

Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина

М.А. Островский

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва; ostrovsky@sky.chph.ras.ru

Зрительный пигмент родопсин – типичный представитель семейства мембранных светочувствительных ретинальсодержащих белков. К этому семейству относятся также сенсорные родопсины, галородопсин и бактериородопсин галофильных архебактерий. Все эти белки имеют сходную структуру и топографию в мембране.

Эволюция. Ретиналь-содержащие белки – одни из самых древних белков биосферы. Бактериородопсин, относящийся к родопсинам 1-го типа и ответственный за бескислородный фотосинтез (фотоэнергетический процесс), возник в клетках-прокариотах около 3.5 млрд. лет назад. Зрительный пигмент родопсин, относящийся к родопсинам 2-го типа (G-белоксвязывающий рецептор) и ответственный за фоторецепцию (фотоинформационный процесс), появился в клетках-эукариотах многоклеточных организмов около 1 млрд. лет назад. Около 600 млн. лет назад, с которых начинается эволюционное древо животного царства, зрительный родопсин становится светочувствительным белком в самых примитивных фоторецепторных структурах, а с периода кэмбрийского взрыва (около 540 млн. лет назад) сохраняется как рецепторный белок в зрительных клетках разнообразнейших по структуре органах зрения беспозвоночных и позвоночных животных.

Структура. Родопсин стал первым мембранным белком животного происхождения, двухмерная и трёхмерная структура которого были определены. Как и в родопсинах 1-го типа (бактериородопсин), в нём можно выделить гидрофобный внутримембранный (трансмембранный) домен, образованный семью α -спиральными «тя-

жами», собранными в пучок и пересекающими фоторецепторную мембрану, и два гидрофильных, расположенных по обе стороны мембраны – цитоплазматический и внутридисковый. Зрительный пигмент родопсин является классическим G-белоксвязывающим рецептором. Строение обширного класса G-белоксвязывающих рецепторов подобно структуре родопсина.

Наиболее консервативным доменом ретинальсодержащих белков является хромофорный центр белковой части молекулы (опсина), в котором находится ковалентно связанная с белком хромофорная группа – в случае бактериородопсина полностью – *транс*-ретиналь, в случае зрительного родопсина 11-*цис*-ретиналь. Используя методы молекулярной динамики, нами была продемонстрирована взаимная «подстройка» 11-*цис*-ретиналя как хромофора и как лиганда-антагониста (*inverse agonist*) и его ближайшего белкового окружения в хромофорсвязывающем центре опсина. Такая «подстройка» переводит молекулу родопсина (хромофорный центр) в состояние повышенной готовности для поглощения кванта света и стабилизирует родопсин как G-белоксвязывающий рецептор (цитоплазматический домен) в его темновом, физиологически неактивном состоянии. Ряд мутаций в хромофорном центре опсина приводят к неспособности родопсина поддерживать темновое, физиологически неактивное состояние или к нарушению его способности к регенерации. Следствием этого становятся определённые дегенеративные заболевания сетчатки.

Молекулярная физиология родопсина. В механизмах фоторецепции молекула родоп-

сина выполняет несколько физиологических функций. Они определяются в основном хромофорной группой и её специфическим взаимодействием с ближайшим белковым окружением. Во-первых, это функция спектральной настройки зрительных пигментов. Зрительные пигменты способны поглощать свет от ультрафиолетовой до красной области спектра – от 360 до 620 нм. Спектральная настройка обеспечивает возможность цветосприятия. Во-вторых, это функция инициации зрительного акта – процесса фототрансдукции. В-третьих, это функция лиганда-антагониста (*inverse agonist*) хромофорной группы – 11-*цис*-ретиналя в родопсине как G-белоксвязывающем рецепторе. После поглощения света и фотоизомеризации 11-*цис*-ретиналя теперь уже полностью-*транс*-ретиналь на сравнительно долгоживущей стадии фотолиза метародопсина II становится мощным лигандом-агонистом, поддерживая родопсин в физиологически активном состоянии, когда он способен связывать и активировать G-белок трансдуцин. В результате, в условиях темновой адаптации обеспечивается подавление темнового «шума» (взаимодействие родопсина трансдуцином, практически, невозможно) и эффективный запуск процесса фототрансдукции. Наконец, в-четвёртых, – это патогенетическая роль зрительного пигмента. Нарушение зрительного цикла родопсина и, как следствие, накопление в фоторецепторной мембране свободного полностью-*транс*-ретиналя, высвободившегося из опсина на последней стадии фотолиза, приводит как к потенциальной опасности фотоповреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия, так и к опасности развития дегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе болезни Штаргардта, возрастной макулярной дегенерации и ряда других абiotрофий сетчатки.

1. *Спектральная настройка зрительных пигментов.* Спектральная настройка воз-

можно в двух временных шкалах: длительной эволюционной и сравнительно краткосрочной адаптационной (физиологической). Эволюционная настройка обеспечивается специфическим белковым окружением – аминокислотными заменами вокруг хромофорной группы — 11-*цис*-ретиналя или 11-*цис*-дегидроретиналя в хромофорном центре опсина. Адаптационная настройка – сезонная или зависящая от световой среды обитания – осуществляется заменой хромофорной группы – 11-*цис*-ретиналя (ретиналь₁ – альдегид витамина А₁) на 11-*цис*-дегидроретиналь (ретиналь₂ – альдегид витамина А₂) и обратно. Примером такой, зависящей от световой среды обитания, настройки может служить зрительный пигмент двух популяций финских креветок *Mysis relicta* – морской и озёрной, разделившихся в конце ледникового периода (около 9000 лет назад), обитающих при совершенно разных условиях освещения и заметно отличающихся по световой и спектральной чувствительности. Как показано нами совместно с финскими коллегами, максимумы поглощения родопсина у этих креветок отличаются (530 нм у морской, живущей при относительно высоких освещённостях, и 560 нм у озёрной, обитающей на большой глубине). Это отличие связано не с аминокислотными заменами, а, скорее всего, с заменой ретиналя₁ на ретиналь₂.

Принципиально важной является эволюционная настройка. В ходе эволюции в фоторецепторных клетках сетчатки позвоночных сформировалось пять классов зрительных пигментов. Это класс палочковых пигментов, поглощающих в области 500 нм (родопсин), и четыре класса колбочковых: длинноволновые с максимумом поглощения 500–570 нм, средневолновые с максимумом поглощения 480–530 нм и два коротковолновых с максимумами поглощения 400–470 нм и 355–445 нм. Что касается спектральной настройки родоп-

сина в палочках, то, во всяком случае, у наземных позвоночных максимум поглощения расположен в области 500 нм. Единственным, до сих пор известным исключением является адаптация к коротковолновой (голубой) среде морского обитания у глубоко ныряющего бутылконового дельфина (афалины), у которого в результате замены двух аминокислотных остатков максимум спектра поглощения родопсина сдвинут в синюю область к 488 нм. Что касается спектральной настройки колбочковых пигментов, то она гораздо разнообразнее, что, в частности, обеспечивает цветовосприятие у приматов и человека. Одним из наиболее существенных изменений в эволюционной шкале времени является сдвиг спектра поглощения коротковолнового пигмента из ультрафиолетовой в фиолетово-синюю область видимого спектра, который обеспечивается всего одной аминокислотной заменой в хромофорном центре. Спектральная настройка длинноволновых колбочковых пигментов требует нескольких аминокислотных замен в хромофорном центре. Одними из таких замен является появление анионсвязывающих центров. Как нами и рядом других авторов было показано, речь идёт о хлорсвязывающих аминокислотных остатках в «красных» колбочках рептилий, птиц и млекопитающих. На изолированной сетчатке золотой рыбки нами было показано, что удаление ионов хлора не только смещает максимум спектра поглощения длинноволнового пигмента примерно на 30 нм в коротковолновую (зелёную) область, но и приводит к уменьшению или даже исчезновению позднего рецепторного потенциала красночувствительных колбочек в ответ на красную световую вспышку.

Таким образом, одной из важнейшей физиологической функцией хромофорного центра зрительного пигмента является «настройка» его спектральной чувствительности, что обеспечивает адаптацию

фоторецепторных клеток к световой среде обитания и формирование механизма цветовосприятия.

2. *Фотохимическая реакция, иницирующая процесс фототрансдукции.* Фототрансдукция запускается реакцией фотоизомеризации хромофорной группы родопсина 11-*цис*-ретиная. Следует подчеркнуть, что хромофорный центр белковой части молекулы (опсина) является наиболее консервативным доменом ретинальсодержащих белков. Хромофор – полностью-*транс*-ретинаяль в случае бактериородопсина и 11-*цис*-ретинаяль в случае зрительного родопсина – связан с белком как ковалентно, так и взаимодействует нековалентно с окружающими его аминокислотными остатками. Фотоизомеризация ретинаяля в ретинальсодержащих белках совершается в фемтосекундной шкале времени ($1 \text{ фс} = 10^{-15} \text{ с}$) и с высоким квантовым выходом (0,7–0,8 для бактериородопсина и 0,65 для зрительного родопсина). Функциональный смысл столь высокой скорости и эффективности этой реакции состоит в том, чтобы энергия поглощённого кванта света была использована для необходимой реакции изомеризации, а не рассеялась в виде тепла или высветилась в виде флуоресценции. Скорость и эффективность реакции фотоизомеризации обеспечиваются поистине уникальным строением хромофорного центра и взаимодействием в нём хромофорной группы с её белковым окружением. Благодаря этому взаимодействию скорость фотоизомеризации хромофорной группы ретинальсодержащих белков соизмерима с теоретически рассчитанной скоростью фотоизомеризации ретинаяля в газовой фазе. Иными словами, скоростью фотоизомеризации ретинаяля в свободном объёме соизмерима со скоростью в тесном белковом окружении, что представляется удивительным и свидетельствует об идеальном взаимодействии хромофора с его белковым

окружением, сформировавшемся на самых ранних стадиях биологической эволюции.

Как совсем недавно нами и группой американских авторов было показано, переход молекулы зрительного пигмента родопсина в электронно-возбуждённое состояние совершается в пределах 75–110 фс, во время которого, собственно говоря, и совершается поворот вокруг С11-С12-связи в полиеновой цепи 11-*цис*-ретиная; а затем, примерно к 200 фс в основном состоянии образуется первый промежуточный продукт фотопревращения родопсина – фотородопсин, ретиналь в котором находится в искажённой, но уже полностью-*транс*оидной форме. Фотородопсин переходит затем в пределах 1 пс в следующий промежуточный продукт – батородопсин, в котором запасённая энергия поглощённого кванта света (35 ккал/моль) используется для конформационных перестроек белковой части молекулы (опсина) на последующих стадиях фотолиза.

С помощью лазерной абсорбционной спектроскопии высокого разрешения мы, совместно с лабораторией фемтосекундной спектроскопии Института химической физики им Н.Н. Семёнова РАН, подробно исследовали, используя двухимпульсную систему, когерентную динамику фотоизомеризации 11-*цис*-ретинаялевого хромофора в бычьем родопсине. С помощью же специально разработанной трёхимпульсной фемтосекундной лазерной системы нам впервые удалось зарегистрировать со стадии фотородопсина сверхбыструю фотообратимую (фотохромную) реакцию родопсина. Этот результат позволяет рассматривать зрительный пигмент родопсин как возможный прообраз сверхбыстрого молекулярного фотопереклювателя.

3. *Физиологически активное состояние родопсина. Фотоиндуцированное изменение конформации опсина и взаимодействие с G-белком трансдуцином.* Молекула родопсина состоит из цитоплазматического, транс-

мембранного и внутридискowego (экстраклеточного) доменов. Фотоизомеризация хромофора 11-*цис*-ретиная в трансмембранном домене инициирует последовательность конформационных перестроек во всей белковой части молекулы. В ходе этих перестроек в трансмембранном домене родопсина происходит депротонирование Шиффова основания— ковалентной связи полностью-*транс*-ретиная с белком, затем взаимное смещение VI, V и III трансмембранных «тяжей». В результате этого в цитоплазматическом домене формируется «щель», в которую «входит» С-полипептидный конец α -субъединицы G-белка трансдуцина. Большим достижением последнего времени стало описание кристаллической структуры метародопсина II. В этой работе с разрешением 3.0Å и 2.85Å представлены трёхмерные структуры самого метародопсина II и в комплексе с С-концевым фрагментом α -субъединицы трансдуцина.

Таким образом, ключевая стадия в механизме фототрансдукции — картина связывания с физиологически активированным родопсином (на стадии метародопсина II) трансдуцина и его последующая активация становится всё более ясной. Ясность эта достигается применением всего разнообразия методов исследования структуры и функции мембранных белков, в том числе метода ЭПР-спектроскопии в сочетании со спиновыми метками, ковалентно связанные с SH-группами цистеиновых аминокислотных остатков родопсина. Используя этот метод, нами в середине 80-х годов впервые было зарегистрировано индуцированное видимым светом увеличение конформационной подвижности цитоплазматических петель при переходе родопсина в метародопсин II и уменьшении этой подвижности при фотопереходе метародопсина II в смесь продуктов, включая родопсин и метародопсин III. Темновая регенерация родопсина – возвращение 11-*цис*-ретиная

в хромофорный центр опсина – приводит к восстановлению темнового конформационного состояния опсина и возвращению способности регенерированного родопсина к фотоиндуцированному конформационному ответу.

Понимание молекулярного механизма связывания и активации G-белка G-белок-связывающим рецептором на примере родопсина имеет принципиальное значение для понимания механизмов работы обширного класса G-белок-связывающих рецепторов и поиска на этой основе новых лекарственных средств.

4. *Последняя стадия фотолиза родопсина: разрыв ковалентной связи полностью-транс ретиналя с белком (опсином). Свободный опсин, десенситизация фоторецепторной клетки и световая адаптация.* На последней стадии фотолиза родопсина происходит гидролиз ковалентной связи Шиффова основания и высвобождение свободного полностью-транс-ретиналя.

а) При обесцвечивании значительного количества родопсина в наружном сегменте фоторецепторной клетки накапливается свободный (не содержащего хромофора) апо-белок – опсин. Как выяснилось, свободный опсин также обладает способностью связывать и активировать трансдукции, однако эффективность его как G-белок-связывающего рецептора крайне низка – около 10^{-6} по отношению к метародопсину II.

Иными словами, свободный опсин способен с чрезвычайно низкой эффективностью возбуждать каскад фототрансдукции, что и создает в клетке т. н. «эквивалентный фоновый свет», существование которого было предположено ещё в начале 30-х годов Стайлсом и Крауфордом. Такая сверхслабая инициация процесса фототрансдукции десенситизирует палочку («эквивалентный фоновый свет») и служит важным звеном в молекулярном механизме световой адаптации. Последующая же ре-

генерация зрительного пигмента (в темновом родопсине хромофор 11-цис-ретиналь, как говорилось, является мощным лигандом-антагонистом) приводит к исчезновению «эквивалентного фонового света» и служит не менее важным звеном в молекулярном механизме темновой адаптации.

б) Свободный полностью-транс-ретиналь и опасность светового повреждения и дегенеративных заболеваний сетчатки глаза. Свет, действуя на родопсин, не только запускает процесс фототрансдукции, но и способен, благодаря образованию фототоксичных ретинальсодержащих продуктов, вызвать повреждение клетки и её гибель. Это, так называемый, фотобиологический парадокс зрения. При физиологических условиях накопления свободного ретиналя в наружном сегменте зрительной клетки или не происходит, или является кратковременным. Это обеспечивают два фермента – ретинолдегидрогеназа (RDH8) и АТФ-зависимый мембранный переносчик (ABCR4). Однако при экстремальных световых засветках или при дефектах этих ферментов *транс*-ретиналь, а также продукты его превращения могут накапливаться. Такое накопление приводит к потенциальной опасности фотоповреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия и к опасности усугубления дегенеративных заболеваний сетчатки.

Согласно нашим данным, *транс*-ретиналь и продукты его превращения, выступая в качестве фотосенсибилизаторов, способны повредить как искусственные мембраны, так и сам родопсин в фоторецепторной мембране. Продукты превращения *транс*-ретиналя содержатся в липофусциновых гранулах, интенсивно накапливающихся с возрастом и, особенно, при дегенеративных заболеваниях сетчатки в клетках ретинального пигментного эпителия. Как мы впервые показали, липофусциновые гранулы способны при действии видимого света генерировать свободные

радикалы (активные формы кислорода), т.е. обладают фототоксичностью. Источником этих радикалов являются ретиноиды – продукты превращения *транс*-ретинала. При действии света, при старении и при патологиях ретиноидные продукты, как мы недавно показали, претерпевают изменения (окисление), что, вероятно, усиливает их токсичность. Эти продукты в составе липофусциновых гранул обладают довольно сильной флуоресценцией, что лежит в основе нового неинвазивного диагностического метода – метода аутофлуоресценции глазного дна. Поскольку накопление липофусциновых гранул рассматривается как важный фактор старения и патологии сетчатки, этот

новый метод представляет большую важность.

Таким образом, зрительный пигмент родопсин выполняет в механизме зрительной рецепции несколько принципиально важных физиологических функций, обеспечивающих спектральную чувствительность фоторецепторных клеток – палочек и колбочек, процессы фототрансдукции, световой и темновой адаптации. В случаях генетически обусловленных дефектов в молекуле зрительного пигмента или накопления в фоторецепторной мембране его хромофорной группы в виде свободного полностью-*транс*-ретинала возникает опасность развития или усугубления патологических процессов (дегенеративных заболеваний сетчатки).