



Д. н., проф. Игнат Игнатов

Игнат Игнатов, доктор Европейской академии естественных наук (Германия), профессор, болгарский биофизик и исследователь воды, директор Научно-исследовательского центра медицинской биофизики (НИЦМБ). Главное научное направление проф. И. Игнатова связано с исследованиями структуры воды, информационных свойств воды и происхождением живой материи. Автор 300 научных работ и нескольких книг. Награждён международной премией им Вернадского по альтернативной медицине и биофизике (2003 г.), Швейцарской премией по альтернативной медицине и биофизике – Швейцарская премия (2003 г.) и Премией им. Чижевского (2005 г.).



Олег Викторович Мосин

Российский исследователь воды, биохимик, канд. хим. наук, доц., член Японского Общества биохимии, биотехнологии и бионауки и других международных академий. Научные интересы - изучение структуры воды, воздействия на воду, изотопные эффекты дейтерия, клеточная адаптация к тяжелой воде, молекулярная эволюция, биотехнология изотопно-меченых природных соединений. Автор 250 научных работ по воде и водоочистке.

ПРОЦЕСС ВОСПРИЯТИЯ СВЕТА И ЭВОЛЮЦИЯ ЗРЕНИЯ У ВЫСШИХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

© *Игнатов И., Мосин О.В.*

Доктор наук, проф. И. Игнатов (Болгария)

к.х.н. О.В. Мосин (Россия)

Контакт с автором: mosin-oleg@yandex.ru

В статье приводятся данные о функционировании зрительного цикла у высших животных и человека. Рассмотрен фотоцикл хромофорного ретинальсодержащего трансмембранного рецепторного белка родопсина, ответственного за функции восприятия света при поглощении его молекулой кванта света и последующих биохимических реакций, связанных с закрытием катионных ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) каналов и гиперполяризации мембраны. Показан механизм взаимодействия родопсина с рецепторным G-белком трансдуцином, являющийся ключевым биохимическим этапом в зрительном процессе, заключающимся в активации трансдуцина при его взаимодействии с активированным родопсином и обмене в связанном состоянии ГТФ на ГДФ. Затем комплекс диссоциирует и активирует фосфодиэстеразу путем замещения ее ингибиторной субъединицы. Также рассмотрен механизм восприятия цвета зрительным аппаратом, обладающим способностью анализировать определенные диапазоны оптического спектра, как цвета. Смещение зеленого и красного цвета не производит никакого среднего цвета: мозг воспринимает его, как желтый цвет. При излучении электромагнитных волн, соответствующих зеленому и красному цвету, мозг воспринимает «среднее решение» – желтый цвет.

ВВЕДЕНИЕ

Зрение (зрительное восприятие) — процесс психофизиологической обработки изображения объектов окружающего мира, осуществляемое зрительной системой, и позволяющий получать представление о величине, форме и цвете окружающих предметов, их взаимном расположении и расстоянии между ними. Посредством зрения человек получает 90 % всей поступающей в мозг информации. Не случайно так огромна роль зрения в жизнедеятельности человека. С помощью зрения человек получают не только огромное количество информации об окружающем внешнем мире, а также может наслаждаться красотами природы и великими произведениями искусства. Источником зрительного восприятия является свет, излучаемый или отражаемый от предметов внешнего мира.

Функция зрения осуществляется благодаря сложной системе различных взаимосвязанных структур — зрительного анализатора, состоящего из периферического

отдела (сетчатка, зрительный нерв, зрительный тракт) и центрального отдела, объединяющего подкорковые и ствольные центры среднего мозга, а также зрительную область коры полушарий большого мозга. Человеческий глаз воспринимает световые волны лишь определенной длины — от 380 до 770 нм. Световые лучи от рассматриваемых предметов проходят через оптическую систему глаза (роговицу, хрусталик и стекловидное тело) и попадают на сетчатку, в которой расположены светочувствительные клетки — фоторецепторы (колбочки и палочки). Свет, попадая на фоторецепторы, вызывает каскад биохимических реакций содержащихся в них зрительных пигментов (в частности, наиболее изученного из них родопсина, ответственного за восприятие электромагнитного излучения видимого диапазона), и в свою очередь, — возникновение нервных импульсов, которые передаются в следующие нейроны сетчатки и далее в зрительный нерв. По зрительным нервам, затем по зрительным трактам нервные импульсы поступают в латеральные коленчатые тела — подкорковый центр зрения, а оттуда в корковый центр зрения, расположенный в затылочных долях головного мозга, где происходит формирование зрительного образа.

За последнее десятилетие российскими и зарубежными учеными были получены новые данные, раскрывающие молекулярные основы зрительного восприятия. Идентифицированы зрительные молекулы, принимающие участие в реакции на свет и раскрыт механизм их действия. В данной статье рассмотрены основные биохимические механизмы, связанные со зрительным восприятием и эволюцией зрительных молекул.

Молекулярные основы зрения.

Процесс восприятия света имеет определенную локализацию в фоторецепторных клетках сетчатки глаза, чувствительных к свету. Сетчатка по своему строению представляет собой многослойный слой нервной ткани, чувствительной к свету, который выстилает внутреннюю заднюю часть глазного яблока. Сетчатка расположена на пигментированной мембране, обозначаемой как пигментированный эпителий сетчатки (ПЭС), который поглощает свет, проходящий сквозь сетчатку. Это предотвращает обратное отображение света сквозь сетчатку и новое реагирование, что не разрешает зрению расплываться.

Свет проникает сквозь глаз и создает сложную биохимическую реакцию в клетках фоторецепторов сетчатки, чувствительных к свету [1]. Фоторецепторные клетки подразделяются на два типа, которые за их характерную форму называют палочками и колбочками (рис. 1). Палочки расположены в окрашенном слое сетчатки глаза, в

котором синтезируется ответственный за цветовое восприятие фотохромный белок родопсин, и являются рецепторами света низкой интенсивности. Колбочки выделяют группу зрительных пигментов (йодопсин), и приспособлены различать цвета. Палочки позволяют видеть черно-белые изображения при тусклом свете; колбочки осуществляют цветовое зрение при ярком свете. Сетчатка человека содержит около 3 млн. колбочек и 100 млн. палочек. Размеры их очень невелики: длина около 50 мкм, диаметр — от 1 до 4 мкм.

Электрические сигналы, генерируемые колбочками и палочками, обрабатываются другими клетками сетчатки – биполярными и ганглиозными клетками, прежде чем они передаются в мозг по зрительному нерву. Дополнительно существуют ещё два слоя промежуточных нейронов. Горизонтальные клетки передают сообщения туда и обратно между клетками фоторецепторов, биполярным клеткам и друг другу. Амакринные клетки (клетки сетчатки) взаимосвязаны с биполярными клетками, ганглиозными клетками, а также друг с другом. Оба вида таких промежуточных нейронов играют главную роль в обработке визуальной информации на уровне сетчатки перед тем, как она передается в мозг для конечной обработки.

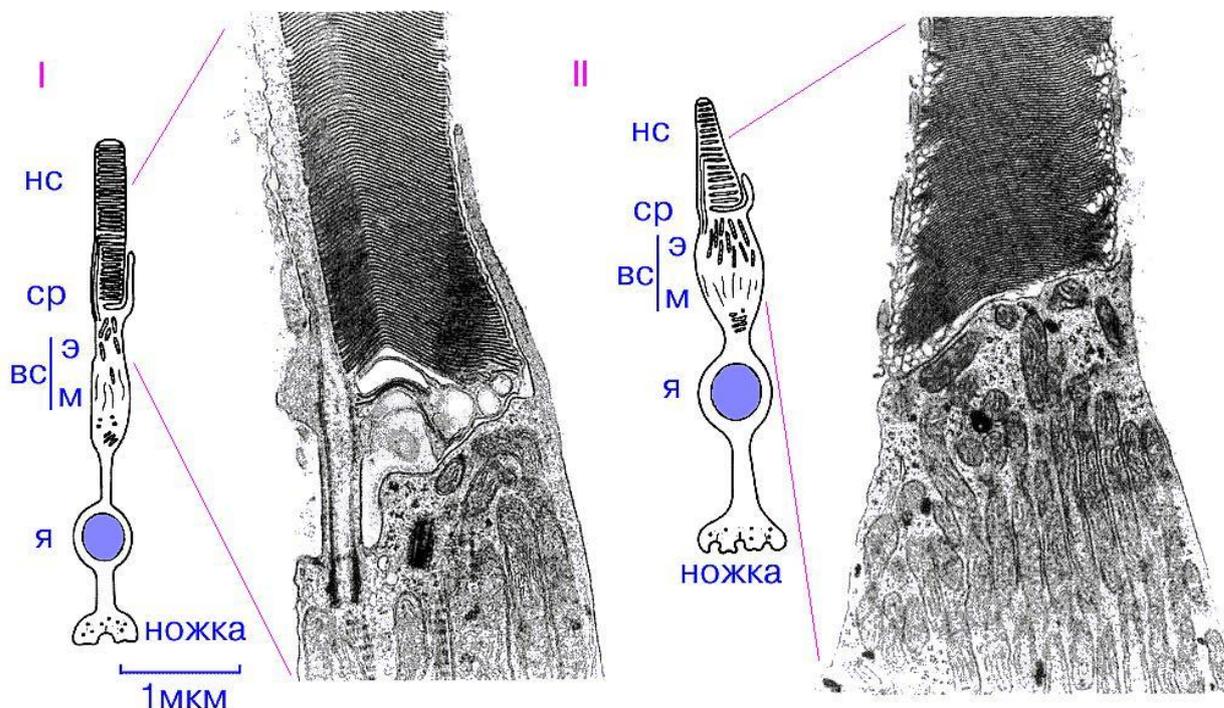


Рис. 1. Палочка (I) и колбочка (II). ср - соединительная ресничка, э - эллипсоид, с - ножка, м - миоид, я - область ядра, вс - внутренний сегмент, нс - наружный сегмент (электронная микрофотография [2]).

Колбочки приблизительно в 100 раз менее чувствительны к свету, чем палочки, но гораздо лучше воспринимают быстрые движения. Палочка может быть возбуждена одним фотоном — наименьшим возможным количеством света. Каскад молекулярных взаимодействий усиливает этот «квант» информации в химический сигнал, который затем воспринимается нервной системой. Степень усиления сигнала изменяется в зависимости от фонового освещения: палочки более чувствительнее при тусклом свете, чем при ярком. В результате они эффективно функционируют в широком диапазоне фонового освещения. Сенсорная система палочек упакована в хорошо различимые клеточные субструктуры, которые можно легко выделять и исследовать *in vitro*.

Колбочки и палочки сходны по строению и состоят из четырех участков. В их строении принято различать:

- наружный сегмент, содержащий мембранные полудиски;
- внутренний сегмент, содержащий митохондрии;
- связующий отдел – перетяжка;
- синаптическую область.

По строению палочка представляет собой длинную тонкую клетку, разграниченную на две части. Наружный сегмент клетки содержит большую часть молекулярного механизма, детектирующего свет и инициирующего нервный импульс. Внутренний сегмент ответствен за генерацию энергии и обновление молекул в наружном сегменте. Помимо этого, внутренний сегмент формирует синаптическое окончание, которое служит для связи с другими клетками. Если изолированную сетчатку слегка потрясти, наружные сегменты палочек отпадают и весь аппарат возбуждения можно исследовать *in vitro* в высокоочищенном виде. Это свойство палочек делает их незаменимым объектом исследования для биохимиков.

Наружный сегмент палочки представляет собой узкую трубку, заполненную стопкой тонких мембранных дисков; образованными цитоплазматической мембраной и отделившимися от нее. В одной клетке их примерно 2 тысячи. И трубка, и диски образованы двухслойной цитоплазматической мембраной одного и того же типа. Но наружная (плазматическая) мембрана палочки и мембрана дисков имеют различные функции в фоторецепции света и генерации нервного импульса. Диски содержат большинство белковых молекул, участвующих в поглощении света и инициации возбуждающего ответа. Наружная мембрана служит для преобразования химического сигнала в электрический.

Связь между двумя сегментами осуществляется через цитоплазму и пару ресничек, переходящих из одного сегмента в другой. Реснички содержат только 9 периферических дублетов микротрубочек: пара центральных микротрубочек, характерных для ресничек, отсутствует. Внутренний сегмент палочек - это область активного метаболизма; она заполнена митохондриями, доставляющими энергию для процессов зрения, и полирибосомами, на которых синтезируются белки, участвующие в образовании мембранных дисков и зрительного пигмента родопсина.

РОДОПСИН И ЕГО СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА.

К числу наиболее важных интегральных молекул трансмембранных рецепторных G белков, связанных с мембраной дисков, относится родопсин [3]. Он представляет собой фоторецепторный хромофорный белок палочек, который поглощает фотон и создает ответ, составляющий первую стадию в цепи событий, обеспечивающих зрение. Родопсин состоит из двух компонентов — бесцветного белка опсина, функционирующим как фермент и ковалентно связанного хромофорного компонента – производного витамина А, 11-*цис*-ретинала, акцептирующего свет (рис. 2). Поглощение фотона света 11-*цис*-ретиналом «включает» ферментативную активность опсина и приводит в действие биохимический каскад фоточувствительных реакций, ответственных за зрительное восприятие.

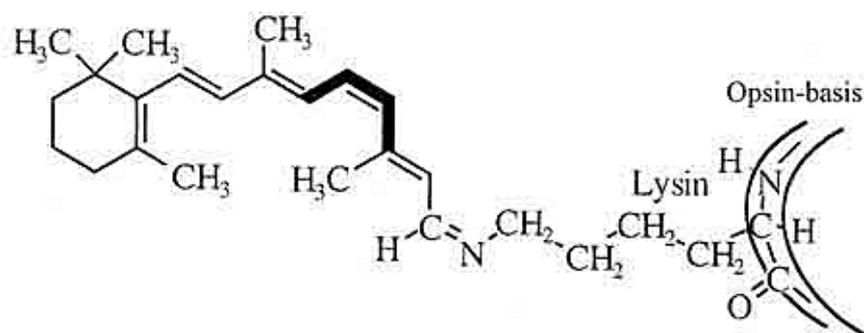


Рис. 2. Конфигурация светочувствительного хромофора родопсина в основной (невозбужденной) фазе (выделена 11-*цис*-конфигурация при двойной связи)

Родопсин принадлежит к семейству G-рецепторов (GPCR-рецепторов), ответственных за механизм трансмембранной передачи сигнала, основанный на взаимодействии с внутриклеточными мембранными G-белками – сигнальными G-белками, являющимися универсальными посредниками при передаче гормональных сигналов от рецепторов клеточной мембраны к эффекторным белкам, вызывающим конечный клеточный ответ. Установление его пространственной структуры является важным в биологии и медицине, так как родопсин как «родоначальник» семейства GPCR-рецепторов является «моделью» структуры и функций множества других рецепторов, чрезвычайно важных с научно-фундаментальной и практической (фармакологической) точек зрения.

Пространственная структура родопсина долго не поддавалась изучению «прямыми» методами – рентгеноструктурным анализом и спектроскопией ЯМР, в то время как молекулярная структура другого родственного родопсину трансмембранного белка бактериородопсина [4] с аналогичной структурой, выполняющего функции АТФ-зависимой транслоказы в мембранах клеток галофильных микроорганизмов, перекачивающему протоны через цитоплазматическую мембрану клетки и участвующему в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании (бесхлорофилльном синтезе), была определена еще в 1990-м году. Структура зрительного родопсина оставалась неизвестной вплоть до 2003 года [5].

По своему строению молекула опсина представляет собой полипептидную цепь из 348 остатков аминокислот. Аминокислотная последовательность опсина была определена российскими учеными в лаборатории Ю.А. Овчинникова в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина в Москве [6]. В этих исследованиях получена важная информация о трехмерной структуре этого важного белка, пронизывающего мембрану диска. Полипептидная цепь опсина образует семь трансмембранных участков α -спирали, расположенные поперек мембраны и соединенные между собой короткими неспиральными участками. При этом N-конец находится во внеклеточной области, а C-конец α -спирали — в цитоплазматической. С одной из α -спиралей связана молекула 11-*цис*-ретиная, расположенная вблизи от середины мембраны так, что ее длинная ось параллельна поверхности мембраны (рис. 3). Также было установлено место локализации 11-*цис*-ретиная, связанного альдиминной связью с ϵ -аминогруппой остатка Lys-296, расположенного в седьмой α -спирали. Таким образом, 11-*цис*-ретиная вмонтирован в центр сложного, высокоорганизованного белкового окружения в составе клеточной мембраны палочек. Это окружение обеспечивает фотохимическую «подстройку» ретиная, влияя на спектр его поглощения. Сам по себе свободный 11-*цис*-ретиная в растворенном виде имеет максимум поглощения в ультрафиолетовой области спектра

— при длине волны 380 нм, в то время как родопсин поглощает зеленый свет при 500 нм [7]. Этот сдвиг в световых длинах волн важен с функциональной точки зрения: благодаря ему спектр поглощения родопсина приводится в соответствие со спектром света, попадающего в глаз.

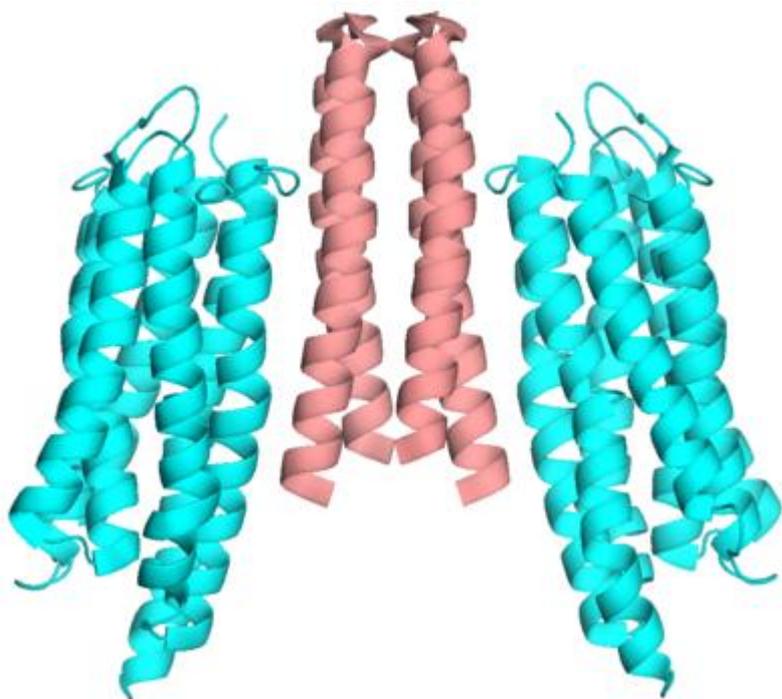


Рис. 3. Молекула родопсина по данным компьютерного моделирования.

Спектр поглощения родопсина определяется как свойствами хромофора – остатка 11-*цис*-ретинала, так и опсина. Этот спектр у позвоночных имеет два максимума — один в ультрафиолетовой области (278 нм), обусловленный опсином, и другой — в видимой области (около 500 нм) — поглощение хромофора (рис. 4). Превращение при действии света зрительного пигмента до конечного стабильного продукта состоит из ряда очень быстрых промежуточных стадий. Исследуя спектры поглощения промежуточных продуктов в экстрактах родопсина при низких температурах, при которых эти продукты стабильны, удалось подробно описать весь фотопроецесс обесцвечивания зрительного пигмента [8].

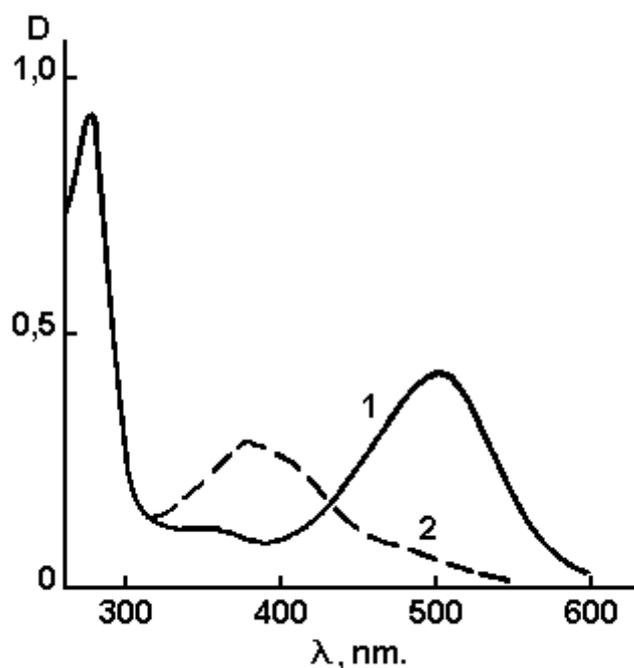


Рис. 4. Спектр поглощения родопсина лягушки *Rana temporaria* в водном экстракте [8]. Видны два максимума поглощения в видимой (500 нм.) и ультрафиолетовой (280 нм.) области. 1 — родопсин (восстановленный пигмент); 2 — индикатор жёлтый (обесцвеченный пигмент). По оси абсцисс — длина волны (λ); по оси ординат — оптическая плотность (D).

При поглощении молекулой 11-*цис*-ретиная фотона света его молекула изомеризуется в 11-*алл-транс*-ретинаяль (квантовый выход 0,67), а сам родопсин обесцвечивается (фотолиз). При этом происходит вращение вокруг связи между 11-м и 12-м атомами углерода молекулы 11-*цис*-ретинаяля, в результате чего изменяется геометрия молекулы и образуется изомерная форма — *алл-транс*-ретинаяль без изгиба, а спустя 10 мс происходит аллостерический переход родопсина в его активную форму (рис. 5). Энергия поглощенного фотона света распрямляет изгиб цепи между 11-м и 12-м атомами углерода. В этой форме 11-*цис*-ретинаяль существует в темноте. У позвоночных фотолиз родопсина заканчивается отрывом хромофора от опсина; у беспозвоночных хромофор остается связанным с белком на всех стадиях фотолиза. У позвоночных родопсин регенерируется обычно в результате взаимодействия опсина с 11-*цис*-ретинаялем, у беспозвоночных - при поглощении второго фотона света.



Рис. 5. Изомеризация молекулы 11-цис-рeтиналя в 11-*all-транс*-рeтиналь в результате поглощения фотона света.

Молекула родопсина, встроенная в мембрану палочек, очень чувствительна к световому воздействию (рис. 6). Установлено, что поглощение фотона света молекулой в половине случаев вызывает изомеризацию 11-цис-рeтиналя [9]. Спонтанная изомеризация молекулы рeтиналя в темноте происходит очень редко - приблизительно раз в 1000 лет. Такое различие имеет важное следствие для зрения. Когда один фотон попадает на сетчатку глаза, поглотившая его молекула родопсина реагирует с ним с высокой эффективностью, в то время как миллионы других молекул родопсина в сетчатке глаза остаются “молчащими”.

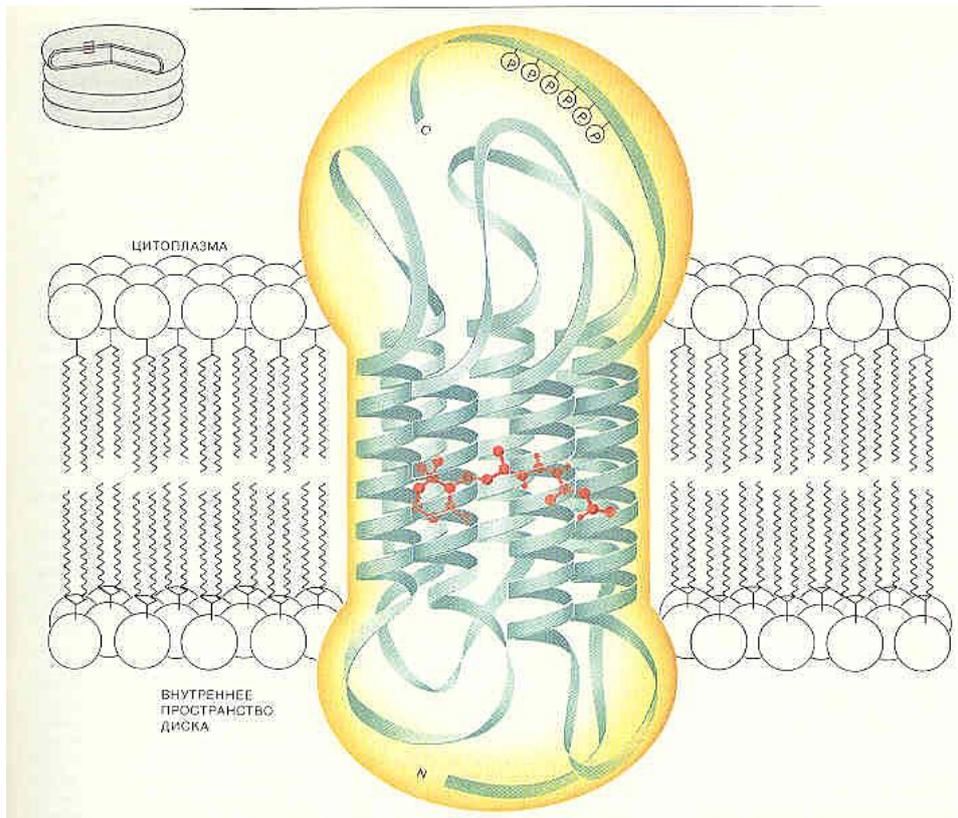


Рис. 6. Функционирование родопсина в мембране 11-*цис*-ретинаял (красный) присоединен к одной из альфа-спиралей спиралей родопсина вблизи мембраны. Поглощение фотона света 11-*цис*-ретинаялем приводит к изменению его конфигурации и активации родопсина. Эта модель структуры родопсина предложена американскими учёными Э. Драцем и П. Харгрэйвом.

Последующие циклы фотохимического превращения родопсина и его активации приводят к возбуждению зрительного нерва за счет изменения ионного транспорта в фоторецепторе. Впоследствии родопсин восстанавливается (регенерирует) в результате синтеза 11-*цис*-ретинаяля и опсина или в процессе синтеза новых дисков наружного слоя сетчатки.

ЗРИТЕЛЬНЫЙ ЦИКЛ РОДОПСИНА

В настоящее время достигнут определенный прогресс в понимании того, что происходит на последнем этапе каскада возбуждения — на наружной мембране палочек. Цитоплазматическая мембрана клетки избирательно проницаема для электрически заряженных ионов (Na^+ , Ca^{2+}), вследствие чего образуется разность электрических потенциалов между внутренней и наружной стороной клеточной мембраны. В состоянии покоя внутренняя часть мембраны клетки несет отрицательный заряд около

40 мВ по отношению к наружной. В 1970 годах учеными было показано, что после освещения клетки светом, разность потенциалов на мембране палочки увеличивается [10]. Это увеличение зависит от интенсивности стимула и фонового освещения; максимальная разность потенциалов при этом составляет — 80 мВ.

Увеличение разности потенциалов - гиперполяризация происходит вследствие уменьшения проницаемости мембраны для катионов натрия Na^+ , несущих положительный заряд. После того как была установлена природа гиперполяризации, было установлено, что поглощение одного фотона приводит к тому, что в плазматической мембране палочки закрываются сотни натриевых каналов, блокируя вход миллионов ионов натрия Na^+ внутрь клетки [11]. Возникнув под действием светового облучения, гиперполяризация затем распространяется по наружной мембране палочки на другой конец клетки к синаптическому окончанию, где возникает нервный импульс, передающийся в мозг.

Эти фундаментальные исследования позволили дать представление о том, что происходит в начале и в конце фотохимического каскада зрительного восприятия света, но оставили нерешенным вопрос: а что же происходит посередине? Каким образом изомеризация молекулы ретиналя в мембране диска палочек приводит к закрыванию натриевых каналов в наружной клеточной мембране? Как известно, в палочках плазматическая мембрана не соприкасается с мембраной дисков. Это означает, что передача сигнала от дисков к наружной мембране должна осуществляться с помощью внутриклеточного посредника-медиатора возбуждающего сигнала. Поскольку один фотон может вызывать закрытие сотен натриевых каналов, каждый акт поглощения фотона должен сопровождаться образованием множества молекул посредника.

В 1973 г. было выдвинуто предположение, что в темноте в дисках накапливаются ионы кальция Ca^+ , а при освещении они высвобождаются и, достигая путем диффузии плазматической мембраны, закрывают натриевые каналы. Эта привлекательная гипотеза вызвала большой интерес и породила множество экспериментов. Однако последующие эксперименты показали, что, хотя ионы кальция Ca^+ и играют большую роль в зрении, они не являются возбуждающим медиатором. Роль медиатора, как выяснилось, играет 3', 5'-циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) (рис. 7).

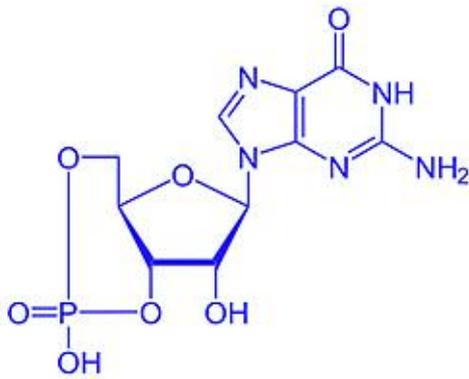


Рис. 7. 3', 5'-циклический гуанозинмонофосфат (сGMP).

Способность сGMP функционировать в качестве медиатора определяется его химической структурой. сGMP — это нуклеотид класса гуаниловых нуклеотидов, представленных в РНК. Как и другие нуклеотиды, он состоит из двух компонентов: азотистого основания - гуанина, и остатка пятиуглеродного сахара рибозы, атомы углерода в котором в положениях 3' и 5', соединены посредством фосфатной группы. Фосфодиэфирная связь замыкает молекулу сGMP в кольцо. Когда это кольцо целое, сGMP способен поддерживать натриевые каналы мембраны в открытом состоянии, а когда фосфодиэфирная связь расщепляется ферментом фосфодиэстеразой, натриевые каналы спонтанно закрываются, в результате чего электрические свойства мембраны изменяются и возникает нервный импульс (рис. 8).

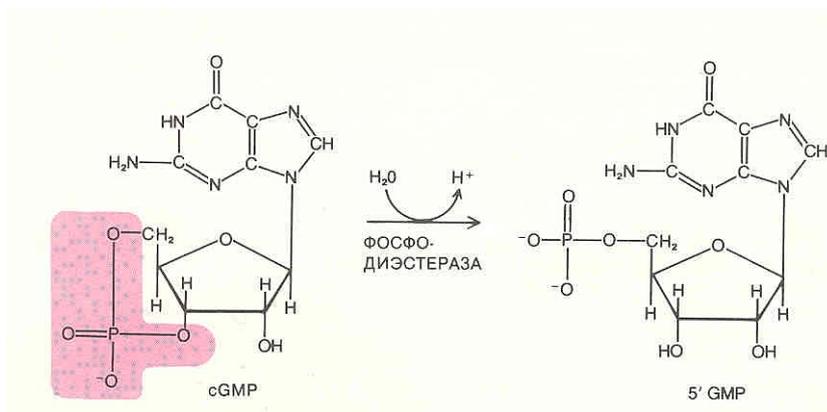


Рис. 8. Функционирование сGMP. Кольцо циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), образованное фосфатной группой, связанной с 3'-и5'-углеродными атомами рибозы, размыкается под действием фермента фосфодиэстеразы. Этот фермент присоединяет к сGMP молекулу воды так, что фосфодиэфирная связь разрывается и остается 5'-гуанозинмонофосфат (5' GMP).

Между возбуждением родопсина и ферментативным расщеплением cGMP лежит несколько промежуточных стадий. Когда молекула 11-*цис*-ретинала поглощает фотон и активируется опсин, родопсин в свою очередь активирует фермент, называемый трансдуцином [12]. Взаимодействие активированной формы родопсина с G-белком трансдуцином является ключевой биохимической стадией в зрительном процессе. Трансдуцин является ключевым интермедиатом в каскаде возбуждения. Этот рецепторный G-белок активирует специфическую фосфодиэстеразу, которая раскрывает кольцо cGMP, присоединяя к нему молекулу воды, осуществляя гидролиз cGMP. Хотя схему этого процесса описать несложно, но выяснение и понимание его физиологической роли потребовали множества различных экспериментов.

Впоследствии было обнаружено, что на свету концентрация cGMP в наружных сегментах палочек уменьшается [13]. Последующие эксперименты показали, что это уменьшение является следствием гидролиза cGMP под действием фосфодиэстеразы, специфичной к данному нуклеотиду. В то время кальциевая гипотеза была еще очень популярна, но уже не вызывало сомнений и то, что cGMP обладает значительным прямым влиянием на возбуждающий ответ.

На конференции, проходившей в 1978 г., П. Либман из Пенсильванского университета сообщил, что в суспензии наружных сегментов палочек один фотон может инициировать активацию сотен молекул фосфодиэстеразы в секунду. В более ранних работах в присутствии другого нуклеотида — аденозинтрифосфата (АТФ) наблюдалось гораздо меньшее усиление, чем в присутствии гуанозинтрифосфата (GTP).

Гуанозинтрифосфат (GTP) имеет такую же структуру, как нециклическая форма GMP, но в GMP с 5' -углеродным атомом связана не одна фосфатная группа, а цепочка из трех фосфатов, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями. Энергия, запасенная в этих связях, используется во многих клеточных функциях. Например, при отщеплении от GTP одной фосфатной группы (при этом образуется гуанозиндифосфат, GDP) выделяется значительное количество энергии. Таким путем клетка получает энергию, позволяющую осуществлять химические реакции, которые в ином случае энергетически невыгодны. Также важно то, что этот процесс имеет место при активации фосфодиэстеразы, где GTP служит необходимым кофактором.

В 1994 г. удалось инъектировать cGMP в наружный сегмент интактной палочки, и результаты этого оказались впечатляющими [14]. Как только циклический гуанозинмонофосфат попадал внутрь клетки, быстро уменьшалась разность потенциалов на плазматической мембране и резко увеличивалась задержка между подачей светового импульса и гиперполяризацией мембраны. Это объясняется тем, что cGMP открывает

натриевые каналы и они остаются открытыми до тех пор, пока cGMP не распадется под действием активированной светом фосфодиэстеразы на GMP. Эта гипотеза казалась весьма привлекательной, но прямых ее доказательств не было.

Существенное значение в механизме передачи светового сигнала имеет тот факт, что для активации фосфодиэстеразы необходим GTP. Это позволило предположить, что важным интермедиатом активации может быть какой-то белок, связывающий GTP. Нужно было тщательно исследовать, что происходит с GTP в палочках. Целью первых экспериментов было обнаружить связывание GTP и его производных в наружных сегментах палочек. Меченный радиоактивным изотопом углерода ^{14}C GTP инкубировали с палочками и фрагментами их наружных сегментов. После нескольких часов препарат промывали на фильтре, задерживающем фрагменты мембран и крупные молекулы, такие, как белки, и пропускающем мелкие молекулы, в том числе GTP и метаболически близкие ему соединения. Оказалось, что значительная часть радиоактивности остается связанной с мембранной фракцией. В дальнейшем выяснилось, что в мембране остается не GTP, а GDP.

Эти опыты показали, что в мембранах палочек содержится белок, способный связывать GTP и отщеплять от него одну фосфатную группу с образованием GDP. Казалось все более очевидным, что такой белок — ключевой интермедиат и что превращение GTP в GDP может приводить в действие процесс активации.

Одним из поразительных фактов было то, что мембраны палочек не только связывают гуаниловые нуклеотиды, но при освещении из них высвобождается GDP причем этот процесс значительно усиливается в присутствии GTP в растворе. Сформировалась гипотеза, объясняющая эти явления. По-видимому, какой-то этап процесса активации включает обмен GTP на GDP в мембране. Поэтому высвобождение GDP так сильно и увеличивается при добавлении GTP: GTP должен замещаться GDP. В дальнейшем GTP превращается в GDP.

Установлено, что обмен GTP на GDP имеет отношение к центральному событию процесса активации. Исследовалось действие света на поглощение GDP мембранами палочек и обнаружилось, что фотовозбуждение одной молекулы родопсина приводит к связыванию около 500 молекул GTP. Открытие этого усиления стало важным этапом на пути к объяснению усиления, присущего каскаду возбуждения.

Этот фундаментальный результат привел к важному выводу, что в каскаде возбуждения участвует белковый интермедиат, существующий в двух состояниях. В одном состоянии он связывает GDP, в другом — GTP. Обмен GDP на GTP, служащий сигналом к активации белка, инициируется молекулой родопсина и в свою очередь активирует

специфическую фосфодиэстеразу. Фосфодиэстераза расщепляет циклический GMP, вследствие чего закрываются натриевые каналы в плазматической мембране. Вскоре этот белок был выделен. Он получил название трансдуцин, так как опосредует трансдукцию — преобразование света в электрический сигнал. Было установлено, что трансдуцин состоит из трех белковых субъединиц — *альфа* (α), *бета* (β), и *гамма* (γ).

Сигнал передается от активированного родопсина к трансдуцину и от его GTP-формы к фосфодиэстеразе. Если такая картина верна, следует ожидать, во первых, что трансдуцин может переходить в GTP-форму в отсутствие фосфодиэстеразы, и, во-вторых, что фосфодиэстераза способна активироваться от возбужденного светом родопсина. Для проверки этого предположения использовалась синтетическая мембранная система, не содержащая фосфодиэстеразы. На искусственную мембрану наносили очищенный трансдуцин в GDP-форме, а затем добавляли активированный родопсин. В этих опытах было установлено, что каждая молекула родопсина катализирует захват мембраной 71 молекул аналога GTP. Значит, активируя трансдуцин, каждая молекула родопсина катализирует обмен GDP на GTP во множестве молекул трансдуцина. Таким образом удалось обнаружить усилительный эффект родопсина, для проявления которого, была выделена очищенная активная форма трансдуцина — в виде его комплекса с GTP. Здесь исследователей ожидал сюрприз. В неактивной GDP-форме молекула трансдуцина целая — все три ее субъединицы находятся вместе. Оказалось, что при переходе в GTP-форму трансдуцин диссоциирует: α -субъединица отделяется от β - и γ -субъединицы белка, а GTP связывается со свободной α -субъединицей.

Необходимо было выяснить, какая субъединица трансдуцина — α - (с присоединенным GTP) или β -, γ -субъединица активирует фосфодиэстеразу. Было установлено, что фосфодиэстеразу активирует α -субъединица в комплексе с GTP; остающиеся вместе β - и γ -субъединицы не влияют на работу фермента. Более того, α -субъединица вызывала активацию трансдуцина и без родопсина; это объясняло предположение о том, что трансдуцин может активировать фосфодиэстеразу без присутствия родопсина.

Механизм активации специфической фосфодиэстеразы трансдуцином в настоящее время детально изучен. В темноте фосфодиэстераза мало активна, поскольку находится в инактивированном состоянии. Добавление небольшого количества трипсина — фермента, расщепляющего белки активирует фосфодиэстеразу. Молекула фосфодиэстеразы состоит из трех полипептидных цепей; как и у трансдуцина, они обозначаются соответственно α -, β - и γ -субъединицы. Трипсин разрушает γ -субъединицу, но не α - и β -субъединицу. Таким образом, выяснилось, что ингибитором фосфодиэстеразы служит γ -субъединица.

Позже удалось выделить γ -субъединицу в чистом виде, добавили ее к активному комплексу α , β -субъединиц и обнаружилось, что γ -субъединица подавляет каталитическую активность трансдуцина более чем на 99% [15]. Кроме того, скорость разрушения γ -субъединицы трипсином хорошо соответствует скорости активации фосфодиэстеразы в каскаде возбуждения. Трансдуцин в GTP-форме может связываться с γ -субъединицей фосфодиэстеразы, образуя комплекс.

Все эти данные складываются в следующую картину. После воздействия света α -субъединица трансдуцина с присоединенным GTP связывается с фосфодиэстеразой и ингибирующая ее γ -субъединица отделяется. В результате этого трансдуцин активируется и проявляется каталитическая активность фосфодиэстеразы. Эта активность велика: каждая активированная молекула фермента может осуществить гидролиз 4200 молекул циклического гуанозинмонофосфата за 1 секунду. Итак, стала ясной большая часть биохимических реакций зрительного цикла (рис. 9). Начальный этап каскада возбуждения — поглощение фотона родопсином. Затем активированный родопсин взаимодействует с трансдуцином, что приводит к обмену GDP на GTP, происходящему на α -субъединице трансдуцина. В результате α -субъединица отделяется от остальной части фермента, активируя фосфодиэстеразу. Последняя расщепляет множество молекул cGMP. Этот процесс длится всего около миллисекунды. Через некоторое время «встроенный таймер» α -субъединицы трансдуцина расщепляет GTP с образованием GDP и α -субъединица воссоединяется с β - и γ -субъединицами. Фосфодиэстераза также восстанавливается. Родопсин инактивируется и затем переходит в форму, готовую к активации.

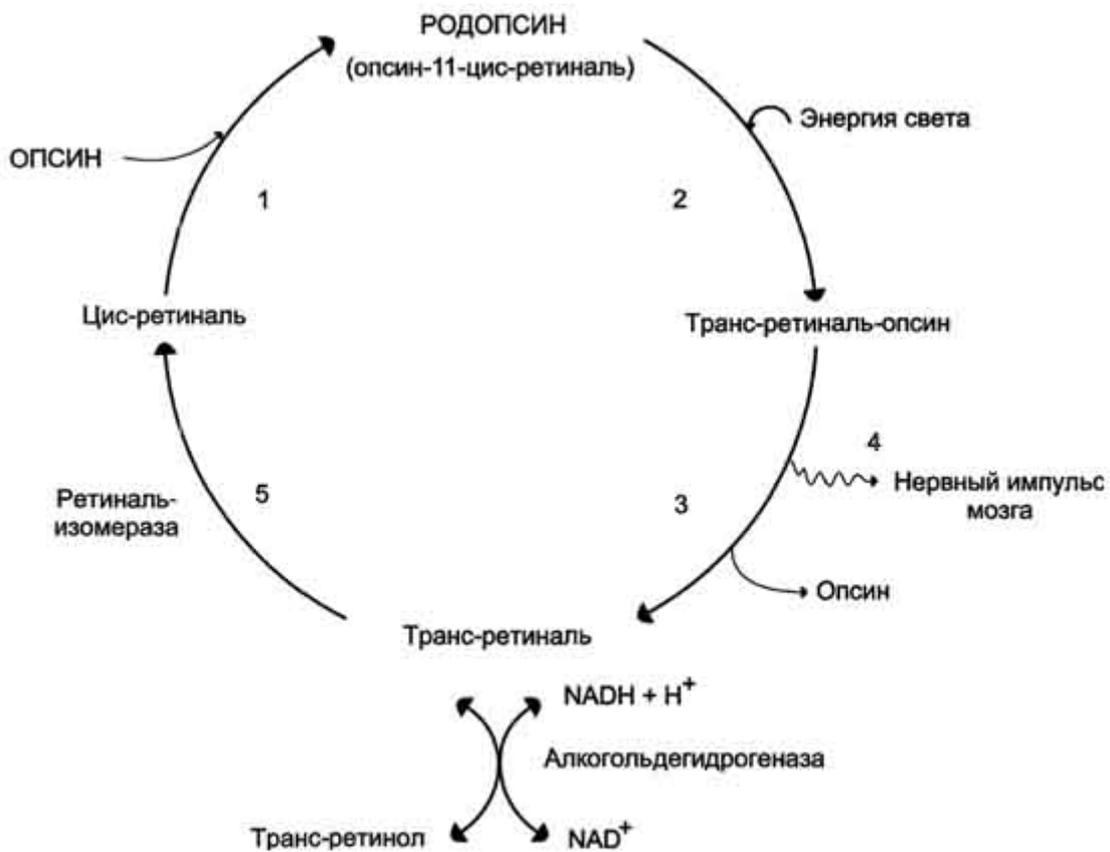


Рис. 9. Схема зрительного цикла. 1 – 11-*цис*-ретиналь в темноте соединяется с белком опсином, образуя родопсин; 2 - под действием кванта света происходит фотоизомеризация 11-*цис*-ретиналя в 11-*транс*-ретиналь; 3 – 11-*транс*-ретиналь-опсин распадается на 11-*транс*-ретиналь и опсин; 4 - поскольку пигменты встроены в мембраны светочувствительных клеток сетчатки, это приводит к местной деполяризации мембраны и возникновению нервного импульса, распространяющегося по нервному волокну; 5 - заключительный этап этого процесса - регенерация исходного пигмента. Это происходит при участии ретинальизомеразы через стадии: 11-*транс*-ретиналь → 11-*транс*-ретинол → 11-*цис*-ретинол → 11-*цис*-ретиналь; последний вновь соединяется с опсином, образуя родопсин.

В результате действия одной молекулы родопсина образуется несколько сотен активных комплексов α -субъединицы трансдуцина GTP, что является первой ступенью усиления. Затем α -субъединица трансдуцина, несущая GTP, активирует фосфодиэстеразу. На этой стадии усиления нет; каждая молекула α -субъединицы трансдуцина связывает и активирует одну молекулу фосфодиэстеразы. Следующую стадию усиления обеспечивает пара трансдуцин-фосфодиэстераза, действующая как одно целое. α -субъединица трансдуцина остается связанной с фосфодиэстеразой до тех пор, пока та не расщепит 3'-5'-

связь в циклическом гуанозинмонофосфате. Каждая активированная молекула фермента может осуществить превращение нескольких тысяч молекул GMP. Это усиление, обеспечиваемое родопсином, лежит в основе замечательного по своей эффективности преобразования, благодаря которому один единственный фотон вызывает интенсивный нервный импульс.

Однако организм способен воспринимать свет многократно, значит, этот цикл должен и выключаться. Оказывается трансдуцин играет ключевую роль не только в активации, но и в деактивации. Его α -субъединица имеет встроенный механизм - "таймер", который прерывает активированное состояние, превращая связанный GTP в GDP. Механизм действия этого "таймера" не совсем ясен. Известно, что гидролиз GTP с образованием GDP в фазе деактивации играет важную роль в осуществлении всего цикла. Реакции, ведущие к активации, энергетически выгодны. Напротив, некоторые реакции деактивации невыгодны; без превращения GTP в GDP система не может быть приведена в исходное состояние для новой активации.

Когда GTP расщепляется и образуется GDP, α -субъединица трансдуцина освобождает ингибирующую γ -субъединицу фосфодиэстеразы. Затем γ -субъединица опять связывается с фосфодиэстеразой, возвращая ее в состояние покоя. Трансдуцин восстанавливает свою доактивационную форму благодаря воссоединению субъединиц α и β , γ . Родопсин деактивируется с помощью фермента - киназы, распознающей его специфическую структуру. Этот фермент присоединяет фосфатные группы к нескольким аминокислотам на одном конце полипептидной цепи опсина. Родопсин затем образует комплекс с белком арестином, который блокирует связывание трансдуцина и возвращает систему назад в темновое состояние.

Исследования зрительного каскада в середине 1980-х начале 1990-х гг. опирались в значительной мере на предположение о том, что циклический гуанозинмонофосфат открывает натриевые каналы в наружной мембране палочки и что его гидролиз приводит к их закрыванию. Однако о механизмах этих процессов было известно немного. Действует ли cGMP на каналы прямо или же через какие-то промежуточные стадии? Определенный ответ на этот вопрос был получен в 1985 г. российским ученым Е.Е. Фесенко из Института биологической физики в Москве. В экспериментах использовалась микропипетка, в которую затягивался маленький участок плазматической мембраны палочки. Он плотно прилипал к кончику пипетки и та сторона, которая в норме была обращена внутрь клетки, оказывалась наружной. Эту сторону мембраны омывали различными растворами и определяли их влияние на натриевую проводимость.

Результаты были получены совершенно однозначные: натриевые каналы открываются непосредственно cGMP; другие вещества, включая ионы кальция Ca^{+} , на них не влияют.

Блестящие эксперименты российских учёных опровергли представления об ионах кальция Ca^{+} как о медиаторе возбуждения и установили последнее звено в каскаде возбуждения. Стал понятен и общий контур цепи возбуждения. Как и предполагалось, поток информации направлен от родопсина к трансдуцину, затем к фосфодиэстеразе и, наконец, к cGMP.

Хотя изучение путей и механизмов каскада возбуждения добилось больших успехов, ряд важных вопросов все еще остается без ответа. В частности, не ясно, каким образом регулируется усилительный ответ каскада. Палочки значительно менее чувствительны на ярком свете, чем в темноте. Фоновое освещение должно как-то влиять на общий результат действия системы, т. е. на суммарное усиление, создаваемое на двух стадиях — при передаче сигнала от родопсина к трансдуцину и от фосфодиэстеразы к cGMP. Многие свидетельствуют об участии ионов кальция в этом процессе, однако детали этого механизма полностью не изучены. В связи с этим важно было также установить структуру натриевых каналов и механизмы, предотвращающие истощение циклического гуанозинмонофосфата в клетке. Большой вклад в изучение этого внесли группы Б. Кауппа из института нейробиологии при Оснабрюкском университете (ФРГ) и Либмана: они выделили управляемые cGMP каналы и реконструировали их функцию на модельных мембранах. Ключевой элемент - гуанилатциклаза — фермент, синтезирующий cGMP. В клетке существует регуляция концентрации cGMP по типу обратной связи, которая обеспечивает после ответа на световой стимул восстановление концентрации cGMP до исходного уровня. Не будь этого, клетка имела бы возможность сработать лишь несколько раз и тем надолго исчерпала бы способность к ответу.

Результаты последних исследований каскада зрительных реакций в палочках, имеют отношение и к другим типам клеток. Система преобразования светового сигнала в других фоторецепторных клетках — колбочках — сходна с таковой палочек. Известно, что в колбочках содержатся три аналогичных родопсину зрительных пигмента, отвечающих на свет определенной длины волны — красный, зеленый либо синий. В состав всех трех пигментов входит 11-*цис*-ретиаль. С применением методов молекулярной генетики было установлено, что структура у колбочковых пигментов такая же, как у родопсина. Трансдуцин, фосфодиэстераза и каналы, контролируемые cGMP, в колбочках и в палочках очень похожи.

ЭВОЛЮЦИЯ G-БЕЛКОВ.

Значение каскада с участием циклического гуанозинмонофосфата не ограничивается зрением. Каскад возбуждения в палочках имеет заметное сходство с механизмом действия некоторых гормонов. Например, действие адреналина начинается с того, что он активирует фермент, называемый аденилатциклазой. Аденилатциклаза катализирует образование циклического аденозинмонофосфата (сАМФ), который служит внутриклеточным посредником для многих гормонов. Обнаружилось поразительное сходство этой реакции с функционированием каскада возбуждения в палочках. Подобно тому как каскад возбуждения начинается с поглощения фотона родопсином, гормональный каскад начинается со связывания гормона специфическим белковым рецептором, расположенным на поверхности клетки. Комплекс рецептор-гормон взаимодействует с так называемым G-белком, напоминающим трансдуцин. Такой же обмен связанных молекул, какой активирует трансдуцин (GTP на GDP), активирует и G-белок, когда он взаимодействует с комплексом рецептор-гормон. G-белок, как и трансдуцин, состоит из трех субъединиц. Аденилатциклаза активируется его α -субъединицей, снимающей ингибирующее влияние. Стимулирующее действие G-белка тоже прекращается благодаря встроенному “таймеру”, превращающему GTP в GDP.

Сходство трансдуцина и G-белков относится не только к активности, но и к структуре. Трансдуцин и G-белки принадлежат к одному семейству — семейству рецепторных мембранных белков, передающих те или иные сигналы. Все идентифицированные к настоящему времени представители этой группы имеют практически одинаковую α -субъединицу. Кроме того, α -субъединица выполняет одну и ту же функцию, что показано на молекулярном уровне. Недавно в нескольких лабораториях были установлены нуклеотидные последовательности ДНК, кодирующие α -субъединицы трансдуцина и трех G-белков. Судя по ДНК, аминокислотные последовательности этих четырех полипептидных цепей примерно на половине своей длины идентичны или почти идентичны друг другу.

При сравнительном анализе генетической информации обнаружилось, что в составе α -субъединиц трансдуцина и G-белков имеются как участки, оставшиеся неизменными в ходе эволюции, так и сильно дивергировавшие области [16]. В каждом белке имеются три места связывания: одно для гуаниловых нуклеотидов, одно для активированного рецептора (родопсина или комплекса гормон-рецептор) и одно для эффекторного белка - фосфодиэстеразы или аденилатциклазы. Места связывания GTP и GDP, как и следовало

ожидать, исходя из их решающей роли в каскаде возбуждения, оказались наиболее консервативными.

Кроме того, оказалось, что GTP-связывающие участки этих белков напоминают одну область функционально совершенно иного белка; так называемого фактора элонгации Tu. Этот белок играет важную роль в синтезе белков: он образует комплекс с GTP и с молекулами аминоксил-тРНК, а затем связывается с рибосомой, т. е. обеспечивает процесс элонгации - доставку аминокислот к месту роста синтезируемой полипептидной цепи. Цикл событий, происходящих с белком Tu в процессе его функционирования подобен трансдуциновому циклу. Цикл начинается расщеплением GTP. На молекуле Tu есть место связывания GTP, причем по аминокислотной последовательности оно очень сходно с участками связывания гуаниловых нуклеотидов в трансдуцине и различных G-белках.

Синтез белков — один из основных аспектов метаболизма клетки, и вероятно, что фактор элонгации Tu, участвующий в этом фундаментальном процессе, в ходе эволюции возник раньше, чем G-белки или родственный им трансдуцин. Этот интересный белок может быть предком и трансдуцина и G-белков. Контролируемое высвобождение и связывание белков, связанное с обменом GTP на GDP сформировалось на ранних этапах эволюции и фактор элонгации Tu, возможно, представляет один из первых эволюционных вариантов такого цикла.

Одна из удивительных особенностей эволюции заключается в том, что механизм, возникший применительно к определенной функции, может в дальнейшем изменяться и использоваться для совершенно иных функций. Именно это, и произошло с механизмом действия Tu. Сформировавшись в ходе эволюции для осуществления синтеза белка, он сохранялся на протяжении миллиардов лет и впоследствии вошел в систему передачи гормональных и сенсорных сигналов. В последние несколько лет одна из его функций — трансдуциновый цикл — изучен до мельчайших деталей. Результаты этих исследований имеют большое научное значение, поскольку удалось на молекулярном уровне понять один из наиболее удивительных сенсорных механизмов — механизм передачи света и зрительного возбуждения.

Возможно, вскоре будут раскрыты и новые представления о цветном зрении. Все еще неясно, является ли зеленый цвет, который мы видим, средним эффектом между желтым и синим цветом, или в некоторых случаях он соответствует длине волн, соответствующих зеленому цвету спектра.

Наш мозг может регистрировать зеленый цвет, как спектрометр, т.е., при определенной длине электромагнитных волн. Он также может регистрировать зеленый цвет и как смесь

желтого и синего цветов. Восприятие цветов зрительным анализатором не может быть определено, как спектрометром.

В качестве примера смешивания электромагнитных волн, которые соответствуют зеленому и красному цвету, приводится желтый цвет. Считается, что при зрительном акте, действуют пары сине-желтый и зелено-красный цвет. Зрительный анализатор обладает свойством анализировать определенные диапазоны оптического спектра, как цвета. Смещение зеленого и красного цвета не производит никакого среднего цвета. Мозг воспринимает его, как желтый цвет. Когда происходит излучение электромагнитных волн, которые соответствуют зеленому и красному цвету, мозг воспринимает «среднее решение» – желтый цвет.

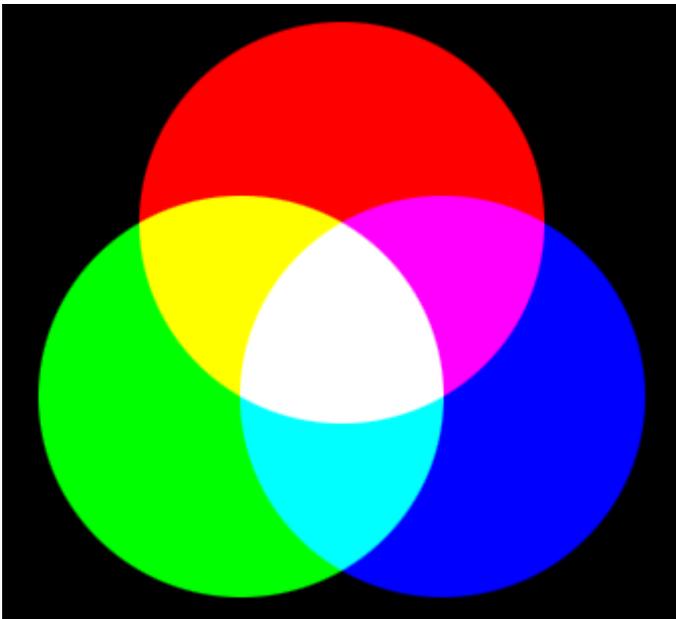


Рис. 10. Аддитивное смешение цветов

Таким же образом синий и желтый цвет воспринимаются, как зеленый. Это означает, что между парами - синий-желтый и зелено-красный цвет происходит спектральное смешивание цвета. Это относится и к положению, когда зрительный анализатор «принимает решение» о цветах, к которым он более чувствителен. Аналогично зеленый и синий цвет воспринимаются, как циан. Например, зрительный анализатор всегда воспринимает апельсин в оранжевом цвете, поскольку от него отражаются электромагнитные волны, которые соответствуют желтому и красному цвету. Ниже всего проявляется зрительная чувствительность к фиолетовому, синему и красному цвету. Причем смешение электромагнитных волн, которые соответствуют синему и красному цвету, воспринимается, как фиолетовый цвет. При смешении электромагнитных волн, которые соответствуют большему количеству цветов, мозг не воспринимает их, как

отдельные цвета, или как «среднее» решение, а как белый цвет. Эти данные свидетельствуют о том, что представление о цвете не определяется однозначно длиной волны. Анализ производится «биокомпьютером» - мозгом, и представление о цвете, по своей сущности, является продуктом нашего сознания [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные исследования родопсина и других родственных ему ретинальсодержащих хромофорных белков (йодопсин, бактериородопсин), а также выявление глазных патологий, связанных с его функционированием, продолжают в НИЦМБ (Болгария) последние 10 лет, и среди вопросов, требующих скорейшего разрешения, можно выделить следующие:

- Какие структурные превращения сопровождают активацию родопсина и придают ему способность взаимодействовать с рецепторными G-белками (трансдуцин, белки-киназы и аррестин)?
- Каковы пространственные структуры комплексов активированного родопсина и трансдуцина?
- Каков механизм клеточного «созревания» и деградации родопсина?

Дальнейшее исследование родопсина имеет не только научно-фундаментальное, но и прикладное значение, и может быть использовано для лечения или предотвращения биохимических нарушений зрения. Родопсин является наиболее исследованным белком из семейства GPCR-рецепторов, и вышеизложенные выводы, полученные для него, могут быть использованы для изучения структуры и функциональных свойств других трансмембранных белков этого семейства, например бактериородопсина [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Хьюбел. *Глаз, мозг, зрение* / под ред. А. Л. Бызова., Мир, Москва (1990), 172 с.
2. M. J. Hogan, J. A. Alvarado, J. E. Weddell. *Histology of the Human Eye*, Saunders, Philadelphia (1971), 115 p.
3. J. Nathans, D. Thomas, D. S. Hogness. “*Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments*”, *Science*, **232**(47), 193–202 (1986).
4. R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing. “*Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy*”, *J. Mol. Biol.*, **212**, 899–29 (1991).

5. K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, “Crystal Structure of Rhodopsin: A G-Protein-Coupled Receptor”, *Science*, **289**, 739–745 (2000).
6. Ю. А. Овчинников, Н. Г. Абдулаев, М. Ю. Фейгина, И. Д. Артамонов, А. С. Богачук. “Зрительный родопсин: Полная аминокислотная последовательность и топология в мембране”, *Биоорганическая химия*, **10**, 1331–1340 19830.
7. P.A. Hargrave, J.H. McDowell, D.R. Curtis, J. K. Wang, E. Juszczak, S. L. Fong, J. K. Rao, P. Argos, “The structure of bovine rhodopsin”, *Biophys. Struct. Mech.*, **9**, 235–244 (1983).
8. G. F. Schertler, P. A. Hargrave, “Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 11578–11582 (1995).
9. В. М. Липкин. “Зрительная система. Механизмы передачи и усиления зрительного сигнала в сетчатке глаза”, *Соросовский образовательный журнал*, **9**, 2–8 (2001).
10. Y. Shichida, H. Imai. “Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals”, *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 1299–1315 (1998).
11. А. Б. Рубин. Фотопревращения бактериородопсина и родопсина, *Биофизика*, т.2., Москва, Наука (2004), 87 с.
12. Y. Liang, D. Fotiadis, T. Maeda, A. Maeda, A. Modzelewska, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel, K. Palczewski. “Rhodopsin signaling and organization in heterozygote rhodopsin knockout mice”, *J. Biol. Chem.*, **279**, 48189–48196 (2004).
13. J. M. Baldwin, G. F. Schertler, V. M. Unger. “An α carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors”, *J. Mol. Biol.*, **272**, 144–164 (1997).
14. J. Fitzgibbon, B. Appukuttan, S. Gayther, D. Wells, J. Delhanty, D. M. Hunt. “Localisation of the human blue cone pigment gene to chromosome band 7q31.3-32”, *Human Genetics*, **93**(1), 79–80 (1994).
15. K. Palczewski “G-Protein-Coupled Receptor Rhodopsin”, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 743–767 (2006).
16. P. S. Park, S. Filipek, J. W. Wells, K. Palczewski. “Oligomerization of G-protein-coupled receptors: past, present, and future”, *Biochemistry*, **43**, 15643–15656 (2004).
17. I. Ignatov, M. Marinov. *Color Kirlian Spectral Analysis. Color Observation with Visual Analyzer*, EUROMEDICA, Hanover, (2008), 32 p.
18. О.В. Мосин, И. И. Игнатов. “Природный фотопреобразующий наноматериал бактериородопсин из галофильной бактерии *Halobacterium halobium*”, *Наноматериалы и наноструктуры*, **2**, 47-58 (2012).

