

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ФОТОТРАНСДУКЦИИ В МЕМБРАНЕ ДИСКА ФОТОРЕЦЕПТОРА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА МОНТЕ-КАРЛО

© 2016 г. О.В. Петрухин, Т.Г. Орлова, А.Р. Незвецкий, Н.Я. Орлов

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
149290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: petrukhinoleg@rambler.ru*

Поступила в редакцию 01.06.16 г.

Методом Монте-Карло моделировалось диффузионное поведение функционально важных белков системы фототрансдукции в мембранах дисков наружных сегментов палочек сетчатки. Полученные результаты расширяют наши представления о механизмах инактивации ключевого белка системы фототрансдукции гетеротримерного GTP-связывающего белка трансдуцина.

*Ключевые слова: наружные сегменты палочек сетчатки, система фототрансдукции, трансдуцин, моделирование, метод Монте-Карло.*

Основными элементами молекулярного усилителя наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки позвоночных являются рецептор света мембранный белок родопсин (R), гетеротримерный GTP-связывающий белок трансдуцин (Gt) и исполнительный фермент cGMP-специфичная фосфодиэстераза (PDE) (см., например, [1,2]). Поглотившая квант света молекула родопсина, например, (R\*) за время ее жизни в активном состоянии ( $t \approx 1$  с) последовательно взаимодействует с большим числом ( $10^2$ – $10^3$ ) молекул Gt, индуцируя их переход из неактивного состояния Gt-GDP в активное состояние Gt-GTP [3–5]. Такой процесс ведет к активации значительного количества ( $10^2$ – $10^3$ ) молекул PDE и, как следствие, к гидролизу вторичного мессенджера cGMP [3–5]. Падение концентрации cGMP инактивирует cGMP-регулируемые ионные каналы плазматической мембраны НСП [6] и в конечном итоге приводит к генерации электрического ответа фоторецептора.

Ответ фоторецептора имеет кратковременный характер [3,4,7,8]. Поэтому вслед за процессом активации должен следовать процесс инактивации основных элементов системы фо-

тотрансдукции (родопсина, трансдуцина и cGMP-специфичной фосфодиэстеразы (PDE)) и восстановления концентрации медиатора cGMP до первоначального уровня. Последнее происходит в результате активации  $Ca^{2+}$ -зависимой гуанилатциклазы [9,10] вследствие известного быстрого падения концентрации свободных ионов кальция  $[Ca^{2+}]_i$  (см., например, [11–16]).

Падение концентрации кальция также ведет к инактивации фотоактивированного родопсина. Это происходит в результате его многократного фосфорилирования протеинкиназой, специфичной к родопсину, – родопсинкиназой [3,4,17–20]. Это достаточно быстрый процесс. Время жизни активного состояния родопсина составляет около 0,3–0,5 с [4,5,12,13] и не является лимитирующим звеном в процессе выключения системы фототрансдукции [4].

За это время родопсин активирует около 1000 молекул трансдуцина [1–4, 21]. Родопсин является мембранным белком, поэтому, несмотря на низкую вязкость фоторецепторной мембраны, его положение в мембране остается относительно постоянным. Трансдуцин как периферический мембранный белок имеет гораздо большую диффузионную подвижность, что и определяет скорость его активации.

Время жизни активного состояния изолированного трансдуцина, определяемое временем гидролиза GTP в его активном центре, составляет около 10–20 с [22] и, таким образом, значительно превышает длительность ответа фоторецептора. Однако оно ускоряется до вели-

Сокращения: НСП – наружные сегменты палочек сетчатки, R – родопсин, R\* – фотоактивированный родопсин, Gt – трансдуцин, Gt\* – активированный трансдуцин; PDE – cGMP-специфичная фосфодиэстераза; PDE\* и PDE\*\* – активные формы PDE, формирующиеся в результате последовательного взаимодействия фермента с двумя молекулами активированного трансдуцина.

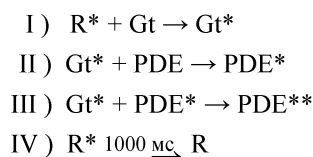
чины, сравнимой с длительностью ответа фоторецептора, в результате взаимодействия с ферментом-мишенью, в качестве которой выступает ключевой фермент системы фототрансдукции – сGMP-специфичная фосфодиэстераза [22]. Ключевую роль в процессе инктивации трансдуцина (ускорения гидролиза GTP) играет система так называемых RGS-белков, в состав которой входит белок RGS9-1 [23], ускоряющий процесс гидролиза [5,24,25] и потенцирующие этот процесс белки Gβ5L ((лонг-сплайс вариант β-субъединицы G-белка [25,26]) и трансмембранный белок R9AP [27,28], обеспечивающий мембранную локализацию инактиваторного комплекса). Однако обязательным условием начала их действия является взаимодействие трансдуцина с ферментом-мишенью, в результате которой α-субъединица трансдуцина образует комплекс с ингибиторной γ-субъединицей PDE [5,8,29]. Таким образом, инактиваторная система начинает функционировать только тогда, когда трансдуцин вступит во взаимодействие с PDE, активирует ее и, таким образом, выполнит свою функциональную роль в системе фототрансдукции.

Концентрация PDE в фоторецепторной мембране уступает концентрации Gt примерно в 10 раз [4]. Поэтому ранее мы выдвинули предположение, согласно которому далеко не каждая молекула трансдуцина сможет найти фермент-мишень за время, определяемое временем формирования ответа фоторецептора и, таким образом, не приобретет способность инактивироваться [30]. В настоящей работе мы моделировали процесс двумерной диффузии в плоскости мембраны диска для того, чтобы подтвердить это предположение.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процесс диффузии белковых молекул в плоскости мембраны диска изучали применяя подход, использованный ранее в работах [31,32] при исследовании поведения активированных молекул трансдуцина в течение первых 100 мс процесса развития фотоответа. В настоящей работе исследовалось поведение этих молекул в течение более длительного времени (2000 мс).

Для моделирования реакционно-диффузионного процесса на поверхности мембраны диска фоторецептора методом Монте-Карло была реализована компьютерная программа на языке программирования C++. Несмотря на существование готовых программных продуктов, предназначенных для стохастического моделирования диффузионных процессов (в частности, программы Smoldyn), у нас были основания



**Рис. 1.** Принципиальные схемы реакций, протекающих между компонентами системы фототрансдукции на поверхности мембраны диска НСП: I – формирование активной молекулы трансдуцина (Gt\*) родопсином, поглотившим квант света (R\*); II, III – активация молекулы PDE в результате ее последовательного взаимодействия с двумя молекулами активированного трансдуцина (PDE\* и PDE\*\* соответственно); IV – инактивация родопсина, поглотившего квант света, происходящая, согласно условиям моделирования, через 1000 мс после его активации).

использовать собственную реализацию алгоритма для того, чтобы родопсин прекращал активировать трансдуцин строго через 1000 мс после поглощения кванта света.

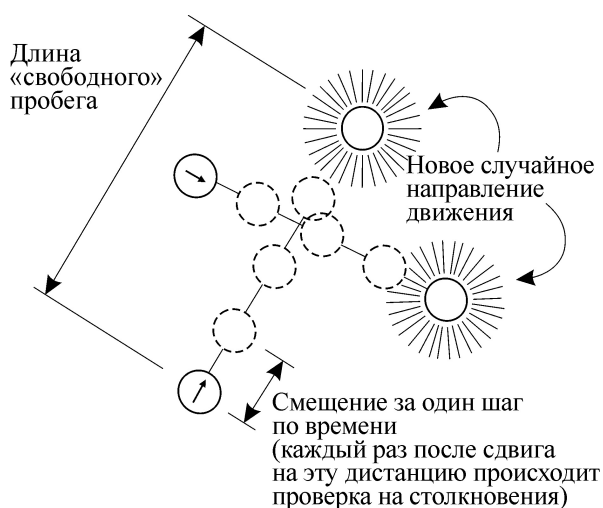
При построении модели эффективность взаимодействий реагирующих макромолекул предполагалась равной единице. Таким образом, программа являлась счетчиком столкновений.

В модельном взаимодействии на поверхности мембраны диска принимали участие молекулы родопсина, трансдуцина и фосфодиэстеразы, которые могли находиться в нескольких состояниях в соответствии со схемой реакций, показанной на рис. 1.

В начальный момент времени все молекулы случайным образом распределялись по квадратной области площадью 3,14 мкм<sup>2</sup> (площадь мембраны диска НСП диаметром около 2 мкм) [35]. Всем молекулам задавали равномерно распределенный вектор скорости, модуль которой принимался равным средней скорости теплового движения, характерной для данного типа молекул и вычисляемый по формуле диффузии Эйнштейна для двумерной среды  $\langle v \rangle = 4 \frac{D}{\langle l \rangle}$ , где  $\langle v \rangle$  – средняя скорость теплового движения,  $D$  – коэффициент диффузии,  $\langle l \rangle$  – средняя длина свободного пробега.

Использовали выражение для длины свободного пробега молекул  $\langle l \rangle = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}} \frac{S}{N}} - \langle d \rangle$ , где  $S$  – площадь диска НСП,  $N$  – общее число молекул на диске,  $\langle d \rangle$  – средний диаметр молекул.

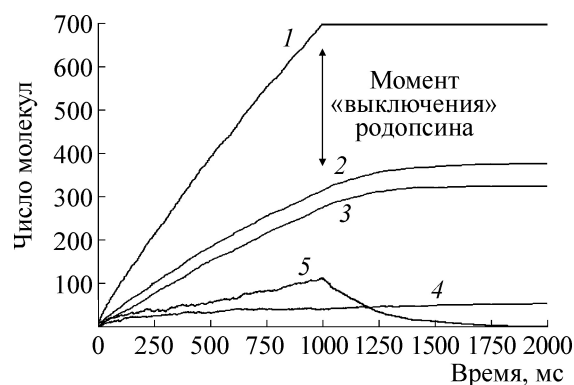
Следовательно, в нашей модели все молекулы каждого типа двигались с одинаковой



**Рис. 2.** Схема моделируемых диффузионных взаимодействий молекул в плоскости мембраны диска НСП.

скоростью, равной средней величине для данной группы. Шаг по времени составлял 1 мкс. Он был выбран так, чтобы быть в несколько раз меньше минимального времени колебательной релаксации (т.е. тех мод, которые обусловлены столкновением макромолекул друг с другом) и, таким образом, был меньше величины, определяемой выражением  $\tau = \frac{\langle l \rangle}{\langle v \rangle}$ .

Среднюю поверхностную плотность молекул родопсина в мембране диска принимали равной около 24000 молекул/мкм<sup>2</sup> [35] при общепринятых стехиометрических соотношениях между участниками процесса (R : Gt : PDE = 100 : 10 : 1). Это означало, что в моделировании принимали участие около 8300 объектов ( $\approx 760$  молекул фосфодиэстеразы,  $\approx 7570$  молекул трансдуцина и единственная фотоактивированная молекула родопсина, старт которой начался в центре квадратной области). В моделировании не принимали участие молекулы родопсина, не поглотившие квант света, поскольку в этом состоянии они не являются активаторами, а их влияние на диффузионный процесс опосредуется выбором коэффициентов диффузии всех участников. Коэффициенты диффузии молекул соответствовали значениям, принятым Лэмбом [31, 32]: R – 70 нм<sup>2</sup>/мс, Gt – 120 нм<sup>2</sup>/мс, Gt\* – 150 нм<sup>2</sup>/мс, PDE – 80 нм<sup>2</sup>/мс, PDE\* – 80 нм<sup>2</sup>/мс. Случайный процесс разыгрывался путем генерации нового направления движения молекул в тот момент, когда они преодолевали свой путь свободного пробега. Поскольку временной шаг был меньше времени колебательной релаксации, то мест, где проводилась проверка



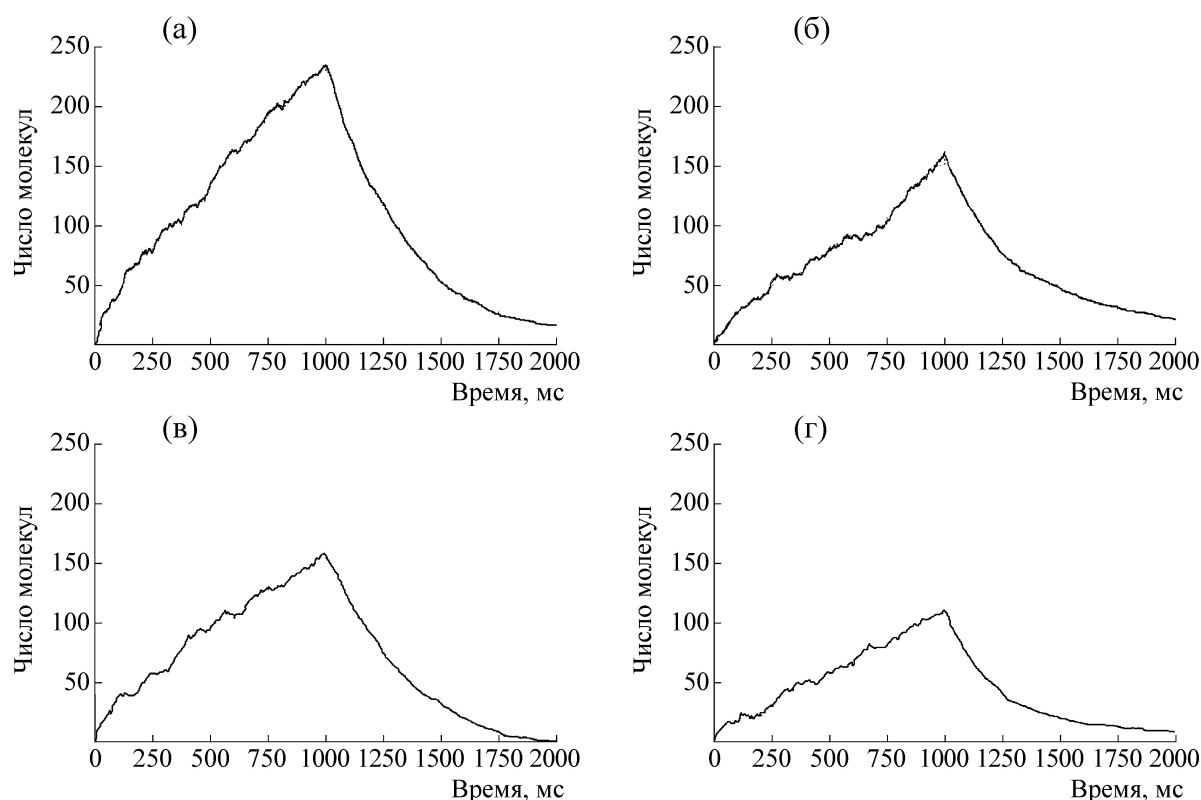
**Рис. 3.** Усредненные кинетические кривые по результатам стохастического моделирования: 1 – кинетика формирования активных молекул трансдуцина; 2 – кинетика активации (по обоим стадиям) фосфодиэстеразы; 3 – кинетика активации PDE в результате ее взаимодействия с двумя молекулами трансдуцина; 4 – кинетика активации PDE в результате ее взаимодействия с одной молекулой трансдуцина; 5 – динамика числа активированных молекул трансдуцина, не успевших за время развития фотоответа найти PDE в качестве партнера.

на столкновения, было в несколько раз больше, чем мест, где молекулы меняли направление движения (рис. 2).

В ряде случаев при моделировании варьировали коэффициент диффузии одного из участников процесса для того, чтобы выяснить влияние изменений этого параметра на частоты активации и инактивации молекул, а также на долю активированных молекул Gt\*, которые не успели связаться с PDE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерные «кинетические» кривые, полученные в результате стохастического моделирования реакционно-диффузионного процесса между компонентами системы фототрансдукции в мембране диска НСП, представлены на рис. 3. Интересно отметить, что столкновение (комплексирование) второй молекулы трансдуцина со вторым сайтом связывания на молекуле PDE оказалось довольно вероятным процессом. Это связано с тем, что однократно активированные молекулы (PDE\*) не успевают покинуть область, в которой происходит реакция активации трансдуцина родопсином. Данная точка зрения укладывается в рамки высказанной ранее «гипотезы совпадений» [33], согласно которой для максимальной активации PDE необходимо одновременное взаимодействие двух молекул трансдуцина с двумя центрами их связывания на молекуле фермента.



**Рис. 4.** Динамика активированного трансдуцина, который не успел связаться с фосфодиэстеразой при различных коэффициентах диффузии участников: (а) – в 1,5 раза увеличен коэффициент диффузии Gt; (б) – в 1,5 раза увеличен коэффициент диффузии R\*; (в) – в 1,5 раза уменьшен коэффициент диффузии Gt\*; (г) – в 1,5 раза уменьшен коэффициент диффузии PDE\*. По оси абсцисс отложено время развития фотоответа в мс, по оси ординат – число активированных свободных молекул трансдуцина.

Интересно отметить, что анализ моделей двустадийного процесса активации PDE с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), т.е. без учета диффузии, показывает, что присоединение только одной молекулы Gt\* к PDE будет превалировать над второй стадией (см. напр. [34]). По нашему мнению, кинетические модели, основанные на системах ОДУ недостаточны для описания явлений, происходящих в фоторецепторе. По-видимому, для адекватного моделирования процесса фототрансдукции следует использовать подходы, которые учитывают как кинетические, так и диффузионные процессы во всем объеме НСП. Это подходы, основанные на использовании дифференциальных уравнений с частными производными, либо методы Монте-Карло.

Несмотря на то, что в модели каждое взаимодействие молекул Gt и PDE вело к активации фосфодиэстеразы, оказалось, что от 5 до 15% активированного трансдуцина, тем не менее, не успевало взаимодействовать с молекулами PDE за время развития фотоответа (1500 мс) (см. рис. 4). Отметим, что полученные нами значения представляют собой нижнюю предель-

ную оценку, поскольку действительная эффективность взаимодействий Gt и PDE едва ли достигает 100%. Поэтому мы предполагаем, что инактивация этой популяции молекул трансдуцина происходит в результате независимого механизма, который включается в ответ на известное падение концентрации ионов кальция в цитоплазме НСП в ответ на свет. Некоторые экспериментальные данные в пользу такого механизма были получены нами ранее [30].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Stryer, *Annu. Rev. Neurosci.* **9**, 87 (1986).
2. L. Stryer, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10711 (1991).
3. E. N. Pugh, Jr., and T. D. Lamb, *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 111 (1993).
4. E. N. Pugh, Jr., and T. D. Lamb, in *Handbook of Biological Physics*, Ed. by D. G. Stavenga, E. N. Pugh, Jr., and W. J. de Grip (Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2000), Chapter 5, p. 183.
5. V. Y. Arshavsky, T. D. Lamb, and E. N. Pugh, Jr., *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 153 (2002).
6. E. E. Fesenko, S. S. Kolesnikov, and A. L. Lyubarsky, *Nature* **313**, 310 (1985).

7. D. A. Baylor, T. D. Lamb, and K.-W. Yau, *J. Physiol.* **288**, 613 (1979).
8. M. E. Burns and D. A. Baylor, *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 779 (2001).
9. K.-W. Koch and L. Stryer, *Nature* **334**, 64 (1988).
10. E. N. Pugh, Jr., T. Duda, A. Sitaramayya, and R. K. Sharma, *Bioscience Reports* **17**, 429 (1997).
11. K. Nakatani, and K.-W. Yau, *J. Physiol.* **395**, 695 (1988).
12. H. R. Matthews, *J. Physiol.* **490**, 1 (1996).
13. H. R. Matthews, *J. Gen. Physiol.* **109**, 141 (1997).
14. L. Lagnado, L. Cervetto, and P. A. McNaughton, *J. Physiol.* **455**, 111 (1992).
15. V. Torre, H. R. Matthews, and T. D. Lamb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7109 (1986).
16. M. P. Gray-Keller and P. B. Detwiler, *Neuron* **13**, 849 (1994).
17. S. Kawamura, and M. Murakami, *Nature* **349**, 420 (1991).
18. S. Kawamura, *Nature* **362**, 855 (1993).
19. L. Lagnado and D. A. Baylor, *Nature* **367**, 273 (1994).
20. T. Maeda, Y. Imanishi, and K. Palczewski, *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 417 (2003).
21. T. M. Vuong, M. Chabre, and L. Stryer, *Nature* **311**, 659 (1984).
22. V. Y. Arshavsky and M. D. Bownds, *Nature* **357**, 416 (1992).
23. W. He, C. W. Cowan, and T. G. Wensel, *Neuron* **20**, 95 (1998).
24. C. W. Cowan, W. He, and T. G. Wensel, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**, 341 (2000).
25. C. W. Cowan, T. G. Wensel, and V. Y. Arshavsky, *Methods Enzymol.* **315**, 524 (2000).
26. W. He, L. S. Lu, X. Zhang, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 37093 (2000).
27. G. Hu and T. G. Wensel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9755 (2002).
28. G. Hu, Z. Zhang, and T. G. Wensel, *J. Biol. Chem.* **278**, 14550 (2003).
29. K. Martemyanov and V. Y. Arshavsky, *Methods Enzymol.* **390**, 196 (2004).
30. О. В. Петрухин, Т. Г. Орлова, А. Р. Незвецкий и Н. Я. Орлов, *Биофизика* **59**, 854 (2014).
31. T. D. Lamb, *Biophys. J.* **67**, 1439 (1994).
32. T. D. Lamb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 566 (1996).
33. N. Bennett and A. Clerc, *Biochemistry* **28**, 7418 (1989).
34. Р. Р. Юнусов, Дис. ... к-та физ.-мат. наук (Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, М. 2006).
35. S. Nickell, P. S.-H. Park, W. Baumeister, and K. Palczewski, *J. Cell Biol.* **177**, 917 (2007).

## **Modelling of Phototransduction Processes in the Photoreceptor Disk Membranes by the Monte Carlo Method**

**O.V. Petrukhin, T.G. Orlova, A.R. Nezvetzky, and N.Ya. Orlov**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The Monte Carlo method was used to model the diffusion behaviors of functionally important proteins of the phototransduction system in retinal rod outer segment disk membranes. The results obtained expand our knowledge of mechanisms by which the main phototransduction heterotrimeric GTP-binding protein transducin is inactivated.

*Key words: retinal rod outer segments, phototransduction system, transducin, modeling, Monte Carlo method*