kristalografinių duomenų [21] žinoma, kad prie Asp96 atsiranda grupė vandeniliniais ryšiais surištų vandens molekulių. Tai sumažina Asp96 pK_a, o ši vandens molekulių grupė yra pradžia tinklo, kuris turėtų nusitęsti iki pat Šifo bazės, kadangi M_2 būsenoje atstumas tarp artimiausios vandens molekulės ir Šifo bazės yra vis dar labai didelis (7,4 Å) [5]. Turimi N' būsenos (su jau protonuota Šifo baze) struktūros duomenys [22] patvirtina vandeniliniais ryšiais sujungtų 4 vandens molekulių grandinės nuo Asp96 iki Šifo bazės egzistavimą. Todėl tikėtina, kad būtent šiuo keliu ir buvo perduotas protonas. Papildomų vandens molekulių atsiradimas citoplazminėje pusėje yra siejamas su F ir G spiralių citoplazminių galų nuokrypiais ir Leu93, Thr46 bei Phe219 grupių poslinkiais, kurie atlaisvina vietą citoplazminėje pusėje [5].

Sekantis fotociklo žingsnis po Šifo bazės reprotonavimo yra protonų donoro Asp96 sugrąžinimas į jo pradinę būseną, pasiimant protoną iš citoplazminio paviršiaus. Maždaug tuo pačiu metu (perėjime tarp būsenų N→O) įvyksta retinalio reizomerizacija, kas rodo, kad šie du įvykiai yra susieti [5]. Asp96 protonavimas išardo vandens molekulių vandenilinių ryšių tinklą, siekiantį Šifo bazę ir tokiu būdu destabilizuoja Šifo bazės N-H ryšio citoplazminę orientaciją. O būsenoje retinalis yra *all-trans* konfigūracijos, tačiau deformuotas ir relaksuoja tik po Asp85 deprotonavimo, kurio metu protonas yra perduodamas į grupes, kurios ankstesniame fotociklo etape išlaisvino protoną į išorinį membranos paviršių. Šis procesas žymi fotociklo pabaigą ir po jo baltymas yra paruoštas naujam fotociklui [5,23].

2.Skaičiavimo teorija

Kvantinių sistemų, sudarytų iš atomų ir molekulių, elektroninės struktūros nagrinėjimas yra susijęs su Šriodingerio lygties sprendimu. Daugelio mikrodalelių sistemoje yra susiduriama su daugelio kūnų problema, todėl sistemos Šriodingerio lygtį reikia spręsti apytiksliais metodais. Du dažnai naudojami Šriodingerio lygties sprendimo būdai yra pagrįsti arba banginės funkcijos formalizmu, arba tankio funkcionalo artiniu. Sekančiame skyrelyje bus trumpai pristatyta tankio funkcionalo teorija (DFT), kurios metodika bus naudojama šiame darbe.

2.1. Tankio funkcionalo teorija (DFT)

DFT yra populiari skaičiavimo metodika, leidžianti gauti pakankamai didelio tikslumo rezultatus per trumpesnį laiką negu *ab initio* metodais. DFT metodo pagrindas yra dvi Hohenbergo (Hohenberg) ir Kohno (Kohn) suformuluotos teoremos. Pirmoji teorema teigia, kad daugelio elektronų sistemos pagrindinės elektroninės būsenos savybės yra vienareikšmiškai nulemtos elektronų tankio, kuris priklauso tik nuo 3 erdvinių koordinačių [24]:

$$\rho(r) = \sum_{\gamma=\alpha}^{\beta} \rho^{\gamma}(r) = \sum_{i\in\alpha} \psi_i^2\,(r) + \sum_{i\in\beta} \psi_i^2\,(r) \qquad (1)$$

čia α ir β yra dvi galimos sukinio būsenos. Vadinasi, naudojant elektronų tankio funkcionalą, galima N elektronų su 3N erdvinėmis koordinatėmis daugelio kūnų problemą sumažinti iki sistemos, aprašomos 3 erdvinėmis koordinatėmis. Gaunama energijos išraiška [24]:

$$E_V[\rho] = F_{HK} + \int \rho(r)V(r)dr \qquad (2)$$

čia F_{HK} – universalus pasiskirstymo funkcionalas. Antroji (variacinė) Hohenbergo ir Kohno teorema nusako sistemos energijos funkcionalo formą ir teigia, kad teisingai pasirinktas pagrindinės būsenos elektronų tankis atitinka energijos funkcionalo minimumą. Viendalelė Kohno ir Šamo tikrinių verčių lygtis, iš kurios galima gauti tikslius DFT sprendinius, atrodo taip [24]:

$$H_{KS}^{\gamma}\varphi_{i\sigma}(r_1) = \left(-\frac{1}{2}\Delta + \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r_1|} + \int \frac{\rho^{\gamma}}{|r_1 - r_2|} + V_{XC}(r)\right)\varphi_{i\sigma}(r_1) = \epsilon_{i\sigma}\varphi_{i\sigma}(r_1) \qquad (3)$$

čia pirmasis narys Kohno ir Šamo hamiltoniano išraiškoje aprašo nesąveikaujančių elektronų kinetinę energiją, antrasis narys – klasikinę kuloninę sąveiką tarp elektronų ir branduolių, trečiasis – elektronų tarpusavio sąveiką, o ketvirtasis narys yra pakaitinis-koreliacijos potencialas, kuriame atsispindi neklasikinės pakaitinės ir koreliacijos sąveikos. V_{XC} yra gaunamas iš pakaitinės-koreliacijos energijos E_{XC}, kurios funkcionalo forma nėra žinoma, todėl yra konstruojami apytiksliai funkcionalai. Populiariausias naudojamas funkcionalas yra trijų parametrų Becke funkcionalas, žymimas B3LYP. Tai yra hibridinis funkcionalas, gaunamas kombinuojant žinomas analizines išraiškas su empiriškai parinktais svoriniais koeficientais. B3LYP išraiška [25] :

$$E_{XC} = 0{,}2E_X^{HF} + 0{,}8E_X^{LDA} + 0{,}72E_X^{B} + 1{,}0E_C^{LDA} + 0{,}81E_C^{LYP} \qquad (4)$$

čia E_X^{HF} – pakaitinės energijos funkcionalas, E_X^{B} – pakaitinis Becke funkcionalas, E_C^{LYP} – koreliacinis Lee-Yango-Parro (Lee-Yang-Par) funkcionalas, E_X^{LDA} ir E_C^{LDA}- atitinkamai lokalaus tankio artinio funkcionalo pakaitinės ir koreliacinės komponentės.

Sužadintas būsenas galima skaičiuoti remiantis nuo laiko priklausančia DFT teorija (TD-DFT teorija) [24]. TD-DFT yra pagrįsta Rungės ir Groso teorema, analogiška dviem Hohenbergo ir Kohno teoremoms.

2.2. ONIOM metodas

Tyrinėjant labai dideles sistemas, pavyzdžiui, baltymus, DFT arba *ab initio* metodai reikalauja nepaprastai didelių kompiuterinių pajėgumų. Kadangi atliekant skaičiavimus dažniausiai domina tiktai nedidelė sistemos dalis, todėl galima tik šią dalį aprašyti kvantinės mechanikos (QM) lygmenyje, panaudojant DFT ar *ab initio* metodus. Tuo tarpu likusią aplinkos dalį užtenka charakterizuoti panaudojant paprastesnius modelius, pavyzdžiui, molekulių mechanikos (MM) metodus. Tokiu būdu QM/MM metodai leidžia modeliuoti dideles sistemas su daug mažesniais kompiuteriniais pajėgumais.

Vienas iš tokių QM/MM metodų yra ONIOM metodas, leidžiantis sugrupuoti molekules į du arba tris lygmenis. Aukščiausiame lygmenyje paprastai naudojamas didžiausio tikslumo metodas, įskaitantis elektronų koreliacijas, o žemesniuose lygmenyse gali būti naudojami paprastesni kvantinės mechanikos, pusempiriai ar molekulių mechanikos metodai [26].

3.Skaičiavimo metodika

Šiame darbe skaičiavimai buvo atliekami su BR (PDB kodas 1C3W) [27] ir L (PDB kodas 2NTW) [28] būsenos struktūromis, kurios buvo gautos iš 1.55 Å ir 1.53 Å skyros rentgeno kristalografijos duomenų atitinkamai. Visi skaičiavimai buvo atliekami Gaussian09 programiniu paketu.

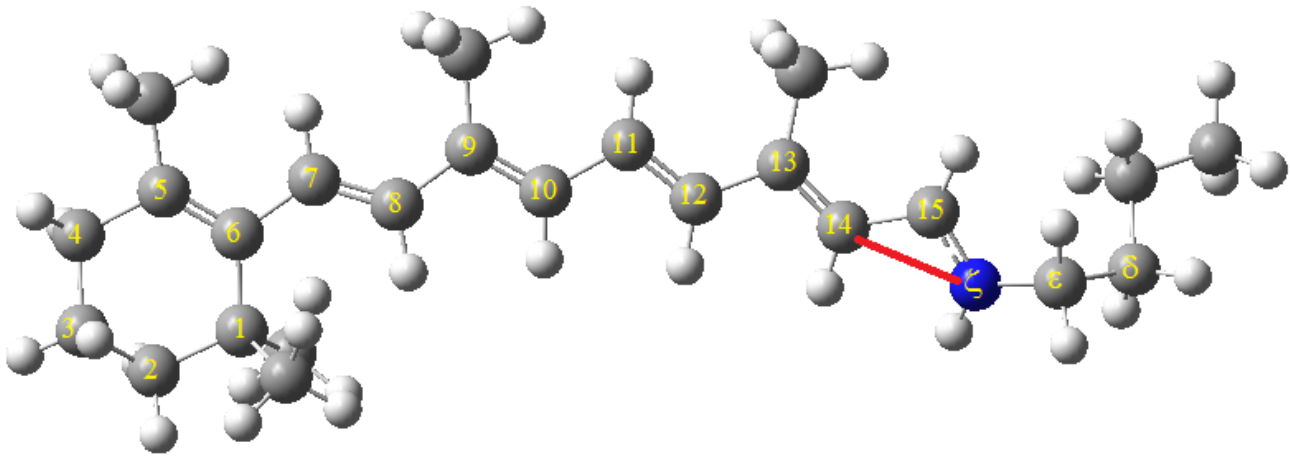
Darbe buvo naudotas Lietuvos nacionalinio fizinių ir technologijos mokslų centro aukšto našumo superkompiuteris Vilniaus universitete Fizikos fakultete („HPC Saulėtekis“).

Retinalio molekulės geometrijos optimizacija be baltymo aplinkos buvo atilikta naudojant DFT metodikos B3LYP funkcionalą su cc-pVTZ bazinių funkcijų rinkiniu. BR ir L būsenos retinalio molekulės kartu su Šifo baze ir keturiais lizino (Lys216) anglies atomais buvo iškirptos iš jas atitinkančių PDB failų. Abi iškirptos molekulės buvo optimizuotos tiek esant protonuotai Šifo bazei, tiek neprotonuotai. Iš pradžių buvo optimizuojama neužfiksavus jokių kampų, vėliau buvo optimizuojama užfiksuojant tam tikrus dvisienius kampus, kad būtų išlaikyta konkrečiai būsenai būdinga retinalio molekulės geometrinė forma netoli Šifo bazės. BR būsenos retinalyje buvo užfiksuoti kampai $\gamma_{11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$, $\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$, $\gamma_{13\text{-}14\text{-}15\text{-}\zeta}$, $\gamma_{14\text{-}15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ (žr. 5 pav.), kad būtų išlaikytas šioje būsenoje esantis retinalio polieninės grandinės sulenkimas. L būsenos retinalyje buvo užfiksuoti dvisieniai kampai $\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$, $\gamma_{13\text{-}14\text{-}15}$ $\gamma_{14\text{-}15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$, $\gamma_{15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon\text{-}\delta}$ (žr. ten pat), siekiant išlaikyti posūkį ties C_{13}=C_{14} dvigubu ryšiu [29].

Toliau buvo atlikta retinalio molekulės geometrijos optimizacija (BR ir L būsenų, protonuotos ir neprotonuotos Šifo bazės atvejais) pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje. Iš PDB duomenų tiek BR, tiek L struktūrose buvo palikti 33 struktūriniai baltymo elementai (įskaitant Lys216) ir 3 vandens molekulės, esantys 5 Å spinduliu nuo retinalio. Vietose, kuriose iškerpant molekules buvo nutraukiamas ryšys, buvo prijungiami vandenilio atomai. Optimizacija baltymo aplinkoje buvo atlikta pasinaudojant ONIOM metodika. Retinalio molekulė, kartu su Šifo baze ir keturiais Lys216 anglies atomais, buvo priskirta aukštesniam ONIOM sluoksniui ir optimizuota naudojant tą pačią B3LYP/cc-pVTZ metodiką. Baltymo aplinka buvo priskirta žemesniam ONIOM sluoksniui ir buvo optimizuota naudojant pusempirę PM6 metodiką [29]. Aplinka taip pat buvo optimizuota naudojant molekulių mechanikos UFF metodą, tačiau gauti rezultatai buvo mažesnio tikslumo nei PM6 atveju. Optimizacijos procesas buvo vykdomas dviejomis pakopomis – visų pirma buvo užšaldomi visi aukštesniojo ONIOM sluoksnio atomai kartu su visais sunkiaisiais žemesniojo ONIOM sluoksnio atomais (C, O, N ir kt.), taigi, buvo optimizuojami tik baltymo aplinkos vandeniliai. Antrojoje pakopoje

buvo užfiksuoti visi žemesniojo ONIOM sluoksnio atomai ir optimizuotas tik aukštesnysis sluoksnis [29].

Retinalio molekulėse, optimizuotose tiek be baltymo aplinkos, tiek su baltymo aplinka buvo skaičiuojami energijos paviršiai (pagrindinės ir pirmos sužadintos būsenos) keičiant dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ vertę kas 10°, t.y. buvo sukamas C_{15} anglies atomas ir trys vandenilio atomai aplink ašį, einančią tarp C_{14} ir N_ζ atomų (žr. 5 pav., sukimo ašis pažymėta raudona linija) [29].



5 pav. BR būsenos retinalio molekulė ir Lys216 grandinės dalis su sutartine atomų numeracija. Raudona linija žymi ašį, aplink kurią buvo sukami atomai skaičiuojant energijos paviršius [29].

Siekiant išsiaiškinti, kurios baltymo aplinkos dalys daro didžiausią įtaką retinalio struktūrai BR būsenoje su protonuota Šifo baze ir L būsenoje su neprotonuota Šifo baze, buvo palaipsniui mažinamas aplinkos molekulių grupių skaičius ir struktūros buvo per naujo optimizuojamos naudojant ONIOM metodiką su B3LYP/cc-pVTZ aprašymu aukštesniajam sluoksniui ir PM6 metodika žemesniajam sluoksniui. Tuo tarpu, kadangi pirmojo aplinkos sluoksnio neužteko, kad būtų išlaikyta L būsenos su protonuota Šifo baze retinalio struktūra, buvo pridedamas antras baltymo aplinkos sluoksnis, t.y., paliekamos struktūrinės grupės, esančios 10 Å spinduliu nuo retinalio. Struktūrai optimizuoti buvo naudojama trijų sluoksnių ONIOM metodika, kaip ir anksčiau paliekant retinalio molekulę su lizino dalimi aukščiausiame ONIOM sluoksnyje, pirmąjį aplinkos sluoksnį (iki 5 Å) įdedant į vidurinįjį ONIOM sluoksnį, o antrąjį (tarp 5-10 Å) į žemiausią ONIOM sluoksnį. Šiems sluoksniams optimizuoti buvo naudojamos atitinkamai B3LYP/cc-pVTZ, PM6 ir UFF metodikos. Optimizacija kaip ir anksčiau buvo vykdoma dviem etapais, iš pradžių optimizuojant tik viduriniojo sluoksnio vandenilius, o vėliau tik aukščiausiąjį ONIOM sluoksnį [29].

Toliau buvo optimizuojama BR būsenos retinalio sužadintos būsenos struktūra, siekiant patikrinti, ar po sužadinimo yra deprotonuojama Šifo bazė ir gaunama *13-cis* retinalio konfigūracija. Sužadintosios būsenos geometrijos optimizavimas iš pradžių buvo atliekamas naudojant TD-DFT su tuo pačiu B3LYP funkcionalu ir cc-pVTZ bazinių funkcijų rinkiniu, tačiau atliekant optimizaciją net minimalioje (10-ies artimų struktūrinių grupių) baltymo aplinkoje, vienas optimizacijos žingsnis užtrukdavo tarp 5-10 valandų. Todėl visi kiti sužadintosios būsenos optimizacijos skaičiavimai buvo atliekami naudojant B3LYP funkcionalą su paprastesniu cc-pVDZ bazinių funkcijų rinkinių, kadangi retinalio sužadintosios būsenos struktūros optimizacijos rezultatai be baltymo aplinkos bei minimalioje baltymo aplinkoje sutapo su anksčiau gautais rezultatais naudojant B3LYP/cc-pVTZ. Aplinka, kaip ir ankstesniuose skaičiavimuose, buvo aprašoma PM6 metodika ir priskirta žemesniam ONIOM sluoksniui.

Toliau sekančiuose sužadintosios būsenos retinalio struktūros optimizacijos skaičiavimuose buvo plečiama baltymo aplinkos sritis – paimtas pilnas pirmas aplinkos sluoksnis, vėliau pridėtas antrasis sluoksnis, esantis 5-10 Å spinduliu nuo retinalio, kuris, kaip ir anksčiau, buvo įtrauktas į atskirą, žemiausią ONIOM sluoksnį ir aprašytas UFF metodikos tikslumu. Vėliau skaičiavimai buvo pakartoti, leidžiantis optimizuotis daliai bakteriorodopsino G spiralės grupių, prijungtų prie Lys216 bei W402 vandens molekulei. Kadangi spiralės dalies, kuriai leidžiama optimizuotis, didinimas nedavė norimų rezultatų, toliau buvo didinamas skaičiavimų tikslumas. Tolesni skaičiavimai buvo vykdomi tik su pirmo sluoksnio aplinka, tačiau buvo praplėsta sritis netoli aktyviojo centro ir Lys216 grupės, pridedant 7 struktūrines grupes, priklausančias G spiralei. Galiausiai, skaičiavimų tikslumas buvo dar kartą padidintas įtraukiant dalį Lys216 ir keletą prie jo besijungiančių G spiralės struktūrų į atskirą ONIOM vidurinį sluoksnį, kuris buvo aprašytas DFT metodikos B3LYP/cc-pVDZ.

4.Rezultatai

4.1. Retinalio struktūra BR ir L fotociklo būsenose

Retinalio molekulės geometrija BR ir L būsenose, esant protonuotai ir neprotonuotai Šifo bazei, buvo suoptimizuota be baltymo aplinkos, o vėliau – baltymo aplinkoje, tam, kad būtų įvertinta baltymo aplinkos įtaka retinalio struktūrai. Gautos suoptimizuotos struktūros suteikia žinių apie tai, kokia yra pradinė fotociklo eiga ir kaip įvyksta Šifo bazės deprotonavimas. Optimizuotos geometrijos struktūros taip pat vėliau buvo panaudotos energijos paviršių skaičiavimui.

Be baltymo aplinkos suoptimizuotos geometrijos retinalio molekulės dvisieniai kampai, nusakantys molekulės geometriją ties Šifo baze (tarp C_{13} - C_{ε} atomų), yra pateikti 1 lentelėje. RETH ir RET žymi retinalį su atitinkamai protonuota ir neprotonuota Šifo baze, skliaustuose nurodyta fotociklo būsena (BR arba L). Lentelėje palyginimui taip pat yra įtraukti ir dviejų pradinių (neoptimizuotos geometrijos) struktūrų atitinkami dvisieniai kampai [29].

1 lentelė. Suoptimizuotos geometrijos retinalio dvisienių kampų vertės, kai nėra baltymo aplinkos

Struktūra/kampas	$\gamma_{11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$	$\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$	$\gamma_{13\text{-}14\text{-}15\text{-}\zeta}$	$\gamma_{14\text{-}15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$	$\gamma_{15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon\text{-}\delta}$	$\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$
RETH(BR) (neopt.)	177,61	-156,85	178,95	-162,69	-108,58	29,00
RETH(BR)	177,61*	-156,85*	178,95*	-162,69*	-147,60	30,23
RET(BR)	177,61*	-156,85*	178,95*	-162,69*	-141,39	29,08
RETH(L) (neopt.)	174,41	-107,90	175,81	146,41	-126,62	-56,60
RETH(L)	178,75	-107,90*	175,81*	146,41*	-126,62*	-51,61
RET(L)	166,41	-107,90*	175,81*	146,41*	-126,62*	-51,83
RETH (nefiks.)	-179,55	-179,72	-179,72	-179,63	-117,65	0,69
RET (nefiks.)	-179,35	-179,74	-179,29	-179,31	-126,54	1,21

* - kampo vertė buvo užfiksuota.

Atlikus retinalio molekulės geometrijos optimizaciją be baltymo aplinkos ir nefiksavus dvisienių kampų yra gaunama, kad retinalio polieninė grandinė įgauna visiškai plokščią formą iki pat N_{ζ}-C_{ε} ryšio Lys216 dalyje. Tokia retinalio struktūra gaunama nepriklausomai nuo to, ar pradinė struktūra yra BR, ar L. Tiek protonuotos, tiek neprotonuotos Šifo bazės atveju gaunama beveik

identiška struktūra, pagrindinis skirtumas yra Lys216 grandinės dalies ties N_ζ-C_ε ryšiu atsilenkimo kampas (atitinkamai -126,54° ir -117,65° protonuotoje ir neprotonuotoje struktūroje) [29].

BR būsenos optimizuotoje retinalio struktūroje su fiksuotais dvisieniais kampais buvo sėkmingai išlaikytas tai būsenai būdingas polieninės grandinės sulenkimas, tiek protonuotos, tiek neprotonuotos Šifo bazės atvejais. L būsenos optimizuotoje retinalio struktūroje su fiksuotais dvisieniais kampais taip pat pavyko išlaikyti būdingą posūkį ties C_{13}=C_{14} dvigubu ryšiu [29].

Baltymo aplinkoje suoptimizuotos geometrijos retinalio molekulės dvisieniai kampai, nusakantys molekulės geometriją ties Šifo baze (tarp C_{13} - C_ε atomų), yra pateikti 2 lentelėje. Lentelėje palyginimui yra įtraukti ir dviejų pradinių (neoptimizuotos geometrijos) struktūrų atitinkami dvisieniai kampai [29].

2 lentelė. Suoptimizuotos geometrijos retinalio dvisienių kampų vertės, esant baltymo aplinkai

Struktūra/kampas	$\gamma_{11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$	$\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$	$\gamma_{13\text{-}14\text{-}15\text{-}\zeta}$	$\gamma_{14\text{-}15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$	$\gamma_{15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon\text{-}\delta}$	$\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$
RETH(BR) (neopt.)	177,61	-156,85	178,95	-162,69	-108,58	29,00
RETH(BR)+1SL	176,95	-153,34	173,51	-169,35	-101,82	20,14
RET(BR)+1SL	-172,79	-109,89	-167,95	174,03	-129,90	-10,95
RETH(L) (neopt.)	174,41	-107,90	175,81	146,41	-126,62	-56,60
RETH(L)+1SL	175,80	-154,83	170,62	-171,73	-97,24	14,86
RETH(L)+2SL	175,36	-153,55	169,62	-169,91	-101,81	16,65
RET(L)+1SL	-174,48	-104,30	-168,64	169,86	-129,41	-18,35

Atlikus BR būsenos retinalio geometrijos optimizaciją pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje protonuotos Šifo bazės atveju buvo gauta, kad suoptimizuota struktūra yra artima neoptimizuotai struktūrai, t.y., kristalografiniams duomenims. Gerai išsilaiko BR būsenai būdinga deformacija – iš lentelės galima matyti, kad $\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$ dvisienio kampo vertė skiriasi tik maždaug 3°, lyginant su pradine struktūra. Šifo bazės N-H ryšio kryptis yra link W402 vandens molekulės, taip pat nukreipta šiek tiek labiau į Asp212 pusę, negu į Asp85. Tai sutampa su 1.2. skyrelyje išsakytais pastebėjimais apie BR būsenos retinalio struktūrą [29].

Iš atliktų BR būsenos retinalio geometrijos optimizacijų su protonuota Šifo baze, kai buvo palaipsniui mažinamas baltymo aplinkos struktūrų skaičius, buvo gauta, kad BR būsenai būdinga deformacija yra išlaikoma tik tais atvejais, kai yra bent šios 9 struktūrinės grupės - Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 ir vandens molekulė W402, esantys netoli

retinalio Šifo bazės. Šiame sąraše esantys Trp86 ir W402 yra buvę paminėti kaip esantys svarbiausi BR būsenos retinalio deformacijai [10]. Toliau mažinant aplinkos elementų skaičių būdavo gaunamas retinalis su arba pernelyg smarkiai deformuota polienine grandine, arba priešingai, visiškai plokščia polienine grandine, analogiška struktūroje, kuri buvo gauta suoptimizavus retinalį be baltymo aplinkos ir be fiksuotų dvisienių kampų. Todėl galima teigti, kad paminėtos struktūrinės grupės yra reikalingos išlaikyti BR būsenoje būdingai retinalio deformacijai [29].

Atlikus L būsenos retinalio geometrijos optimizaciją pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje protonuotos Šifo bazės atveju, buvo gauta, kad suoptimizuota struktūra yra *all-trans* konfigūracijos ir yra artima BR būsenos struktūrai, t.y., iš kristalografinių duomenų turima L būsenos retinalio struktūra neišsilaiko. Atlikti papildomi skaičiavimai įtraukus antrą baltymo aplinkos sluoksnį davė analogišką rezultatą [29].

BR būsenos neprotonuotos Šifo bazės atveju gauta optimizuota retinalio struktūra yra daug artimesnė L būsenos retinalio struktūrai iš kristalografinių duomenų, negu BR, t.y., gaunama *13-cis* konfigūracijos struktūra. C_{13}=C_{14} dvigubo ryšio posūkio vertė yra -109,89° šioje suoptimizuotoje struktūroje ir -107,90° neoptimizuotoje L būsenos struktūroje [29].

Beveik identiška struktūra buvo gauta atlikus L būsenos retinalio geometrijos optimizaciją pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje neprotonuotos Šifo bazės atveju. Suoptimizuota struktūra yra artima L būsenos neoptimizuotai struktūrai: C_{13}=C_{14} dvigubo ryšio posūkio vertė šiuo atveju yra -104,30°. Optimizaciją pakartotinai atlikus su protonuota Asp85 grupe (simuliuojant bakteriorodopsino būseną, įvykus pirmajam protono pernašos žingsniui), buvo gauta apytiksliai tokia pati struktūra. Šis rezultatas leidžia įtarti, *13-cis* konfigūracijos retinalio struktūra, turima iš kristalografinių duomenų yra išlaikoma tik tuo atveju, kai pradinis protono pernašos etapas iš Šifo bazės į Asp85 jau yra įvykęs [29]. Atsižvelgus ir į BR būsenos su neprotonuota Šifo baze optimizacijos rezultatą galima spėti, kad Šifo bazė yra deprotonuojama iškart po retinalio sužadinimo šviesos kvantu.

Atlikus L būsenos retinalio geometrijos optimizacijas su neprotonuota Šifo baze, kai buvo palaipsniui mažinamas aplinkinių baltymo struktūrų skaičius, buvo nustatyta, kad L būsenai būdinga struktūra yra išlaikoma tik tais atvejais, kai yra paliekamos bent šios 9 struktūrinės grupės - Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 ir vandens molekulė W402. Visos šios struktūros yra arti aktyviojo centro (arba yra aktyviojo centro dalys), be to, jos sutampa su struktūromis, kurios yra reikalingos išlaikyti BR būsenai būdingoms deformacijoms, o tai patvirtina, kad būtent šios baltymo dalys daro didžiausią įtaką retinalio struktūrai bakteriorodopsine. Toliau mažinant aplinkos struktūrų skaičių, retinalio struktūra drastiškai pasikeičia. Pavyzdžiui, pašalinus Tyr185 arba Trp86 grupes, esančias atitinkamai išorinėje ir citoplazminėje membranos pusėse ties

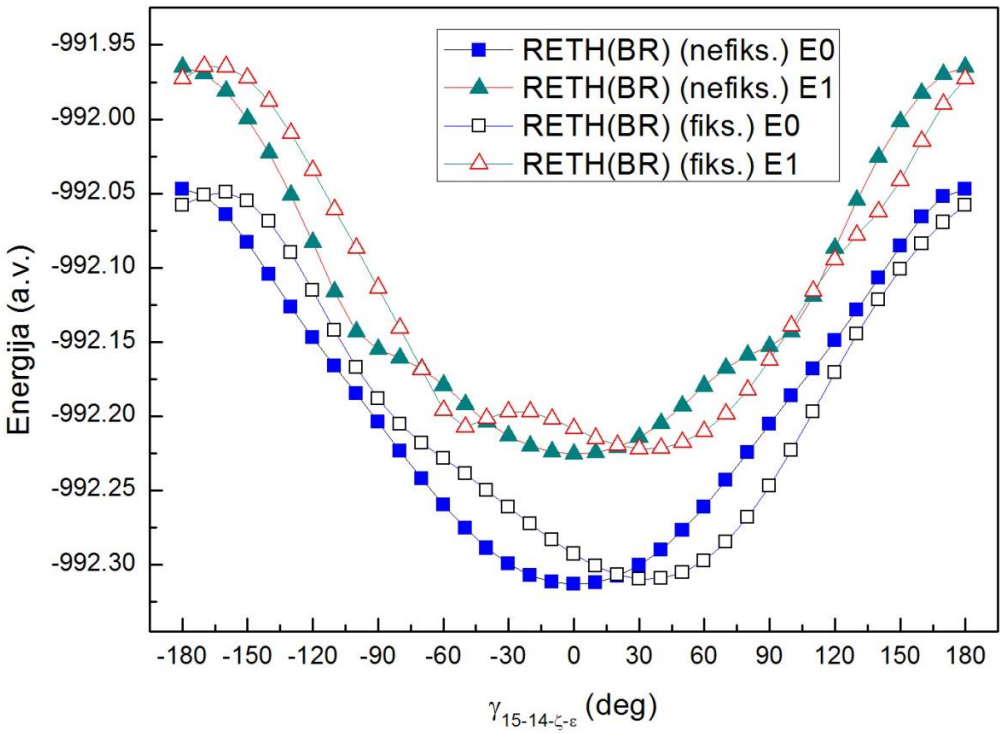
maždaug retinalio polieninės grandinės viduriu, didžiausias deformacijas patiria būtent polieninė grandinė (stipriai susilenkia link citoplazminės pusės). Pašalinus Val49 grupę, susidaro *11-cis* retinalio konformeras, t.y., įvyksta retinalio izomerizacija ties C_{11}=C_{12} dvigubu ryšiu. Pašalinus Leu93 grupę retinalis grįžta į *all-trans* konfigūraciją, artimą optimizuotai retinalio struktūrai be baltymo aplinkos.

Apibendrinant galima teigti, kad BR ir L būsenoms išlaikyti yra būtina baltymo aplinka. BR būsenos su protonuota Šifo baze ir L būsenos su neprotonuota Šifo baze struktūra yra nulemta 10-ies artimos baltymo aplinkos struktūrinių elementų - Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 ir W402. Modeliuoti L būsenai su protonuota Šifo baze nepakanka dviejų aplinkos sluoksnių ir reikia didinti skaičiavimo tikslumą. BR ir L būsenų su protonuota ir neprotonuota Šifo baze optimizacijos rezultatai leidžia įtarti, kad L būsenoje jau yra įvykusi protono pernaša į Asp85 grupę ir, kad Šifo bazė yra deprotonuojama netrukus po retinalio sužadinimo šviesa.

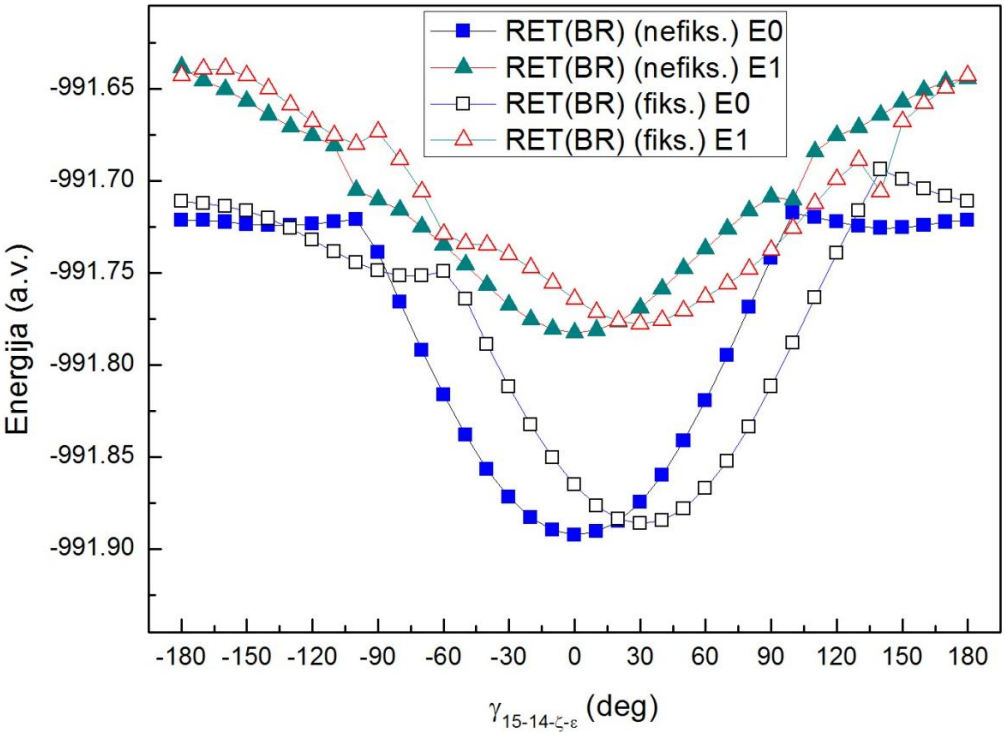
4.2. Retinalio energijos paviršiai

Retinalio energijos paviršiai buvo paskaičiuoti suoptimizuotoms struktūroms be baltymo aplinkos (su nefiksuotais ir fiksuotais kampais) bei struktūroms, optimizuotoms pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje (aprašytoje PM6 metodikos tikslumu). Iš energijos paviršių minimumų buvo nustatytos potencialios stabilios struktūros, kurios vėliau buvo gautos optimizuojant minimalioje pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje.

Paskaičiuoti vakuume optimizuotos BR būsenos retinalio su protonuota Šifo baze energijos paviršiai fiksuotų ir nefiksuotų dvisienių kampų atvejais yra pateikti 6 pav. BR būsenoje retinalio molekulei su protonuota Šifo baze, kurios geometrija buvo optimizuota nefiksuojant dvisienių kampų, yra būdinga pagrindinės ir pirmos sužadintos būsenos energijų simetrija šių būsenų energijos minimumo, esančio ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = 0° verte, atžvilgiu. Tuo tarpu struktūroje su fiksuotais dvisieniais kampais tokios simetrijos nebelieka ir pagrindinės būsenos energijos minimumas pasislenka į dešinę pusę per maždaug 30°. Pirmojoje sužadintoje būsenoje atsiranda naujas minimumas, esantis ties maždaug -50° dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ verte, o antras minimumas, kaip ir pagrindinės būsenos minimumo atveju, pasislenka ties maždaug 30° verte [29].



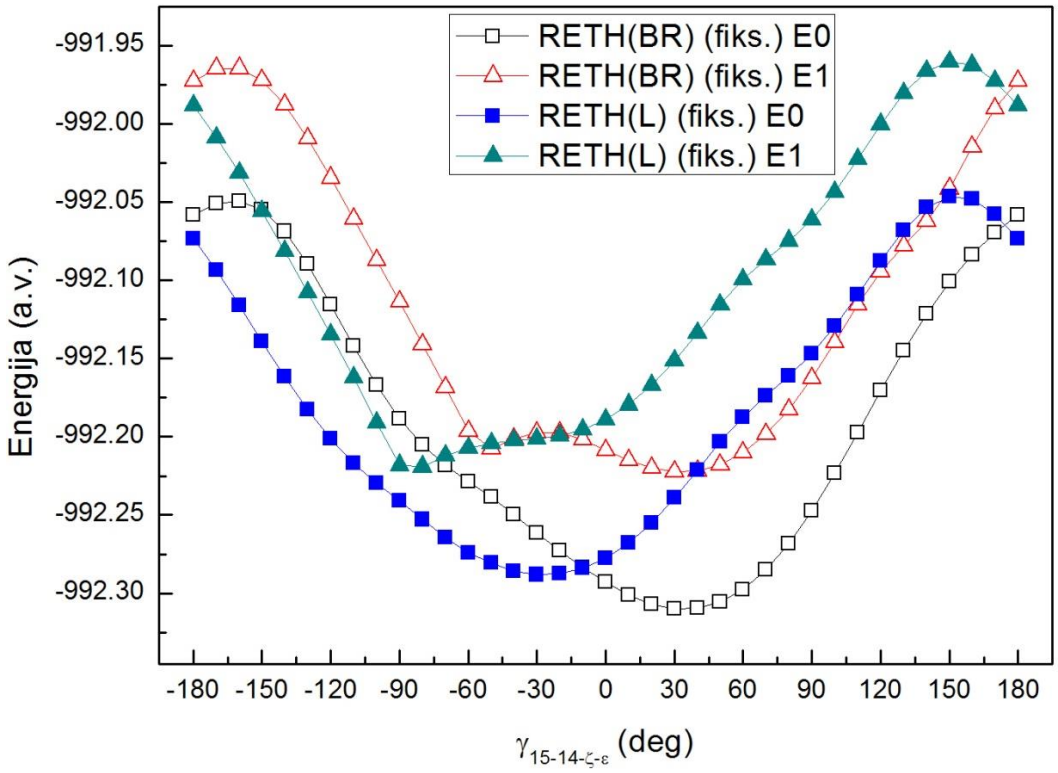
6 pav. BR būsenos retinalio struktūros su protonuota Šifo baze pagrindinės (E0) ir pirmos sužadintos (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ esant fiksuotiems (fiks.) ir nefiksuotiems (nefiks.) dvisieniams kampams [29]



7 pav. BR būsenos retinalio struktūros su neprotonuota Šifo baze pagrindinės (E0) ir pirmos sužadintos (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ esant fiksuotiems (fiks.) ir nefiksuotiems (nefiks.) dvisieniams kampams [29]

Vakuume optimizuotos BR būsenos retinalio su neprotonuota Šifo baze energijos paviršiai fiksuotų ir nefiksuotų dvisienių kampų atvejais yra pateikti 7 pav. Analogiškai kaip ir protonuotos Šifo bazės atveju, struktūrai, kuri buvo suoptimizuota nefiksuojant dvisienių kampų, yra būdinga pagrindinės ir pirmosios sužadintosios būsenos energijų simetrija šių būsenų minimumo atžvilgiu, kuris vėl yra ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 0°$ verte. Struktūroje su fiksuotais dvisieniais kampais pagrindinės ir pirmos sužadintosios būsenų minimumai yra pasislinkę per maždaug 30° į dešinę pusę. Ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 140°$ verte yra matoma kūginė sankirta [29].

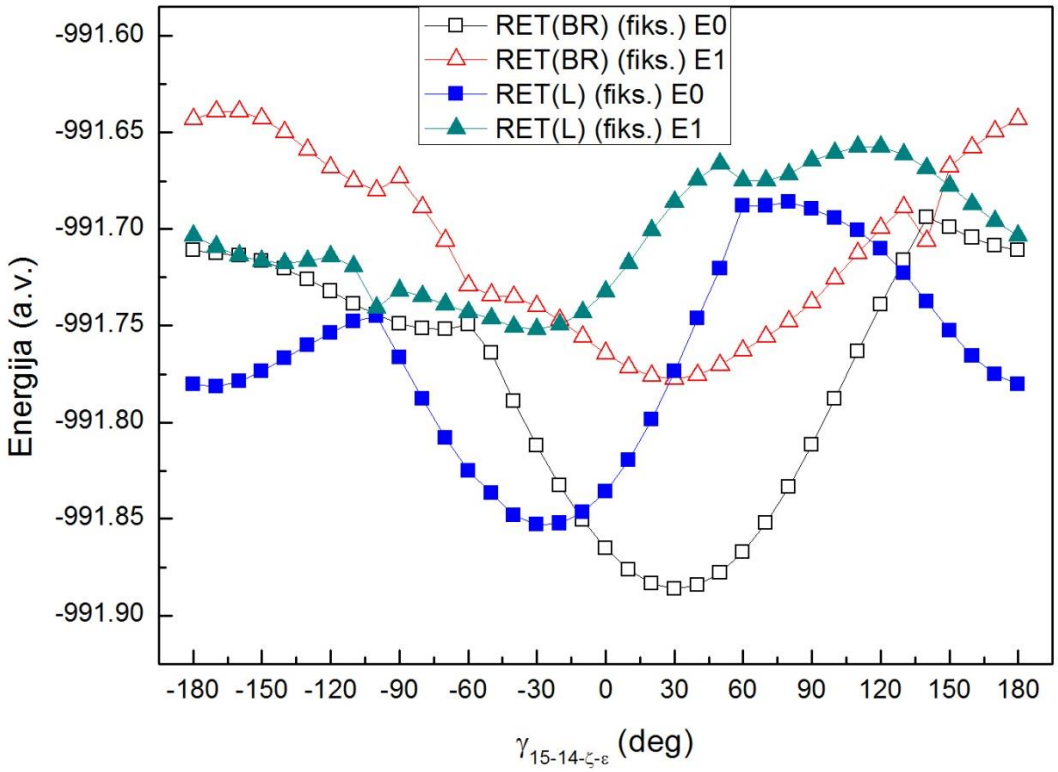
Vakuume optimizuotos L būsenos retinalio energijos paviršiaus palyginimas su BR būsenos retinaliu, esant protonuotai Šifo bazei ir fiksuotiems dvisieniams kampams, yra pateiktas 8 pav. L būsenoje pagrindinės energijos minimumas yra maždaug ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -30°$ verte. Pirmoji sužadinta būsena turi minimumą ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -90°$ verte [29].



8 pav. BR ir L būsenų retinalio struktūrų su protonuota Šifo baze pagrindinių (E0) ir pirmų sužadintų (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ [29]

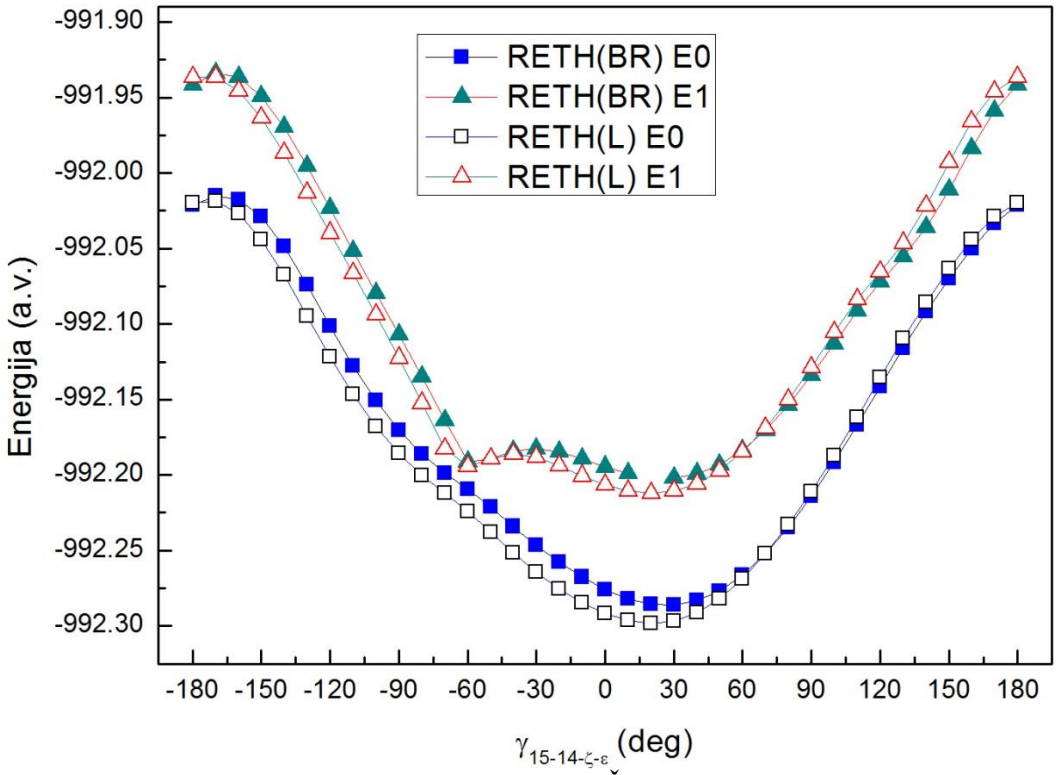
Vakuume optimizuotos L būsenos retinalio energijos paviršiaus palyginimas su BR būsenos retinaliu, esant neprotonuotai Šifo bazei ir fiksuotiems dvisieniams kampams, yra pateiktas 9 pav. L būsenoje pagrindinės būsenos energijos minimumas šiuo atveju vėl yra ties dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$

= -30° verte, taip pat yra dar vienas aukštesnės energijos minimumas apytiksliai ties $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = -180°. Pirmoji sužadinta būsena turi kelis minimumus: ties -100°, -30° ir 60° dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ vertėmis [29].

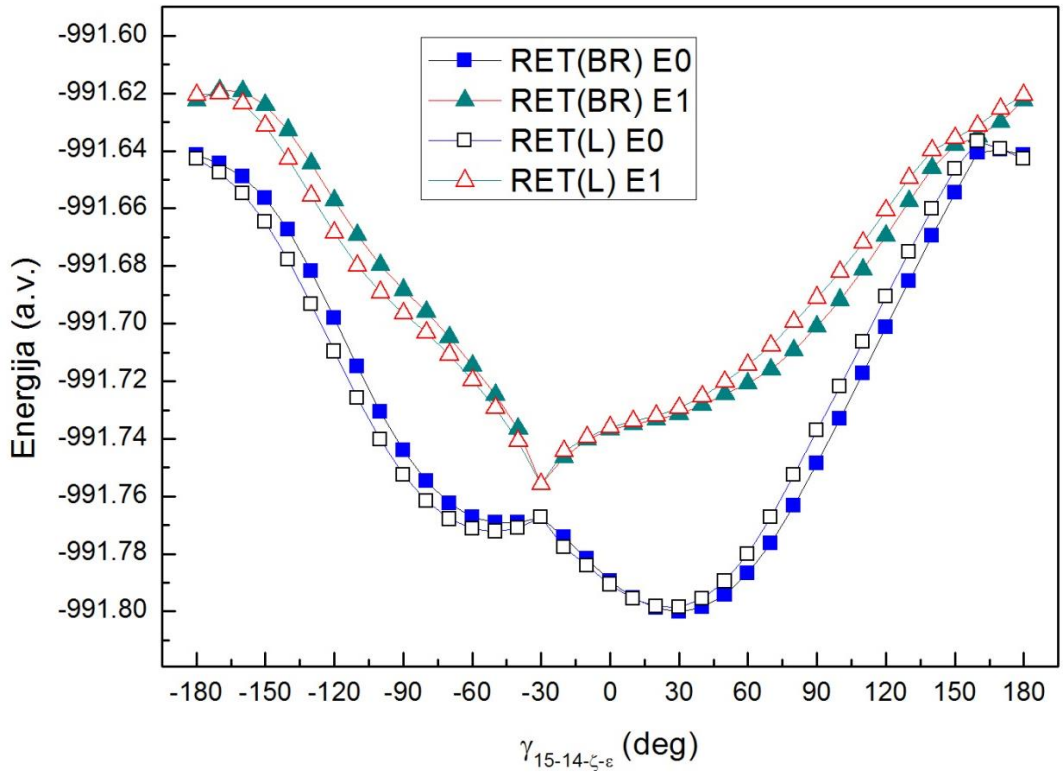


9 pav. BR ir L būsenų retinalio struktūrų su neprotonuota Šifo baze pagrindinių (E0) ir pirmų sužadintų (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ [29].

Pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje, suoptimizuotų BR ir L būsenų retinalių struktūrų energijos paviršiai protonuotos Šifo bazės atveju yra pavaizduoti 10 pav. Po optimizacijos gautos tiek BR, tiek ir L būsenos retinalių struktūros buvo labai artimos BR būsenos retinalio struktūrai iš kristalografinių duomenų, todėl ir gauti energijos paviršiai yra beveik identiški, be to, labai artimi BR būsenos retinalio energijos paviršiui, kai buvo fiksuoti dvisieniai kampai ir protonuota Šifo bazė (žr. 6 arba 8 pav.). Pagrindinėje būsenoje yra vienas minimumas ties 20-30° dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ vertėmis. Pirmojoje sužadintoje būsenoje yra du minimumai ties -60° ir 30° $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ vertėmis. Mažiausios sužadinimo energijos vertės yra ties dvisienio kampo padėtimi $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = -60° ir yra lygios 0,49 eV ir 0,8 eV atitinkamai BR ir L būsenos retinalio struktūroms [29].



10 pav. BR ir L būsenų retinalio struktūrų su protonuota Šifo baze pagrindinių (E0) ir pirmų sužadintų (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ esant baltymo aplinkai [29]



11 pav. BR ir L būsenų retinalio struktūrų su neprotonuota Šifo baze pagrindinių (E0) ir pirmų sužadintų (E1) būsenų energijų priklausomybė nuo dvisienio kampo $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ esant baltymo aplinkai [29]

Pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje, suoptimizuotų BR ir L būsenų retinalių struktūrų energijos paviršiai neprotonuotos Šifo bazės atveju yra pavaizduoti 11 pav. Po optimizacijos gautos tiek BR, tiek ir L būsenos retinalių struktūros buvo artimos L būsenos retinalio struktūrai iš kristalografinių duomenų, todėl ir šiuo atveju gauti energijos paviršiai yra beveik identiški. Pagrindinėje būsenoje yra du energijos minimumai, kurių padėtys atitinka struktūrų su protonuota Šifo baze pirmųjų sužadintųjų būsenų minimumų padėtis, t.y., ties -60° ir 30° $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ vertėmis (plg. su 10 pav.). Pirmojoje sužadintoje būsenoje yra vienas minimumas ties $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = -30° verte. Mažiausia sužadinimo energija yra 0,31 eV ties ta pačia dvisienio kampo verte [29].

Šiuose energijos paviršiuose stebimi pagrindinėse būsenose matomi du minimumai buvo patikrinti optimizuojant BR ir L struktūras su neprotonuota Šifo baze minimalioje baltymo aplinkoje, t.y., paliekant tik anksčiau nustatytas 10 baltymo struktūrinių grupių, turinčių didžiausią įtaką retinalio struktūrai. Šių suoptimizuotos geometrijos retinalio molekulių dvisieniai kampai, apibūdinantys retinalio struktūrą ties aktyviuoju centru (tarp C_{13} - C_{ε} atomų), yra pateikti 3 lentelėje. Lentelėje palyginimui yra įtraukti ir dviejų pradinių (neoptimizuotos geometrijos) struktūrų atitinkami dvisieniai kampai.

3 lentelė. Suoptimizuotos geometrijos retinalio molekulės dvisienių kampų vertės, esant minimaliai baltymo aplinkai

Struktūra/kampas	$\gamma_{11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$	$\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$	$\gamma_{13\text{-}14\text{-}15\text{-}\zeta}$	$\gamma_{14\text{-}15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$	$\gamma_{15\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon\text{-}\delta}$	$\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$
RETH(BR) (neopt.)	177,61	-156,85	178,95	-162,69	-108,58	29,00
RET(BR)	170,69	-151,37	173,55	-171,31	-101,60	16,45
RET(BR) (pasuktas į L)	-179,78	-106,79	172,74	-169,16	-134,08	20,56
RETH(L) (neopt.)	174,41	-107,90	175,81	146,41	-126,62	-56,60
RET(L)	-177,76	-110.86	-175.08	138.21	-95.77	-55.75
RET(L) (pasuktas į BR)	-179,55	-172.81	-176,18	-179,9	-133,53	0,18

Optimizuojant BR struktūrą yra išlaikoma šiai būsenai būdinga struktūra. Dvisienio kampo $\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$ vertė optimizuotoje struktūroje yra -151,37°, o tai yra artima šio kampo vertei BR būsenos kristalografiniuose duomenyse (-156,85°). Dirbtinai pasukus keletą atomų, esančių arti Šifo bazės taip, kad struktūra būtų panaši į L būsenos struktūrą ir pakartojus optimizaciją buvo gauta, kad retinalis negrįžta į ankstesnę *all-trans* konfigūraciją. Gauta struktūra yra panaši į L būsenos struktūrą. Gaunama

ypač artima $\gamma_{12\text{-}13\text{-}14\text{-}15}$ dvisienio kampo vertė, atitinkanti C_{13}=C_{14} dvigubo ryšio posūkio kampą (-106,79° optimizuotoje struktūroje ir -107,90° L būsenos struktūroje iš kristalografinių duomenų).

Analogiškai, optimizuojant L būsenos retinalio struktūrą su neprotonuota Šifo baze minimalioje baltymo aplinkoje yra gaunama, kad išsilaiko L būsenai būdinga struktūra (*13-cis* konfigūracija). Pakartotinai atlikus optimizaciją, prieš tai dirbtinai pasukus atomus į apytiksliai BR būsenai būdingą struktūrą, buvo gauta, kad tokia struktūra taipogi išsilaiko. Tačiau šiuo atveju gauta optimizuota struktūra yra labiau plokščia, negu BR struktūra iš kristalografinių duomenų, ir yra gana artima retinalio struktūrai, optimizuotai be baltymo aplinkos.

Apibendrinant, baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su protonuota Šifo baze yra būdingas tik vienas pagrindinės būsenos energijos minimumas, ties dvisieniu kampu $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = 30° ir du sužadintosios būsenos minimumai, ties $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = 30° ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = -60°. Baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su neprotonuota Šifo baze yra būdingi du pagrindinės būsenos energijos minimumai, ties dvisieniais kampais $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = 30° ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ = -60°. Šį rezultatą patvirtina atliktos optimizacijos - retinalio molekulė su neprotonuota Šifo baze baltymo aplinkoje turi du minimumus, nepriklausomai nuo to, ar naudojami BR ar L būsenos kristalografiniai duomenys.

4.3. Sužadintos būsenos retinalio modeliavimas

Retinalio geometrijos optimizavimo baltymo aplinkoje rezultatai rodo, kad L būsenai būdinga retinalio struktūra yra gaunama tik tuo atveju, kada yra neprotonuota Šifo bazė, nepriklausomai nuo to, ar buvo optimizuojama BR ar L struktūra. Todėl buvo atliktos retinalio sužadintos būsenos geometrijos optimizacijos, siekiant patikrinti, ar po sužadinimo yra deprotonuojama Šifo bazė ir gaunama *13-cis* retinalio konfigūracija.

Atlikus BR būsenos retinalio sužadintos būsenos geometrijos optimizaciją be baltymo aplinkos yra gaunama, jog izomerizacija įvyksta ties retinalio β-jonono žiedu. Žiedo padėtis tampa apytiksliai statmena retinalio polieninei grandinei, t.y., C_6-C_7 ryšio posūkio kampas pakinta nuo 176,3° iki 89,8°. Be to, kaip ir optimizuojant pagrindinę būseną be baltymo aplinkos, polieninė grandinė įgauna visiškai plokščią formą ir BR būsenoje stebimas polieninei grandinei būdingas išlinkimas neišlieka.

Atlikus BR būsenos retinalio sužadintos būsenos geometrijos optimizaciją minimalioje 10-ies aplinkinių baltymo grupių aplinkoje, buvo gauta, kad įvyksta retinalio izomerizacija ties C_{11}=C_{12} dvigubu ryšiu. Šio ryšio posūkio kampas pakinta nuo -163,5° iki 88,6°, be to, susilenkia retinalio

polieninės grandinės dalis, esanti arti β-jonono žiedo. Kadangi pagrindiniai atomų persitvarkymai įvyksta ties pasirinktos minimalios baltymo aplinkos kraštu (β-jonono žiedas ir polieninės grandinės dalis, iki C_{11} atomo yra neapsupti jokių baltymo aplinkos struktūrinių grupių), galima įtarti, kad šis rezultatas yra bent iš dalies nulemtas pasirinktos per mažos baltymo aplinkos.

Skaičiavimus pakartojus paimant pilną pirmo sluoksnio baltymo aplinkos sluoksnį buvo gauta, kad retinalio struktūra beveik nesipakeičia. Stebimi pokyčiai yra minimalūs, pavyzdžiui, C_{13}=C_{14} dvigubo ryšio posūkio vertė pakinta nuo -153,3° iki -150°. Atstumas tarp Šifo bazės azoto atomo ir vandenilio padidėja nuo 1,045 Å iki 1,054 Å.

Skaičiavimus pakartojus pridėjus antrą baltymo aplinkos sluoksnį yra gaunama, kad įvyksta retinalio izomerizacija ties C_{10}-C_{11} ryšiu – posūkio kampas pasikeičia nuo 178,8° iki -96,8°. Tačiau Lys216 grupėje padidėja atstumas tarp dviejų anglies atomų (einančių link Val217 grupės) nuo 1,3 Å iki 1,69 Å ir nutrūksta cheminis ryšys, t.y., nutrūksta baltymo spiralė. Kaip jau buvo minėta 1.4. skyrelyje, kai kurie bakteriorodopsino fotociklo modeliai [5] teigia, kad C ir G spiralių poslinkiai gali būti labai svarbūs inicijuojant protono pernašą iš Šifo bazės į Asp85. Kadangi Lys216 ir Val217 grupės priklauso G spiralei, galima numanyti, kad cheminio ryšio nutraukimas rodo, jog spiralė nori pasislinkti. Todėl tolesniuose sužadintos būsenos geometrijos optimizacijos skaičiavimuose daliai G spiralės grupių, esančių arčiausiai retinalio, buvo taip pat leidžiama optimizuotis.

Atlikus skaičiavimus su pirmo sluoksnio baltymo aplinka ir leidus optimizuotis šiame sluoksnyje esančiai G spiralės daliai (šiuo atveju tai yra tik Lys216 ir Ala215 grupės), gautas rezultatas yra panašus į prieš tai buvusį – įvyko retinalio izomerizacija ties C_{10}-C_{11} ryšiu ir šiuo atveju posūkio kampas pasiekė -98,3° vertę. Tačiau retinalio dalis prie Šifo bazės yra smarkiai deformuota, ir G spiralės dalis atsilenkė gana dideliu kampu. Pakartojus šį skaičiavimą ir papildomai leidus optimizuotis W402 vandens molekulei, gaunama beveik identiška struktūra. Atstumas tarp Šifo bazės vandenilio ir W402 deguonies atomo sumažėjo nežymiai, nuo 1,94 Å iki 1,89 Å.

Atlikus skaičiavimus su dviem baltymo aplinkos sluoksniais ir leidus optimizuotis šiuose sluoksniuose esančiai G spiralės daliai (Leu207, Phe208, Met209, Val210, Leu211, Asp212, Val213, Ser214, Ala215, Lys216, Val217, Gly218, Phe219, Gly220 grupės), gaunama, kad įvyksta reikšmingi pokyčiai G spiralėje. Nutrūksta cheminis ryšys tarp dviejų Ala215 anglies atomų (atstumas tarp jų išauga nuo 1,52 Å iki didesnio nei 2,2 Å), todėl toliau šis skaičiavimas nebuvo tęsiamas. Pakartojus šį skaičiavimą papildomai leidžiant optimizuotis W402 molekulei, gaunamas analogiškas rezultatas. Tuo tarpu atstumas tarp Šifo bazės vandenilio ir W402 pastebimai sumažėjo (iki 1,63 Å).

Atlikus geometrijos optimizacijas pirmo sluoksnio aplinkoje, su išplėsta sritimi netoli aktyvioji centro, be retinalio leidžiant papildomai optimizuotis vienai, dviem arba trims G spiralės grupėms į abi

puses nuo Lys216 grupės, buvo gauta, kad visais trim atvejais rezultatai yra labai panašūs. Retinalis izomerizuojasi ties C_{10}-C_{11} ryšiu, posūkio kampo vertės visais atvejais tarp -99° ir -101°. Baltymo spiralė visais atvejais nutrūksta toje pačioje vietoje – atstumas tarp Lys216 anglies atomų, einančių link Val217 grupės, išauga net iki 3 Å. Skaičiavimų tikslumą toliau padidinus, įtraukiant dalį G spiralės į atskirą DFT sluoksnį (po 1 arba 2 grupes į abi puses nuo Lys216), buvo gaunami analogiški rezultatai.

Apibendrinant, sužadintos būsenos retinalio modeliavimo rezultatai rodo, kad kai yra įtraukiamas pakankamas baltymo aplinkos sluoksnis, sužadintas retinalis yra labiausiai linkęs izomerizuotis ties C_{10}-C_{11} ryšiu, tačiau yra nutraukiama baltymo G spiralė, o to negali būti, lyginant su kristalografiniais duomenimis. Panašu, kad norint gauti *13-cis* konfigūracijos konformerą, kuris yra matomas kristalografiniuose duomenyse, reikalingi skaičiavimai, tiksliau aprašantys artimą baltymo aplinką.

Pagrindiniai rezultatai ir išvados

BR būsenos su protonuota Šifo baze ir L būsenos su neprotonuota Šifo baze struktūra yra nulemta 10-ies artimos baltymo aplinkos struktūrinių elementų - Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 ir W402. Modeliuoti L būsenai su protonuota Šifo baze nepakanka dviejų aplinkos sluoksnių, todėl yra reikalingas didesnis skaičiavimų tikslumas. BR ir L būsenų su protonuota ir neprotonuota Šifo baze optimizacijos rezultatai leidžia manyti, kad L būsenoje jau yra įvykusi protono pernaša į Asp85 grupę ir, kad Šifo bazė yra deprotonuojama netrukus po retinalio sužadinimo šviesa.

Baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su protonuota Šifo baze yra būdingas vienas pagrindinės būsenos energijos minimumas, ties dvisieniu kampu $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir du sužadintosios būsenos minimumai, ties $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$. Baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su neprotonuota Šifo baze yra būdingi du pagrindinės būsenos energijos minimumai, ties dvisieniais kampais $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$. Šiuos minimumus atitinkančios struktūros yra gaunamos optimizuojant retinalio molekulę su neprotonuota Šifo baze minimalioje pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje.

Modeliuojant sužadintą retinalio būseną baltymo aplinkoje, retinalis izomerizuojasi ties C_{10}-C_{11} ryšiu, tačiau reikšmingai pakinta baltymo G spiralė, o to negali būti, lyginant su kristalografiniais duomenimis. Norint gauti *13-cis* konfigūracijos konformerą, kuris yra matomas kristalografiniuose duomenyse, reikalingi detalesni skaičiavimai, tiksliau aprašantys baltymo aplinką.

Literatūra

[1] C. Wickstrand, R. Dods, A. Royant, R. Neutze, „Bacteriorhodopsin: Would the real structural intermediates please stand up?“, Biochimica et Biophysica Acta, Volume 1850, 536-553, (2015).

[2] P. Saeedi, J. M. Moosaabadi, S. S. Sebtahmadi, J. F. Mehrabadi, M. Behmanesh, S. Mekhilef, „Potential applications of bacteriorhodopsin mutants“, Bioengineered, Volume 3:6, 326-328, (2012).

[3] S. Hayashi, I. Ohmine, „Proton Transfer in Bacteriorhodopsin: Structure, Excitation, IR Spectra, and Potential Energy Surface Analyses by an ab Initio QM/MM Method“, J. Phys. Chem., Volume 104, 10678-10691, (2000).

[4] E. Tajkhorshid, J. Baudry, K. Schulten, S. Suhai, "Molecular Dynamics Study of the Nature and Origin of Retinal's Twisted Structure in Bacteriorhodopsin", Biophysical Journal, Volume 78, 683–693, (2000).

[5] J. K. Lanyi, "Bacteriorhodopsin", Annual Review of Physiology, Volume 66, 665-688, (2004).

[6] J. K. Lanyi, B.Schobert, "Structural Changes in the L Photointermediate of Bacteriorhodopsin", J Mol Biol., Volume 365(5), 1379–1392, (2007).

[7] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, "Molecular Dynamics Simulation of Bacteriorhodopsin's Photoisomerization Using Ab Initio Forces for the Excited Chromophore", Biophysical Journal, Volume 85, 1440–1449, (2003).

[8] Belrhali, H., P. Nollert, A. Royant, C. Menzel, J.P. Rosenbusch, E.M. Landau, E.Pebay-Peyroula: Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution“, Structure Fold Des, Volume 7 (8), 909-917, (1999)

[9] H. Luecke, B. Schobert, H.T. Richter, J.P. Cartailler, J.K. Lanyi, „Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution“, J Mol Biol, Volume 291 (4), 899-911, (1999).

[10] B. W. Edmonds, H. Luecke, "Atomic resolution structures and the mechanism of ion pumping in bacteriorhodopsin", Frontiers in Bioscience, Volume 9, 1556-1566, (2004).

[11] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, "Structural Changes during the Formation of Early Intermediates in the Bacteriorhodopsin Photocycle", Biophysical Journal, Volume 83, 1281–1297, (2002).

[12] Y. Koyama, K. Kubo, M. Komori, H. Yasuda, Y. Mukai, „Effect of protonation on the isomerization properties of n-butylamine Schiff base of isomeric retinal as revealed by direct HPLC analyses: selection of isomerization pathways by retinal proteins“, Photochem. Photobiol, Volume 54, 433-443, (1991).

[13] R. R. Birge, „Nature of the primary photochemical event in rhodopsin and bacteriorhodopsin“, Biochim. Biophys. Acta, Volume 1016, 293–327, (1990).

[14] K. Edman, P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula et al., „High resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle“, Nature, Volume 401, 822–26, (1999).

[15] B. Schobert, J. Cupp-Vickery, V. Hornak, S. Smith, J.K. Lanyi, „Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal, J.Mol. Biol, Volume 321, 715–26, (2002).

[16] A. Royant, K. Edman, T. Ursby, E. Pebay-Peyroula, E.M. Landau, R. Neutze, „Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin“, Nature, Volume 406, 645–48, (2000).

[17] J. K. Lanyi, B. Schobert, „Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M1, M2, and M2‘ intermediates of the photocycle“, J. Mol. Biol., Volume 328, 439–50, (2003).

[18] T. Kouyama, T. Nishikawa, T. Tokuhisa, H. Okumura, „Crystal structure of the L intermediate of bacteriorhodopsin: evidence for vertical translocation of a water molecule during the proton pumping cycle“, J Mol Biol, Volume 335, 531–546, (2004).

[19] A. Bondar, M. Elstner, S. Suhai, J. C. Smith, S. Fische, “Mechanism of Primary Proton Transfer in Bacteriorhodopsin”, Structure, Volume 12, 1281–1288, (2004).

[20] H. Kandori, “Hydration switch model for the proton transfer in the Schiff base region of bacteriorhodopsin”, Biochimica et Biophysica Acta, Volume 1658, 72-79, (2004).

[21] H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, A. Rosengarth, R. Needleman, J. K. Lanyi, „Coupling photoisomerization of the retinal in bacteriorhodopsin to directional transport, „J. Mol. Biol., Volume 300, 1237–55, (2000).

[22] B. Schobert, L. S. Brown, J. K. Lanyi, „Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp96 and the retinal Schiff base“, J. Mol. Biol, Volume 330, 553–70, (2003).

[23] T. Hirai, S. Subramaniam, “Structural insights into the mechanism of proton pumping by bacteriorhodopsin”, FEBS Letters, Volume 545, 2-8, (2003).

[24] M. Mačernis, „Aplinkos poveikis fotoindukuotiems reiškiniams organinėse molekulėse“, daktaro disertacija, (2011).

[25] N. M. Harrison, „An Introduction to Density Functional Theory“, paskaitų konspektas, (2006).

[26] L. W. Chung et al, „The ONIOM Method and Its Applications“, Chem. Rev., Volume 115 (12), 5678–5796, (2015).

[27] http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1c3w

[28] http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2NTW

[29] K. Jasinevičius, „Retinalio molekulės struktūros ir spektrų modeliavimas pradiniame bakteriorodopsino fotocikle“, pagrindinių studijų kursinis darbas, (2017).

Summary

Karolis Jasinevičius

MODELING RETINAL MOLECULE STRUCTURE FOR THE PRIMARY PHOTOCYCLE OF BACTERIORHODOPSIN

Bacteriorhodopsin is the simplest known light driven proton pump. It was discovered almost four decades ago in the purple membrane of *Halobacterium salinarum.* The protein consists of seven transmembrane helices, A through G. It contains a chromophore *all-trans* retinal which is covalently bounded to Lys216 via a protonated Schiff base linkage. Photoexcitation of the chromophore initiates a photocycle which involves several intermediate states labeled as J, K, L, M, N, and O. After the O state it returns to the initial bR state.

There are eighty four X-ray diffraction, six electron diffraction and three NMR structures of bacteriorhodopsin deposited in the protein data bank. The general features of the proton transport mechanism are now understood. However, there are some difficulties getting a more detailed understanding of the mechanism. First, there are some significant differences in the x-ray diffraction structures of the early intermediates of the photocycle. Secondly, it is difficult to model these large molecular systems like retinal in bacteriorhodopsin with high accuracy. Nowadays some quantum chemistry methods, such as density functional theory (DFT), along with the use of supercomputer resources, allow modeling of large molecular structures and proteins

The aim of this work is to use DFT methods to model the retinal molecule structures for the ground and excited states in the primary photocycle in bacteriorhodopsin by taking into account the influence of the protein environment to these structures. Finally, to calculate energy surfaces for them.

Using DFT method with B3LYP functional and cc-pVTZ basis set, we optimized the structures of retinal in BR and L states which were obtained from the x-ray crystallography data. The structures were optimized using ONIOM method where protein environment was in different layers. The protein was modeled with semi-empirical PM6 method. Energy surfaces were calculated. Using TD-DFT method with B3LYP functional and cc-pVDZ basis set, we modeled the structure of excited state retinal also.

Conclusions of our work:

- The structures of BR state retinal with protonated Schiff base and L state retinal with deprotonated Schiff base are determined by 10 residues from the close environment of the protein: Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 and the water molecule W402. First and second layers of protein residues are insufficient for modeling the ground state minimum of L state retinal with protonated Schiff base. From the calculations with the protonated and deprotonated Schiff base we can suspect, that in the L state of the photocycle the proton transfer to Asp85 has already happened and that Schiff base loses its proton shortly after photoexcitation of retinal chromophore.
- There is one minimum of the ground state energy in optimized BR and L states with the protonated Schiff base. The dihedral angle $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon}$ value is 30° for the ground state minimum and dihedral angle values are $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ and $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$ for the two minima in the first excited state. There are two minima in the ground state energy for BR and L states retinal with the deprotonated Schiff base: the dihedral angle values are $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ and $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$. The structures, corresponding to these minima are successfully obtained by performing optimizations of retinal with deprotonated Schiff base in the minimal first layers of the protein residues.
- Retinal molecule isomerizes around the C_{10}-C_{11} bond during optimizations of the excited state structure with the protein environment, however chemical bonds break in helix G. Calculations with more precise description of the protein environment need to be done, in order to get good agreement with experimental data.

Santrauka

Karolis Jasinevičius

PRADINIŲ BAKTERIORODOPSINO FOTOCIKLO BŪSENŲ RETINALIO MOLEKULĖS MODELIAVIMAS

Bakteriorodopsino baltymas yra paprasčiausia iš visų žinomų šviesa varomų protonų pompų, kuri buvo aptikta prieš beveik keturis dešimtmečius *Halobacterium salinarum* bakterijų purpurinėse membranose. Bakteriorodopsino baltymą sudaro septynios transmembraninės spiralės, žymimos raidėmis A-G, tarp kurių yra chromoforas – retinalio molekulė, kovalentiškai susijungusi su lizino (Lys216) grupe per protonuotą Šifo bazę. Chromoforo sužadinimas šviesa inicijuoja fotociklą, kuris apima kelias tarpines būsenas, žymimas raidėmis J, K, L, M, N ir O, po kurių bakteriorodopsinas grįžta į pradinę BR būseną.

Baltymų Duomenų Banke (PDB) šiuo metu yra 84 rentgeno spindulių difrakcijos, 6 elektronų difrakcijos ir 3 NMR bakteriorodopsino struktūros. Šių struktūrų dėka, pagrindinės protono pernašos mechanizmo savybės yra gerai žinomos. Tačiau yra keletas iššūkių, dėl kurių yra sudėtinga detalizuoti protono pernašos mechanizmą. Visų pirma, iš rentgeno kristalografijos duomenų turimos ankstyvųjų fotociklo būsenų struktūros turi reikšmingų skirtumų. Antra, yra sudėtinga dideliu tikslumu modeliuoti tokias dideles molekulines sistemas, kaip retinalis bakteriorodopsino baltyme. Tačiau tokie kvantinės chemijos metodai, kaip tankio funkcionalo teorija (DFT), panaudojant superkompiuterių resursus, šiuo metu leidžia modeliuoti ir dideles molekulines struktūras.

Todėl šio darbo tikslas yra naudojantis DFT metodika sumodeliuoti retinalio molekulės pagrindinės ir sužadintos būsenų struktūras pradiniame bakteriorodopsino fotocikle, nustatyti baltymo aplinkos įtaką šioms struktūroms ir suskaičiuoti jų energijos paviršius.

Panaudojant DFT metodiką su B3LYP funkcionalu ir cc-pVTZ bazinių funkcijų rinkiniu, buvo suoptimizuotos iš rentgeno kristalografijos gautos BR ir L būsenų retinalio struktūros. Panaudojant ONIOM metodą tos pačios struktūros buvo suoptimizuotos pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje, aplinkos aprašymui naudojant pusempirę PM6 metodiką. Optimizuotoms struktūroms buvo paskaičiuoti energijos paviršiai. Naudojant TD-DFT metodiką su B3LYP funkcionalu ir cc-pVDZ bazinių funkcijų rinkiniu, buvo modeliuojama sužadintos būsenos retinalio struktūra.

Šio darbo išvados:

- BR būsenos su protonuota Šifo baze ir L būsenos su neprotonuota Šifo baze struktūra yra nulemta 10-ies artimos baltymo aplinkos struktūrinių elementų - Val49, Asp85, Trp86, Thr89, Thr90, Leu93, Tyr185, Asp212, Ala215 ir W402. Modeliuoti L būsenai su protonuota Šifo baze nepakanka dviejų aplinkos sluoksnių, todėl yra reikalingas didesnis skaičiavimų tikslumas. BR ir L būsenų su protonuota ir neprotonuota Šifo baze optimizacijos rezultatai leidžia manyti, kad L būsenoje jau yra įvykusi protono pernaša į Asp85 grupę ir, kad Šifo bazė yra deprotonuojama netrukus po retinalio sužadinimo šviesa.
- Baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su protonuota Šifo baze yra būdingas vienas pagrindinės būsenos energijos minimumas, ties dvisieniu kampu $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir du sužadintosios būsenos minimumai, ties $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$. Baltymo aplinkoje optimizuotiems BR ir L būsenų retinaliams su neprotonuota Šifo baze yra būdingi du pagrindinės būsenos energijos minimumai, ties dvisieniais kampais $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = 30°$ ir $\gamma_{15\text{-}14\text{-}\zeta\text{-}\varepsilon} = -60°$. Šiuos minimumus atitinkančios struktūros yra gaunamos optimizuojant retinalio molekulę su neprotonuota Šifo baze minimalioje pirmo sluoksnio baltymo aplinkoje.
- Modeliuojant sužadintą retinalio būseną baltymo aplinkoje, retinalis izomerizuojasi ties C_{10}-C_{11} ryšiu, tačiau reikšmingai pakinta baltymo G spiralė, o to negali būti, lyginant su kristalografiniais duomenimis. Norint gauti *13-cis* konfigūracijos konformerą, kuris yra matomas kristalografiniuose duomenyse, reikalingi detalesni skaičiavimai, tiksliau aprašantys baltymo aplinką.