



## การศึกษากระบวนการสลับเคาน์เตอร์ไอออนในโรดอปซินด้วยแบบจำลอง QM/MM

### Study of counterion switch in rhodopsin using hybrid QM/MM simulations

ชุตินธร พันธุ์วงศ์

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

\*E-mail: chutintorn@gmail.com

#### บทคัดย่อ

โรดอปซิน คือ โปรตีนบนชั้นเมมเบรนของเรตินาที่ทำหน้าที่ในการรับแสงสำหรับกระบวนการมองเห็นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมี retinal protonated Schiff base (RPSB) ที่มีประจุ +1 เป็นตัวทำปฏิกิริยาต่อแสงโดยตรงผ่านการเปลี่ยนโครงสร้างจาก 11-cis เป็น all-trans ซึ่งการเปลี่ยนโครงสร้างของ RPSB จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไปตามลำดับจนสิ้นสุดการส่งสัญญาณการมองเห็น และหนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญ คือ การถ่ายโอนโปรตอนจาก RPSB ไปให้เคาน์เตอร์ไอออนที่มีประจุ -1 ซึ่งยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าจะเป็นกรดกลูตามิกลำดับที่ 113 (E113) หรือลำดับที่ 181 (E181) ทั้งนี้จากการศึกษาโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม พบว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการสลับเคาน์เตอร์ไอออนจาก E113 ในสถานะพื้น ไปเป็น E181 ในสถานะ metarhodopsin I ในงานนี้จึงทำการศึกษาถึงกลไกการสลับเคาน์เตอร์ไอออนดังกล่าวโดยคำนวณค่าพลังงานของพลังงานอิสระในการรับโปรตอนของ E113 และการเสียโปรตอนของ E181 ด้วยแบบจำลองที่ใช้การผสมผสานระหว่างกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์ดั้งเดิม (QM/MM) จากผลการศึกษาพบว่าในกระบวนการสลับเคาน์เตอร์ไอออนนั้น จะมีความเป็นไปได้มากกว่าที่จะเริ่มจากการรับโปรตอนของ E113 แทนที่จะเริ่มด้วยการเสียโปรตอนของ E181 อันเป็นผลมาจากอันตรกิริยาต่อคู่ตัวให้หรือตัวรับโปรตอนที่ต่างกันของกรดกลูตามิกทั้งสอง

**คำสำคัญ:** โรดอปซิน การถ่ายโอนโปรตอน เคาน์เตอร์ไอออน การจำลองเชิงโมเลกุล

Received: September 25, 2017

Revised: December 09, 2017

Accepted: December 09, 2017

### Abstract

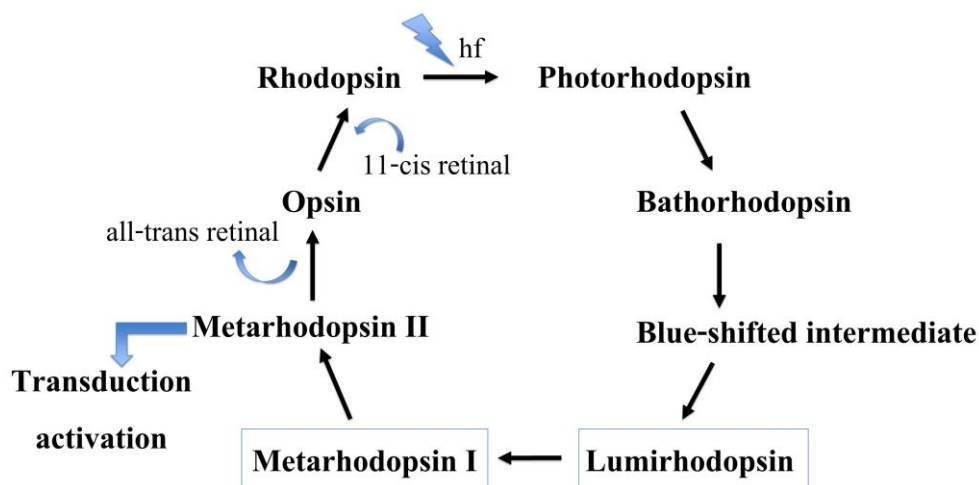
Rhodopsin, a membrane protein on a retina, is responsible for visual perception in vertebrates. Rhodopsin contains retinal protonated Schiff base or RPSB (+1 charged) which undergoes isomerization from 11-cis to all-trans upon photo-excitation. The isomerization of RPSB induces changes in protein structure to complete the visual signaling. One of the important steps is a proton transfer from RPSB to its counterion (-1 charged). It is still not clear whether the 113<sup>th</sup> glutamic acid (E113) or E181 is a proton acceptor from RPSB. However, many various studies have speculated a high possibility of counterion switch process from E113 (on a ground state) to E181 (on metarhodopsin I state). In this work, the detailed study of counterion switch is performed. The quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) simulations are employed to obtain the free energy barriers for protonation of E113 and deprotonation of E181. It was found that protonation of E113 is more likely to occur than deprotonation of E181 due to different counterparts of their proton donor or acceptor.

**Keywords:** rhodopsin, proton transfer, counterion, molecular simulation

### 1. บทนำ

โรดอปซิน (Rhodopsin) เป็นโปรตีนในชั้นเมมเบรนของเรตินาที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับแสงในกระบวนการมองเห็นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งโรดอปซินนี้จัดอยู่ในประเภท G protein-coupled

receptor (GPCR) โดย 11-cis retinal protonated Schiff base (RPSB) เป็นโมเลกุลในโรดอปซินที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับแสงที่มากกระตุ้น โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerization) จาก 11-cis ไปเป็น all-trans

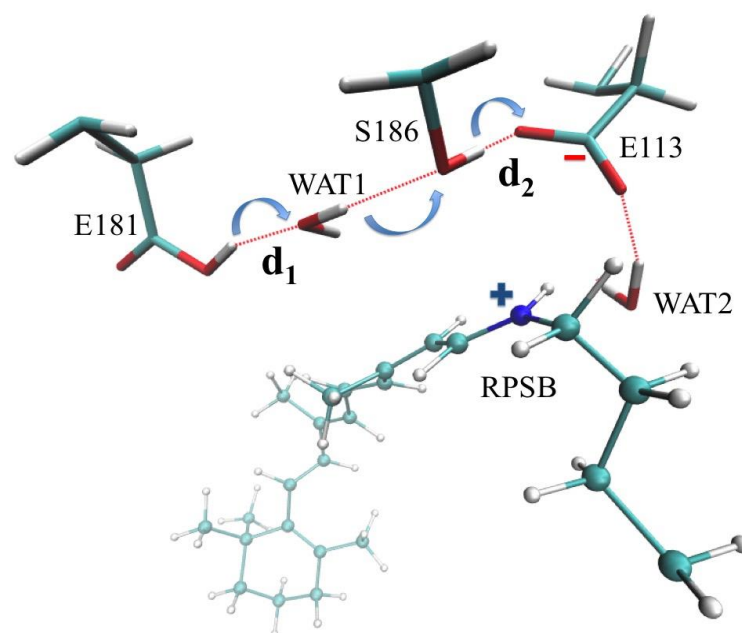


รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของโรดอปซินในกระบวนการมองเห็น

การไอโซเมอไรเซชันนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนไปตามลำดับ [1, 2] ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 1 เมื่อโรดอปซิน เปลี่ยนไปจนถึงสถานะ metarhodopsin II (meta II) มันจะจับกับโปรตีน G ชื่อว่า ทรานสดิวซิน (transducin) และกระตุ้นให้ทรานสดิวซิน มีสภาพพร้อมเพื่อกระบวนการมองเห็นในที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการกระตุ้น (activation) โปรตีนทรานสดิวซิน นับเป็นขั้นตอนสำคัญของกลไกการทำงานของโรดอปซิน

กลไกการทำงานของโรดอปซินได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง [1-14] แต่มีประเด็นหนึ่งที่ยังเป็นที่ถกเถียงกันคือ สถานะการมีโปรตอน (protonation state) ของกรดอะมิโนลำดับที่ 181 ของโปรตีนโรดอปซินซึ่งก็คือ กรดกลูตามิก-181 (E181)

โดยกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มเชื่อว่า E181 มีบทบาทสำคัญต่อปฏิกิริยากับแสงของโรดอปซิน [1, 2, 6, 11, 15] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนของการเปลี่ยนจากสถานะ meta I เป็น meta II ซึ่งในขั้นตอนนี้ RPSB จะเสียโปรตอนให้แก่กรดอะมิโนที่อยู่รอบ ๆ ที่สำคัญเป็นลำดับไป เช่น เคาน์เตอร์ไอออน (counterion) ที่ลำดับ 113 (E113) และ E181 ทั้งนี้จากการศึกษาด้วย UV-VIS spectroscopy [6] และ resonance Raman vibrational spectra [1] พบว่า E181 ในสถานะพื้นของโรดอปซินจะมีสภาพเป็นกลาง นั่นคือมีโปรตอน (protonated) ที่หมู่ฟังก์ชันของกรดกลูตามิก และจากการศึกษากระบวนการไอโซเมอไรเซชันด้วยแบบจำลองทางไดนามิกส์ พบว่าแบบจำลองจะให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองเมื่อ E181 มีสถานะเป็นกลาง [16] นอกจากนี้ Yan และคณะก็ได้



**รูปที่ 2** กลไกการถ่ายโอนโปรตอนในโรดอปซินบนสถานะ lumirhodopsin ซึ่งเป็นโครงสร้างจาก X-ray crystallography รหัส PDB: 2HPY โดยถูกสกัดแทนทิศทางการถ่ายโอนโปรตอน และเส้นประสีแดงแทนพันธะไฮโดรเจน ระยะ  $d_1$  และ  $d_2$  คือความยาวพันธะไฮโดรเจนจาก E181 ไปยัง น้ำ WAT1 และ จาก S186 ไปยัง E113 ตามลำดับ เครื่องหมาย + และ - แสดงประจุของโมเลกุลนั้น ๆ ซึ่งสีเขียว สีแดง สีน้ำเงิน และสีขาว หมายถึง คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และ ไฮโดรเจน ตามลำดับ

ทำการศึกษาอิทธิพลของสภาวะการมีโปรตอนของ E181 ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี และเสนอ กลไกการสลับเคาน์เตอร์ไอออนจาก E113 ในสถานะพื้น มาเป็น E181 ในสถานะ meta I [1] ซึ่งในกระบวนการสลับเคาน์เตอร์ไอออนนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนถ่ายโปรตอนจาก E181 สู่ E113 ดังที่กลุ่มวิจัยเดียวกันนี้เสนอไว้ โดยแสดงในรูปที่ 2 ทั้งนี้ สิ่งที่ยังไม่ชัดเจนคือ การถ่ายโอนโปรตอนดังกล่าวเริ่มจากการให้โปรตอนจาก E181 ไปยังน้ำ WAT1 (ระยะ  $d_1$  ลดลง) หรือ เริ่มจากการที่ E113 ดึงโปรตอนจาก S186 (ระยะ  $d_2$  ลดลง) ซึ่งจุดประสงค์หลักของงานนี้คือ การหาคำตอบดังกล่าว

กลไกการถ่ายโอนโปรตอนนั้น เกิดขึ้นในระดับอะตอมซึ่งวิธีการและเทคนิคการทดลองในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในการศึกษาปรากฏการณ์ไดนามิกส์ในระดับเล็กขนาดนาโนเมตรถึงอังสตรอม ( $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  m) ดังนั้นการทำแบบจำลอง (simulation) จึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง โดยมีข้อดีคือสามารถให้ข้อมูลว่าแต่ละอะตอมในโมเลกุลมีการเปลี่ยนแปลงหรือเคลื่อนที่อย่างไร และมีอันตรกิริยากับสิ่งแวดล้อมเช่นไร ทำให้การอธิบายปรากฏการณ์ที่เราสนใจสามารถทำได้ดียิ่งขึ้น โดยในการศึกษานี้จะใช้ระเบียบวิธีทาง QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) [17] มาใช้ในการศึกษากระบวนการถ่ายโอนโปรตอนในโรดอปซินในช่วงการเปลี่ยนแปลงจาก lumirhodopsin เป็น meta I

การถ่ายโอนโปรตอนเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทำลายและสร้างพันธะ ซึ่งต้องอาศัยกลศาสตร์ควอนตัม (QM) เข้ามาอธิบาย แต่อย่างไรก็ตามระเบียบวิธีทางควอนตัมเป็นระเบียบวิธีที่ซับซ้อนและต้องใช้เวลาในการคำนวณนาน วิธีนี้จึงเหมาะกับระบบเล็ก ๆ ที่มีจำนวนอะตอม 10-20

อะตอมเท่านั้น ทั้งนี้อันตรกิริยากับสิ่งแวดล้อมของโมเลกุลที่สนใจก็เป็นสิ่งที่ละเลยไม่ได้จึงต้องนำมาพิจารณาด้วย แต่สิ่งแวดล้อมเหล่านี้สามารถใช้ระเบียบวิธีที่ซับซ้อนน้อยกว่า และคำนวณได้เร็วกว่า QM ได้ เช่น Molecular Mechanics (MM) ซึ่งอาศัยกลศาสตร์ดั้งเดิม และนี่คือที่มาของระเบียบวิธี QM/MM ที่แบ่งระบบที่สนใจออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนของ QM ที่เกิดปรากฏการณ์เชิงควอนตัม และ ส่วนของ MM สำหรับสิ่งแวดล้อมที่สามารถใช้กลศาสตร์ดั้งเดิมมาอธิบายได้ ทำยสุดแล้วการจำลองเหตุการณ์นี้จึงถือว่าน่าปัจจัยต่างๆ มาคำนวณได้อย่างครอบคลุม โดยในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการศึกษาพลังงานอิสระ (free energy) ของกระบวนการถ่ายโอนโปรตอนในโรดอปซิน เพื่อทดสอบกลไกการสลับเคาน์เตอร์ไอออนที่ได้รับการเสนอขึ้นมาจาก Yan และคณะ [1] และทดสอบข้อเสนอนี้จากหลายการทดลอง [1, 18] เกี่ยวกับการเป็นเคาน์เตอร์ไอออนหลัก (primary counterion) ของ E181 ในช่วง meta I

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1. ระเบียบวิธีที่ใช้การผสมผสานระหว่างกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์ดั้งเดิม หรือ Hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM method)

สำหรับการศึกษานี้ ทำแบบจำลองเชิงโมเลกุลโดยใช้ระเบียบวิธี QM/MM ซึ่งถูกคิดค้นโดย Warshel และ Levitt [17] โดยมีหลักการคือจะใช้ QM คำนวณในส่วนที่เกิดปรากฏการณ์เชิงควอนตัมของระบบซึ่งในที่นี้ คือ กระบวนการถ่ายโอนโปรตอนระหว่างกลุ่มต่าง ๆ ในโรดอปซิน ซึ่งประกอบด้วย RPSB และหมู่ฟังก์ชัน หรือ side-chain ของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ

ถ่ายโอนโปรตอน ประกอบด้วย E113 E181 และ S186 (โดย E แทนกรดกลูตามิก และ S แทนซีรีน) รวมทั้งน้ำ 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 2 และส่วนที่เหลือของระบบจะถูกคำนวณโดยใช้ MM การจำลองเชิงโมเลกุลจะเริ่มต้นด้วยโครงสร้าง X-ray crystal structure ที่มีรหัส Protein Data Bank (PDB) คือ 2HPY ซึ่งเป็นโครงสร้างของโรดอปซินในสถานะ lumirhodopsin [19] นั่นคือ RPSB ในสถานะนี้จะผ่านการไอโซเมอไรเซชันจาก 11-cis ไปเป็น all-trans เพื่อจะเข้าสู่กระบวนการถ่ายโอนโปรตอนต่อไป

การคำนวณในส่วน ของ QM จะใช้ระเบียบวิธี semiempirical method ที่มีการพิจารณาพฤติกรรมของอิเล็กตรอนในหลายรูปแบบ (multiple configuration) โดยอาศัยวิธี floating occupation molecular orbital configuration interaction, FOMO-CI [20] เพื่อเป็นการอธิบายให้ครอบคลุมถึงปรากฏการณ์สร้างและทำลายพันธะในกระบวนการถ่ายโอนโปรตอน โดยใช้ระเบียบวิธีที่เกี่ยวข้องกับ multiple configuration หรือ การเพิ่มรูปแบบการจัดเรียงอิเล็กตรอนในสถานะต่าง ๆ เพื่อให้ได้ค่าพลังงานที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดย wave function ที่ใช้จะเกิดจากการพิจารณา รูปแบบทั้งหมดของการจัดอิเล็กตรอน 6 ตัวใน 6 ออร์บิทัล ในสถานะ singlet ทั้งนี้ electron occupation ในแต่ละออร์บิทัลทั้งหมดนี้จะมีค่าได้ตั้งแต่ 0 ถึง 2 แต่มี spin multiplicity รวมเป็น 1 โดยรูปแบบการจัดเรียงอิเล็กตรอนทั้งหมด คือ 400 แบบ ซึ่งโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณ คือ โปรแกรม MOPAC2000 [21] ที่ได้รับการปรับปรุงระเบียบวิธี FOMO-CI [20] ลงไป และใช้พารามิเตอร์ที่ได้รับการปรับปรุงใหม่เพื่อให้เหมาะกับไดนามิกส์ของ RPSB [22]

การคำนวณในส่วน ของ MM จะอาศัยระเบียบวิธีที่ใช้กลศาสตร์ดั้งเดิมที่พิจารณาให้แต่ละอะตอมในโมเลกุลเปรียบเสมือนลูกบอลที่มีประจุ (ไม่จำเป็นต้องเป็นจำนวนเต็มเท่าของประจุอิเล็กตรอนe) และเชื่อมกันด้วยพันธะที่เปรียบเสมือนสปริง ซึ่งพลังงานที่เกิดขึ้นจะคำนวณได้จากเซตของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสั่นในแบบต่าง ๆ ของโมเลกุล รวมทั้งอันตรกิริยาทางไฟฟ้า และแรง van der Waal ซึ่งในงานนี้จะใช้เซตของพารามิเตอร์ AMBER [23] โดยกรดอะมิโนที่เป็นกรดและเบส จะมี protonation state ตามปกติที่ pH 7 ยกเว้น D83 และ E122 ที่จะมีประจุเป็นกลางตามที่ปรากฏจากการทดลองด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) [3] รวมทั้ง E181 ที่มีประจุเป็นกลางเนื่องจากการเติมโปรตอนตามสมมติฐานของ Yan และคณะ [1]

โครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวจะได้รับการอัปเดตใหม่ซ้ำๆ เพื่อให้ได้โครงสร้างที่มีพลังงานต่ำที่สุด อันจะแสดงถึงความเสถียร และนำไปใช้สำหรับเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองเชิงไดนามิกส์ต่อไป ซึ่งการคำนวณพลังงานจะอาศัยระเบียบวิธี QM/MM ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะทำการเปลี่ยนโครงสร้างแบบสุ่ม แล้วคำนวณพลังงานไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงจุดที่เกรเดียนท์ของพลังงานเข้าใกล้ศูนย์ (ซึ่งมีการกำหนด threshold เป็น 0.2 kcal/mol/Å)

## 2.2 Umbrella Sampling

ความสูงของกำแพงศักย์ (energy barrier) ของค่าพลังงานอิสระ (free energy) จะสามารถบอกความเร็วหรือความยากง่ายในการเกิดปรากฏการณ์เชิงไดนามิกส์ได้ โดยการคำนวณค่าพลังงานงานอิสระ (free energy) จะต้องอาศัยการแจกแจงความ

น่าจะเป็น (probability distribution) หรือ ความถี่ของการปรากฏบน phase space ที่ได้จากการทำแบบจำลองเชิงไดนามิกส์ของโมเลกุล (molecular dynamics) ซึ่งในบางกรณีโมเลกุลจะไม่สามารถปรากฏในทุกบริเวณที่เราสนใจบน phase space โดยเฉพาะบริเวณที่มีพลังงานศักย์สูง เนื่องจากระบบไม่มีพลังงานมากพอ ทำให้ไม่สามารถหา probability distribution ในส่วนนั้นได้ จึงต้องมีการบังคับให้โมเลกุลไปปรากฏอยู่ทุกบริเวณของช่วง reaction coordinate ที่เราสนใจด้วยระเบียบวิธี umbrella sampling [24] ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสุ่มตัวอย่างใน phase space โดยจะเพิ่มพลังงานศักย์พิเศษที่เรียกว่า umbrella potential (เป็นฟังก์ชันเดียวกันกับศักย์ของฮาร์โมนิกออสซิลเลเตอร์) เข้าไปรวมกับพลังงานศักย์อื่น ๆ ของระบบ ( $V_0$ ) ดังสมการ (1)

$$\begin{aligned} V(R, X_r) &= V_0 + U(X_r) \\ &= V_0 + k(X_r - X_0)^2 \end{aligned} \quad (1)$$

เมื่อ  $U$  = umbrella potential;  $V_0$  = พลังงานศักย์;  $R$  = nuclear coordinate ของระบบ;  $X_r$  = reaction coordinate ซึ่งในที่นี้คือ  $d_1$  และ  $d_2$  ดังแสดงในรูปที่ 2;  $X_0$  = reaction coordinate บังคับ; และ  $k$  = force constant (ค่าคงที่ของแรง)

ในระเบียบวิธี umbrella sampling จะมีการแบ่งช่วงของ reaction coordinates ที่สนใจออกเป็นช่วงย่อย ๆ ซึ่งในงานนี้คือ 12 ช่วง สำหรับทั้ง  $d_1$  และ  $d_2$  ซึ่งจุดศูนย์กลาง หรือ reaction coordinate บังคับ ( $d_{01}$  และ  $d_{02}$ ) ของ umbrella potential จะอยู่ที่ 0.8, 0.9, ..., 1.9 Å โดยมีค่าคงที่ของแรง  $k = 150$  kcal/mol ทั้งกรณี  $d_1$  และ  $d_2$  หลังจากนั้นจะทำการจำลองเชิงไดนามิกส์ในแต่ละช่วงย่อย ด้วยระเบียบวิธี full multiple spawning (FMS) [25, 26] เพื่อทำการจำลองสถานการณ์การถ่ายโอนโปรตอนของ

โรคอปซินที่อยู่ภายใต้ umbrella potential อันจะนำไปสู่การคำนวณพลังงานอิสระ และ free energy barrier ในที่สุด ซึ่งเส้นทางของเปลี่ยนแปลงตามเวลาของการจำลองเชิงไดนามิกส์จะอยู่ภายใต้อิทธิพลของพลังงานศักย์ QM/MM ที่บรรยายข้างต้น รวมกับอิทธิพลของ umbrella potential

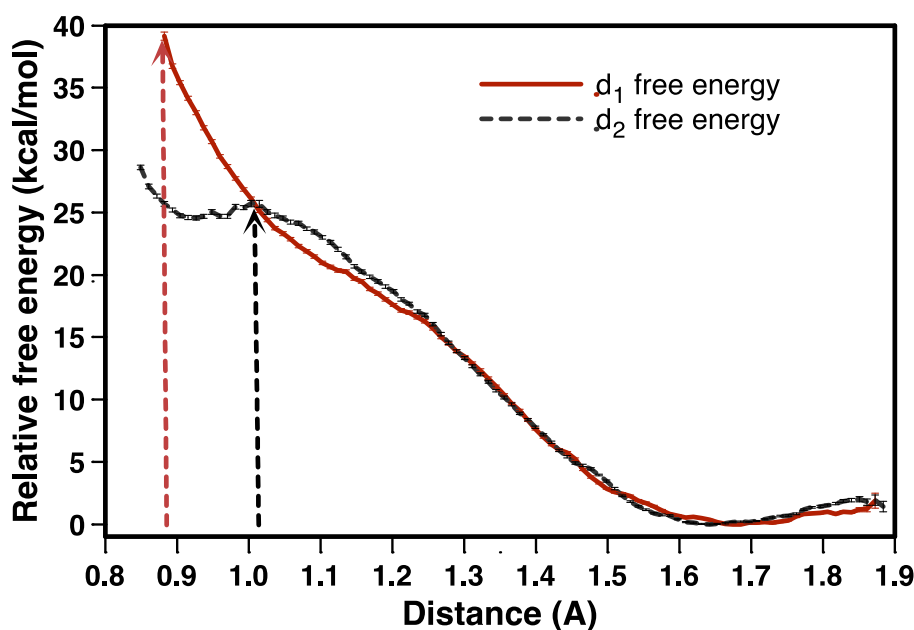
หลังจากการจำลองเชิงไดนามิกส์ จะทำการกำจัดผลของ umbrella potential เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงานอิสระที่แท้จริง หรือเรียกว่า unbiased free energy โดยใช้วิธี Weighted Histogram Analysis Method หรือ WHAM [27] จากโปรแกรมซึ่งพัฒนาโดย Grossfield, A. ซึ่งตั้งอยู่บนหลักการที่ว่า ค่าพลังงานอิสระที่แท้จริง,  $\Delta F(\xi_r)$  นี้ จะคำนวณได้จากค่าลบของลอการิทึมธรรมชาติ (natural logarithm) ของ unbiased probability distribution หรือ  $P(\xi_r)$  ดังสมการ (2)

$$\begin{aligned} \Delta F(\xi_r) &\propto -k_B T \ln[P(\xi_r)] \\ &\approx -\frac{2}{3N} \langle E_{kinetic} \rangle \ln[P(\xi_r)] \end{aligned} \quad (2)$$

เมื่อ  $\langle E_{kinetic} \rangle$  = พลังงานจลน์เฉลี่ย;  $N$  = จำนวนอะตอมในระบบ;  $k_B$  = Boltzmann constant; และ  $T$  คืออุณหภูมิของระบบ ซึ่งในงานนี้ คือ 298 K

### 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการจำลองเชิงไดนามิกส์ด้วย umbrella sampling สำหรับความยาวพันธะไฮโดรเจน OH...H ซึ่งคือ ระยะ  $d_1$  (วัดจาก E181 ไปยังน้ำ WAT1) และระยะ  $d_2$  (วัดจาก S186 ไปยัง E113) จะนำไปสู่การคำนวณค่าพลังงานอิสระ ได้ผลดังรูปที่ 3 ซึ่งจะเห็นว่าทั้งระยะ  $d_1$  และ  $d_2$  มี จุดต่ำสุดที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 1.65-1.70 Å ซึ่งเลื่อนจากผลการออปติไมซ์เซชัน (1.75 Å) เพียงเล็กน้อย ดังนั้นเราจึงสามารถประมาณได้ว่าจุดต่ำสุดของค่า



รูปที่ 3 ค่าพลังงานอิสระที่ระยะทางต่าง ๆ ระหว่างโปรตอนและออกซิเจน  $d_1$  (เส้นทึบสีแดง) และ  $d_2$  (เส้นประสีดำ) ถูกตรึงในแนวตั้งแสดงตำแหน่งและความสูงของกำแพงพลังงานอิสระ (free energy barrier) สำหรับการถ่ายโอนโปรตอนในแต่ละเส้นทาง

พลังงานอิสระสำหรับทั้งสองเส้นทาง การถ่ายโอนโปรตอนมีพลังงานเท่ากัน ทำให้การเปรียบเทียบค่าพลังงานอิสระระหว่างสองเส้นทางในจุดอื่น ๆ จึงถือว่ามีความใกล้เคียงกันด้วย

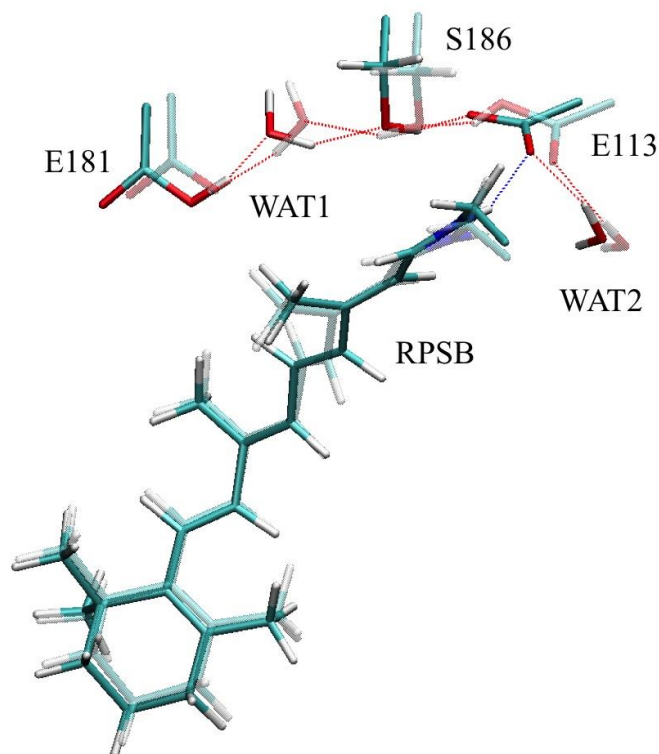
ระยะ  $d_1$  และ  $d_2$  ที่จุดต่ำสุด ถือว่าอยู่ในช่วงของการเป็นพันธะไฮโดรเจน ( $\text{OH} \cdots \text{H}$ ) ในขณะที่ความยาวของพันธะโคเวเลนต์ O-H จะมีค่าประมาณ 0.96 Å ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับจุดต่ำสุดรองลงมาของระยะ  $d_2$  นั่นเอง โดยระยะทางนี้แสดงถึงการเกิดการรับโปรตอน หรือ protonation ของ E113 แต่สำหรับระยะ  $d_1$  จะไม่ปรากฏจุดต่ำสุดที่สองอย่างชัดเจน เนื่องจากพลังงานอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อ ระยะ  $d_1$  สั้นลง โดยสาเหตุของการไม่พบจุดต่ำสุดที่ระยะทางน้อยกว่า 1 Å น่าจะมาจากการที่ในกรณีนี้เกี่ยวข้องกับโมเลกุลน้ำ โดยโมเลกุลน้ำมีอิสระในการเคลื่อนที่มากกว่ากรดอะมิโน โมเลกุลน้ำจึงสามารถเปลี่ยนการจัดเรียงตัว (ซึ่ง

อาจจะเป็นการหมุน) โดยไม่จำเป็นต้องรับหรือเสียโปรตอน

ทั้งนี้จากกราฟพลังงานอิสระ จะสามารถพิจารณาความสูงของกำแพงพลังงานอิสระ (free energy barrier) ได้จาก จุดต่ำสุดจุดแรกไปยังจุดสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งจะได้ค่า free energy barrier สำหรับ  $d_1$  ประมาณ 25 kcal/mol และสำหรับ  $d_2$  มีแนวโน้มว่าจะมีค่ามากกว่า 40 kcal/mol ดังนั้น จะเห็นว่าการรับโปรตอนของ E113 จะเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าการเสียโปรตอน หรือ deprotonation ของ E181 ทำให้ทำนายได้ว่ากระบวนการสลับเคาน์เตอร์ไอออน จะเริ่มที่การเกิด protonation ของ E113 (ที่ตอนแรกมีประจุ -1) ก่อน โดยรับโปรตอนมาจาก S186 และ ถ่ายโอนโปรตอนกันไปตามลำดับ จนทำให้ E181 เสียโปรตอนและกลายเป็นมีประจุเป็นลบในที่สุด โดยสาเหตุที่การ protonation ของ E113 นั้นเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า deprotonation ของ E181 น่าจะ

เป็นผลมาจากคู่ตัวให้-ตัวรับโปรตอน (proton donor-accepter) คู่นี้เป็นกรดอะมิโนทั้งสองตัว นั่นคือ S186-E113 ทำให้ตำแหน่งของทั้งคู่จะถูกจำกัดด้วยพันธะเปปไทด์ที่คงอยู่ตลอดแกนของสายโปรตีน ในขณะที่คู่ตัวให้-ตัวรับโปรตอนในอีกเส้นทางหนึ่งคือ E181-WAT1 จะมีความอิสระในการเปลี่ยนตำแหน่งสัมพัทธ์ระหว่างกันมากกว่ากรณีแรก เพราะโมเลกุลน้ำจะมีอันตรกิริยากับโมเลกุลรอบข้างแบบ non-covalent ซึ่งไม่แข็งแรงเท่าพันธะเปปไทด์ การบังคับให้โมเลกุลน้ำมีระยะเข้าใกล้ E181 มากพอที่จะดึงโปรตอนออกมานั้น จึงทำได้ยากมากขึ้น

จากการออปติไมซ์เซชันโครงสร้างโปรตีนก่อนและหลังการถ่ายโอนโปรตอน พบว่า side-chain ของกรดอะมิโน รวมทั้งโมเลกุลน้ำที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการถ่ายโอนอิเล็กตรอนมีการเลื่อนตำแหน่งไปเล็กน้อยหลังการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยระยะทางที่วัดจาก Schiff base ของ RPSB ถึง primary counterion (E113) และ secondary counterion (E181) ก่อนและหลังการถ่ายโอนโปรตอน ได้แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า หลังการถ่ายโอนโปรตอน ระยะทางจาก Schiff base ถึง E113 จะเพิ่มขึ้นประมาณ 1 Å ในขณะที่ระยะทางถึง E181 ลดลงประมาณ 1 Å เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการสลับ



**รูปที่ 4** โครงสร้างส่วนที่เป็น QM ที่ได้จากการออปติไมซ์เซชันทั้งโปรตีนด้วยระเบียบวิธี QM/MM โดยโครงสร้างก่อนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจะแสดงด้วยแท่งแบบทึบ ในขณะที่โครงสร้างหลังการถ่ายโอนโปรตอนจะแสดงด้วยแท่งแบบโปร่ง ซึ่งสีเขียว สีแดง สีน้ำเงิน และสีขาว หมายถึง คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และ ไฮโดรเจน ตามลำดับ

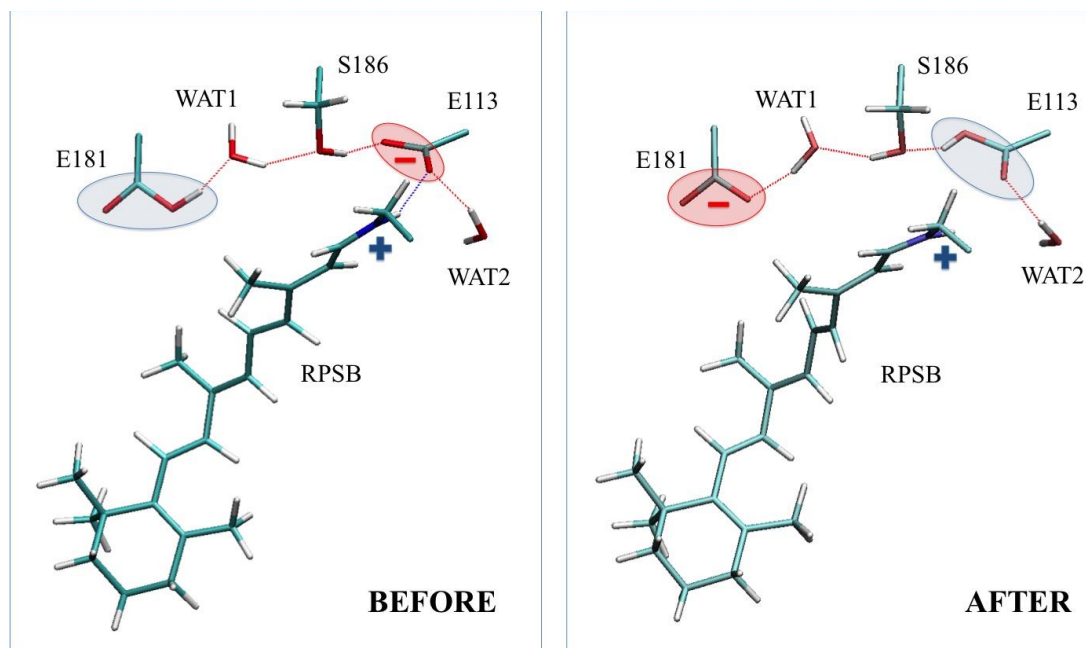
เคาน์เตอร์ไอออนของ RPSB จาก E113 ไปเป็น E181 ดังที่ Yan และ คณะเสนอไว้[1]

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างเดียวกับรูปที่ 4 แต่แสดงผลแบบไม่ซ้อนทับกัน เพื่อให้เห็นเครือข่ายพันธะไฮโดรเจนในแต่ละกรณี (ก่อน และ หลังการ

ถ่ายโอนโปรตอน) จะเห็นได้ว่าจำนวนพันธะไฮโดรเจนยังคงเดิม แต่ทิศทางของตัวให้และตัวรับพันธะไฮโดรเจนเปลี่ยนเป็นตรงกันข้ามภายหลังการถ่ายโอนโปรตอนที่ทำให้เกิด protonation ของ E113 และ deprotonation ของ E181

**ตารางที่ 1** แสดงระยะทางจาก Schiff base (Nitrogen atom ของ RPSB) ไปยัง primary counterion (Oxygen atom ที่ใกล้ที่สุดของ E113) และ secondary counterion (Oxygen atom ที่ใกล้ที่สุดของ E181) ก่อนและหลังการถ่ายโอนโปรตอน

| ระยะทาง         | ก่อนถ่ายโอนโปรตอน | หลังถ่ายโอนโปรตอน |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| N(RPSB)-O(E113) | 2.179 Å           | 3.266 Å           |
| N(RPSB)-O(E181) | 6.718 Å           | 5.793 Å           |



**รูปที่ 5** โครงสร้างส่วนที่เป็น QM ที่ได้จากการออปติไมซ์เซชันทั้งโปรตีนด้วยระเบียบวิธี QM/MM ในกรณีก่อน (ซ้าย) และหลัง (ขวา) การถ่ายโอนอิเล็กตรอน เครื่องหมาย + และ - แสดงประจุของโมเลกุลนั้นๆ โดยสีของวงรีล้อมรอบกรดกลูตามิก (E113 และ E181) แสดงสภาพการมีประจุลบ (สีแดง- deprotonated) หรือเป็นกลาง (สีฟ้า-protonated) ในแต่ละกรณี ซึ่งสีเขียว สีแดง สีนํ้าเงิน และสีขาว หมายถึง คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน ตามลำดับ

#### 4. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษากระบวนการสลับเคาน์เตอร์ไอออนของ RPSB ในโรดอปซินโดยใช้การจำลองเชิงโมเลกุลพบว่า กระบวนการดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเกิดจากการที่ primary counterion หรือ E113 รับโปรตอนจาก S186 และถ่ายโอนโปรตอนไปเรื่อย ๆ จน E181 เสียโปรตอนจนมีประจุลบ และ ทำหน้าที่เป็น เคาน์เตอร์ไอออนแทน E113 โดยกระบวนการดังกล่าว จะมีผลให้ระยะทางระหว่าง Schiff base และ E181 ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทำหน้าที่เป็นเคาน์เตอร์ไอออนต่อไป ทั้งนี้ความยากง่ายของการถ่ายโอนโปรตอนน่าจะมีสาเหตุหลักมาจากความต่างของกลุ่มตัวให้-ตัวรับโปรตอน ในแต่ละเส้นทาง ซึ่งหากเป็นกรดอะมิโนทั้งกลุ่มจะมีข้อจำกัดในการเคลื่อนที่มากกว่า จึงมีโอกาสมายู่ใกล้กันและถ่ายโอนโปรตอนให้แก่กันได้ง่ายกว่ากรณีที่มีโมเลกุลน้ำเป็นตัวให้หรือตัวรับโปรตอน

อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าในกระบวนการถ่ายโอนโปรตอนนี้ขึ้นกับตัวแปรสำคัญสองตัว คือ ระยะ  $d_1$  และ  $d_2$  ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของทั้งคู่จะมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน (correlation) ดังนั้นการทำ umbrella sampling แบบ 2 มิติ คือ พิจารณาทั้งสองตัวแปรไปพร้อม ๆ กัน จะทำให้การอธิบายกระบวนการถ่ายโอนโปรตอนนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น โดยผู้วิจัยอยู่ในระหว่างการทำแบบจำลองดังกล่าว แต่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากจะต้องใช้เวลาเพิ่มมากขึ้นเป็น  $n^2$  แทนที่จะเป็น  $2n$  ในกรณี 1 มิติ แต่ 2 ตัวแปร (เมื่อ  $n$  คือ จำนวนช่วงที่แบ่งในการทำ umbrella sampling)

#### 5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Yan ECY, Kazmi MA, Ganim Z, Hou JM, Pan DH, Chang BSW, et al. Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2003;100:9262-7.
- [2] Yan ECY, Epps J, Lewis JW, Szundi I, Bhagat A, Sakmar TP, et al. Photointermediates of the rhodopsin S186A mutant as a probe of the hydrogen-bond network in the chromophore pocket and the mechanism of counterion switch. *J Phys Chem C*. 2007;111:8843-8.
- [3] Fahmy K, Jäger F, Beck M, Zvyaga TA, Sakmar TP, Siebert F. Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: a Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1993;90:10206-10.
- [4] Fahmy K, Siebert F, Sakmar TP. Photoactivated state of rhodopsin and how it can form *Biophys Chem*. 1995;56:171-81.
- [5] Nagata T, Terakita A, Kandori H, Shichida Y, Maeda A. The hydrogen-bonding network of water molecules and the peptide backbone in the region connecting Asp83, Gly120, and Glu113 in bovine rhodopsin. *Biochemistry*. 1998;37:17216-22.

- [6] Yan ECY, Kazmi MA, De S, Chang BSW, Seibert C, Marin EP, et al. Function of Extracellular Loop 2 in Rhodopsin: Glutamic Acid 181 Modulates Stability and Absorption Wavelength of Metarhodopsin II. *Biochemistry*. 2002;41:3620-7.
- [7] Yan ECY, Ganim Z, Kazmi MA, Chang BSW, Sakmar TP, Mathies RA. Resonance Raman analysis of the mechanism of energy storage and chromophore distortion in the primary visual photoproduct. *Biochemistry*. 2004;43:10867-76.
- [8] Furutani Y, Shichida Y, Kandori H. Structural changes of water molecules during the photoactivation processes in bovine rhodopsin. *Biochemistry*. 2003;42:9619-25.
- [9] Janz JM, Fay JF, Farrens DL. Stability of Dark State Rhodopsin Is Mediated by a Conserved Ion Pair in Intradiscal Loop E-2. *J Biol Chem*. 2003;278:16982-91.
- [10] Janz JM, Farrens DL. Role of the Retinal Hydrogen Bond Network in Rhodopsin Schiff Base Stability and Hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004;279:55886-94.
- [11] Ludeke S, Beck R, Yan ECY, Sakmar TP, Siebert F, Vogel R. The role of Glu181 in the photoactivation of rhodopsin. *J Mol Biol*. 2005;353:345-56.
- [12] Nakamichi H, Okada T. Crystallographic analysis of primary visual photochemistry. *Angew Chem Int Ed*. 2006;45:4270-3.
- [13] Ramon E, Cordomi A, Bosch L, Zernii EY, Senin II, Manyosa J, et al. Critical role of electrostatic interactions of amino acids at the cytoplasmic region of helices 3 and 6 in rhodopsin conformational properties and activation. *J Biol Chem*. 2007;282:14272-82.
- [14] Okada T, Fujiyoshi Y, Silow M, Navarro J, Landau EM, Shichida Y. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2002;99:5982-7.
- [15] Martinez-Mayorga K, Pitman MC, Grossfield A, Feller SE, Brown MF. Retinal counterion switch mechanism in vision evaluated by molecular simulations. *J Am Chem Soc*. 2006;128:16502-3.
- [16] Virshup AM, Punwong C, Pogorelov TV, Lindquist BA, Ko C, Martinez TJ. Photodynamics in Complex Environments: Ab Initio Multiple Spawning Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Dynamics. *J Phys Chem B*. 2009;113:3280-91.
- [17] Warshel A, Levitt M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J Mol Biol*. 1976;103:227-49.
- [18] Birge RR, Knox BE. Perspectives on the counterion switch-induced photoactivation of the G protein-coupled receptor

- rhodopsin. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2003;100:9105-7.
- [19] Nakamichi H, Okada T. Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2006;103:12729-34.
- [20] Granucci G, Toniolo A. Molecular Gradients for Semiempirical CI Wave Functions with Floating Occupation Molecular Orbitals. *Chem Phys Lett*. 2000;325:79-85.
- [21] Stewart JJP. MOPAC 2000. Tokyo, Japan: Fujitsu Limited; 1999.
- [22] Punwong C, Owens J, Martinez TJ. Direct QM/MM Excited-State Dynamics of Retinal Protonated Schiff Base in Isolation and Methanol Solution. *J Phys Chem B*. 2015;119:704-14.
- [23] Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh UC, Ghioand C, Alagona G, et al. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J Am Chem Soc*. 1984;106:765-84.
- [24] Torrie GM, Valleau JP. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J Comp Phys*. 1977;23:187-99.
- [25] Ben-Nun M, Quenneville J, Martinez TJ. Ab Initio Multiple Spawning: Photochemistry from First Principles Quantum Molecular Dynamics. *J Phys Chem*. 2000;104:5161-75.
- [26] Ben-Nun M, Martínez TJ. Ab Initio Quantum Molecular Dynamics. *Adv Chem Phys*. 2002;121:439-512.
- [27] Kumar S, Bouzida D, Swendsen RH, Kollman PA, Rosenberg JM. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I.The method. *J Comp Chem*. 1992;13:1011-21.