

Молекулярная физиология зрения

М. А. Островский

**Кафедра молекулярной физиологии
Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова**

**Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской Академии Наук**

- Физиология (от греч. φύσις — природа и греч. λόγος — знание) — наука о функциях организма.
- Молекулярная физиология — новый этап развития этой классической биологической дисциплины.
- Молекулярная физиология зрения — одна из наиболее разработанных глав современной молекулярной физиологии

Физики и зрение

“Биология становится слишком серьезной наукой, чтобы ее можно было доверять биологам” – шутка физиков 60-х годов

Оптика глаза

Иоганн Кеплер (1611):

«Хрусталик как фокусирующая линза создаёт на сетчатке перевернутое и уменьшенное изображение»

Цветовое зрение

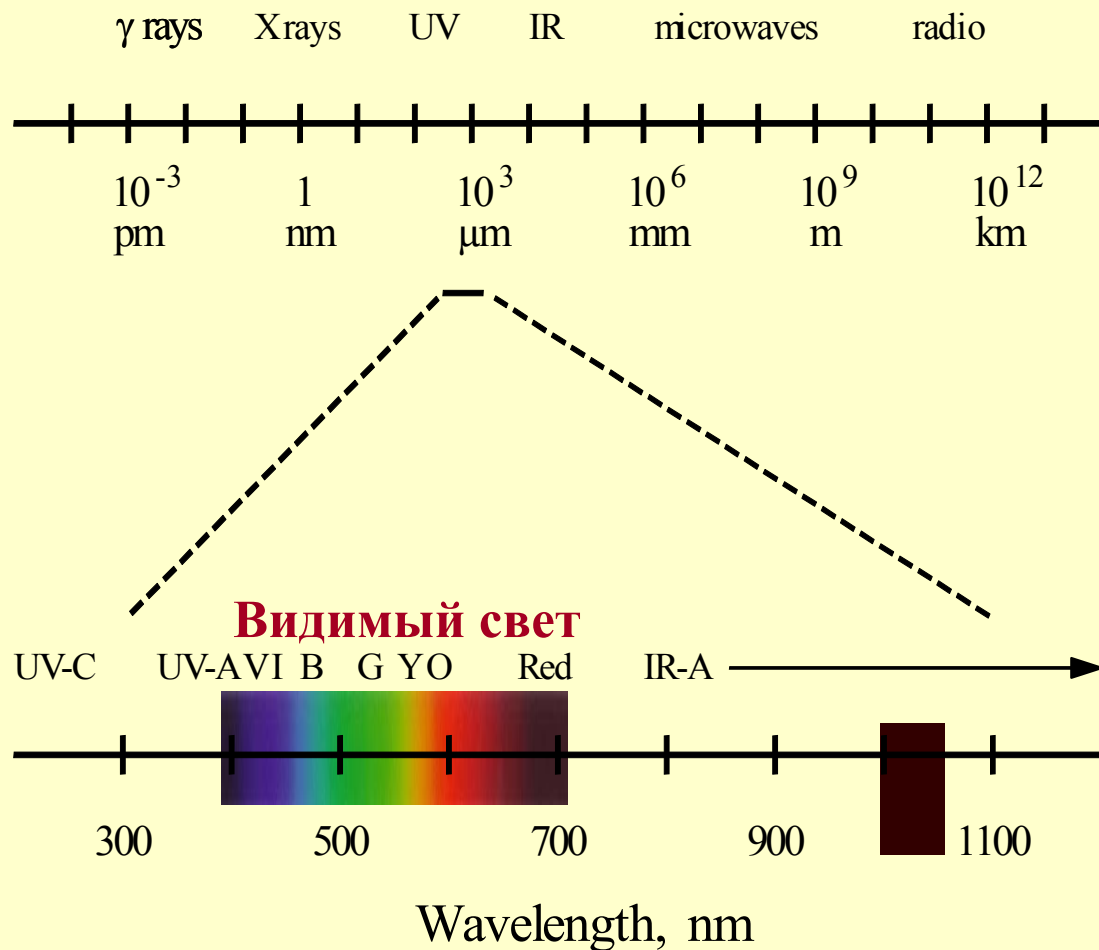
Томас Юнг (1802), Дж. Максвелл (1861), Герман Гельмгольц (1856):

«Цветовое зрение человека основано на восприятии трех основных цветов – синего, зелёного и красного»

Абсолютная чувствительность зрительной клетки глаза

С. Лэнгли (1889), Ю.Б. Харитон (1929), С.И. Вавилов (1933), С. Хехт (1942):
« Поглощения всего одного кванта света палочкой сетчатки глаза достаточно для возникновения в ней фоторецепторного сигнала»

Электромагнитный спектр солнечного излучения



Физические параметры
света, используемые
в зрении - это:

- интенсивность
- длина волны
- поляризация

Эти параметры
ограничивают и
определяют структуру
глаза и молекулярную
«машинерию» зрения

При огромном
эволюционном
разнообразии органов
зрения в животном царстве,
светочувствительная
молекула зрительного
пигмента, в принципе,
одинакова и первичный
фотохимический акт зрения
един.

ЭВОЛЮЦИЯ

Eye is an “organ of extreme perfection”
/Charles Darwin, The Origin of Species by Means
of Natural Selection, 1859/

Кэмбрийский взрыв
(около 540 млн лет назад)

Родопсины 2-ого типа
(G-белок-связывающие рецепторы)
Зрительный пигмент — родопсин

Билатеральные
(около 600 млн лет назад)

Родопсины 2-ого типа
(G-белок-связывающие рецепторы)
Зрительный пигмент — родопсин

Многоклеточные
(около 1 Млрд. лет назад)

Родопсины 2-ого типа
(G-белок-связывающие рецепторы)
Зрительный пигмент — родопсин

Эукариоты
(около 1.5 Млрд. лет назад)

Родопсины 1-ого типа
(ионный транспорт)
(Водоросли, грибы)

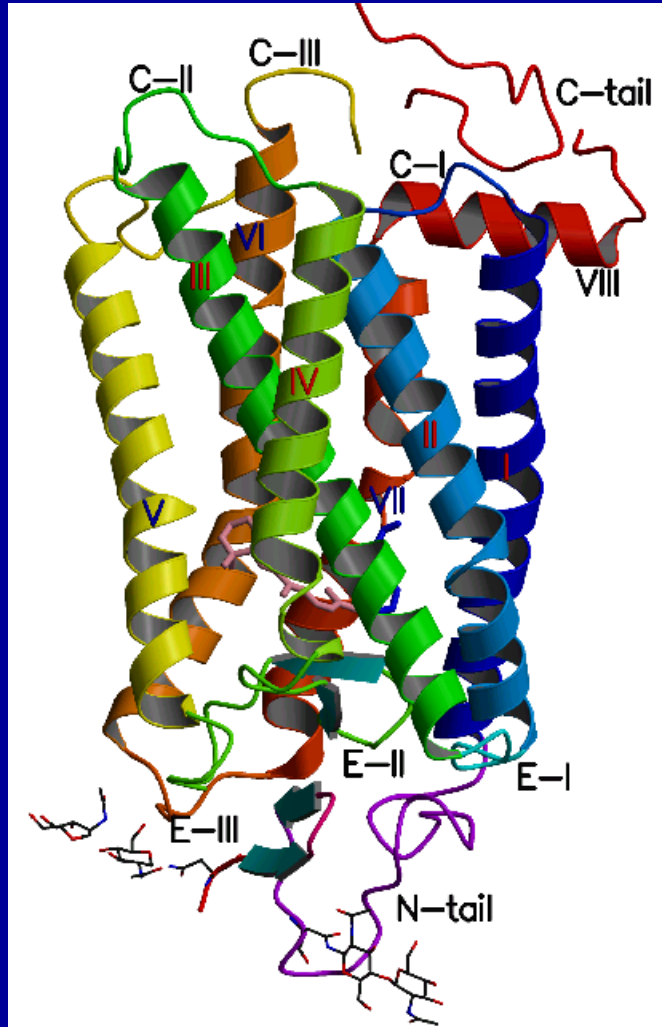
Прокариоты
(около 3.5 Млрд. лет назад)

Родопсины 1-ого типа
(ионный транспорт)
Бактериородопсин – фотосинтез

Образование Земли
(4.567 Млрд. лет назад)

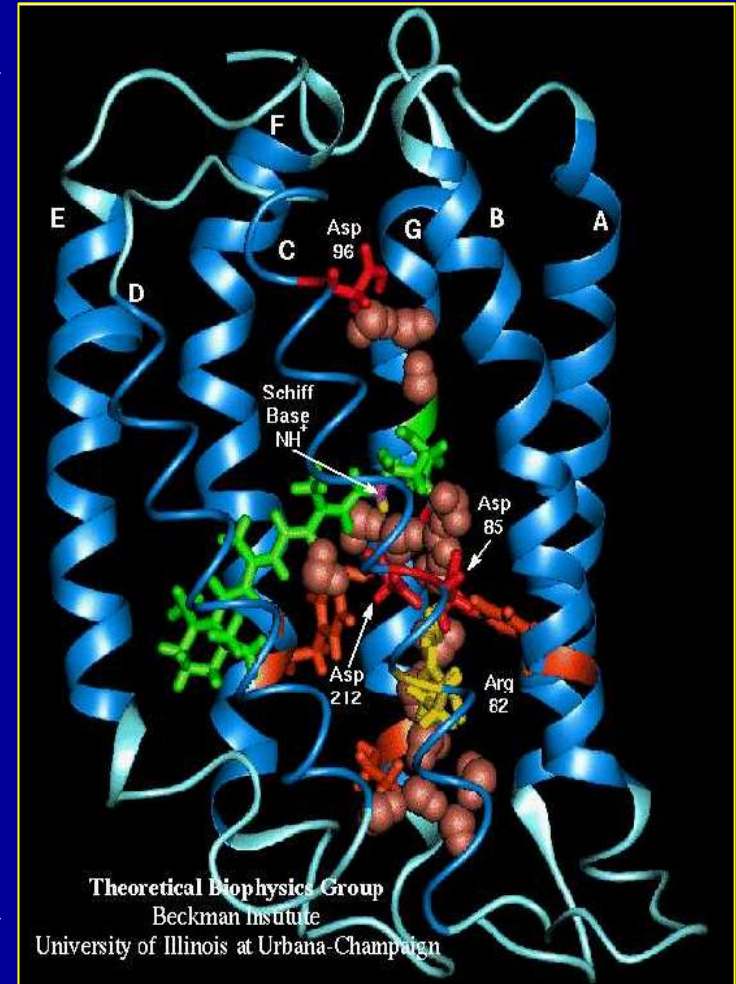
Общий план строения зрительного родопсина и бактериородопсина

~30 ангстрем



Зрительный родопсин

~ 30 ангстрем



Бактериородопсин

Зрительный пигмент родопсин и бактериородопсин галобактерий

«Бактериородопсиновые» пруды



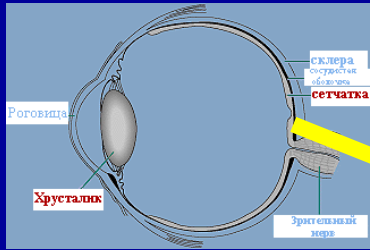
Chronicle / Darryl Bush

**Бактериородопсин - белок фотосинтеза,
возник около 3,5 миллиарда лет назад**

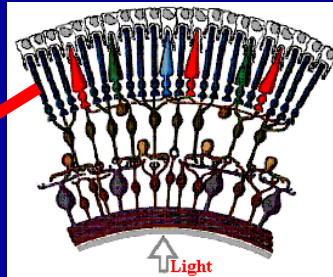


Halobacterium halobium

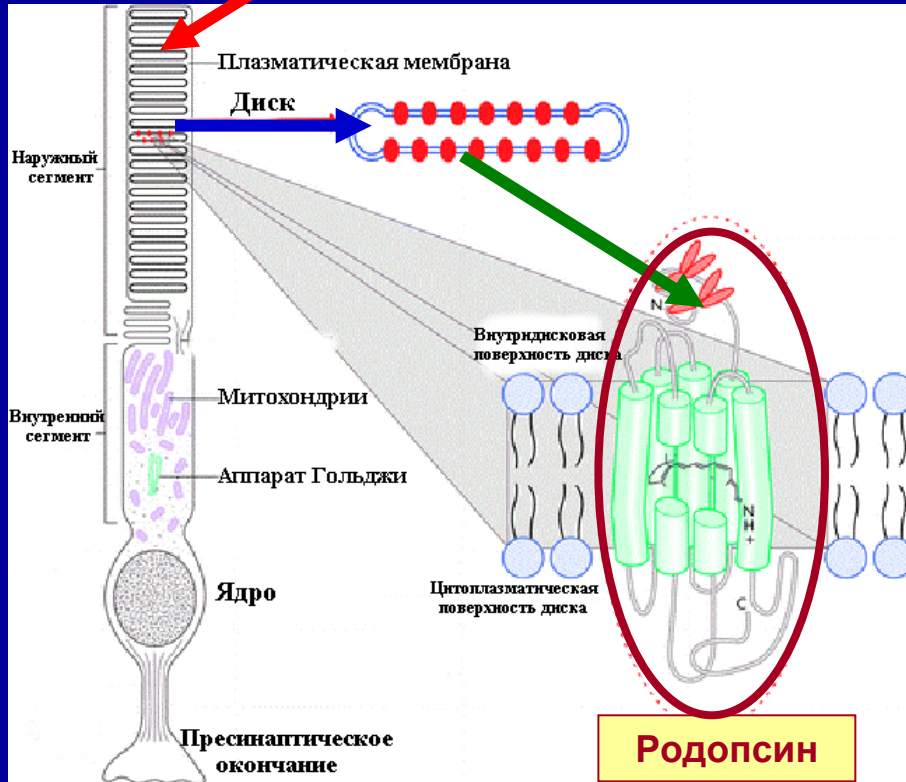
Зрительный пигмент родопсин и бактериородопсин галобактерий



сетчатка



палочка



«Бактериородопсиновые» пруды



Chronicle / Barry J Bush

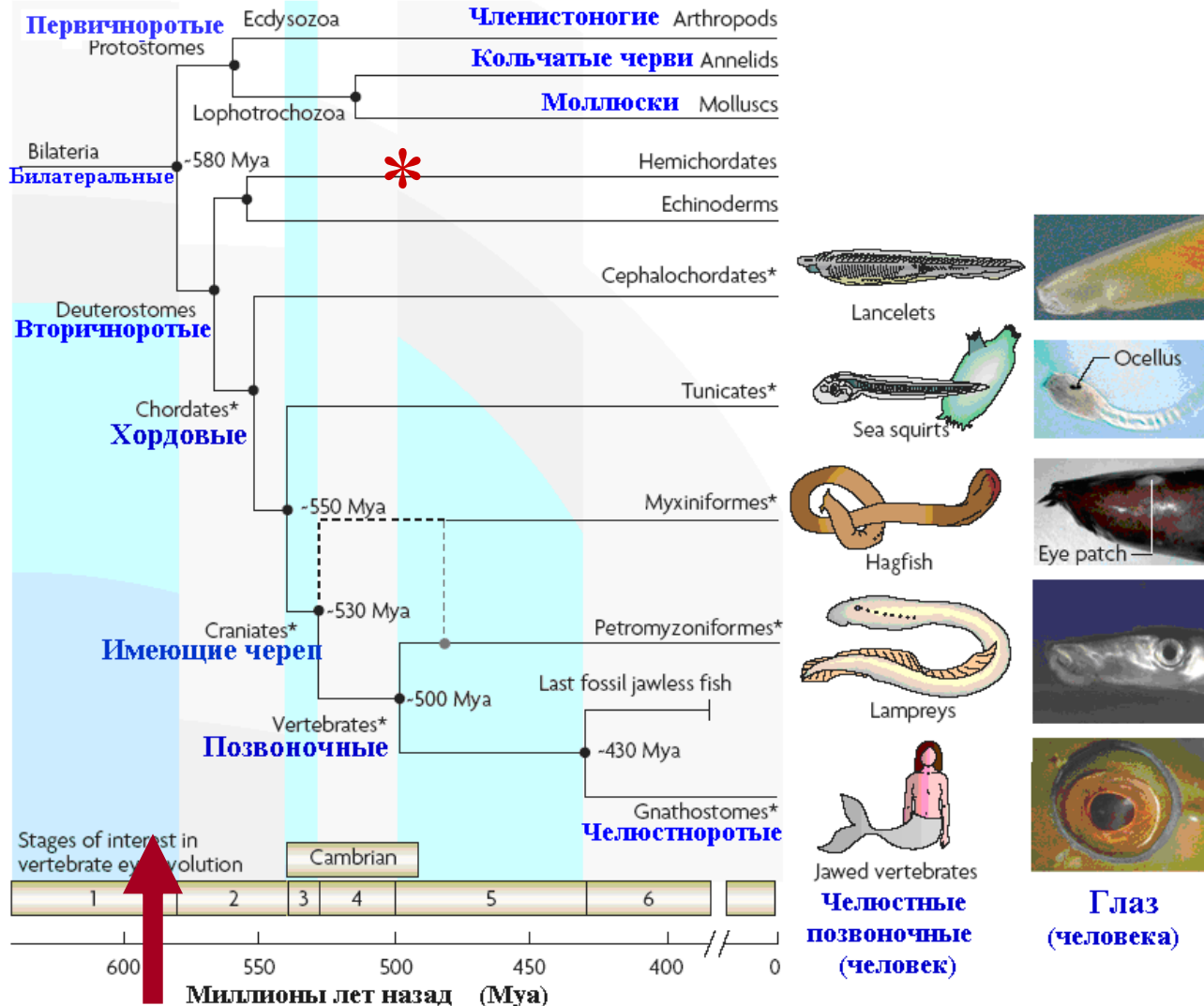
Бактериородопсин - белок фотосинтеза, возник около 3,5 миллиарда лет назад



Halobacterium halobium

Зрительный пигмент родопсин – один из самых древних белков животного царства

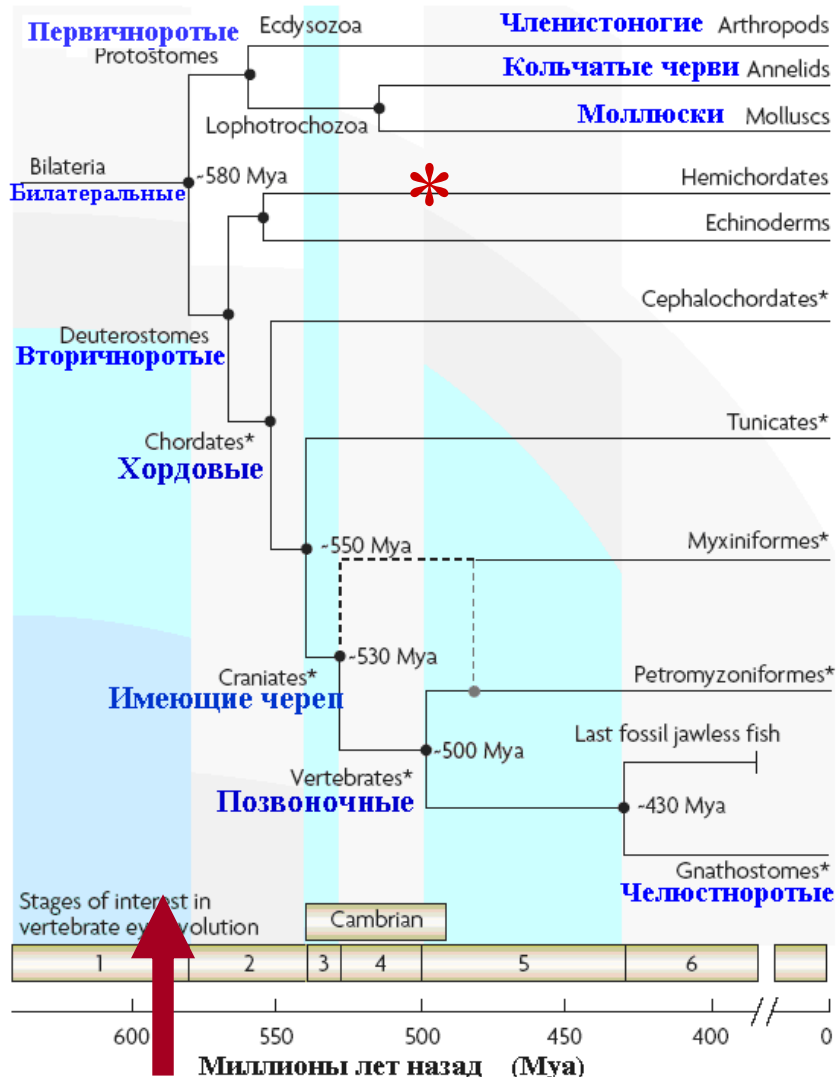
Эволюционное древо животного царства



580 - 550 миллионов лет назад

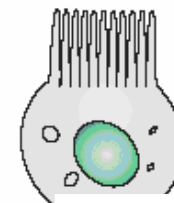
Зрительный пигмент родопсин – один из самых древних белков животного царства

Эволюционное древо животного царства

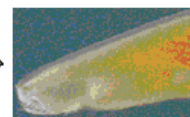


580 - 550 миллионов лет назад

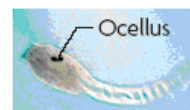
Зрительная клетка



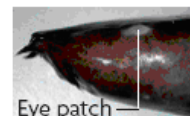
**Рабдом
беспозвоночных**



Lancelets



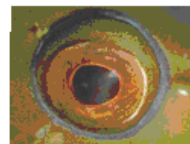
Sea squirts*



Hagfish



Lampreys



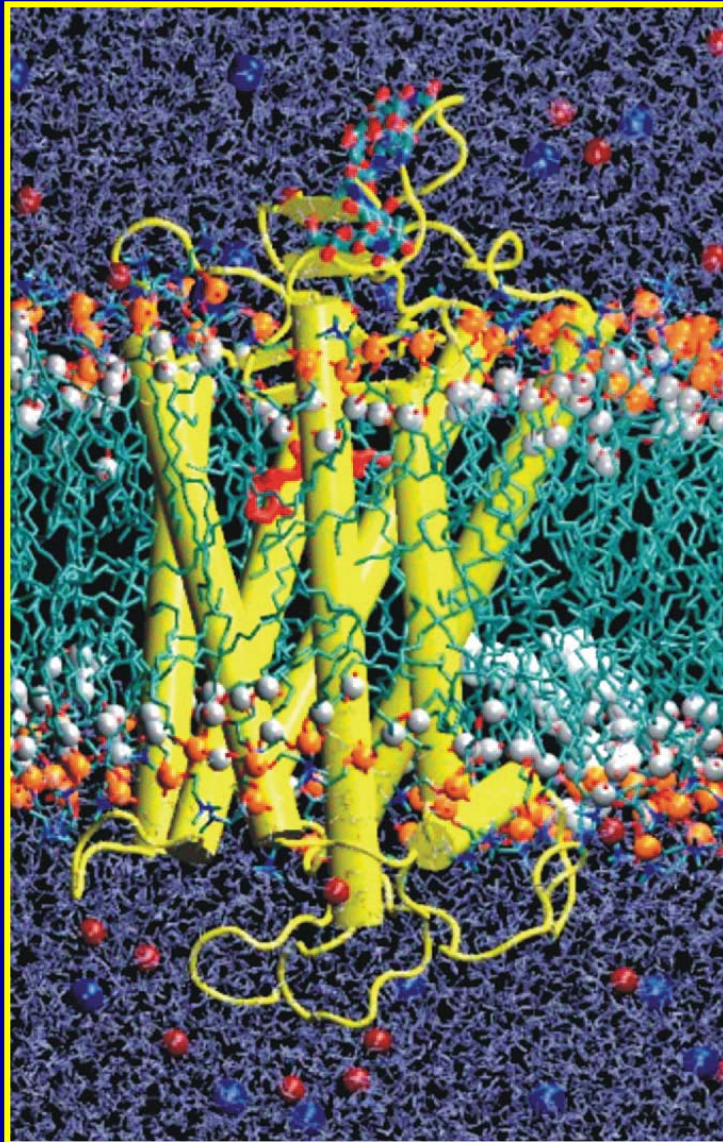
**Глаз
(человека)**



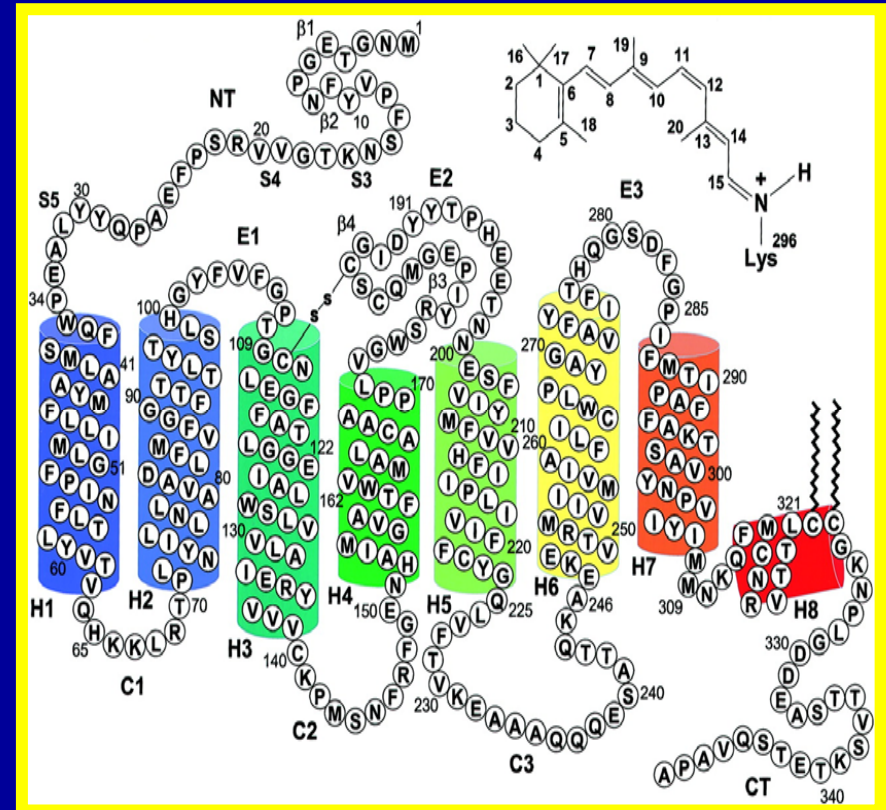
**Колбочка
позвоночных**

Структура молекулы родопсина

Двух – и трёхмерная структура зрительного пигмента родопсина

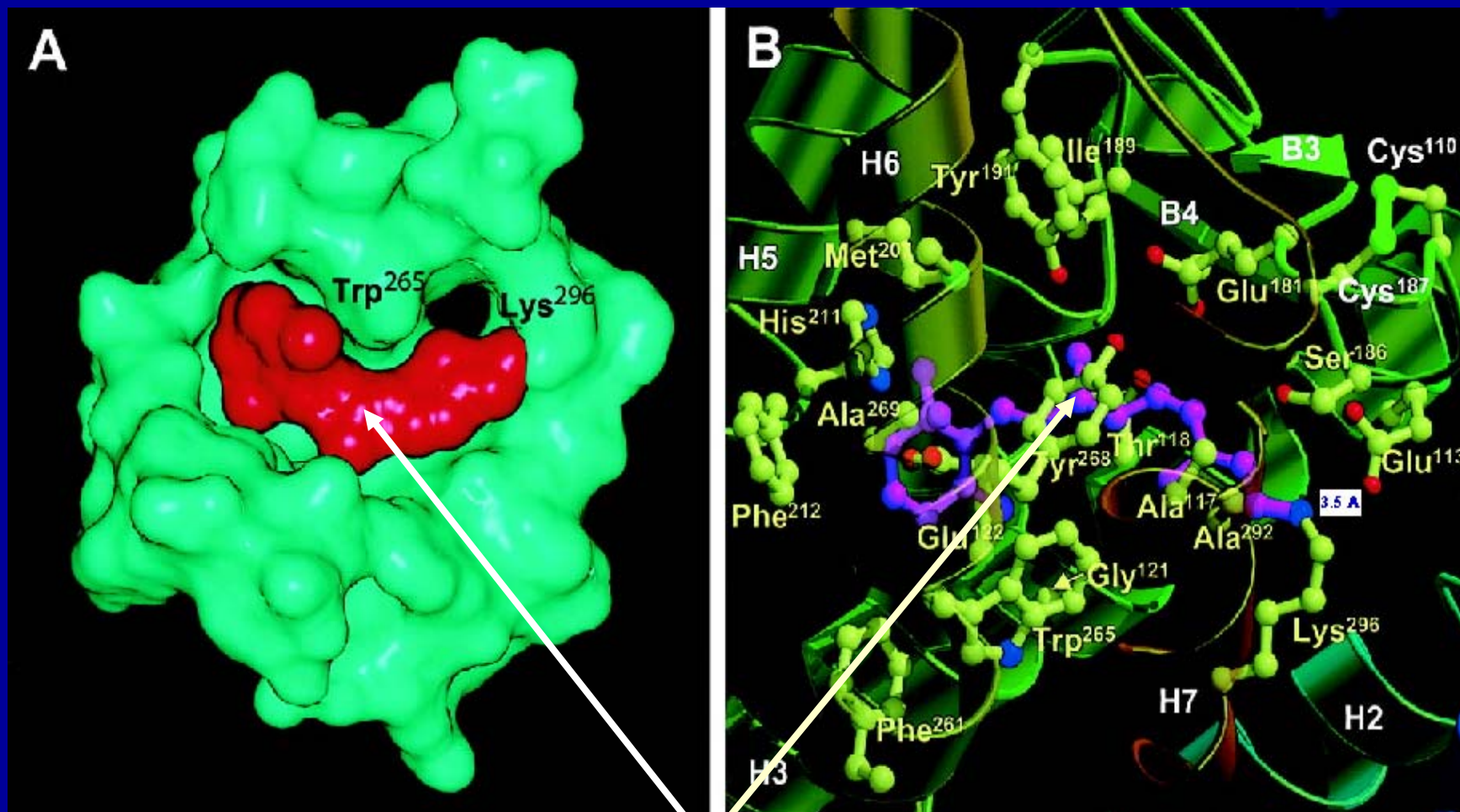


Huber et al 2004



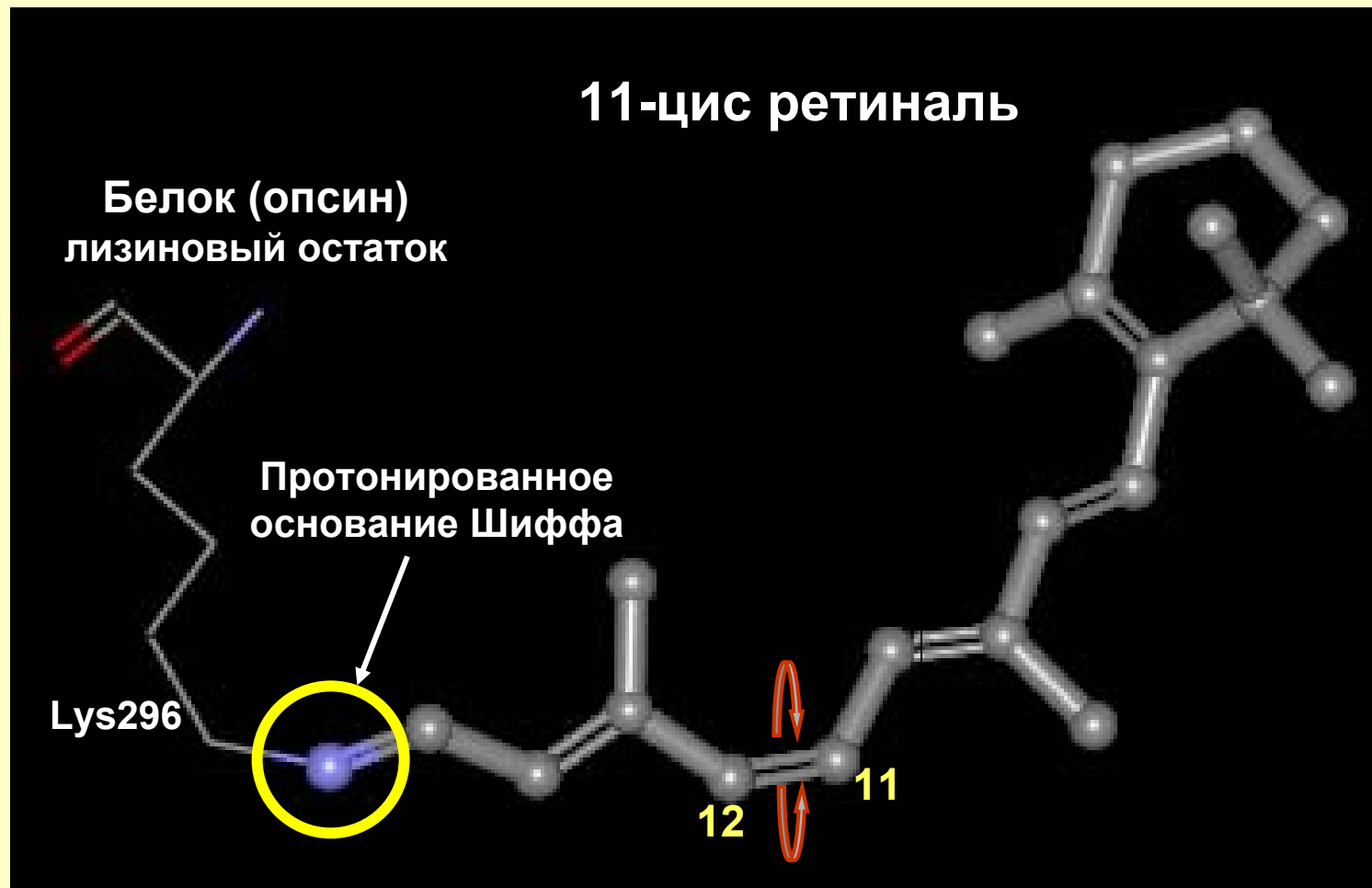
Овчинников и др., 1982

Хромофорный центр родопсина и 11-цис ретиналь — его хромофорная группа

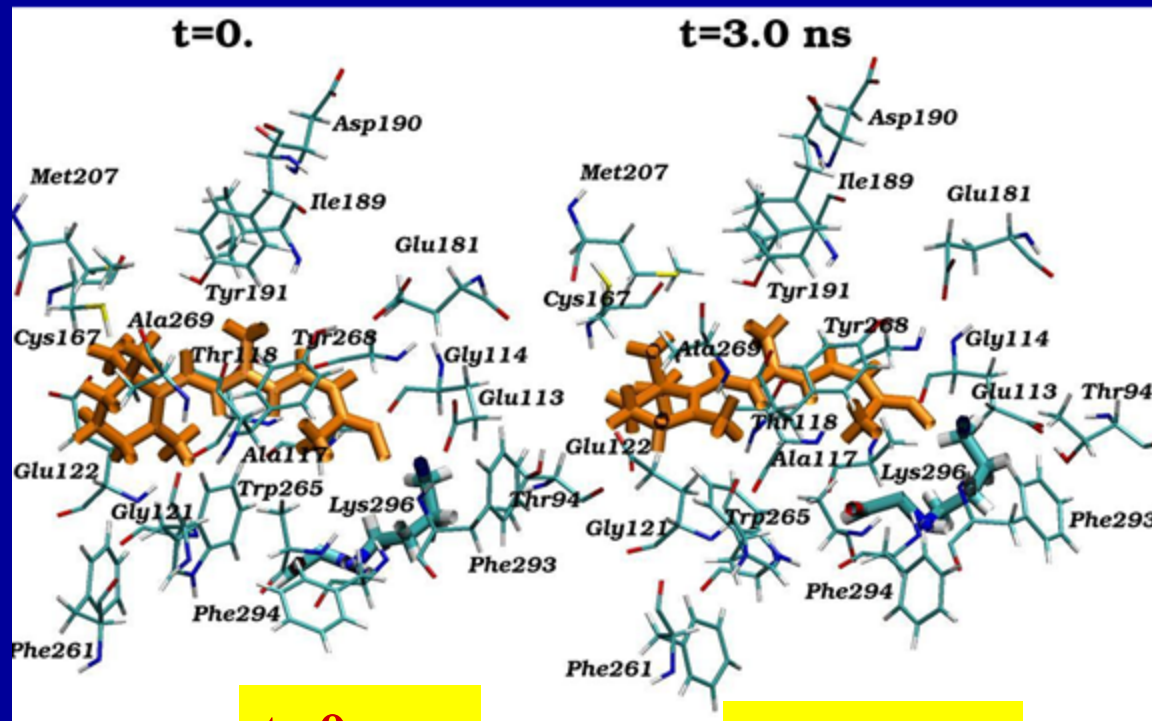


11-цис ретиналь

Ковалентная связь хромофорной группы –11-цис ретиналя с лизиновым аминокислотным остатком белка (опсина)

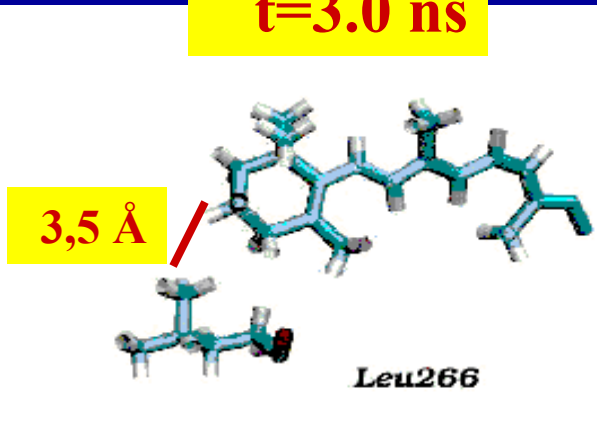
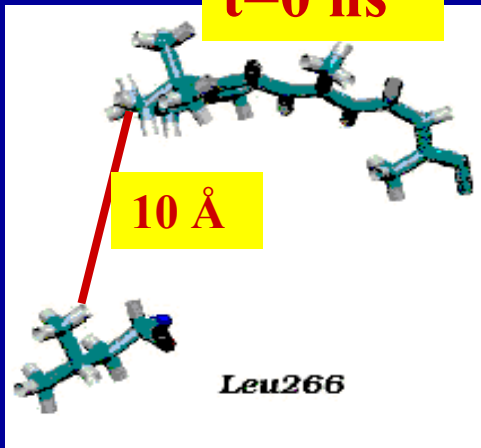


Взаимная «подстройка» хромофорной группы и её белкового окружения (метод молекулярного моделирования) (Kholmurodov, Feldman, Ostrovsky, 2006)

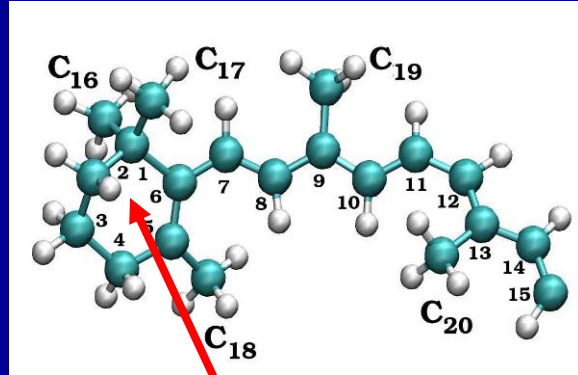


t=0 ns

t=3.0 ns



11-цис ретиналь



β-иононовое кольцо

**Физиологические функции 11-цис ретиналя
как хромофорной группы родопсина
(ключевая роль ближайшего белкового окружения)**

- **Спектральная настройка - от 360 до 620 нм
(цветовой зрение)**
- **Фотоизомеризация (запуск зрительного акта)**
- **Мощный лиганд-антагонист родопсина
как G-белок—связывающего рецептора
(борьба с темновым шумом)**

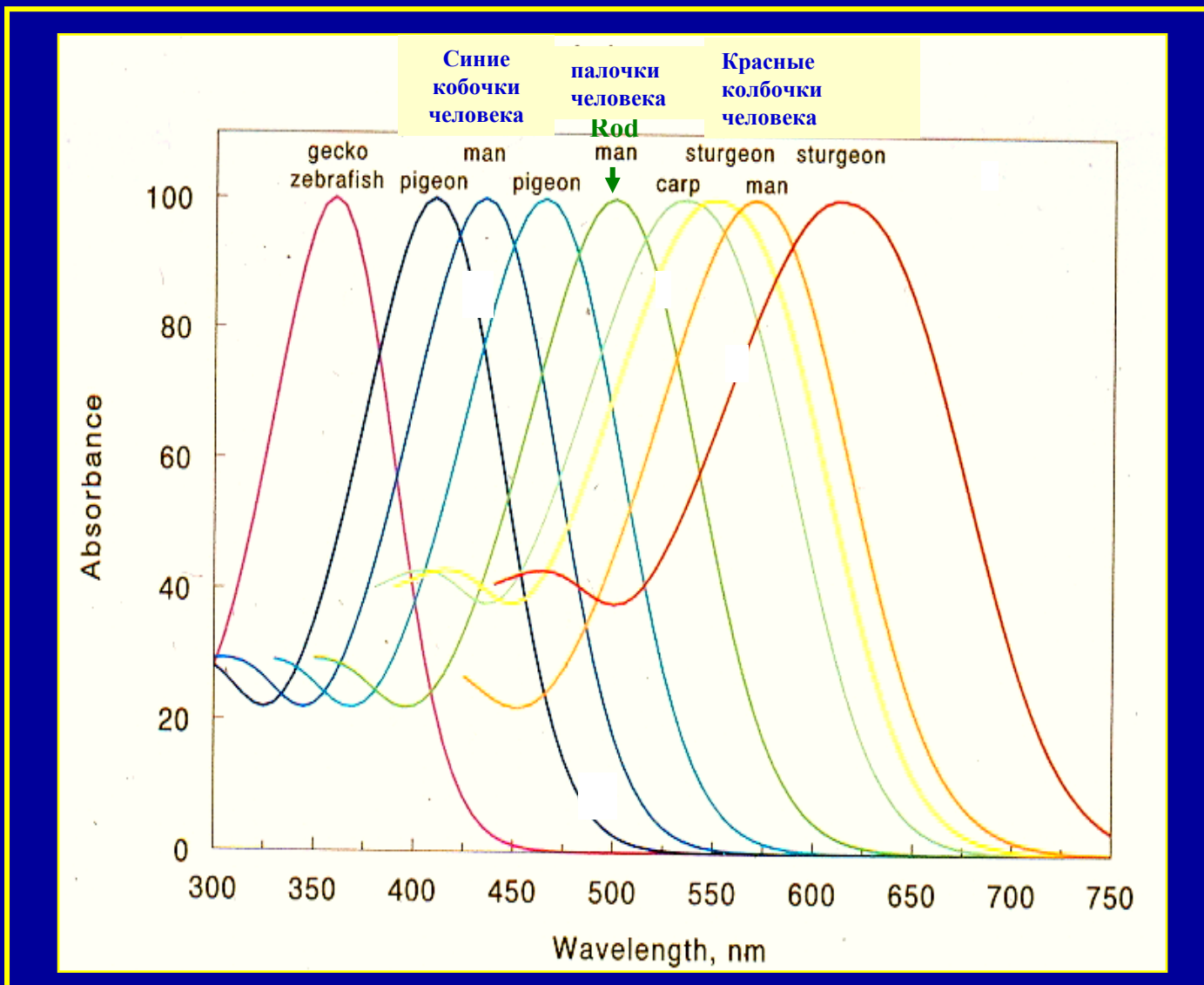
Спектральная настройка

Спектральная настройка достигается:

- в эволюционной шкале времён заменой аминокислотных остатков в ближайшем белковом окружении хромофорной группы
- в физиологической шкале времён заменой витамина А1 (ретиная_1) на витамина А2 (ретинаяль_2)

Спектральная настройка (эволюционная шкала времён)

Зрительные пигменты поглощают свет
от ультрафиолетовой до далёкой красной областей спектра

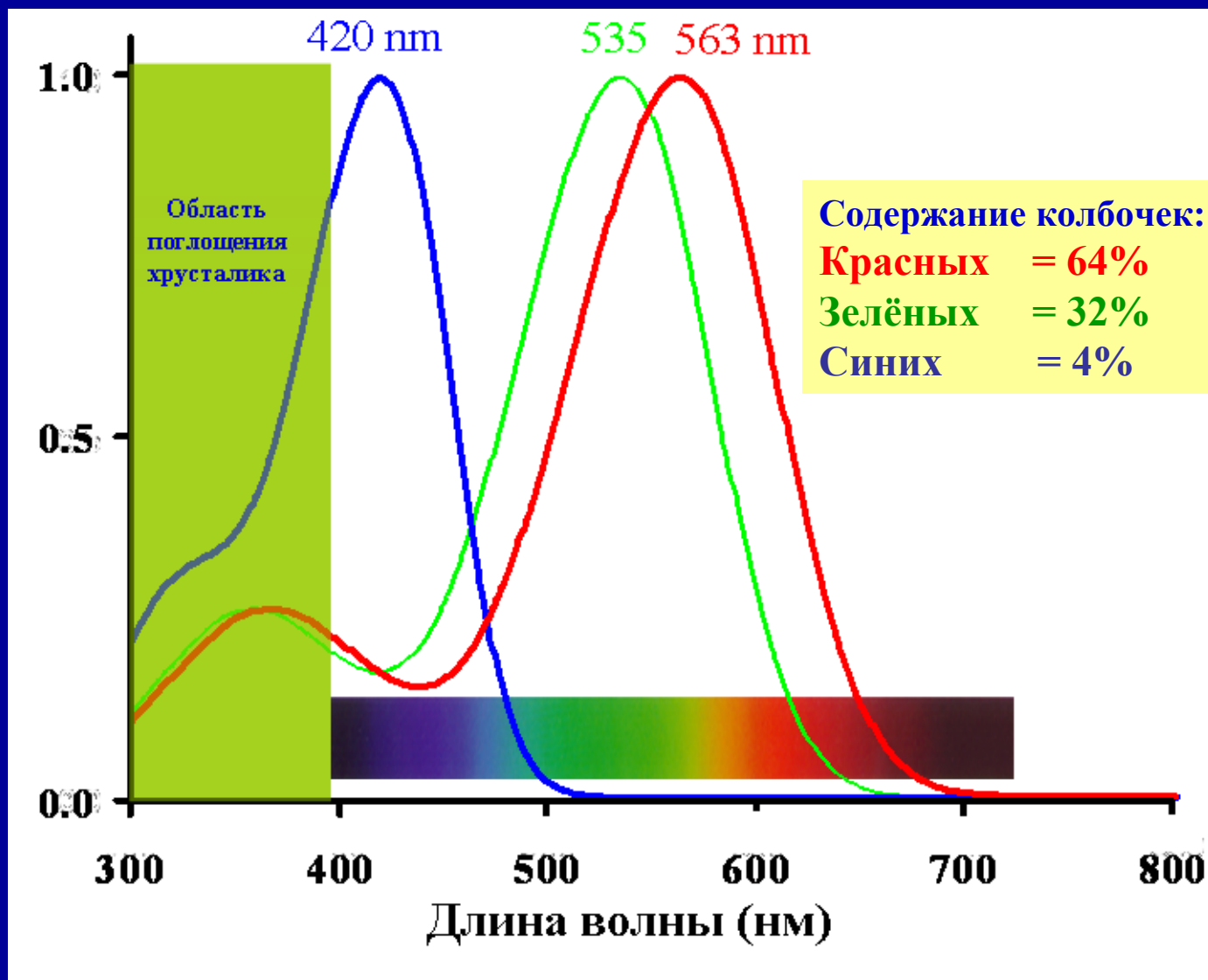


Зрительные пигменты колбочек сетчатки человека (человек – трихромат)

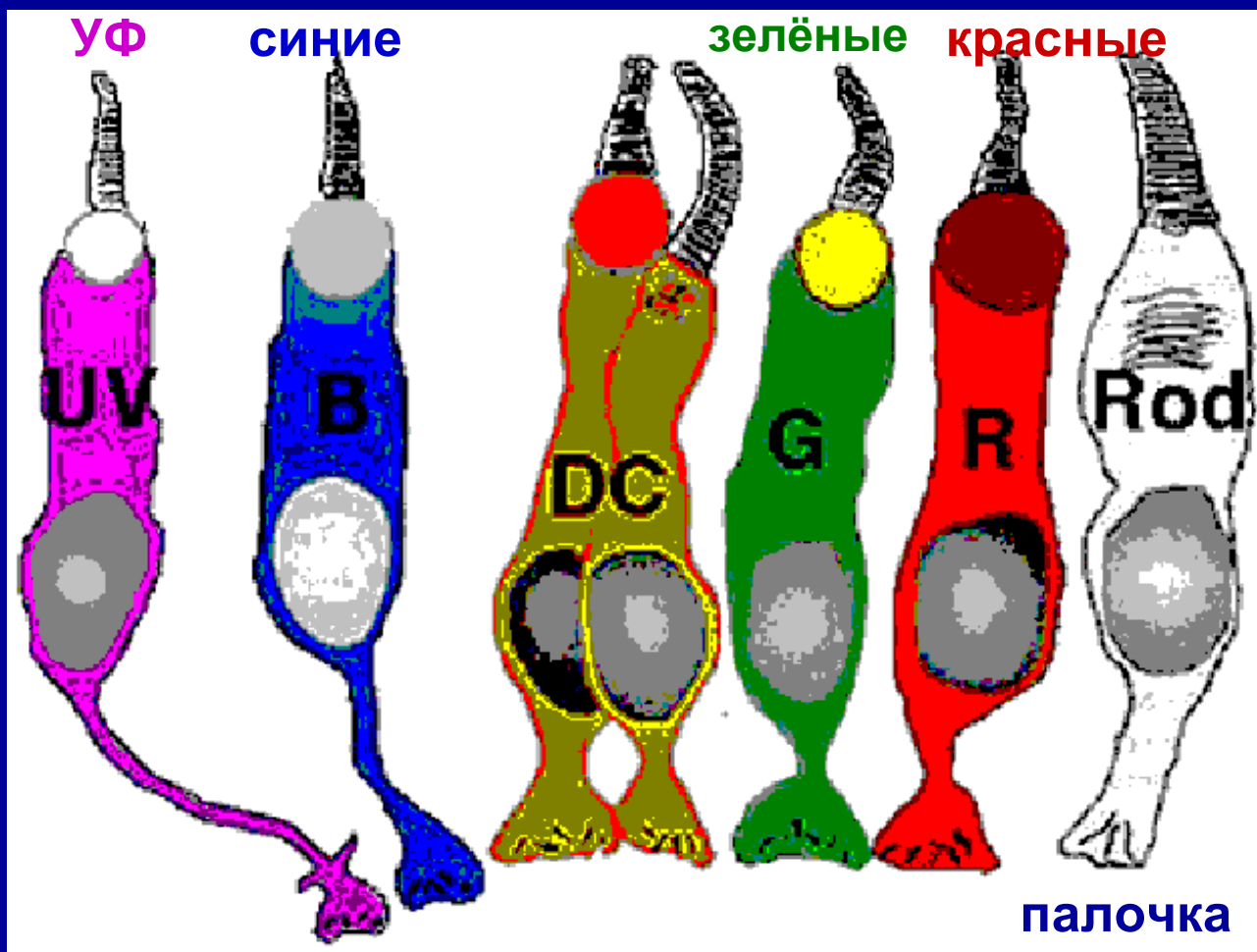
синие

зелёные

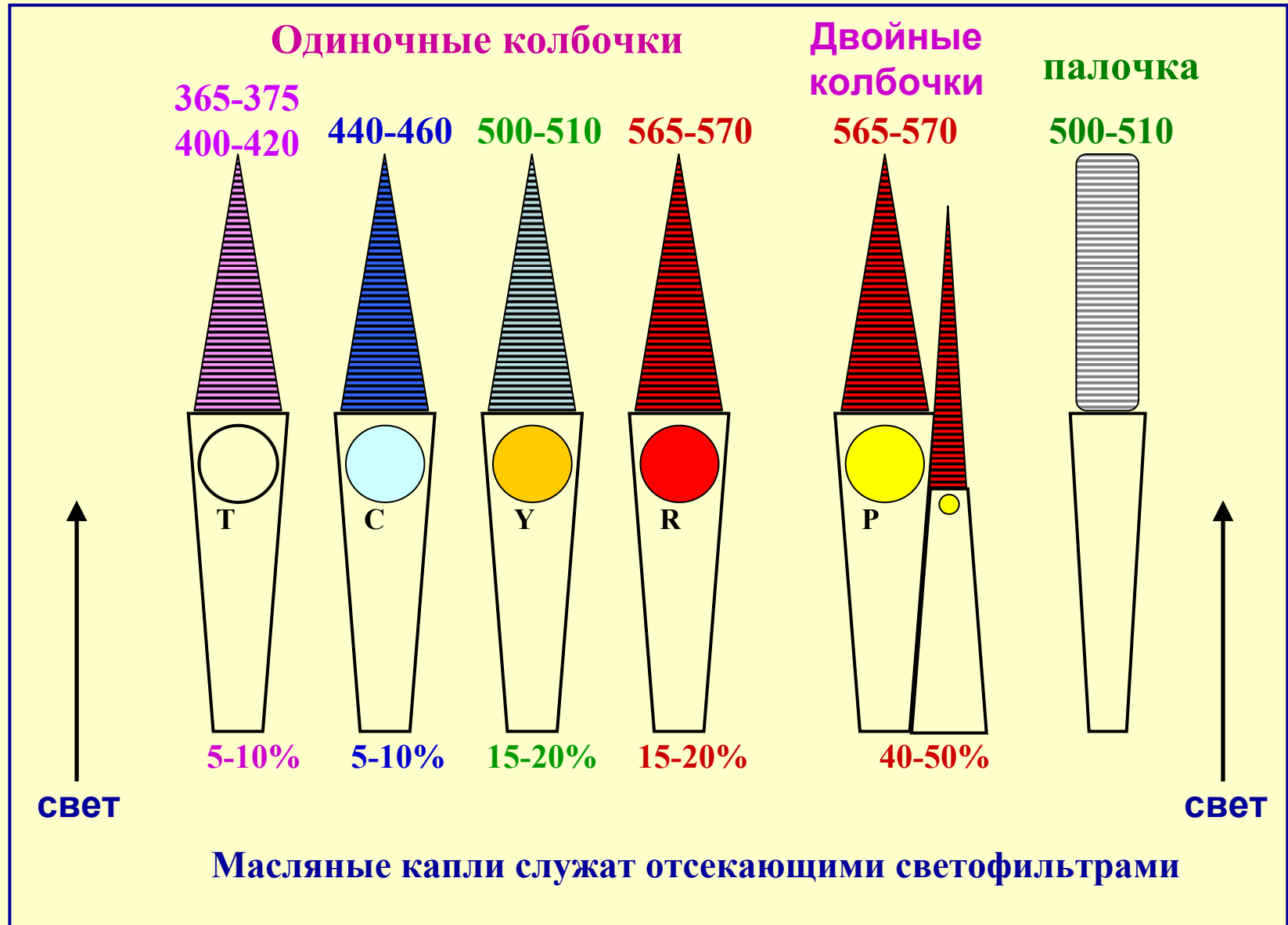
красные



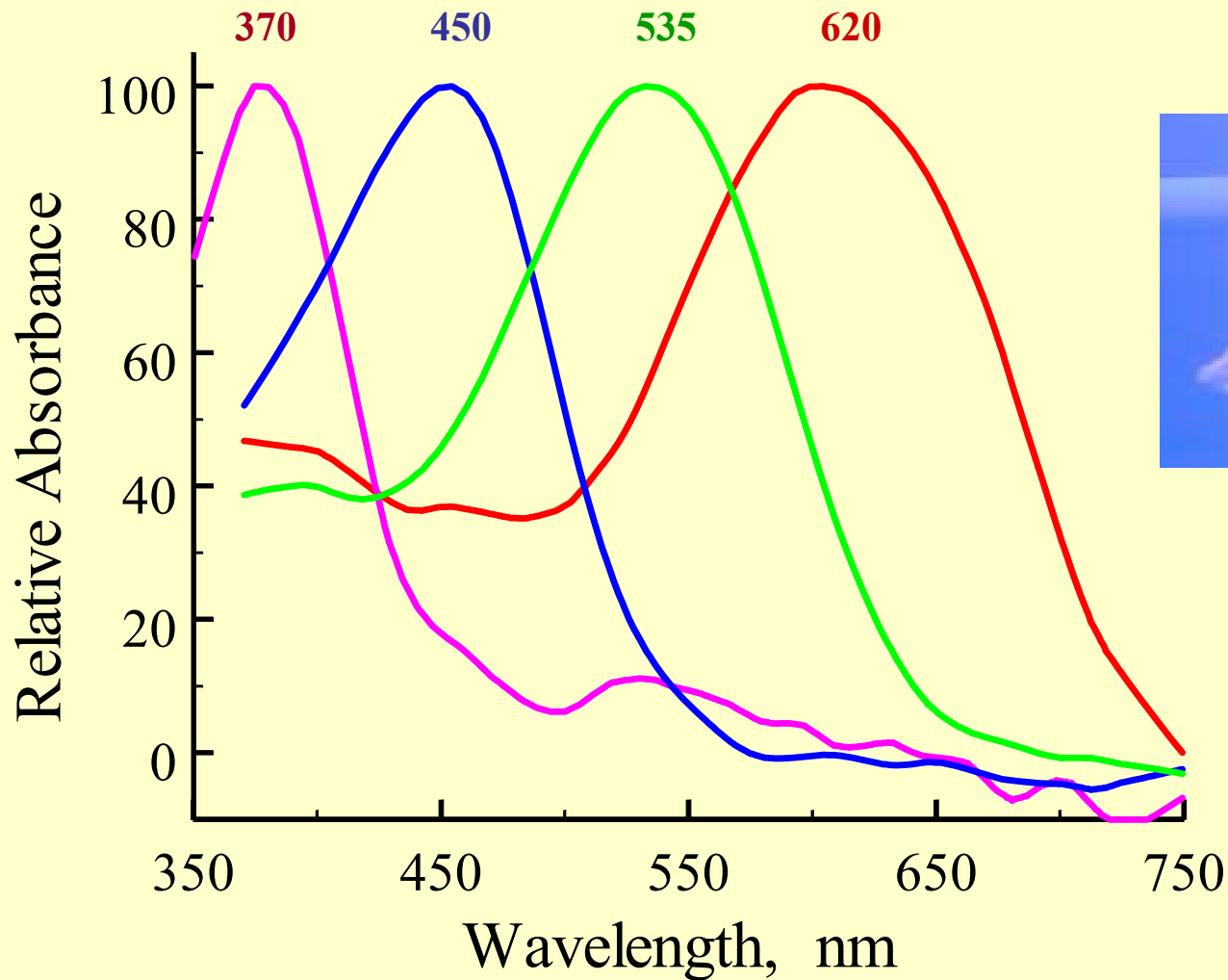
Зрительные пигменты колбочек сетчатки черепахи (черепахи – тетрахроматы)



Зрительные пигменты колбочек сетчатки птиц (птицы – тетрахроматы)



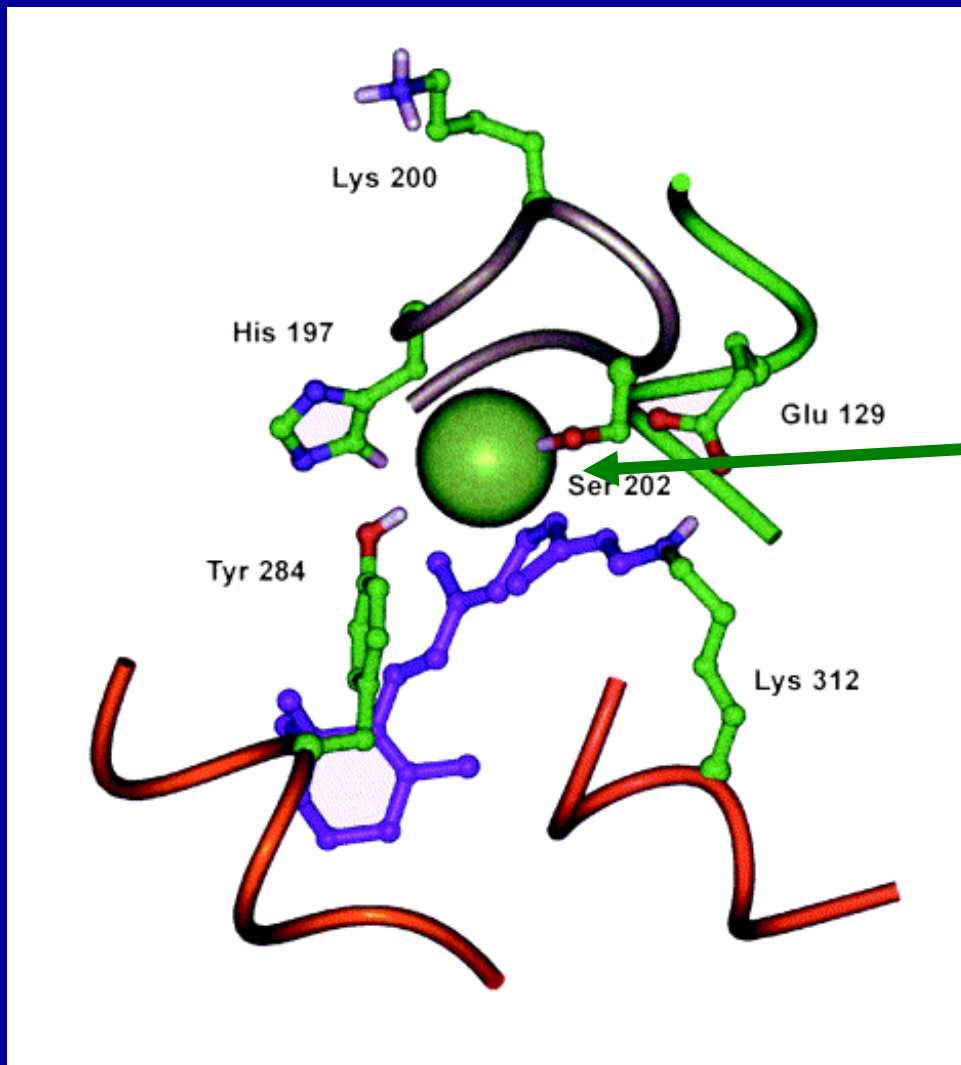
**Золотая рыбка *Carassius auratus*:
четыре колбочковых зрительных пигмента –
УФ-, сине-, зелёно- и красно-чувствительные**



Carassius auratus

Особенность красно-чувствительного пигмента

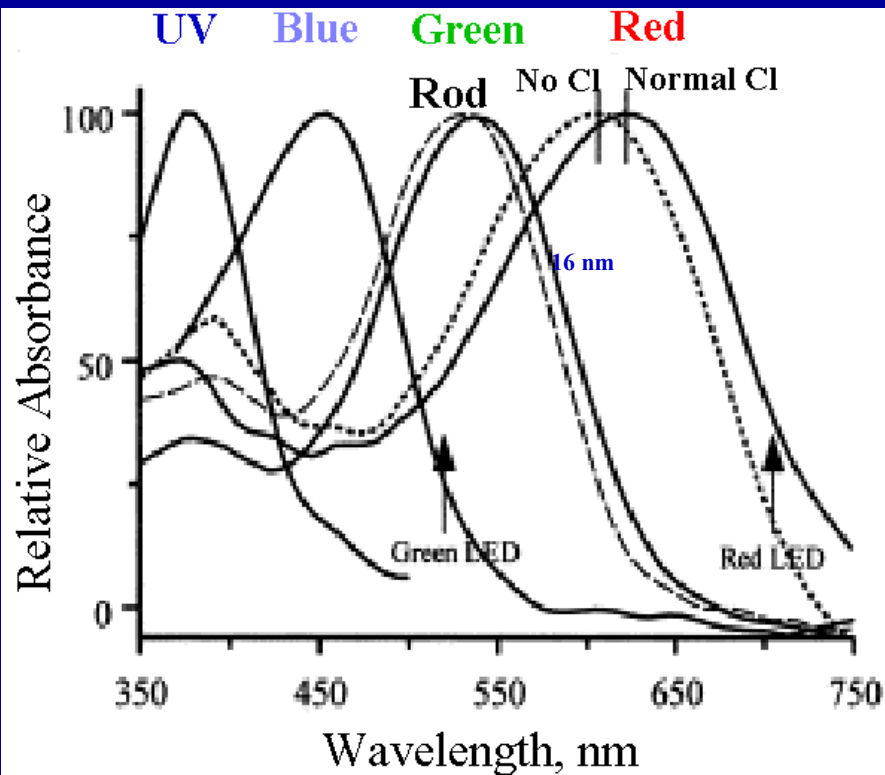
Молекулярная модель хлорид-связывающих мест в хромоформном центре опсина красных колбочек



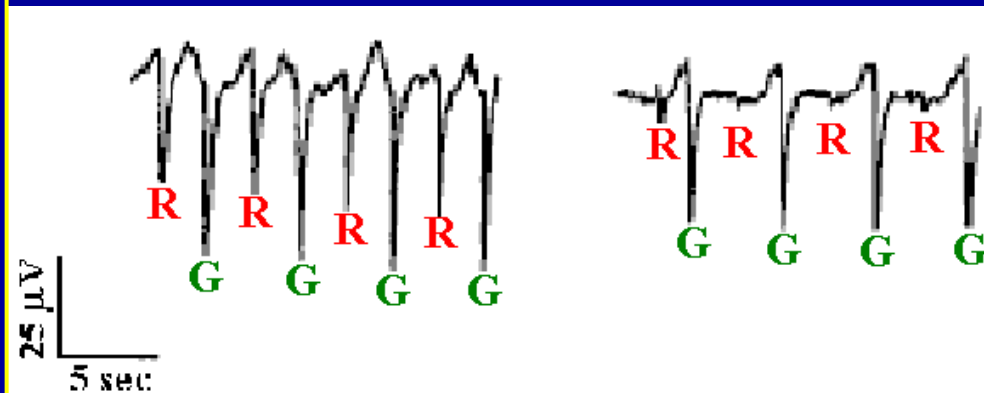
Золотая рыбка:

зависимость спектра поглощения и электрической активности красных колбочек от концентрации ионов хлора (Zak, Ostrovsky, Bowmaker, 2000)

Спектральный сдвиг красных колбочек, но не синих и зелёных колбочек и палочек



Исчезновение позднего рецепторного потенциала красных колбочек в изолированной и перфузируемой сетчатке золотой рыбки при уменьшении в среде ионов хлора

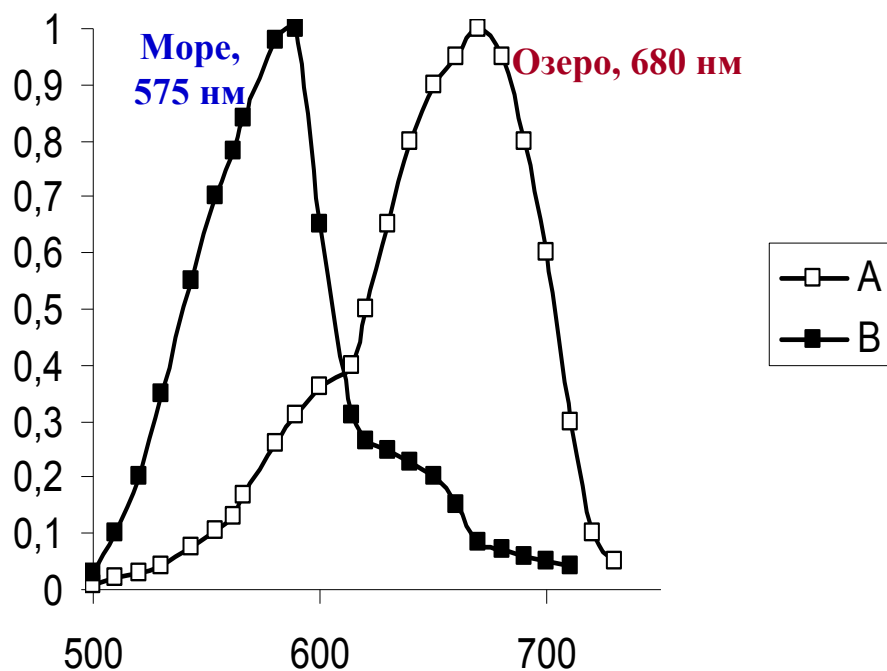


R-красные и G-зелёные вспышки света

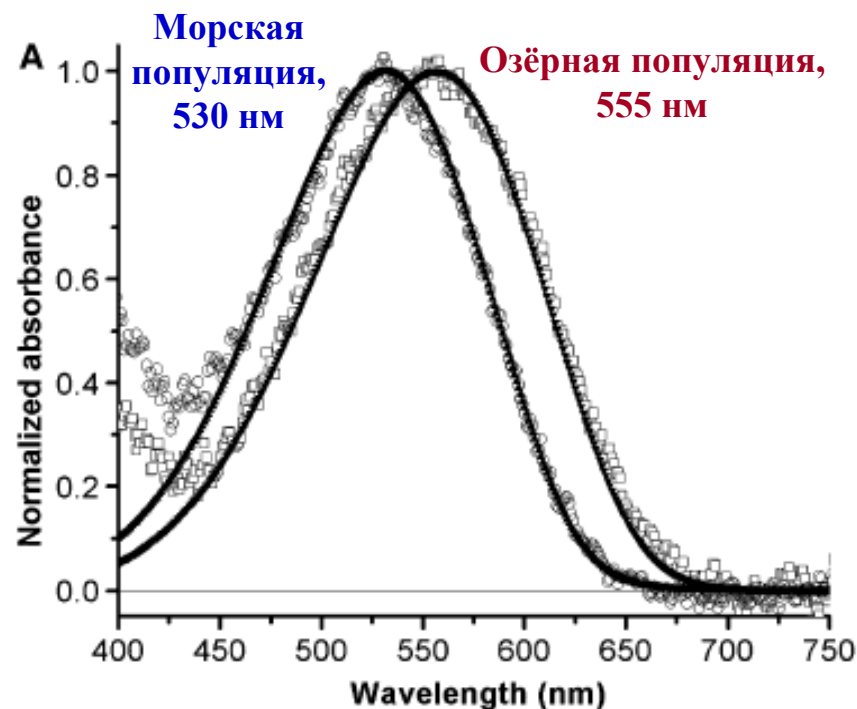
Спектральная настройка (физиологическая шкала времён)



Спектральное распределение света в море (Роё залив) и в озере (озеро Рääjärvi)

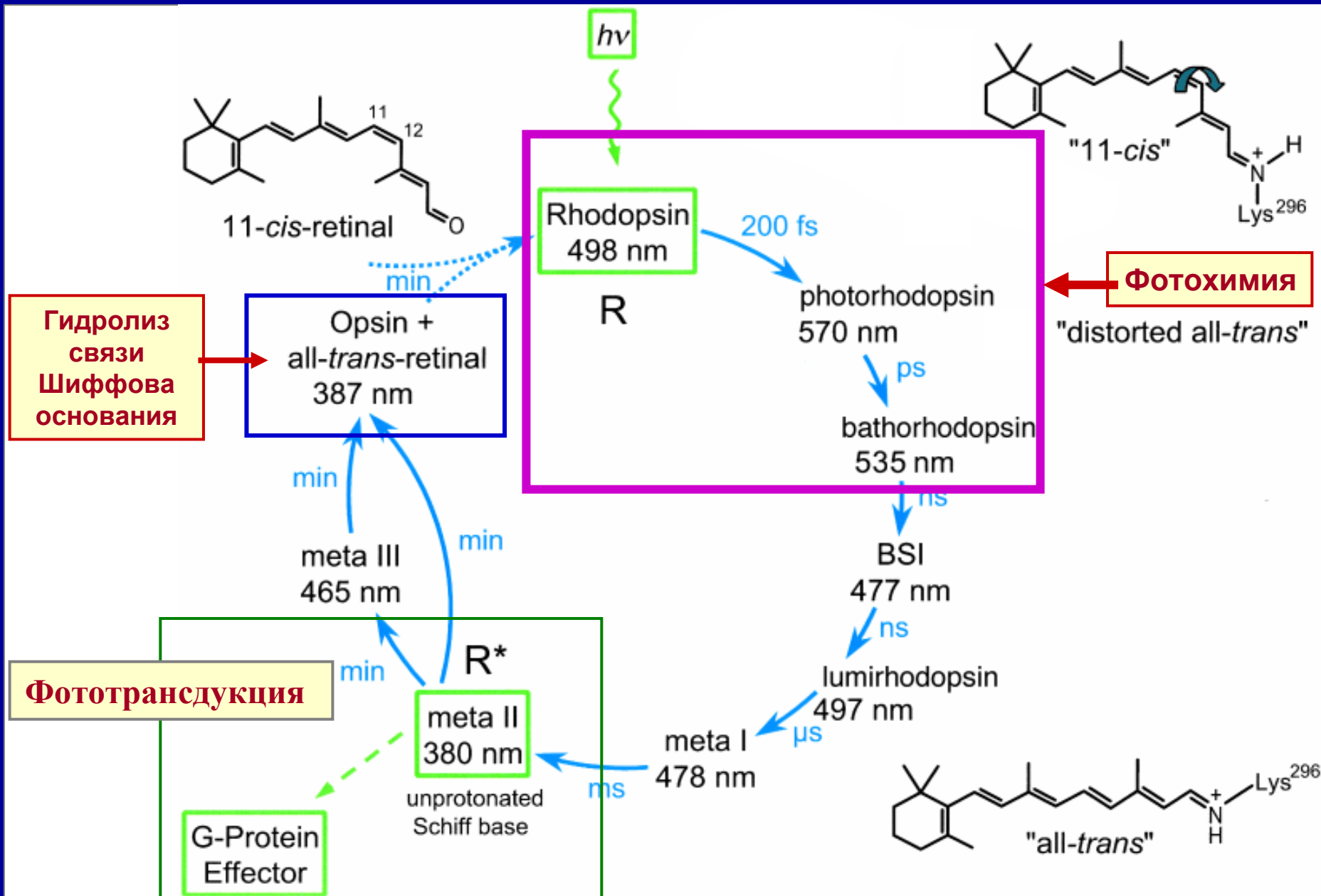


Микроспектрофотометрическая регистрация одиночного рабдома креветки *M. relicta* (Jokela-Maatta, ...Zak, ...Ostrovsky et al., 2005)

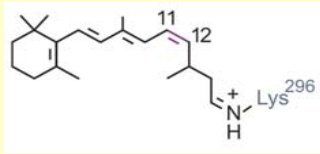


ФОТОХИМИЯ

Фотолиз родопсина: три ключевые стадии



Первичные продукты фотопревращения родопсина



11-цис
ретиаль

Родопсин₄₉₈

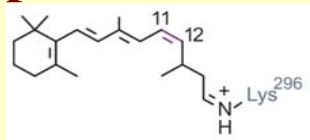
$h\nu$

**Возбужденное
состояние**

1 пс
 γ 0,35

200 фс
 γ 0,65

**Исходное
состояние
родопсина R₄₉₈**

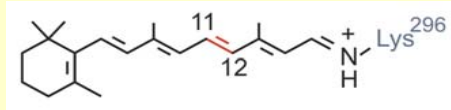


11-цис
ретиаль

Фотородопсин₅₇₀

2-3 пс

Батородопсин₅₃₅



полностью-транс
ретиаль

Спектры поглощения родопсина
и его первичных фотопродуктов —
фото- и батородопсина

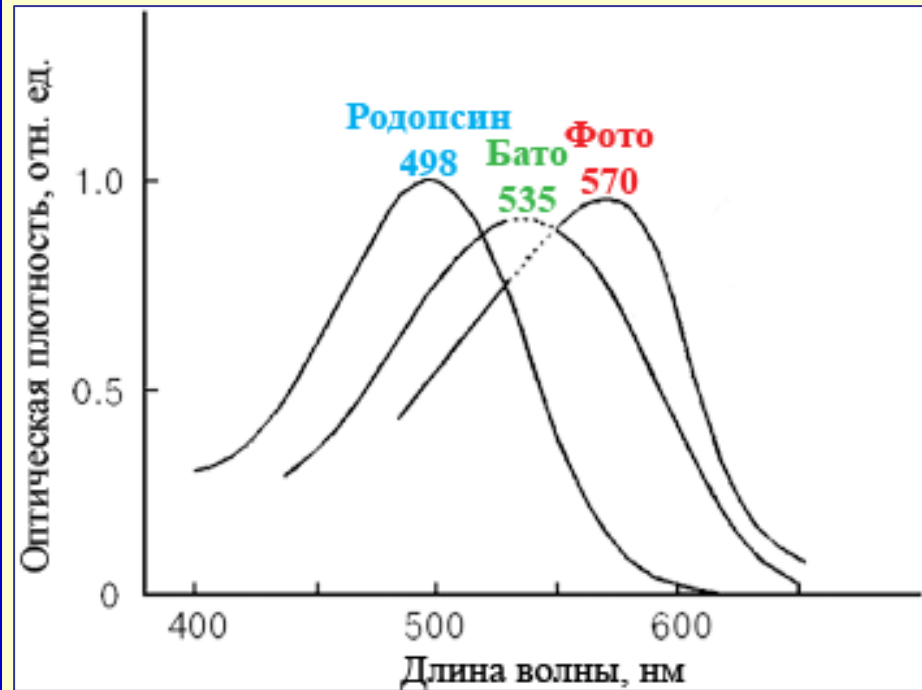
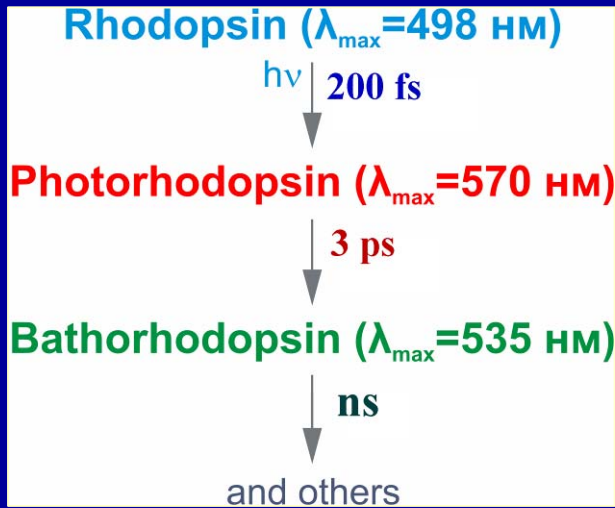
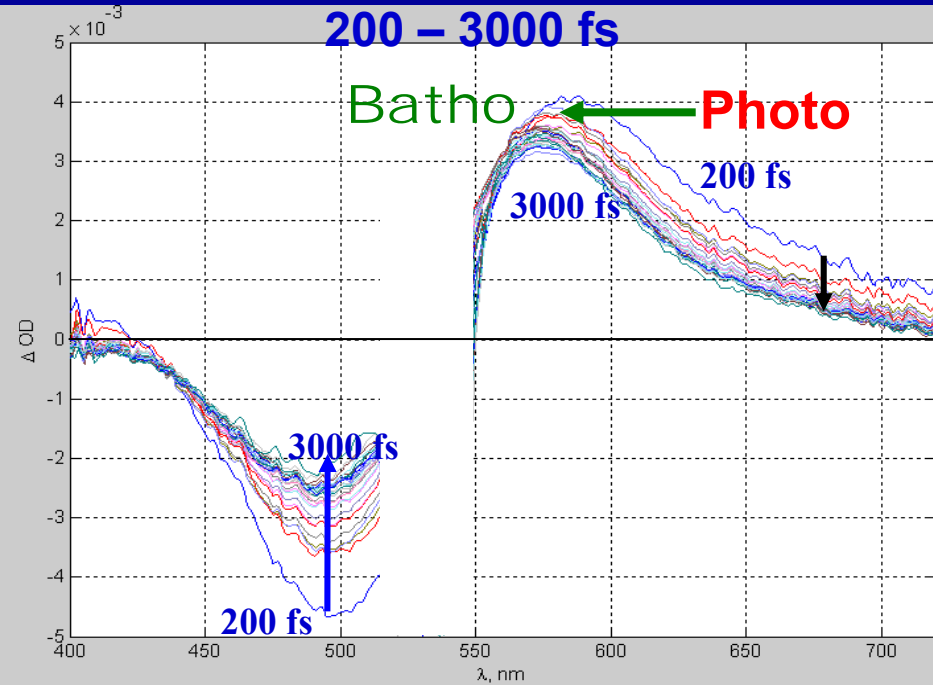
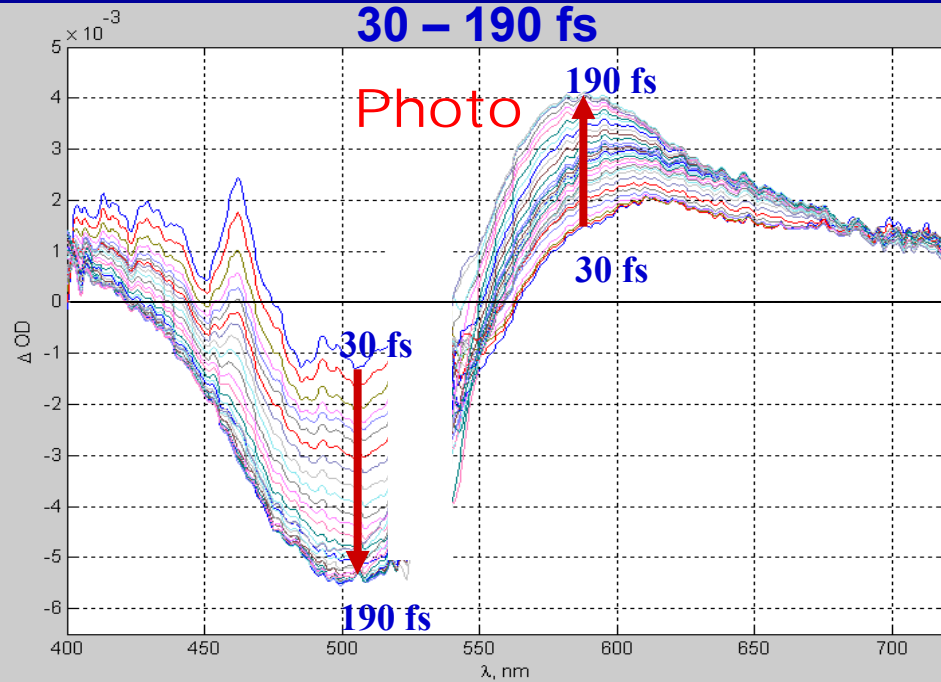
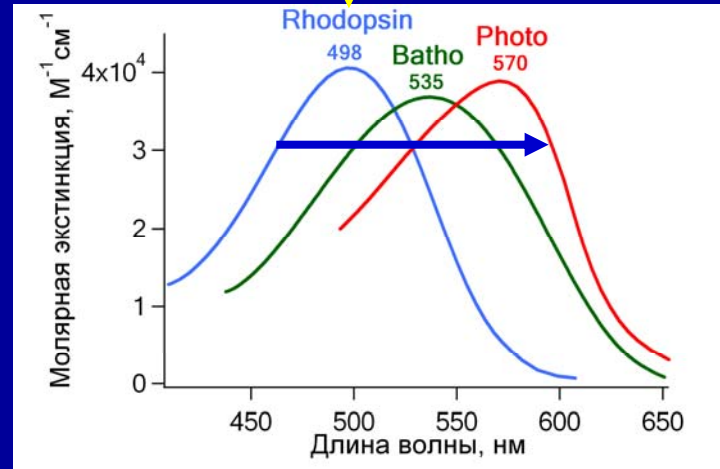


Фото- и батородопсин – прямая фотореакция

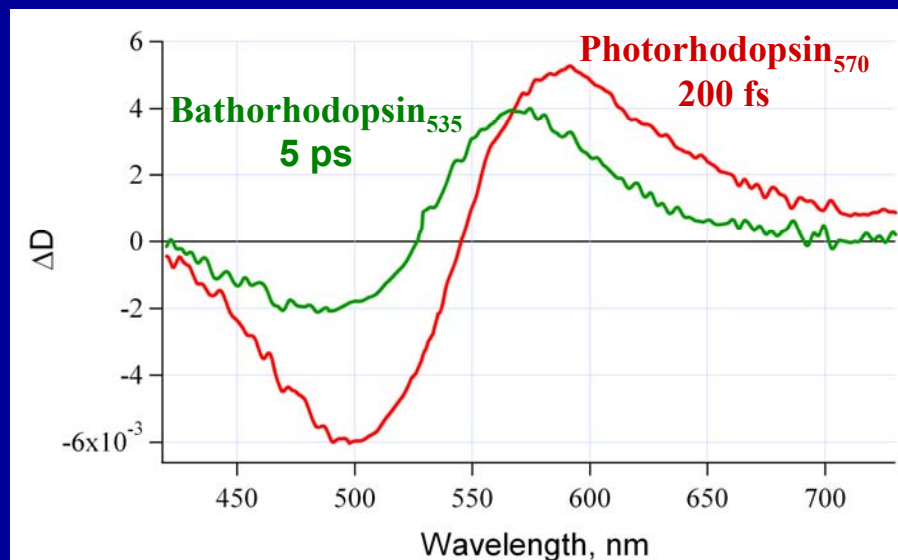


500 nm, t=25 fs E=70 nJ

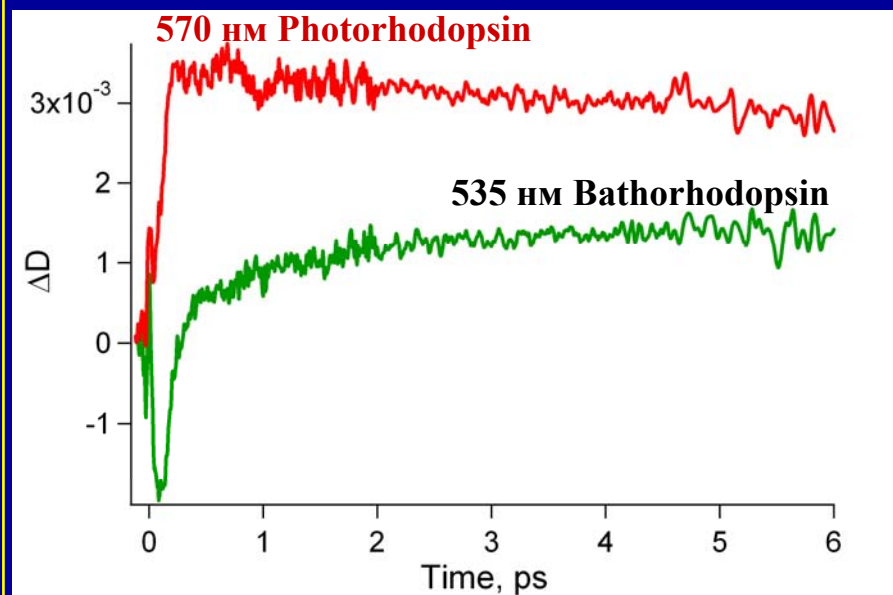


Спектры и кинетика прямой фотореакции (одиночное возбуждение, $\lambda = 500 \text{ nm}$, $t = 30 \text{ fs}$)

Дифференциальные спектры



Кинетика



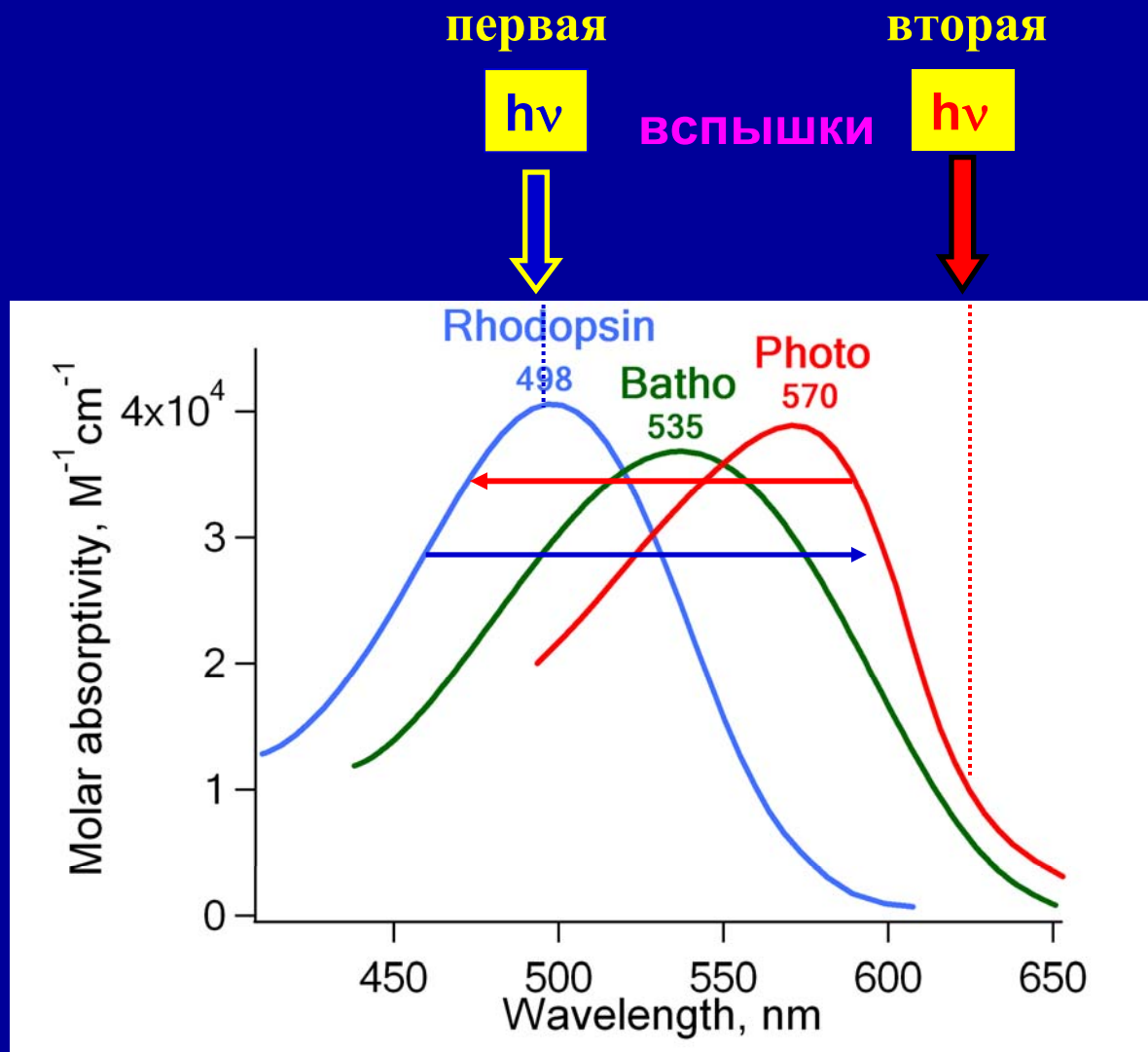
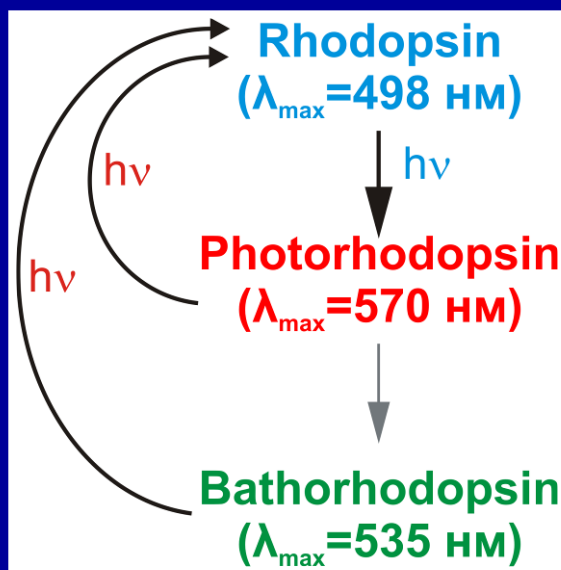
200 fs

200 fs

5 ps



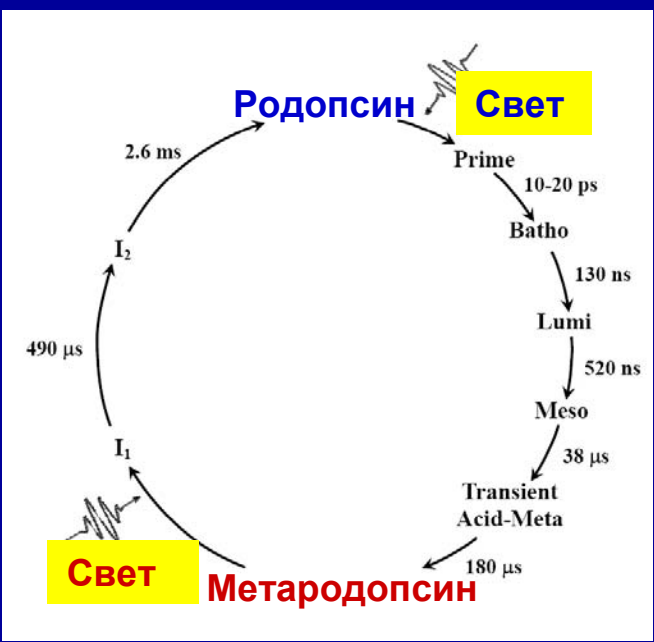
Фотообратимая реакция родопсина при комнатной температуре



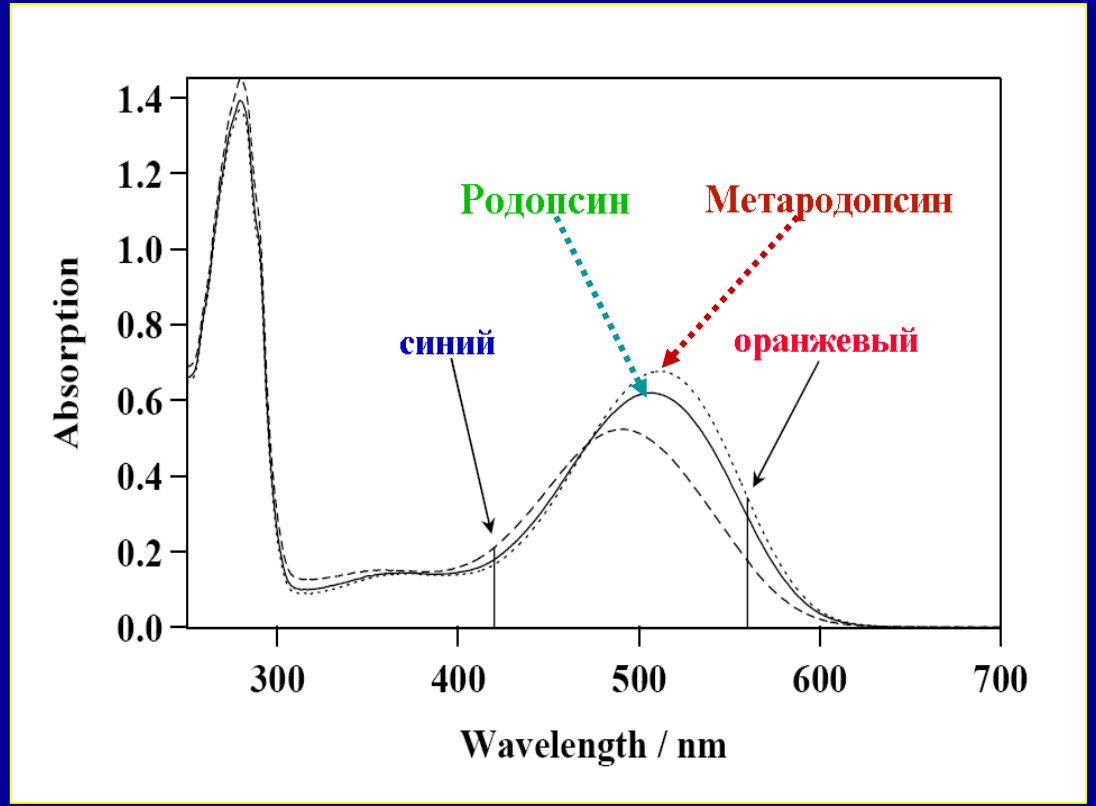
**Фотообратимость
(фоторегенерация)
родопсина беспозвоночных**

Фотообратимость родопсина беспозвоночных (осьминога) (миллисекунды) (Ostrovsky & Weetall, 1998)

Фотоцикл родопсина осьминога

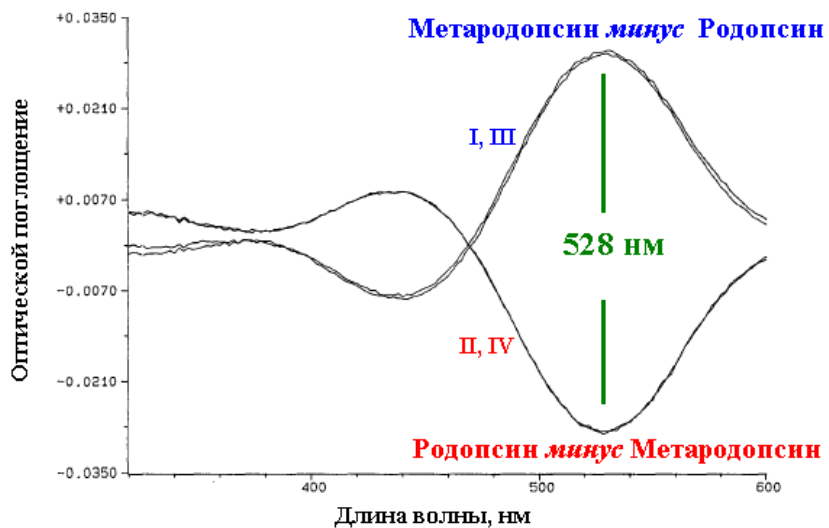


Спектры поглощения родопсина и метародопсина

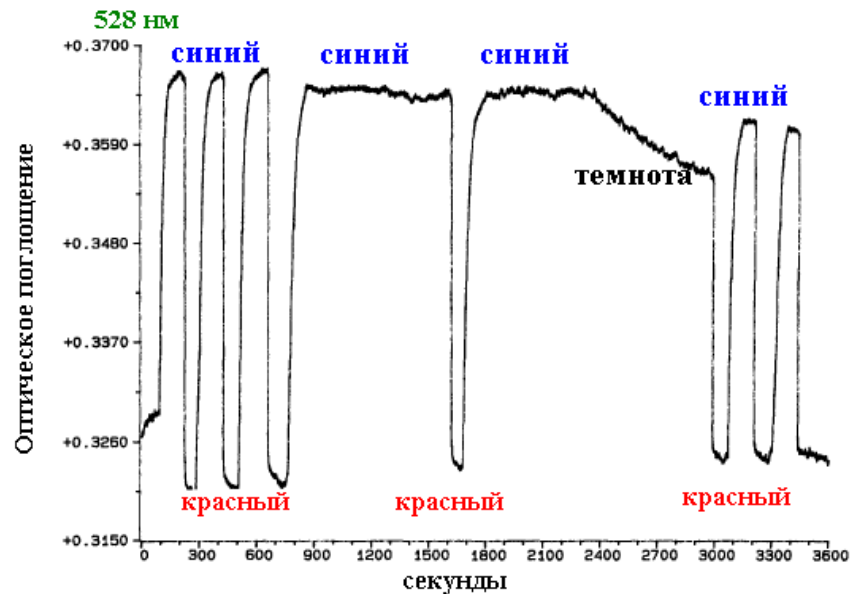


Фотообратимость родопсина осьминога: многократные спектральные переходы (Ostrovsky&Weetall, 1998)

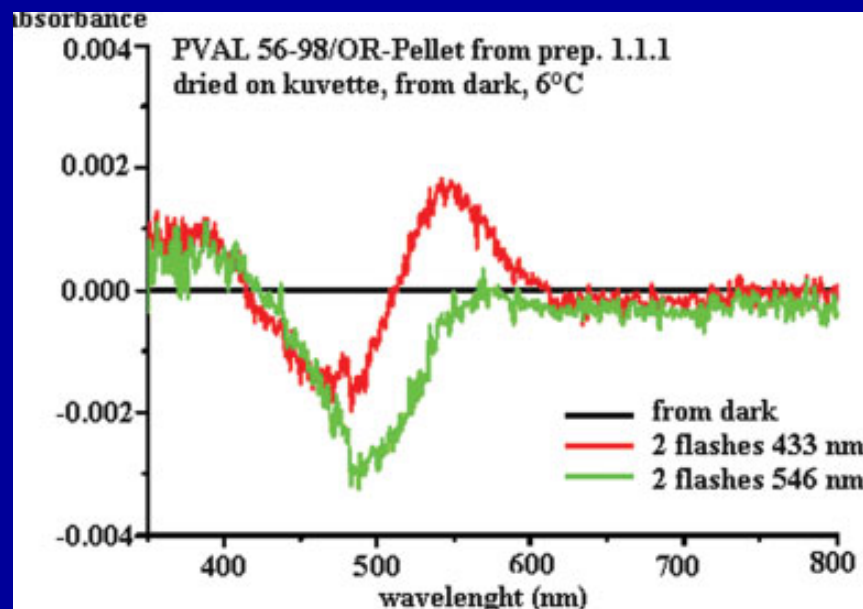
Дифференциальные спектры родопсина осьминога (четыре фотоцикла)



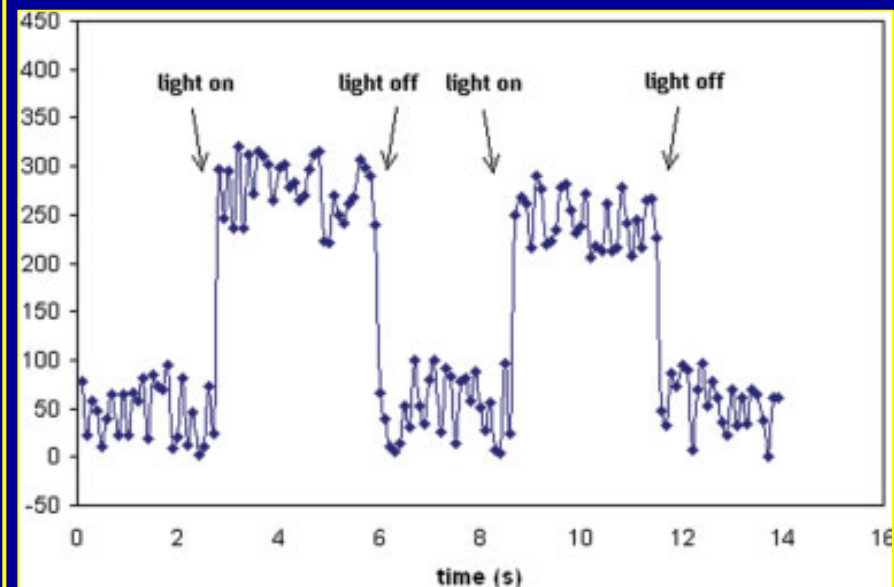
Многократные переходы родопсин — метародопсин при действии синего и красного света при комнатной температуре



Фотообратимость в плёнке и фотоэлектрические ответы родопсина осьминога (Paternolli et al., 2008)



**Фотообратимость родопсина осьминога
(фрагменты микровиллярных мембран
в поливиниловой плёнке)**

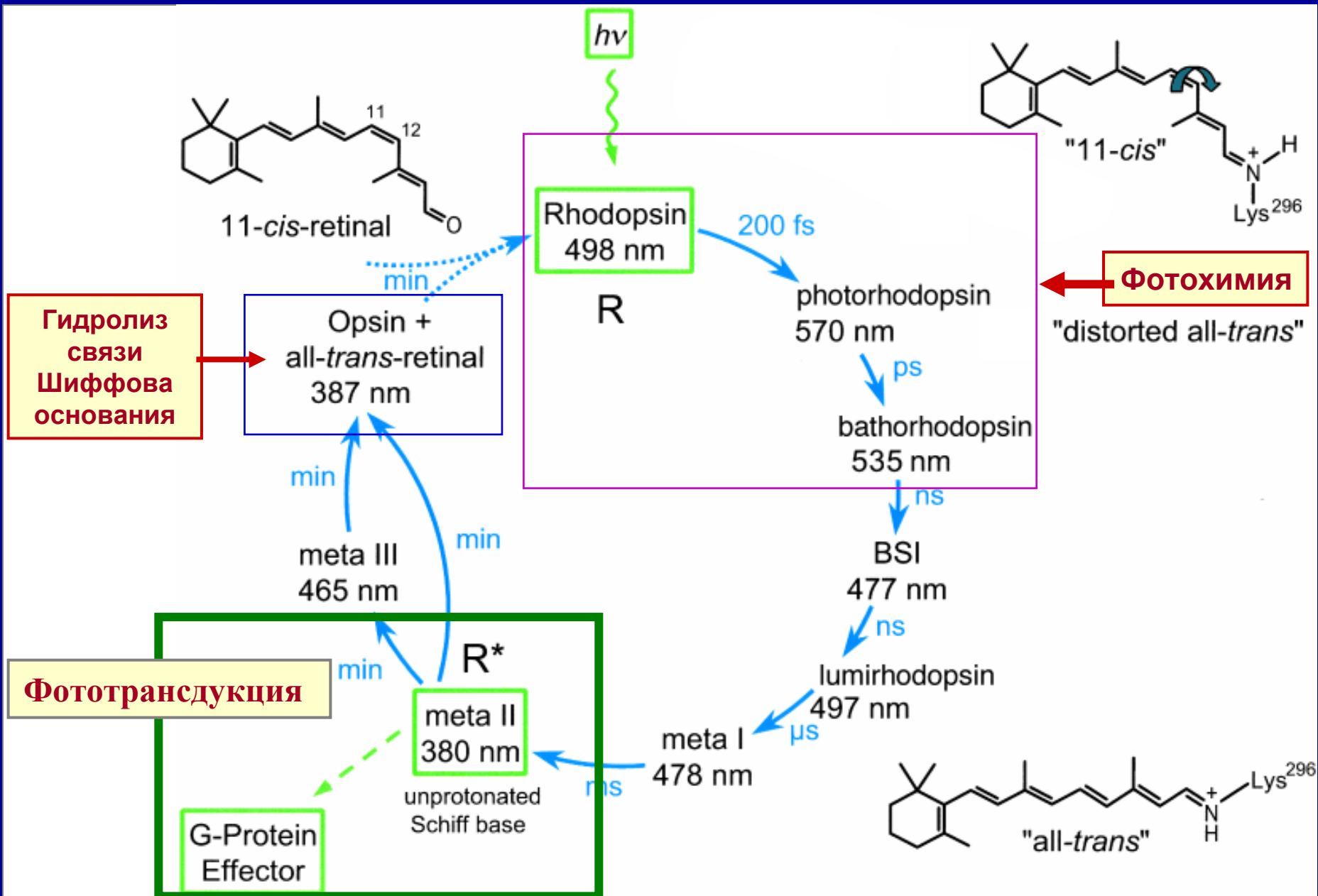


**Фотоэлектрические ответы
высушенных фрагментов
микровиллярных мембран осьминога**

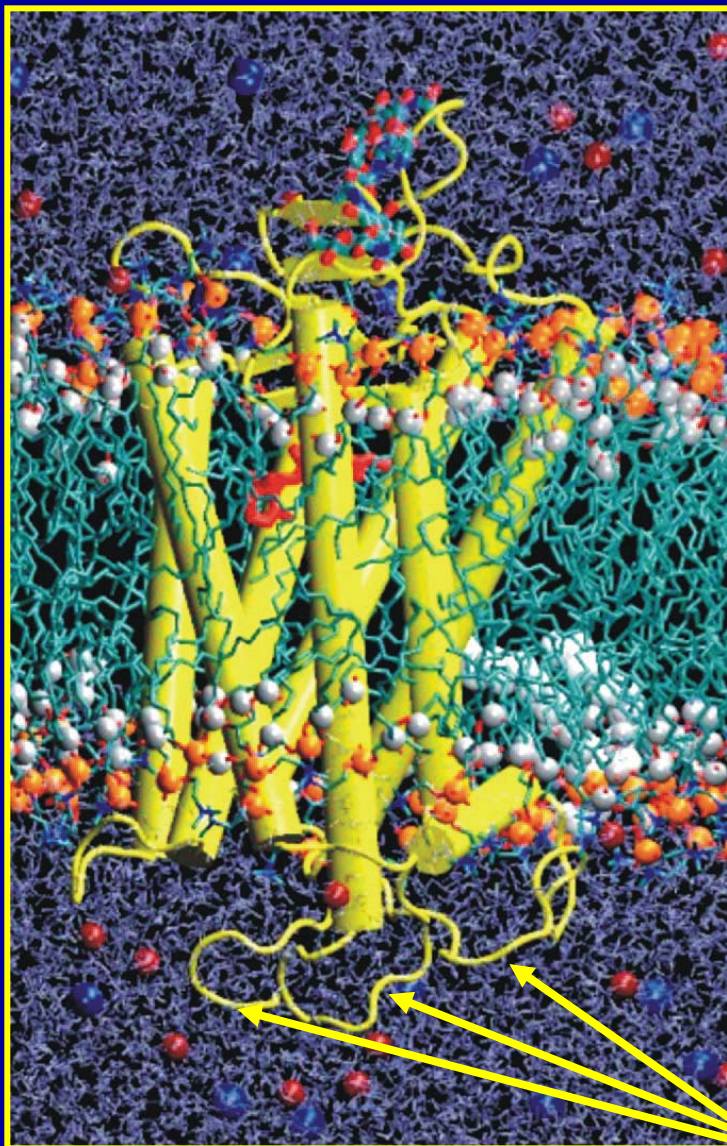
Фототрансдукция

**Физиологическая функция
родопсина – активация
ферментативного каскада
усиления светового сигнала**

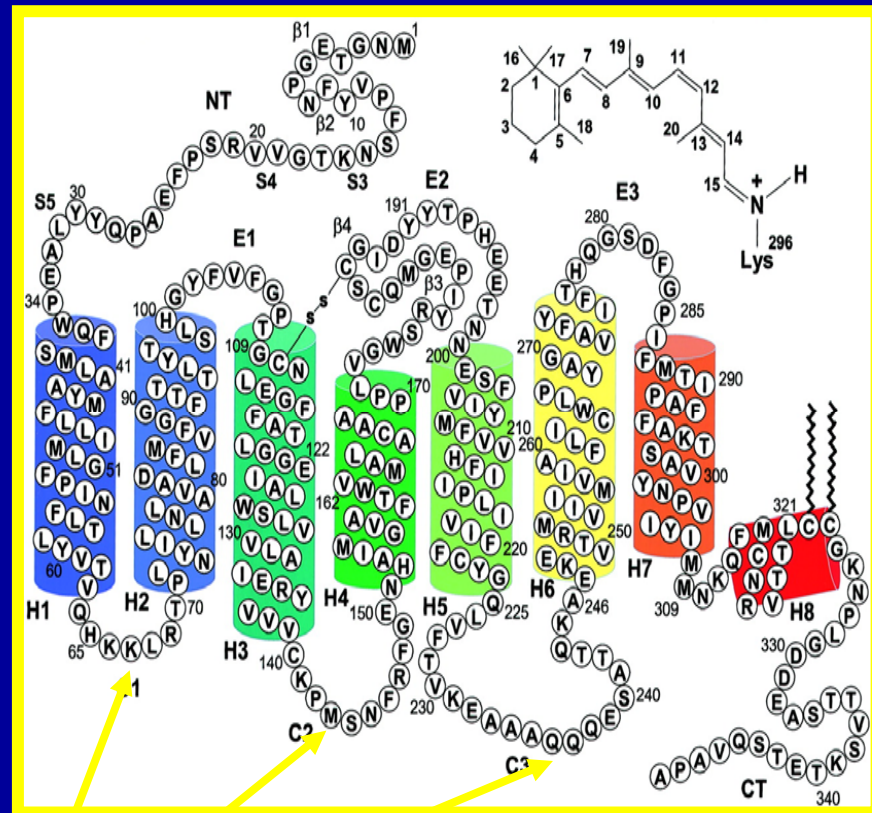
Фотолиз родопсина: три ключевые стадии



Двух – и трёхмерная структура зрительного пигмента родопсина



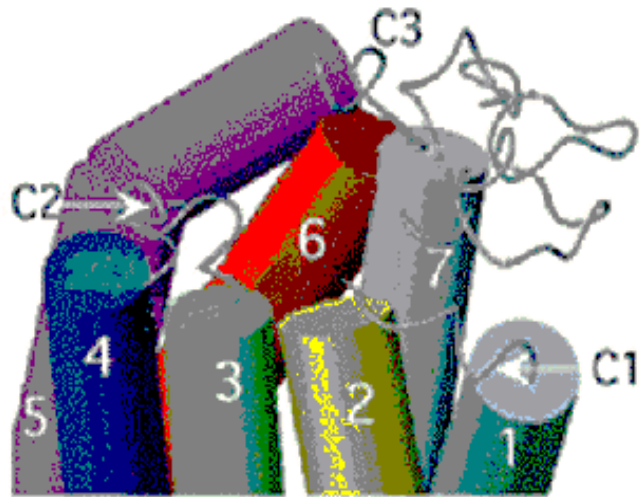
Huber et al 2004



Овчинников и др., 1982

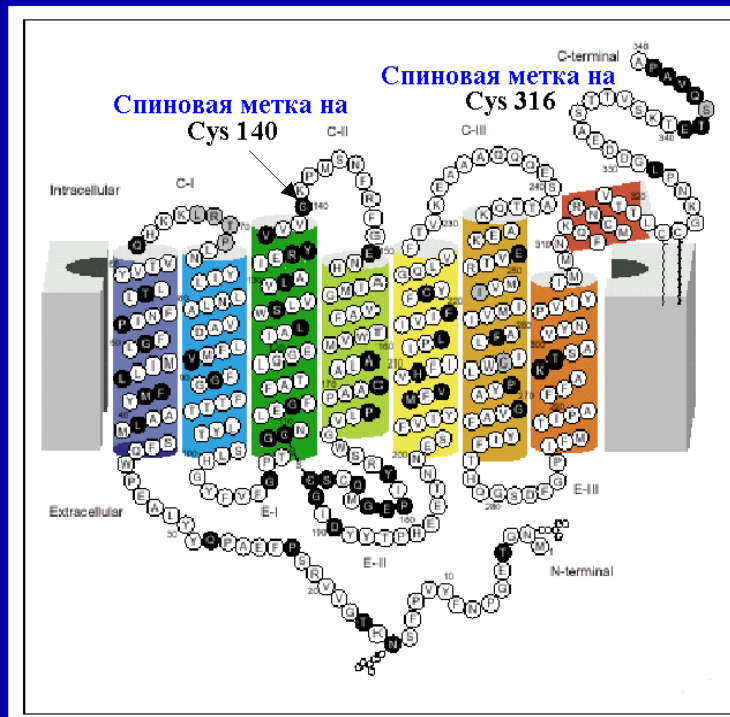
Цитоплазматические петли —
места связывания с трансдуцином

Изменение конформации цитоплазматической части опсина на стадии метародопсина II – открываются места связывания с трансдуцином



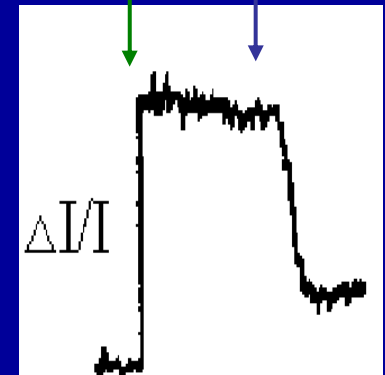
Петли C1, C2 и C3 становятся доступными для взаимодействия с G-белком

Фрагмент цитоплазматической части трёхмерной структуры родопсина



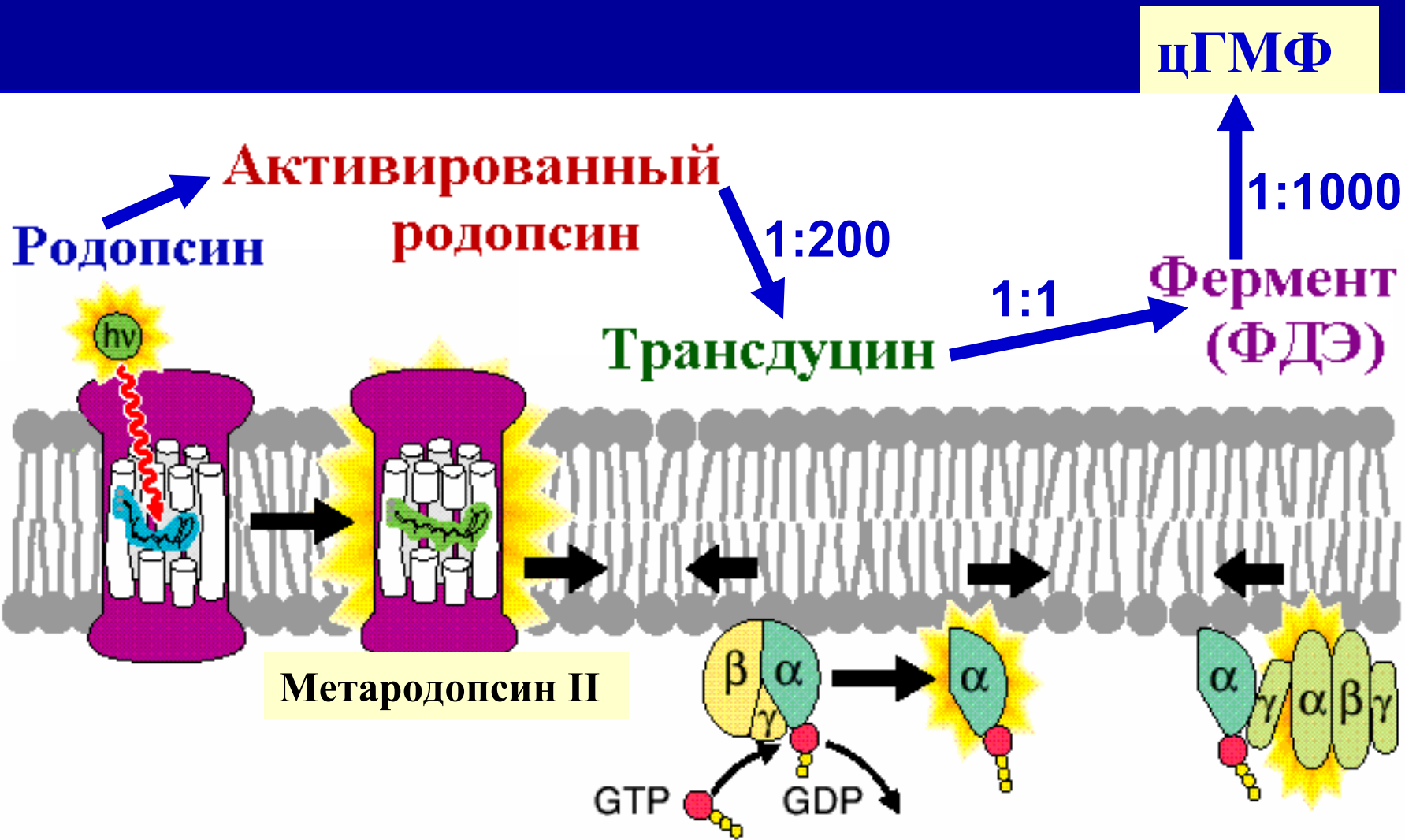
Увеличение подвижности спиновой метки при переходе родопсина в метародопсин II
Спиновая метка «сидит» на Cys140
(Погожева и др., 1985)

Зелёный Синий



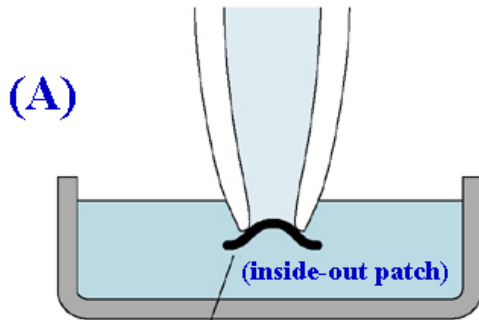
Сигнал ЭПР

Активация ферментативного каскада усиления

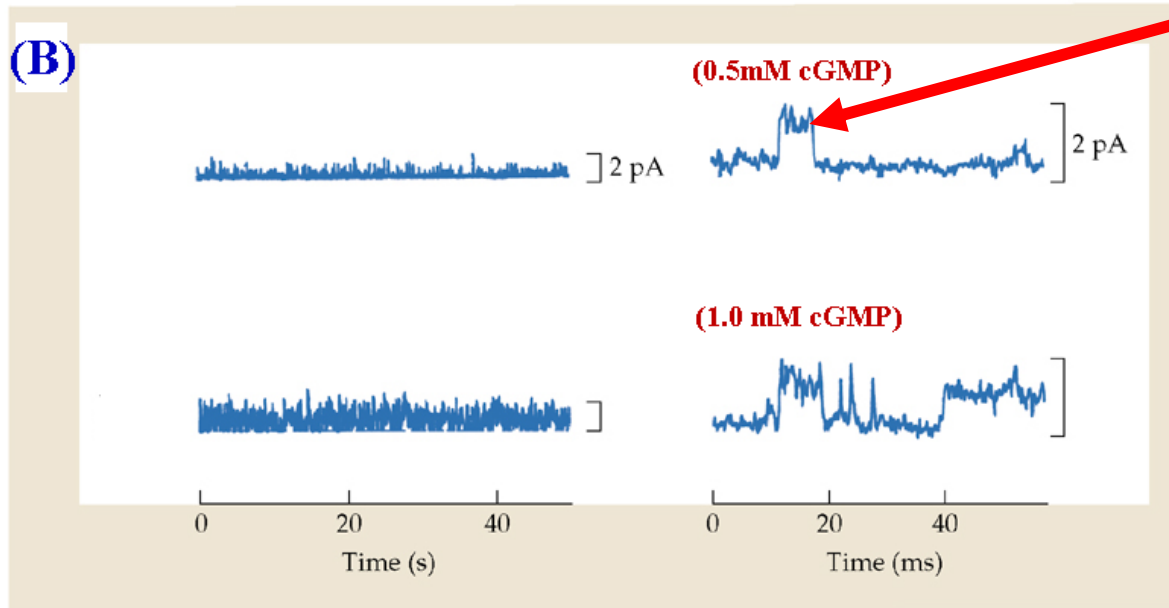


цГМФ способен прямо открывать ионный канал плазматической мембраны наружного сегмента фоторецепторной клетки

Patch clamp



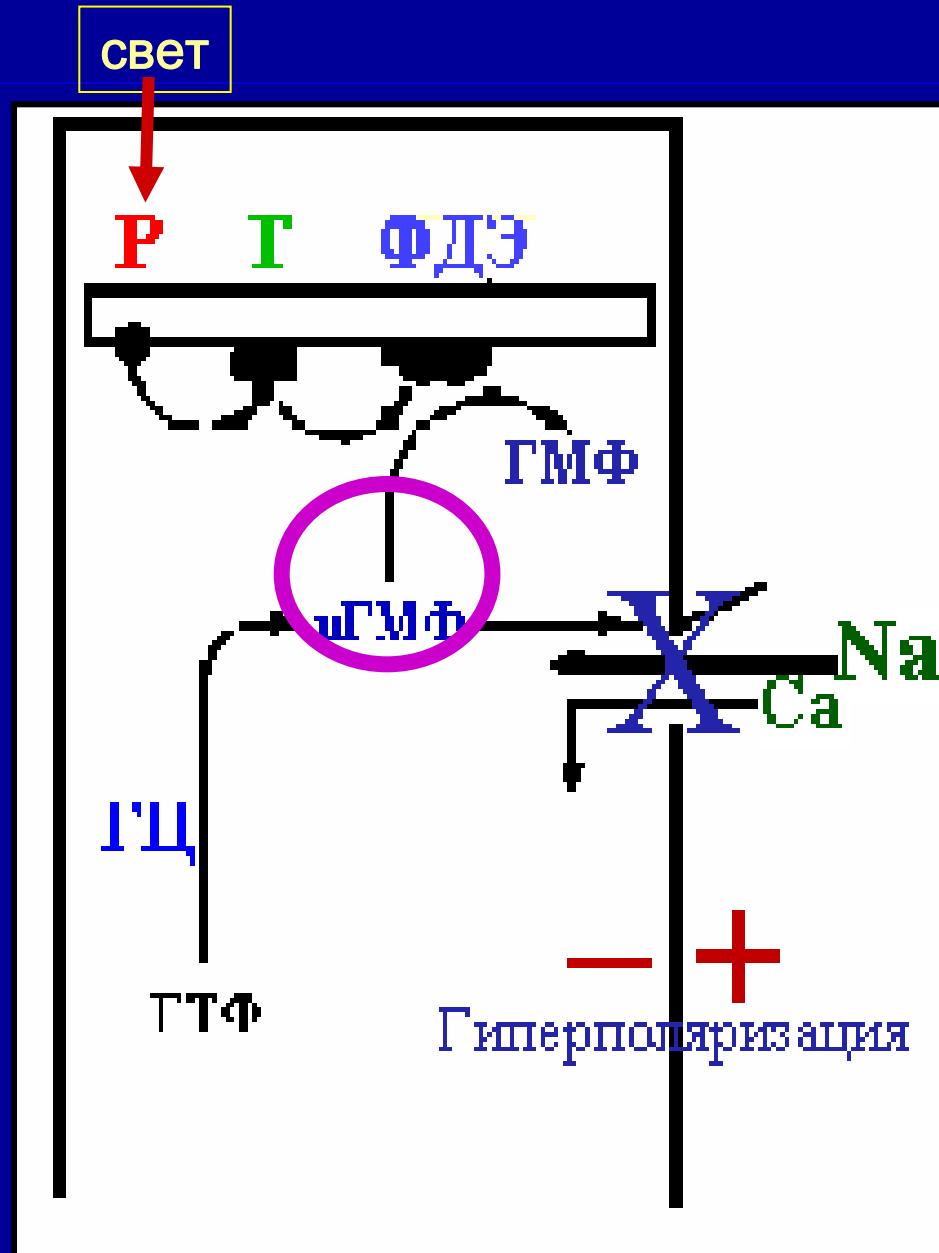
Фрагмент плазматической мембраны наружного сегмента



Аппликация цГМФ к фрагменту плазматической мембраны приводит к увеличению её проводимости (прохождению ионного тока)

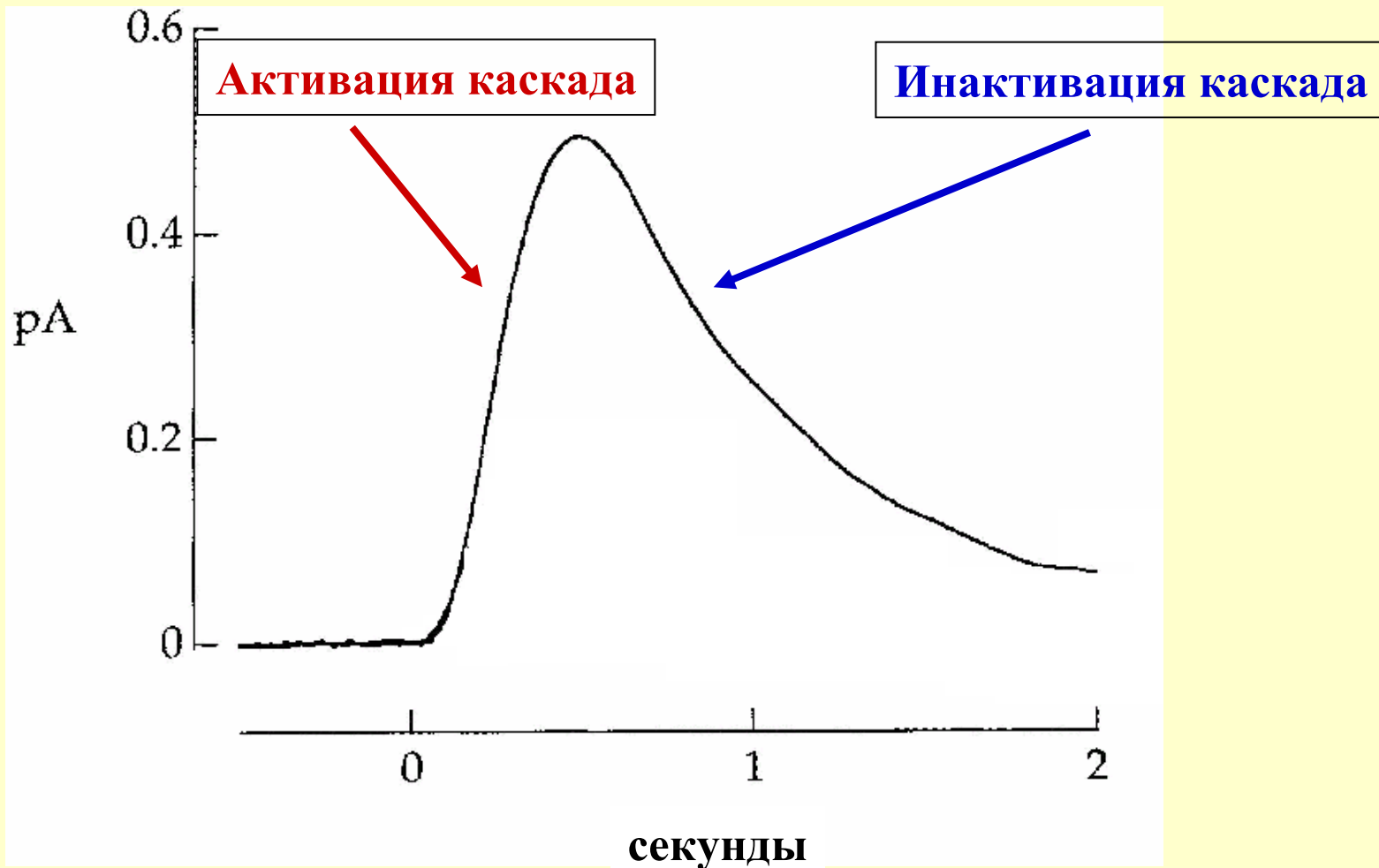
Схема фототрансдукции

Активация ферментативного каскада усиления

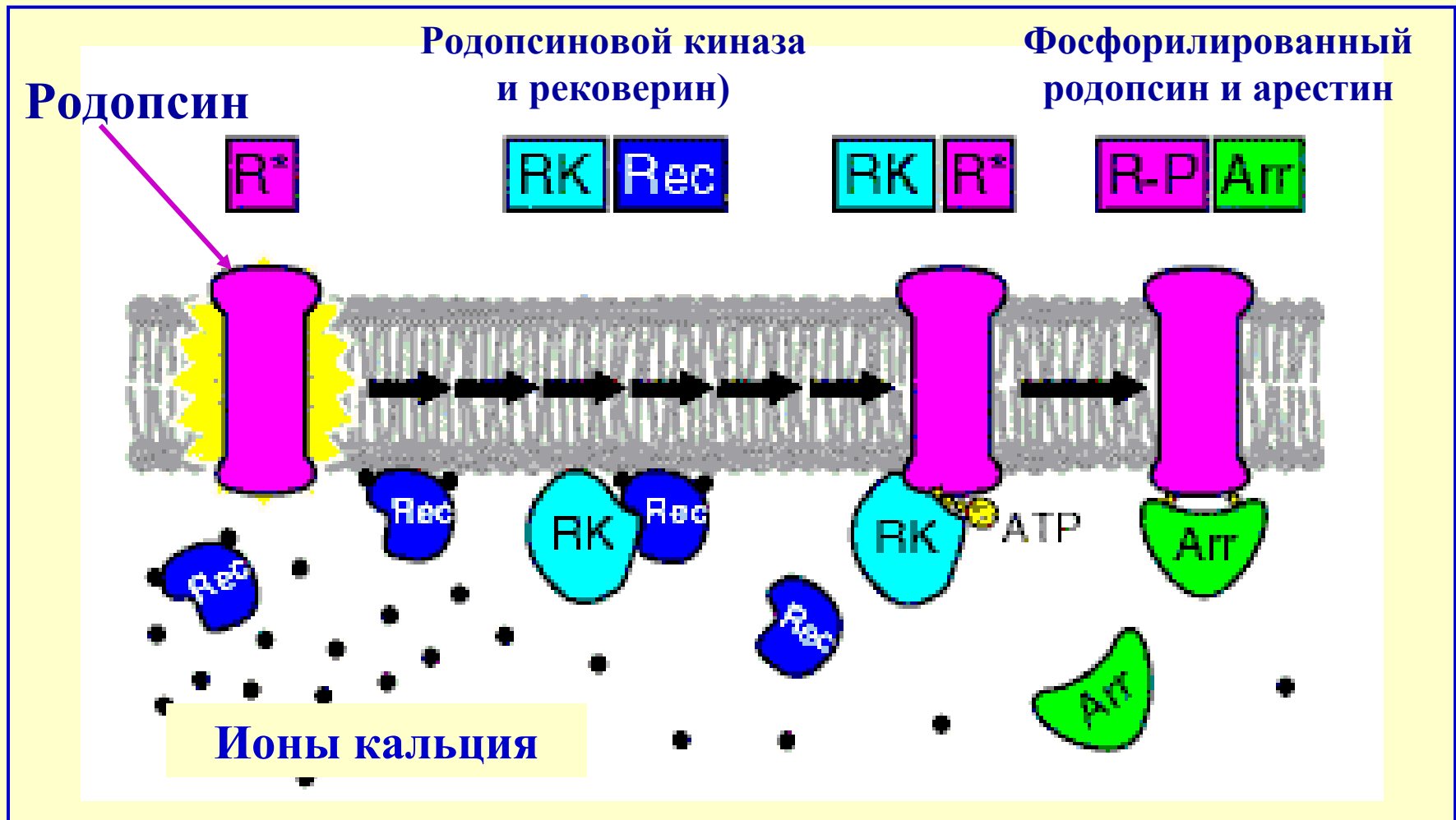


**Электрический ответ (уменьшение «темнового» тока) палочки
в ответ на поглощение одиночного кванта света.**

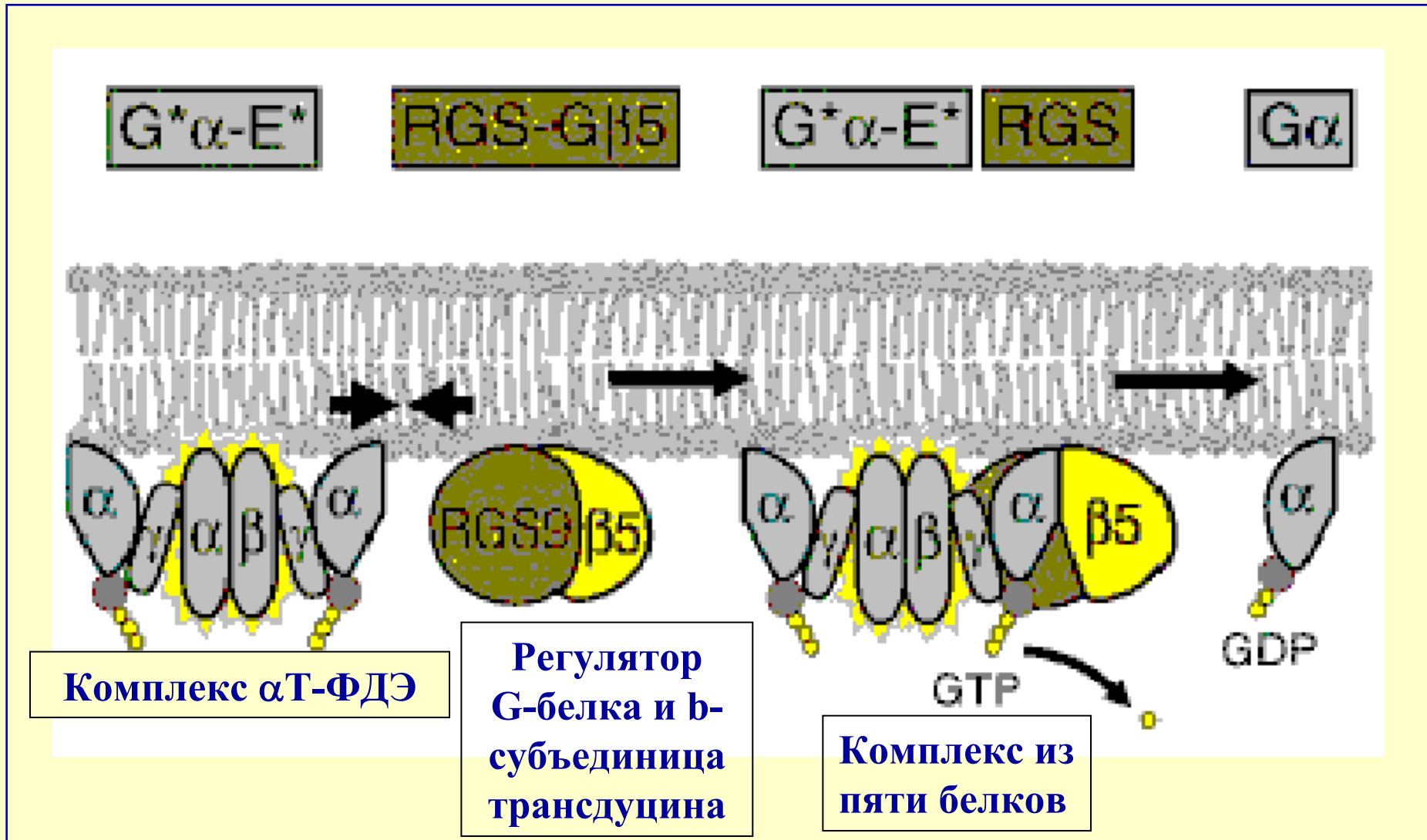
**Восходящая часть ответа— активация и нисходящая часть ответа —
инактивация ферментативного каскада**



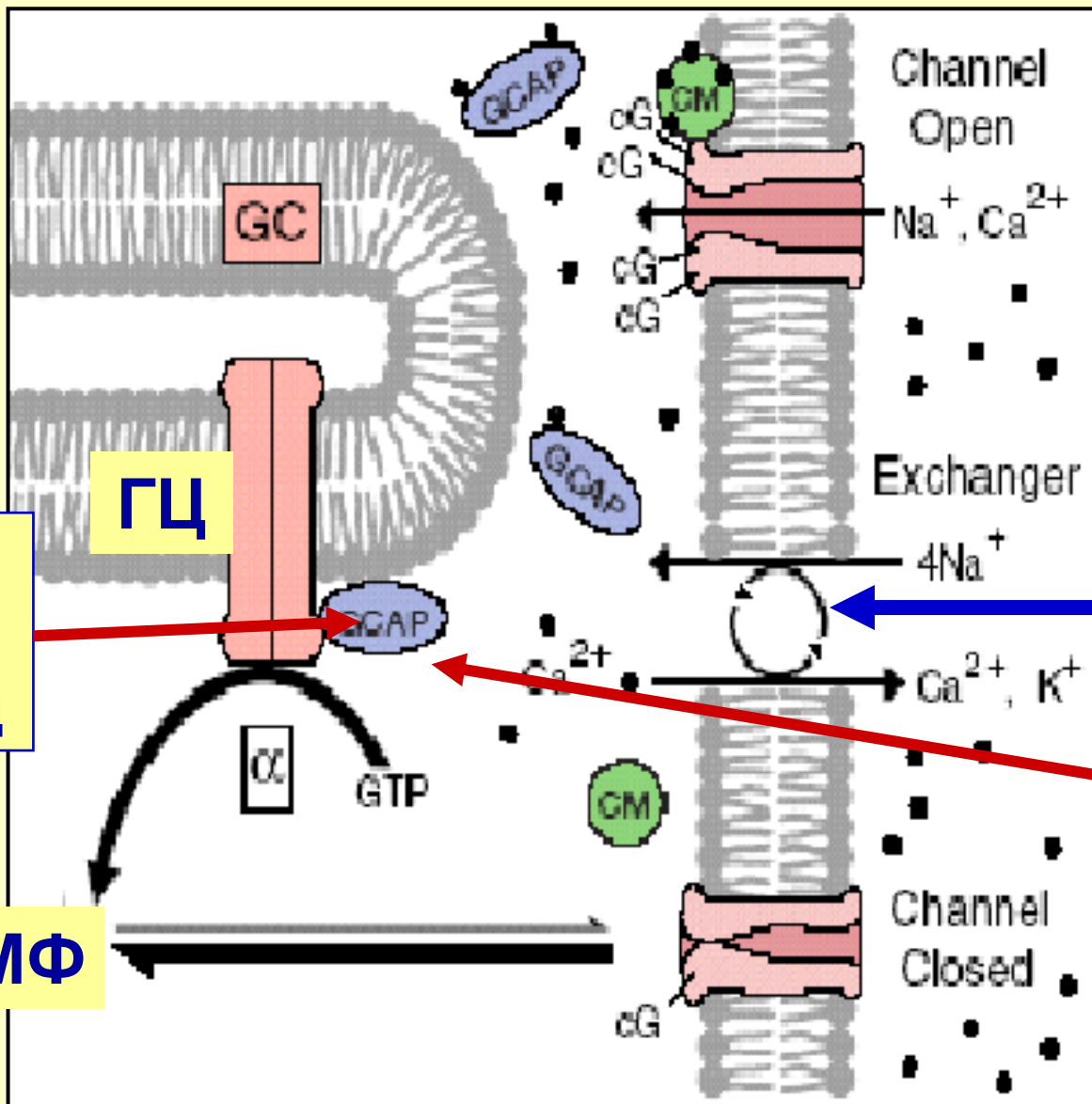
Фототрансдукция: I этап инактивации каскада (инактивация родопсина)



Фототрансдукция: II этап инактивации каскада (инактивация фосфодиэстеразы)



Фототрансдукция: III этап инактивации каскада (открытие \ переход в темновое состояние \ Na-Ca-канала в плазматической мембране)



Кальций-зависимый белок-активатор ГЦ

ГЦ

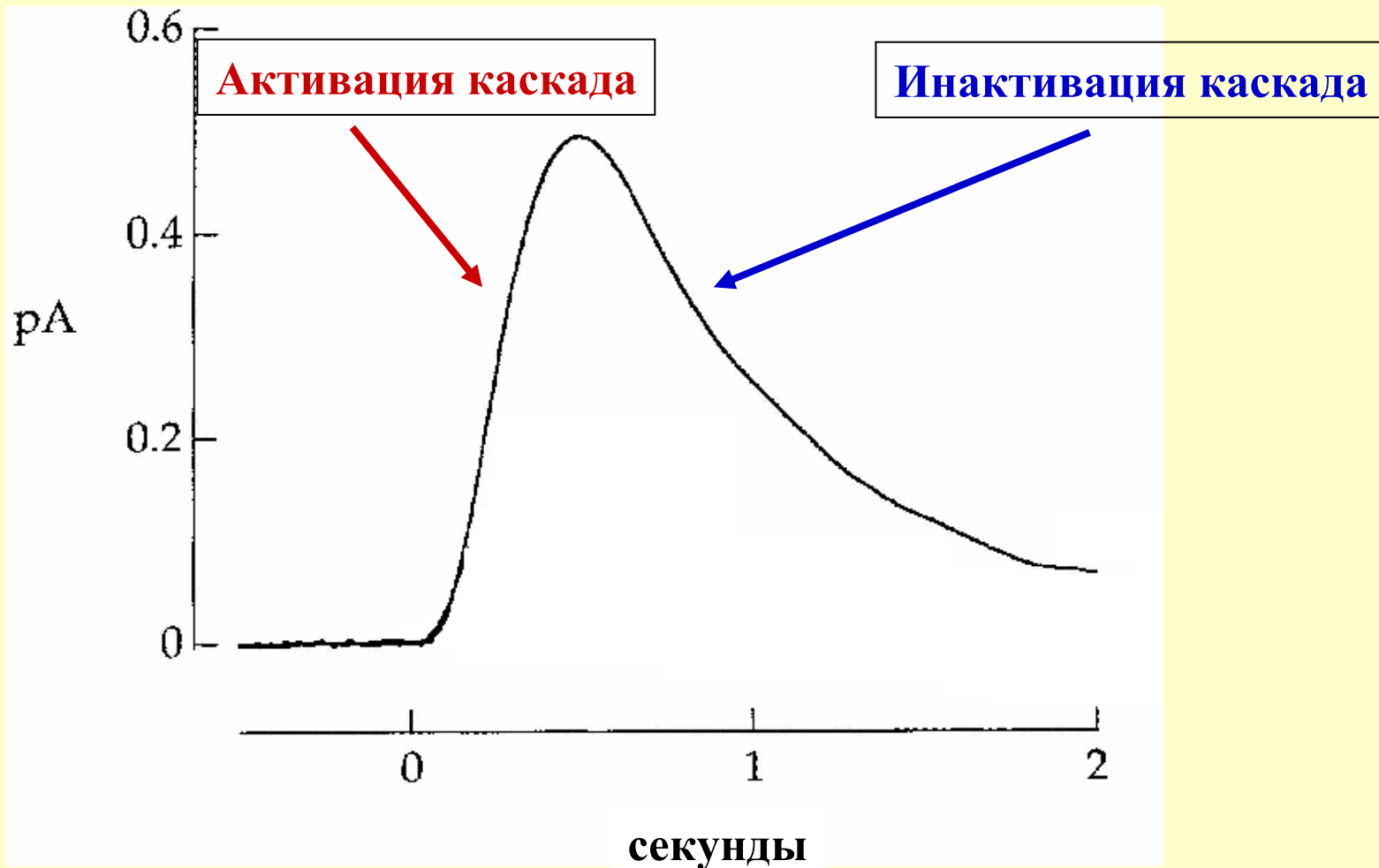
цГМФ

Открытый Na-Ca-канал

Низкая концентрация ионов кальция в цитоплазме

**Электрический ответ (уменьшение «темнового» тока) палочки
в ответ на поглощение одиночного кванта света.**

**Восходящая часть ответа— активация и нисходящая часть ответа —
инактивация ферментативного каскада**



Фотобиологический парадокс зрения

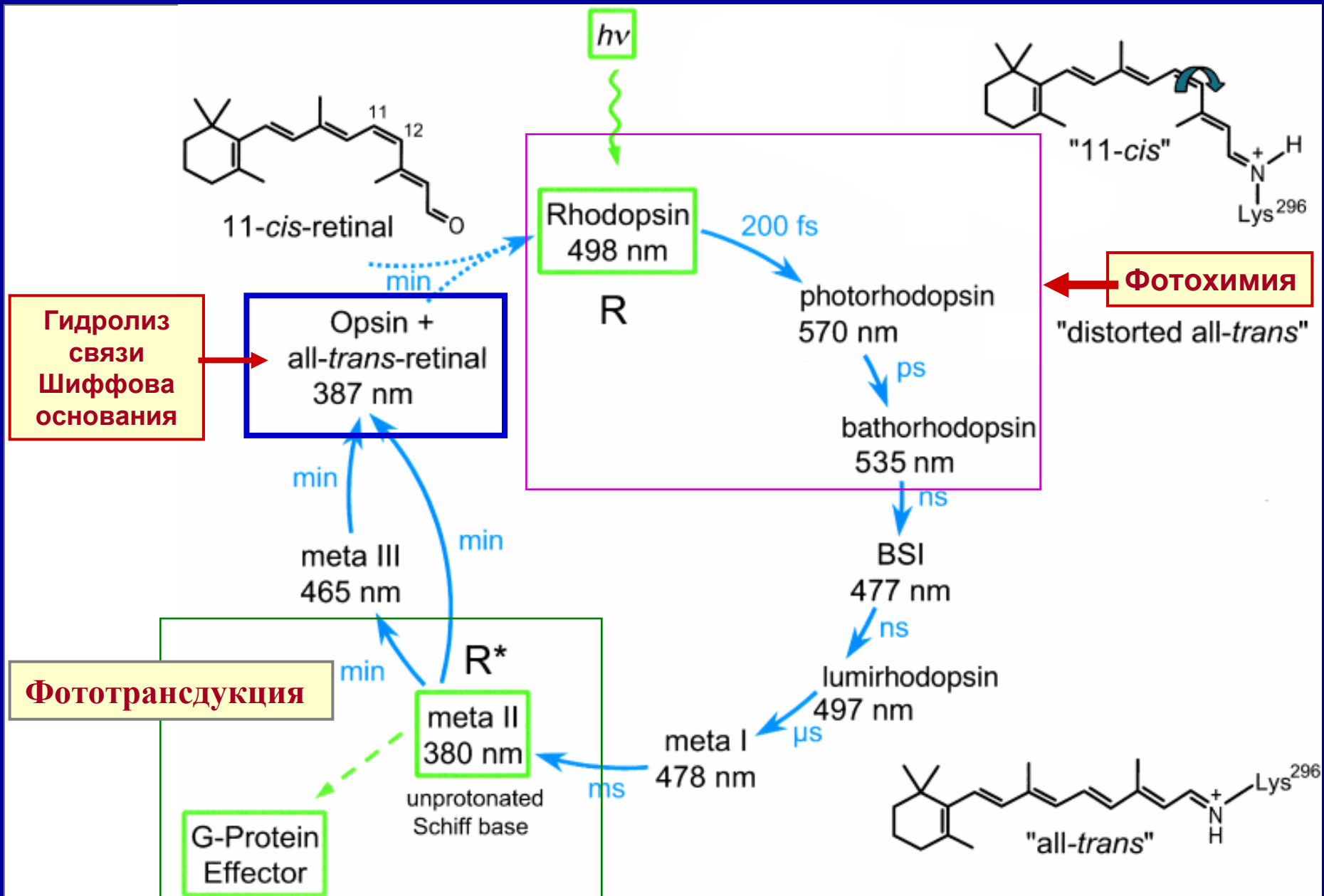
Фотобиологический парадокс зрения

Свет —

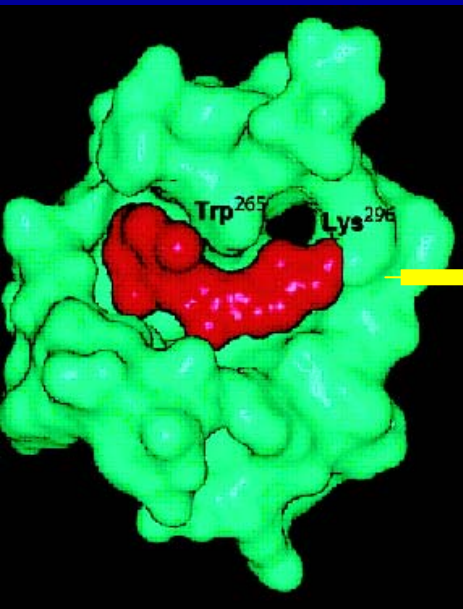
**не только носитель зрительной
информации,
но и потенциально опасный
повреждающий фактор**

Почему?

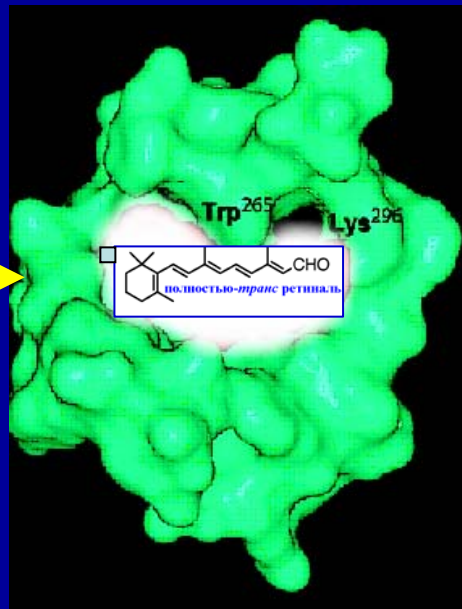
Фотолиз родопсина: три ключевые стадии



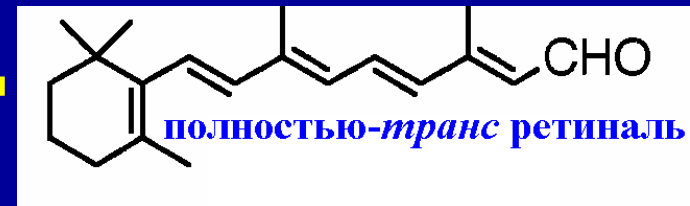
**Транс-ретиаль высвобождается
из хромофорного центра опсина на последней стадии фотолиза**



СВЕТ



+

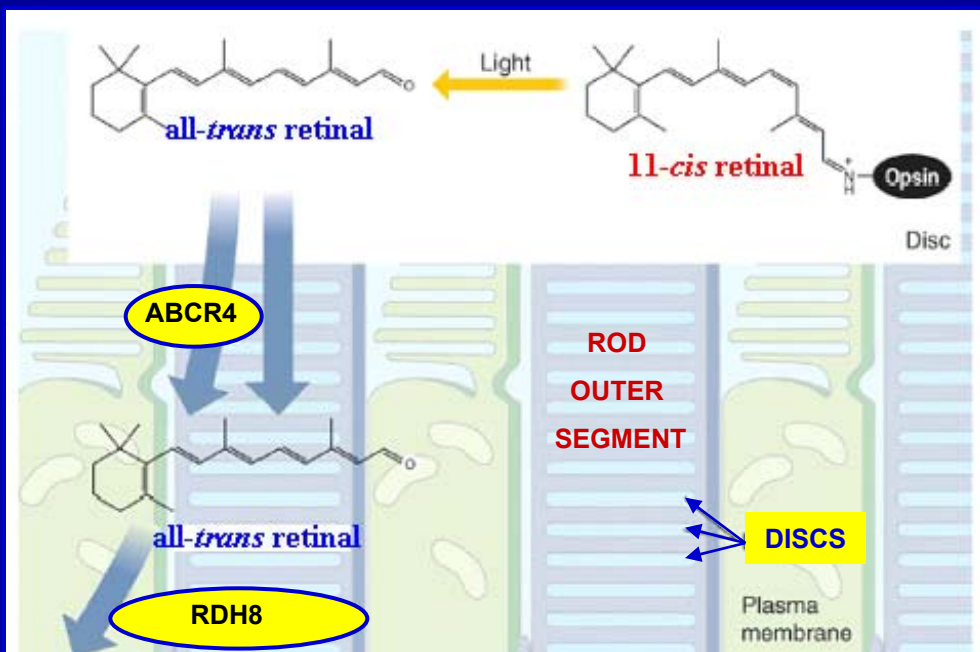


**Родопсин
(11-цис ретиаль)**

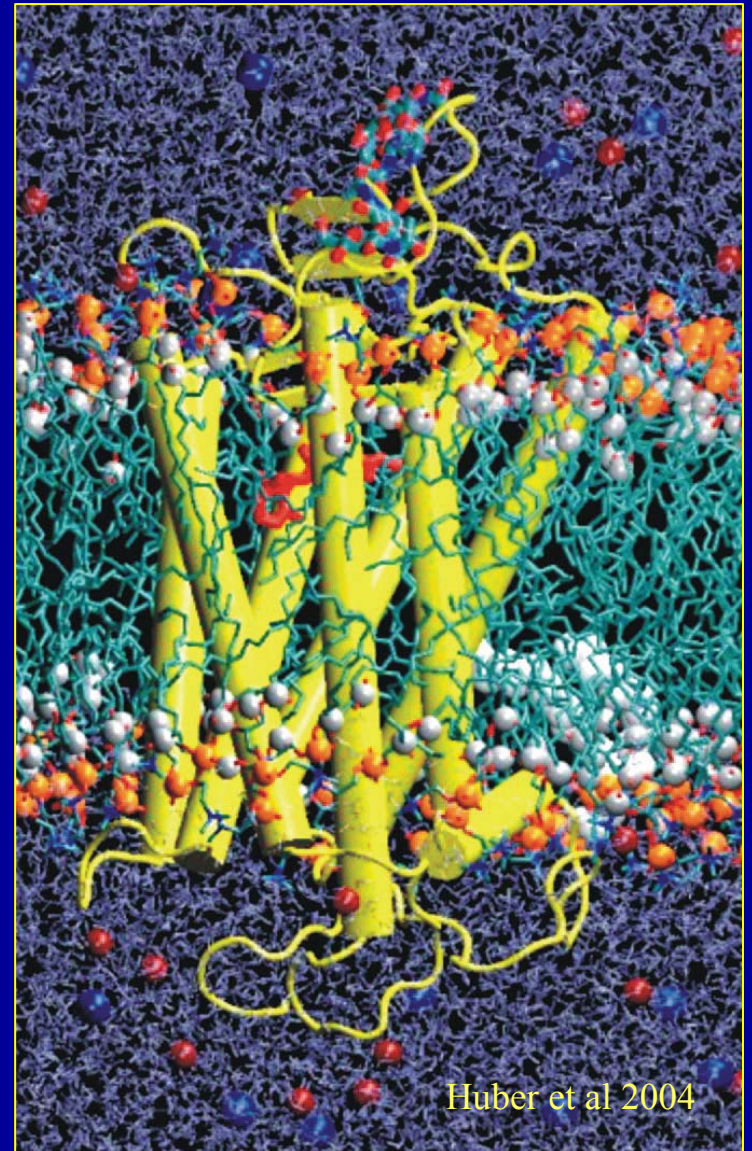
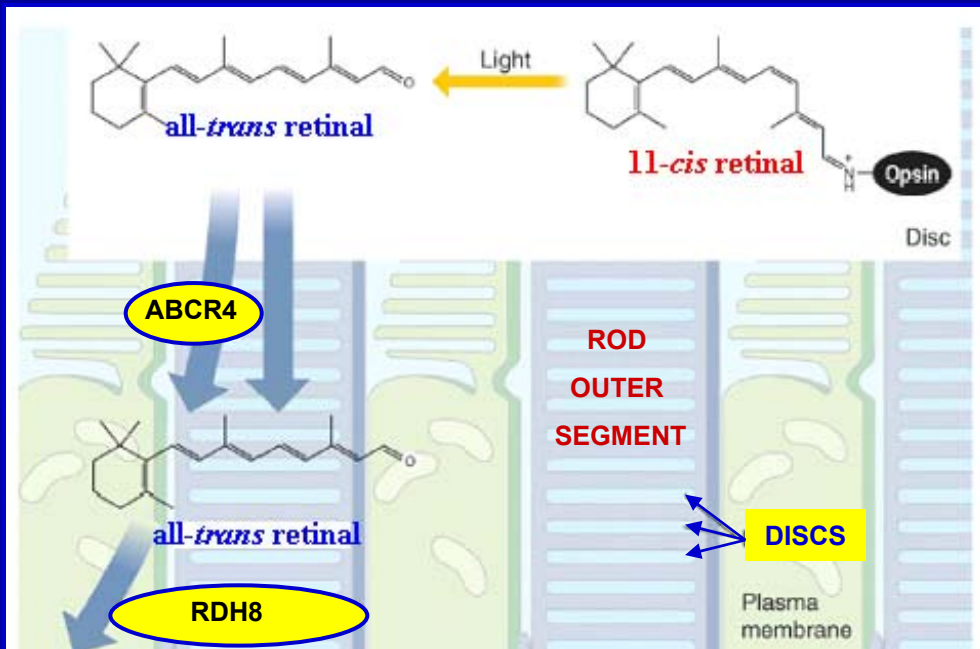
**Метародопсин II
(полностью-транс ретиаль)**

**транс-ретиаль
фототоксичен !!!**

Полностью-транс ретиналь и продукты его превращения как фототоксические агенты

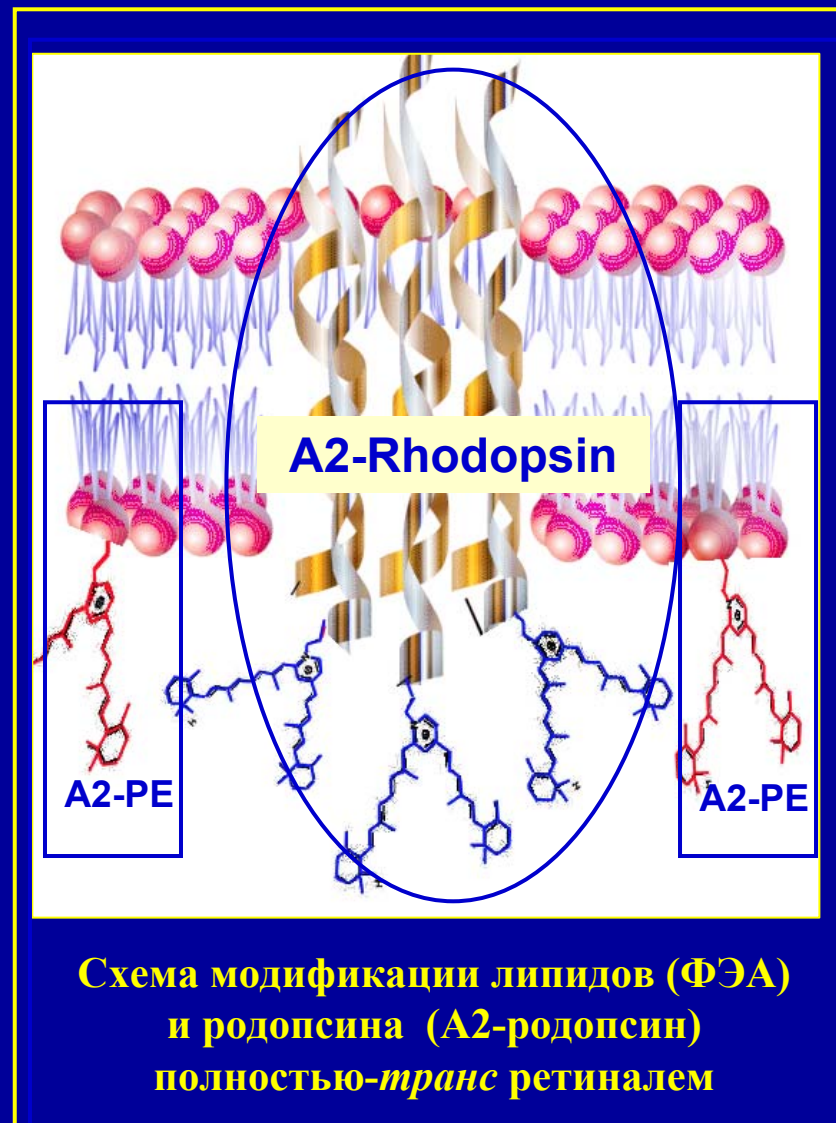
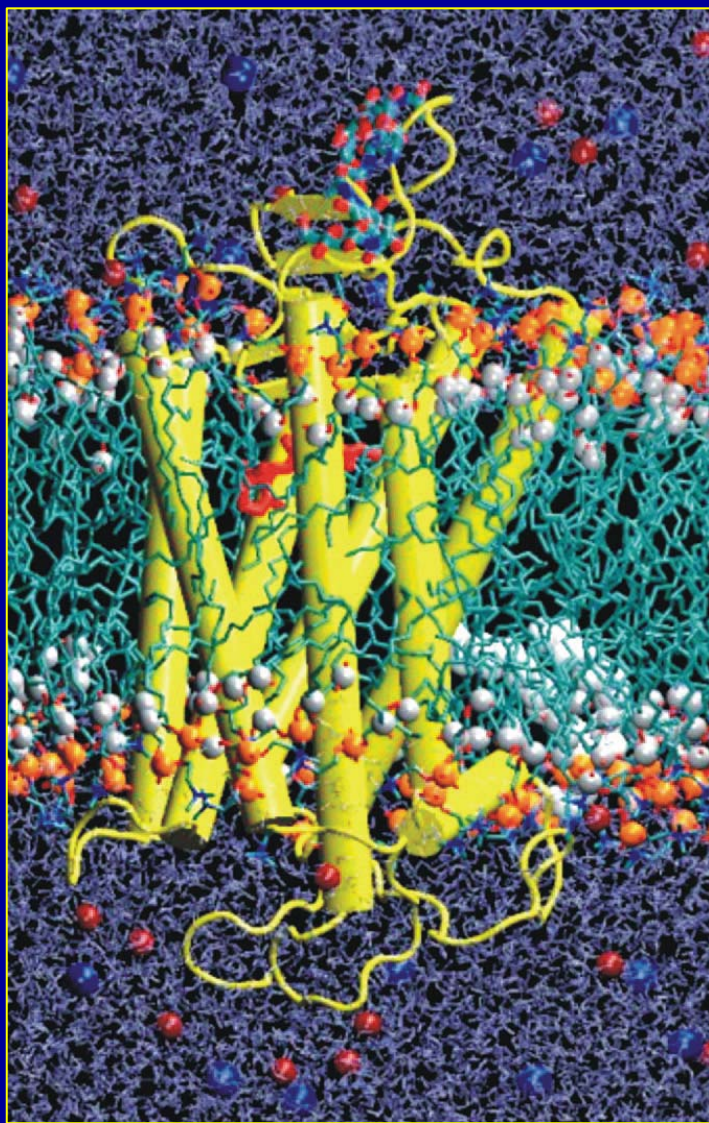


Полностью-транс ретиналь и продукты его превращения как фототоксические агенты

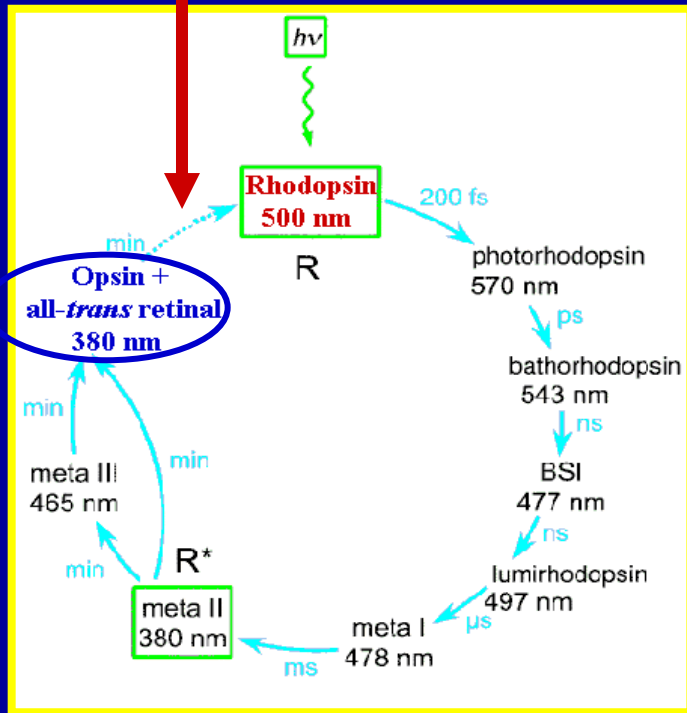


Huber et al 2004

Полностью-транс ретиналь и его продукты его превращения как фототоксические агенты

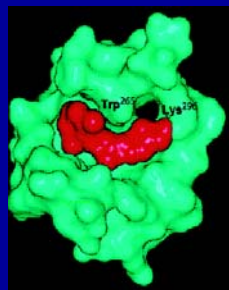


Регенерация (opsin+ 11-cis retinal)



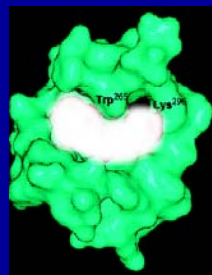
Способность к регенерации — чувствительный тест на сохранение физиологических, нативных свойств зрительного пигмента родопсина

Схема регенерации родопсина



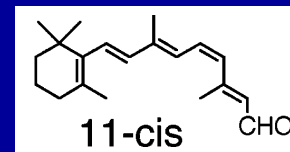
Rhodopsin, 500 nm

СВЕТ
→

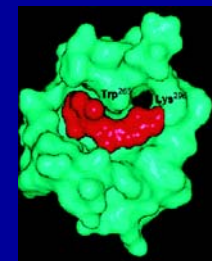


Opsin

+

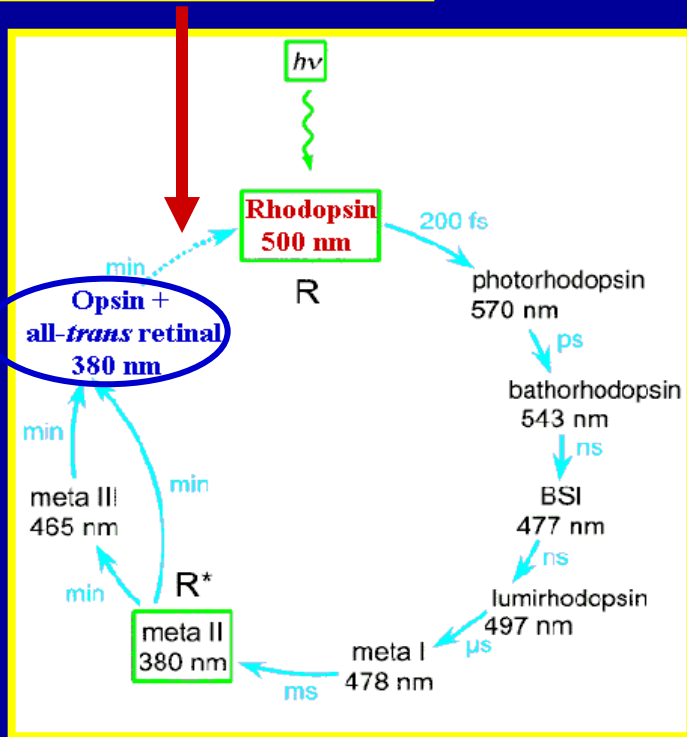


=



Rhodopsin, 500 nm

Регенерация (opsin+ 11-cis retinal)



Регенерация родопсина Спектры поглощения суспензии наружных сегментов палочек

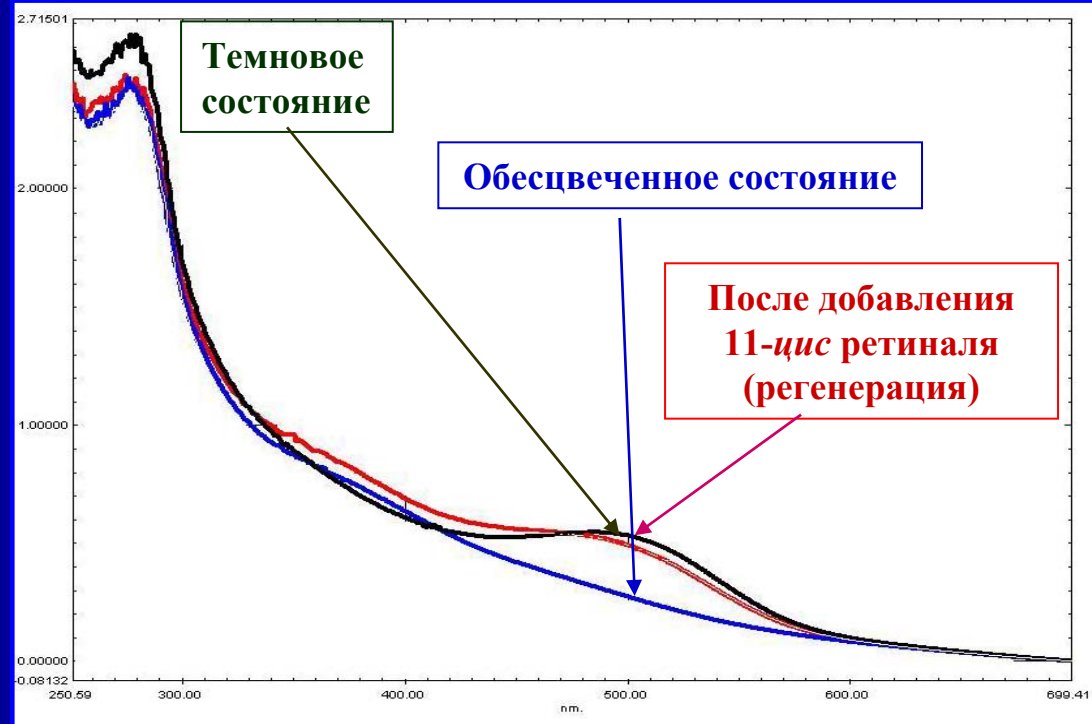
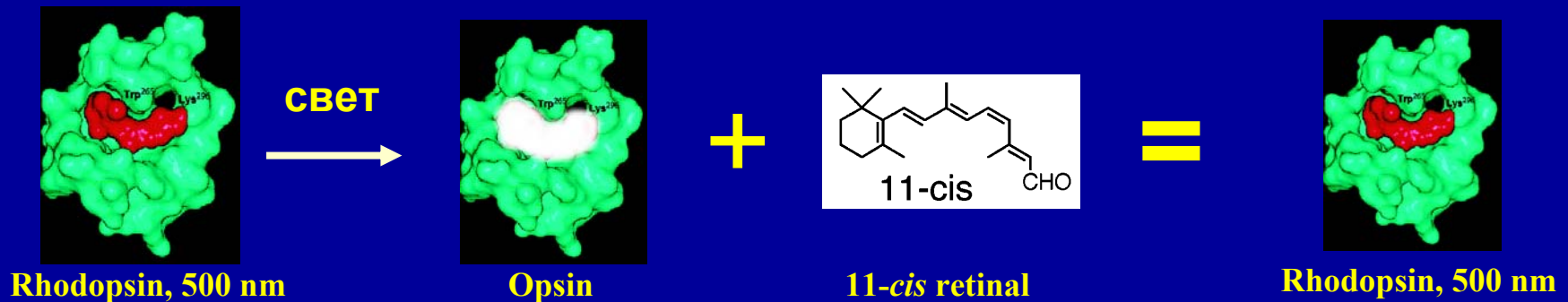
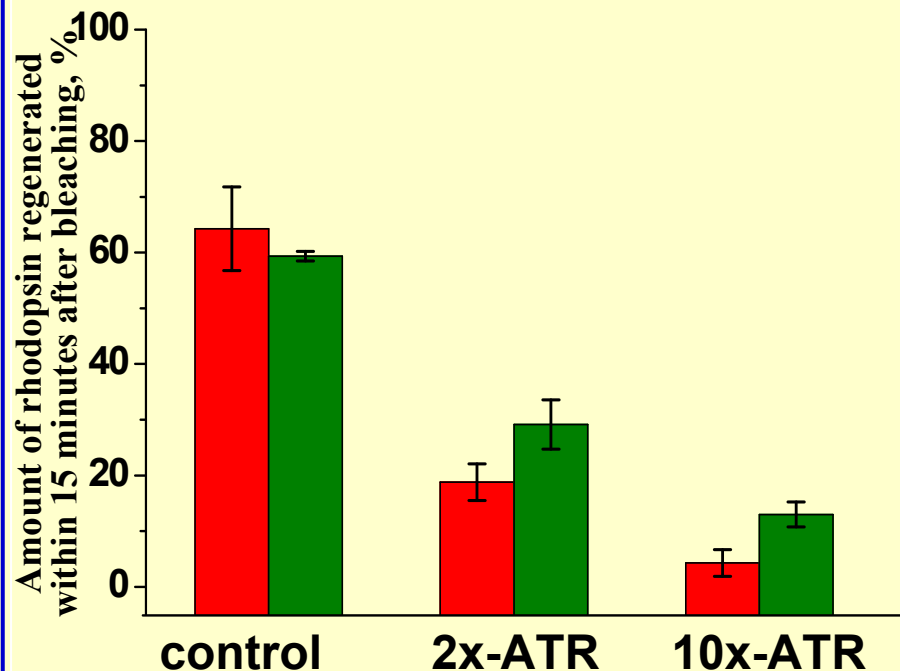


Схема регенерации родопсина

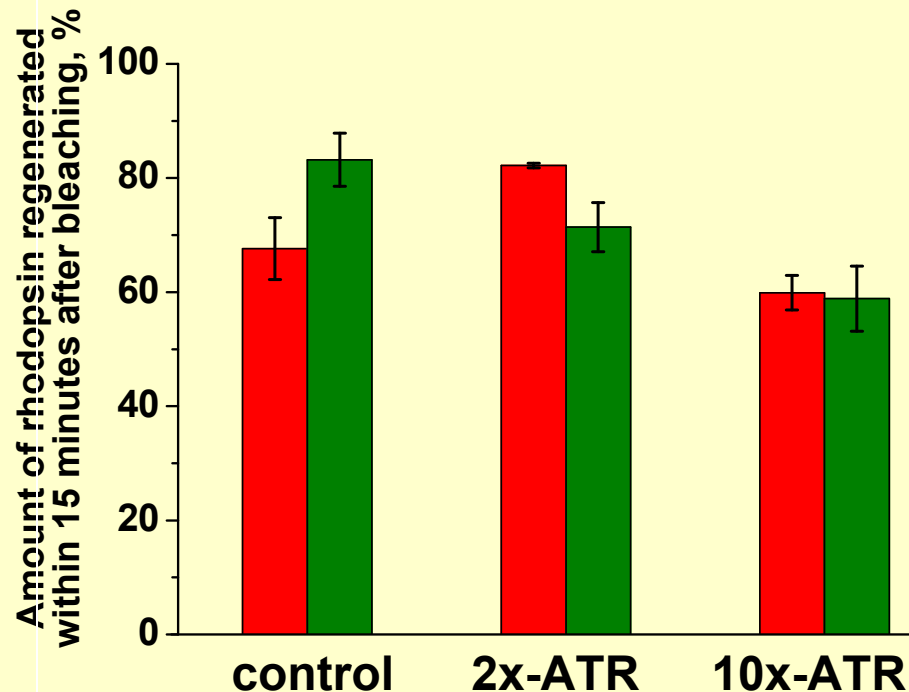


Уменьшение скорости регенерации родопсина в фоторецепторной мембране при действии белого света в присутствии ретиналя и его конъюгатов (Логинова и др., 2008)

Облучение белым светом (400-700 нм)



Облучение оранжевым светом (500-700 нм)



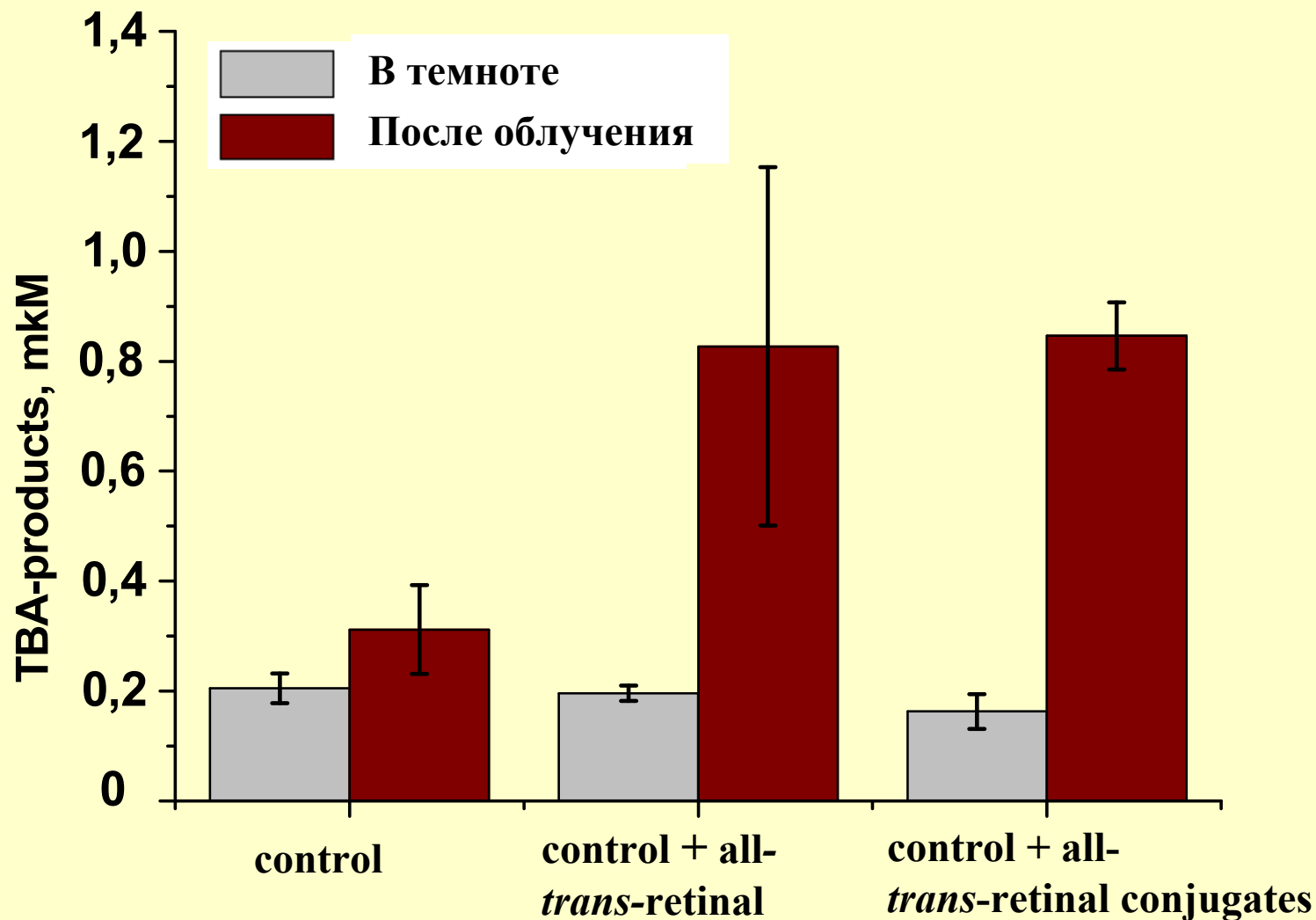
В присутствии свободного полностью-транс ретиналя

В присутствии связанного полностью-транс ретиналя

Контроль – родопсин в мембране до и после инкубации при 37°C.

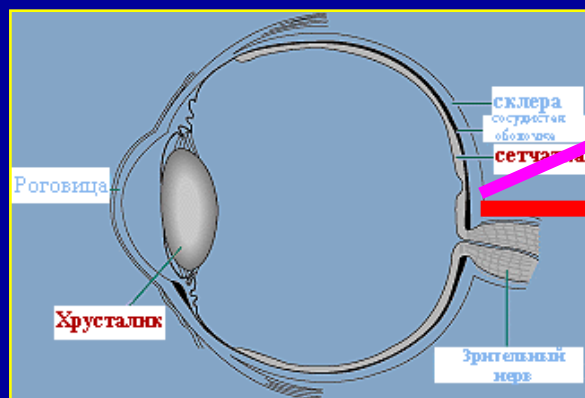
120 минут облучения при комнатной температуре

Фотоокисление липидов фоторецепторной мембраны при действии белого света в присутствии ретиналя и его конъюгатов (Логинова и др., 2008)



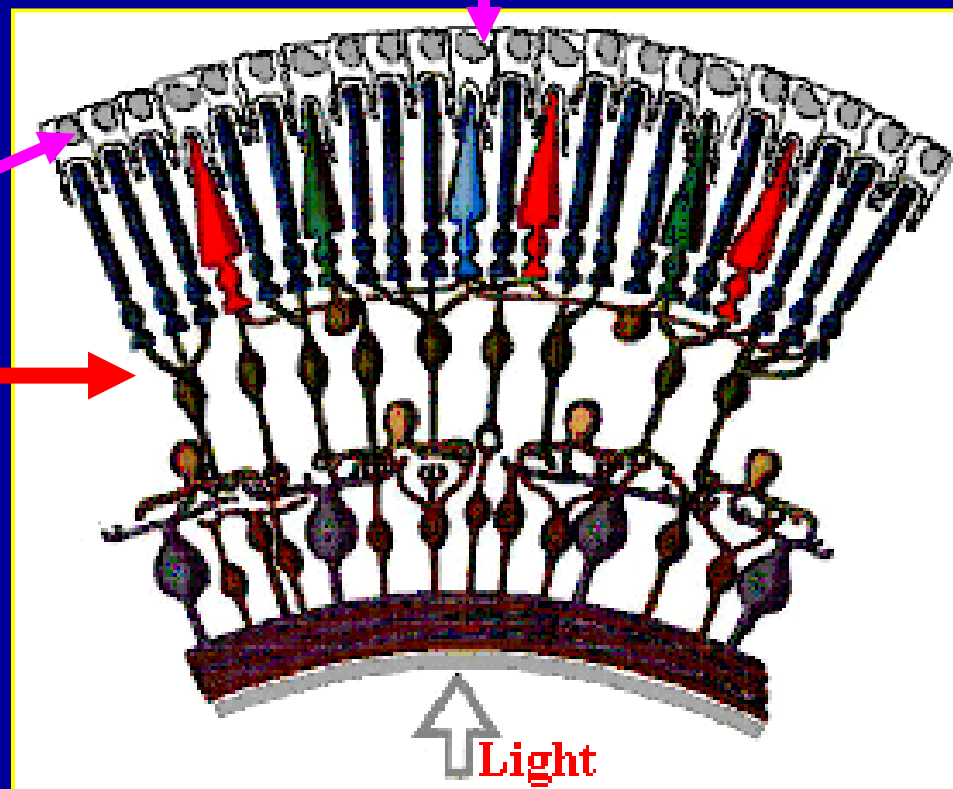
Контроль – фоторецепторная мембрана без ретиналя или его конъюгатов

Ретинальный пигментный эпителий



сетчатка

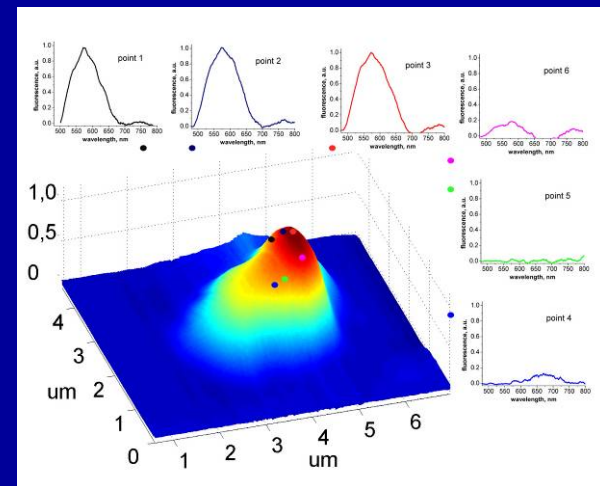
Ретинальный пигментный эпителий



Липофусциновые гранулы или «пигмент старости» – это недопереваренные обломки наружных сегментов палочек и колбочек, накапливающиеся в клетках ретинального пигментного эпителия



Флуоресценция одиночной липофусциновой гранулы
(Петрухин и др., 2005)

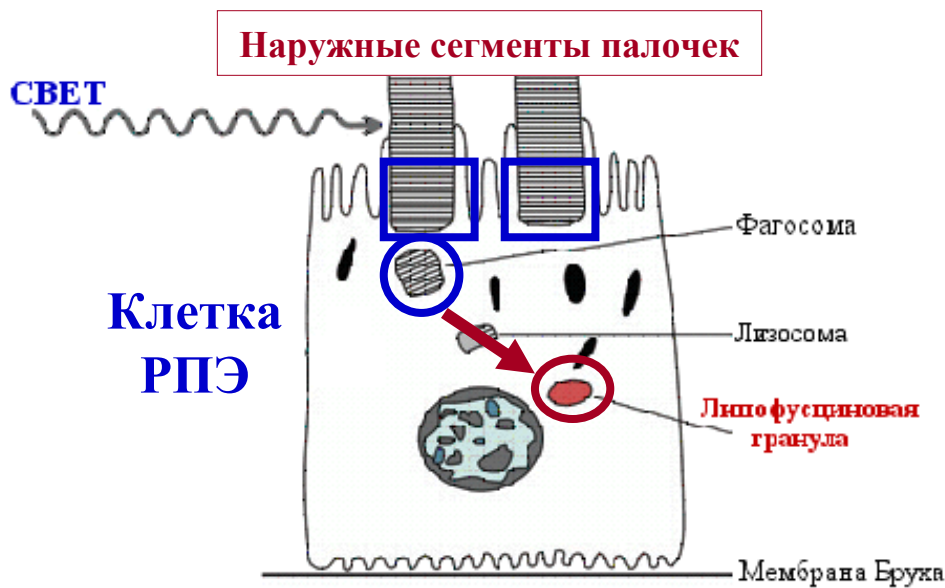


**Липофусциновые гранулы –
источник аутофлуоресценции глазного дна человека
(новый неинвазивный метод диагностики заболеваний сетчатки глаза)**

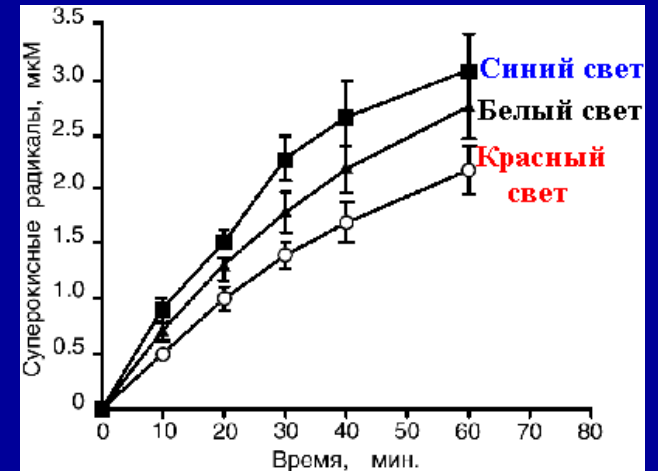


Аутофлуоресценция глазного дна

Липофусциновые гранулы или «пигмент старости» – это недопереваренные обломки наружных сегментов палочек и колбочек, накапливающиеся в клетках ретинального пигментного эпителия

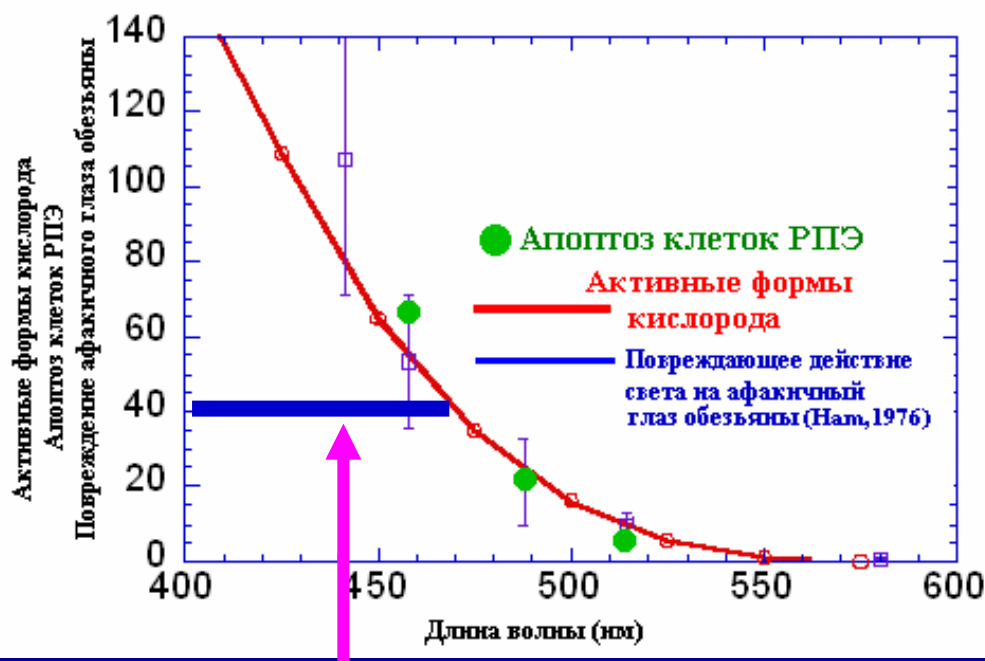


Генерация суперокисных радикалов кислорода
Boulton, Dontsov, Ostrovsky., 1993



Спектр действия фотоповреждения сетчатки и её естественная оптическая защита желтеющим с возрастом хрусталиком

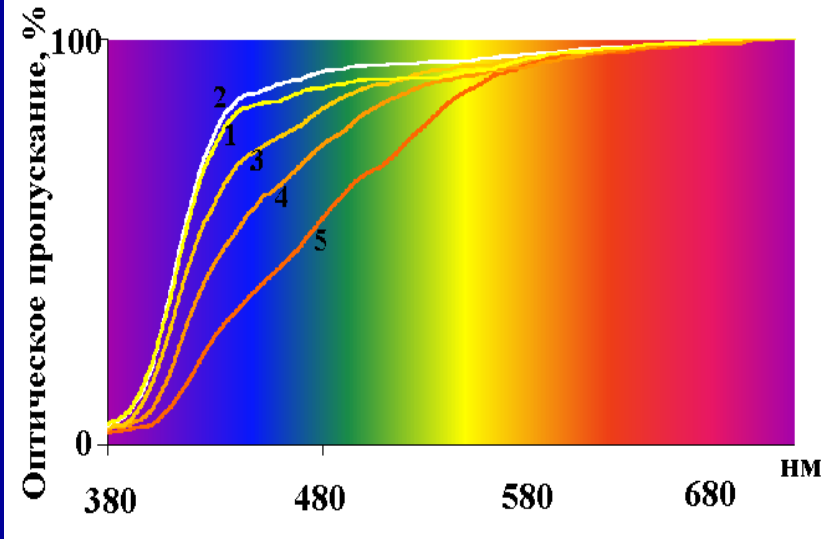
Спектральная зависимость светового повреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия



Потенциально опасная фиолетово-синяя область видимого спектра

Хрусталики глаза как светофильтр

Возрастное пожелтение хрусталика (Федорович, Зак, Островский, 1994)



Спектры (слева направо):

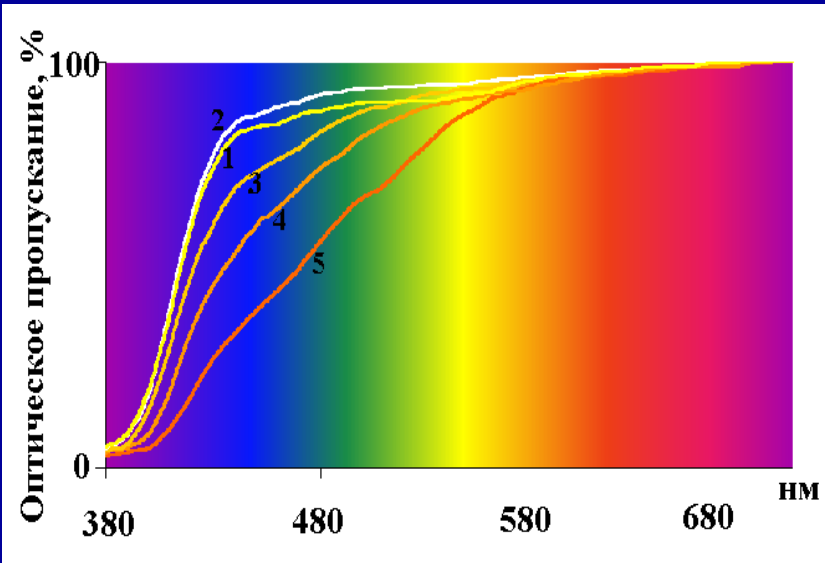
- 1 – новорожденные,
- 2 – от 8 до 29 лет,
- 3 – от 31 до 49 лет,
- 4 – от 52 до 65 лет,
- 5 – старше 70 лет

Система защиты от опасности фотоповреждения:

- **постоянное обновление
наружных сегментов зрительных клеток**
- **набор антиоксидантов**
- **светофильтрующая система:
оптические среды глаза как светофильтры
(Хрусталик!)**

Естественный и искусственный хрусталики глаза как светофильтры

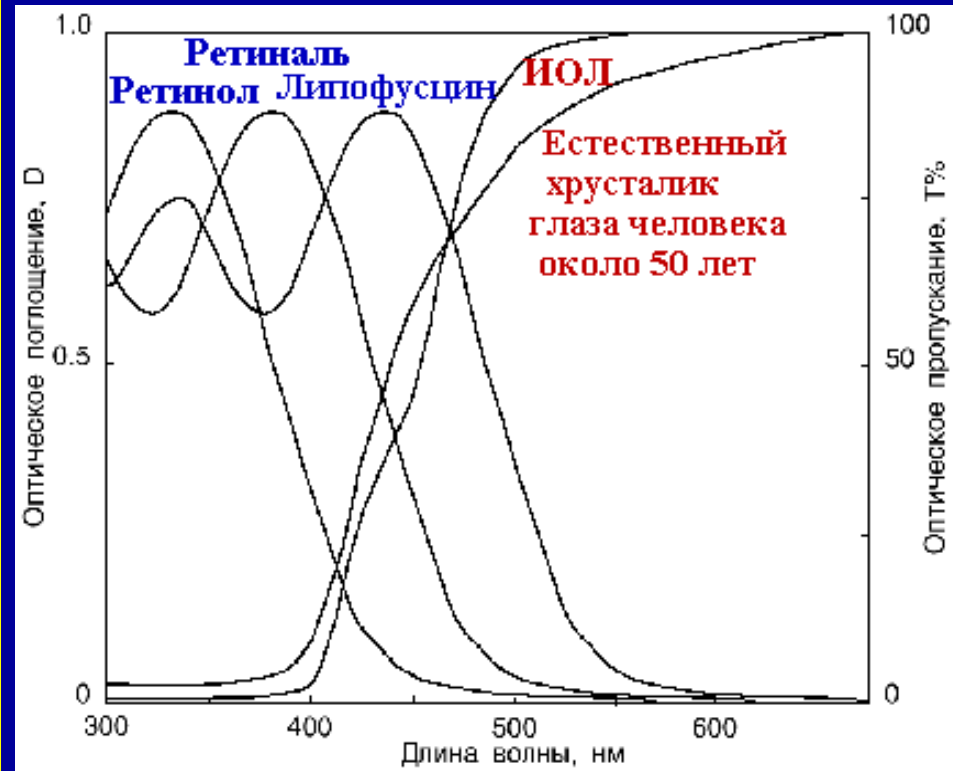
Возрастное пожелтение хрусталика (Федорович, Зак, Островский, 1994)

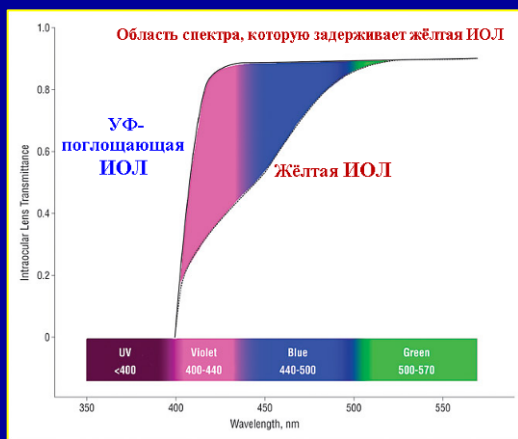


Спектры (слева направо):

- 1 – новорожденные,
- 2 – от 8 до 29 лет,
- 3 – от 31 до 49 лет,
- 4 – от 52 до 65 лет,
- 5 – старше 70 лет

Спектры поглощения фотосенсибилизаторов и спектры пропускания хрусталика глаза и интраокулярной линзы «Спектр»



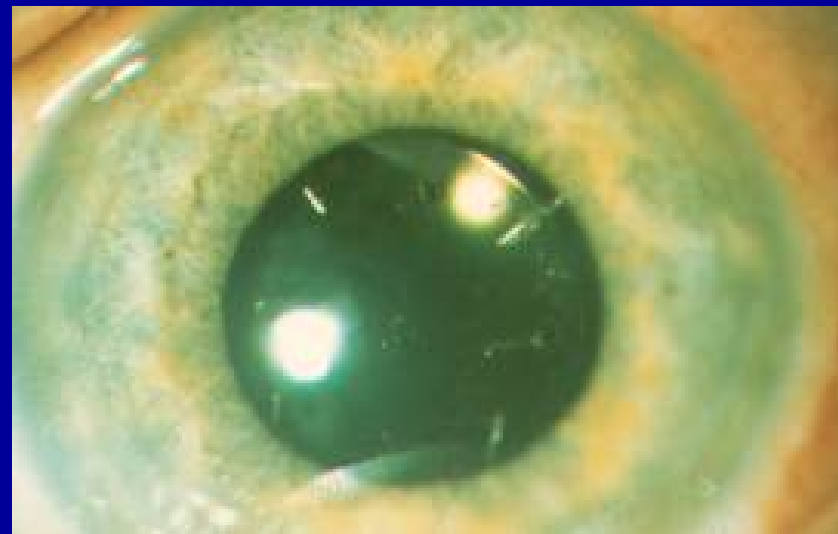


Начиная с 1986 года, имплантировано более 1 млн 300 тысяч искусственных хрусталиков «Спектр».
Опасность фотоповреждение сетчатки снизилась на порядок (Тахчиди и др., 2007)

Фотографии хрусталика глаза человека и искусственного хрусталика «Спектр»



Глаз человека, в который имплантирован искусственный хрусталик «Спектр»



Фотографии любезно предоставлены проф. Л. Ф. Линником, МНТК «Микрохирургия глаза»

Свет –
усугубляющий фактор,
ускоряющий развитие
дегенеративных заболеваний
сетчатки

Задача: **исключить или уменьшить**
усугубляющее действие света,
особенно в афакичном глазу

**Молекулярная физиология
зрения – одна из наиболее
разработанных глав современной
молекулярной физиологии**

Eye is an “organ of extreme perfection”
/Charles Darwin, The Origin of Species by Means
of Natural Selection, 1859/

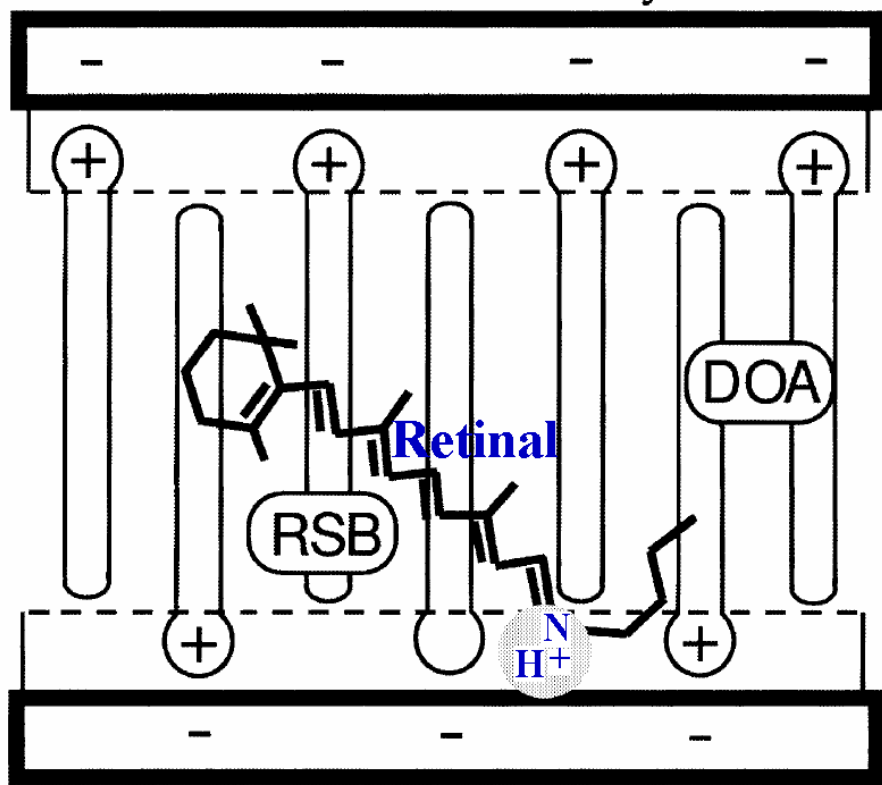
Спасибо за внимание

Фотообратимость ретиналя в искусственной матрице

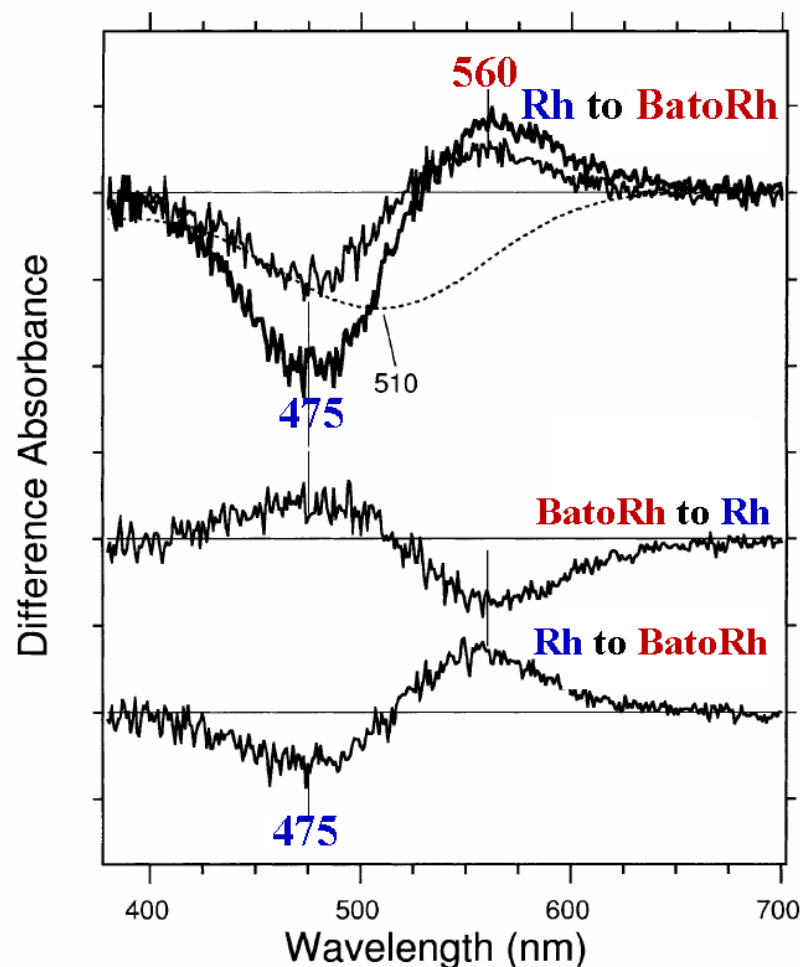
**Фотоизомеризация ретиналя в искусственной матрице
(полностью-*транс* ретиналя между двумя слоями глины (montmorillonite),
модифицированной детергентом (dimethyloctadecylamin)
(Kandori et al., 2002)**

**Схема расположения протонированного
Шиффова основания полностью-*транс*
ретиналя между двумя слоями глины**

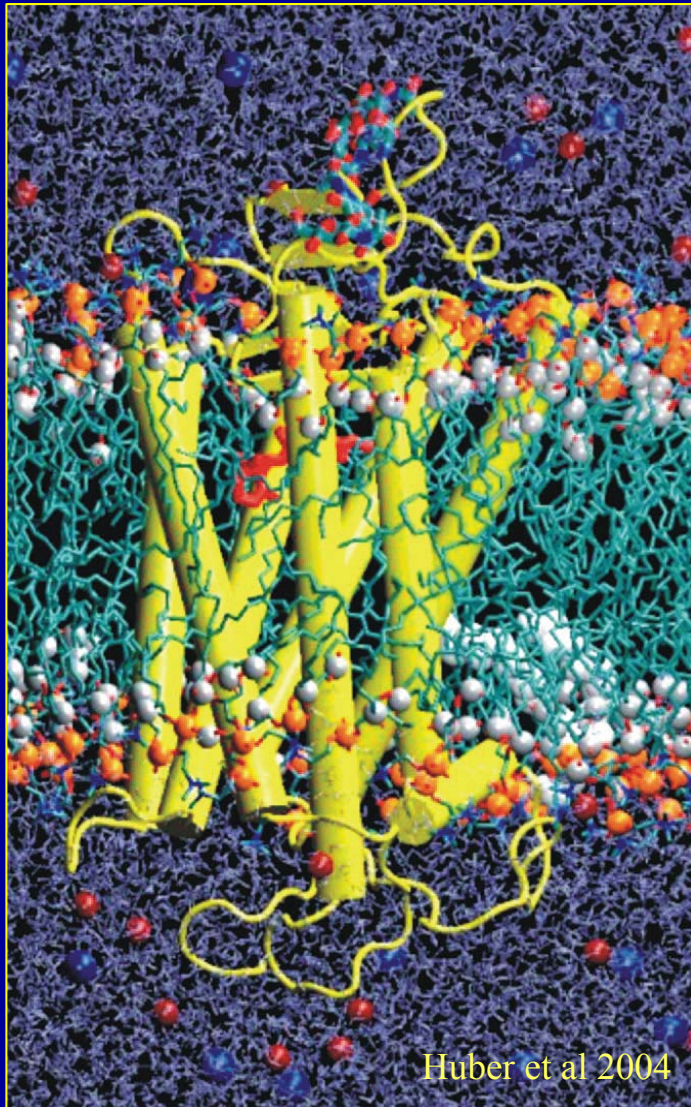
montmorillonite layers



**Фотообратимость при 77К, подобная переходу
родопсина в батородопсин и обратно**

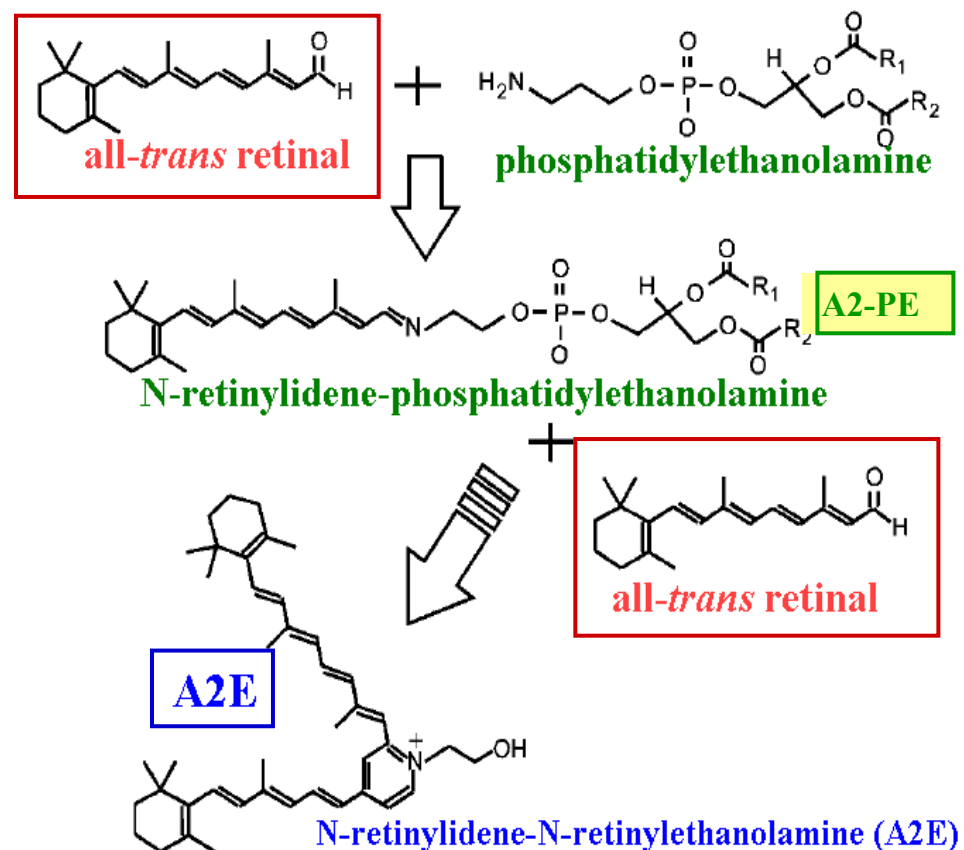


Полностью-*транс* ретиналь способен взаимодействовать в фоторецепторной мембране с аминокетонами липидов и белков



Huber et al 2004

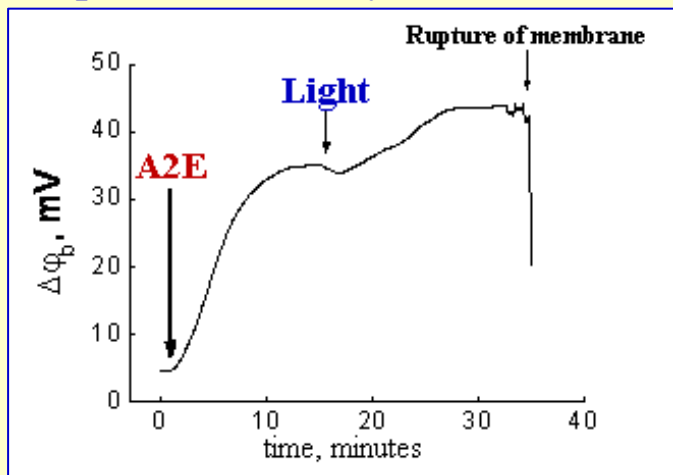
Взаимодействие полностью-*транс* ретиналя с фосфатидилэтаноломином и образование A2E



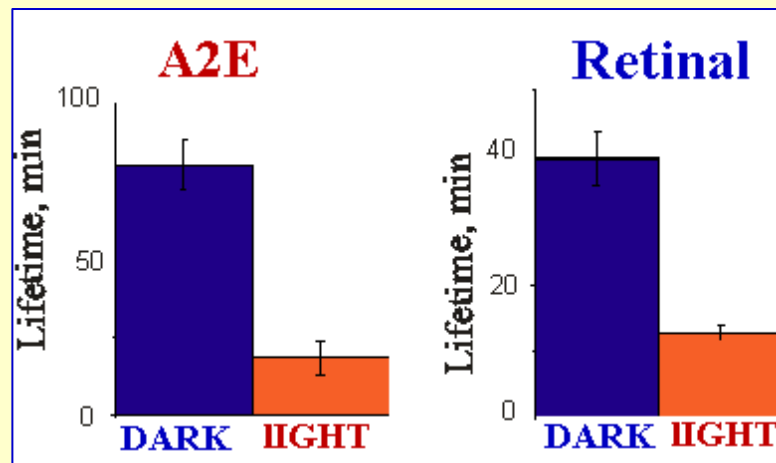
Повреждение искусственной бислойной мембраны

Фотоповреждение искусственной бислоиной мембраны из ненасыщенных липидов в присутствии полностью-*транс* ретиналем и А2Е (Sokolov et al., 2007, 2008)

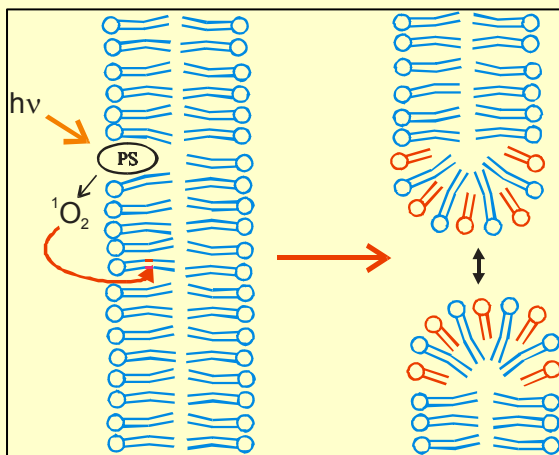
Результат связывания А2Е с мембраной и последующего освещения



Среднее время жизни мембраны



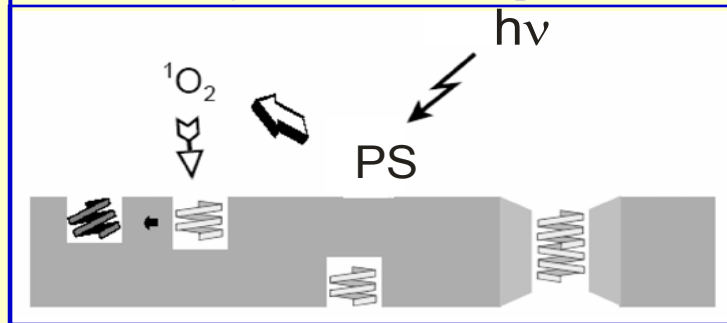
Дестабилизация мембраны фотоокисленными липидами



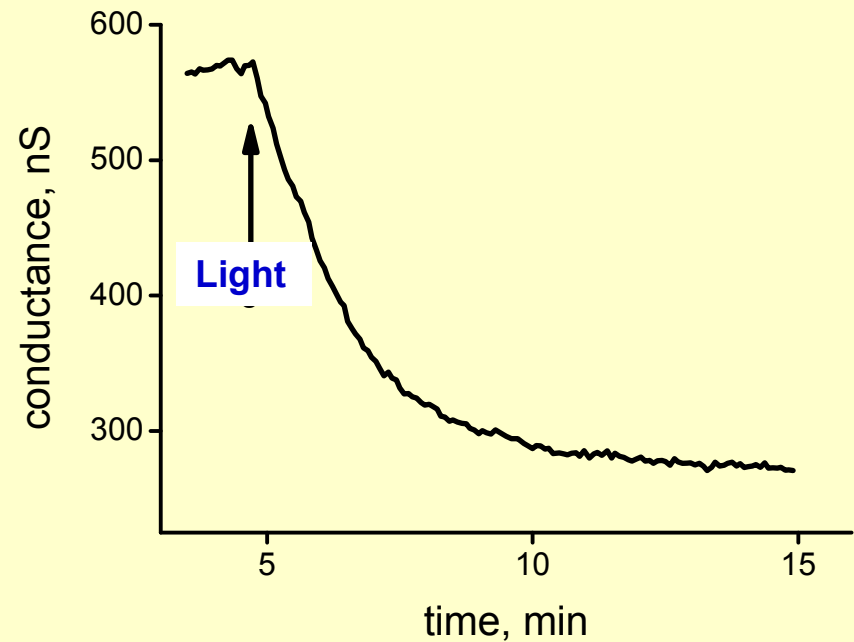
Фотоинактивация грамицидиновых каналов

в присутствии полностью-транс ретиналя и А2Е (Sokolov et al., 2007, 2008)

Схема: грамицидиновый канал в искусственной мембране



Уменьшение проводимости искусственной мембраны с инкорпорированным грамицидиновым каналом в присутствии ретиналя и при действии белого света (200 W/m²)



Скорости фотоинактивации грамицидиновых каналов в присутствии А2Е и ретиналя.

Влияние ингибиторов синглетного кислорода (NaN₃) и суперокисных радикалов (SOD)

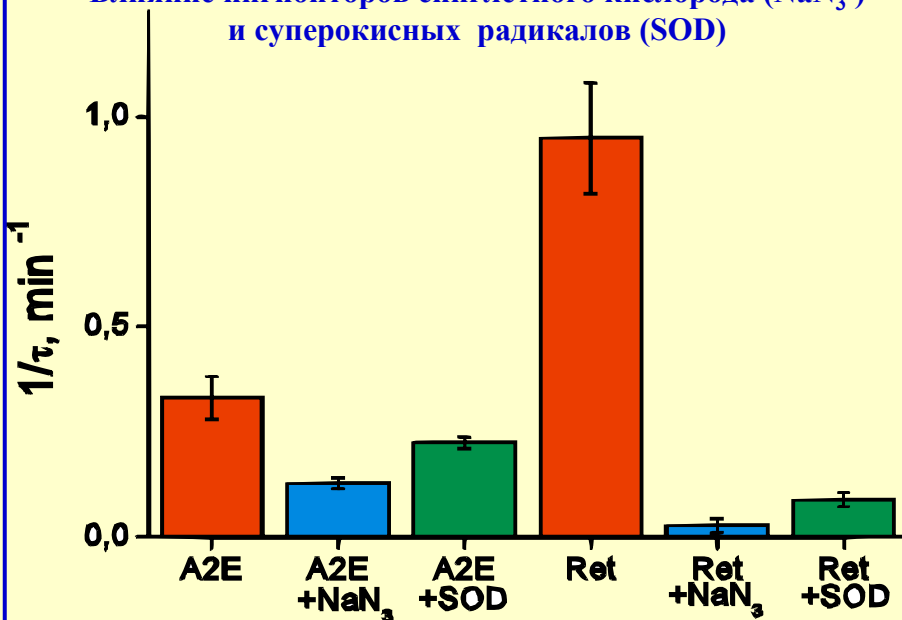
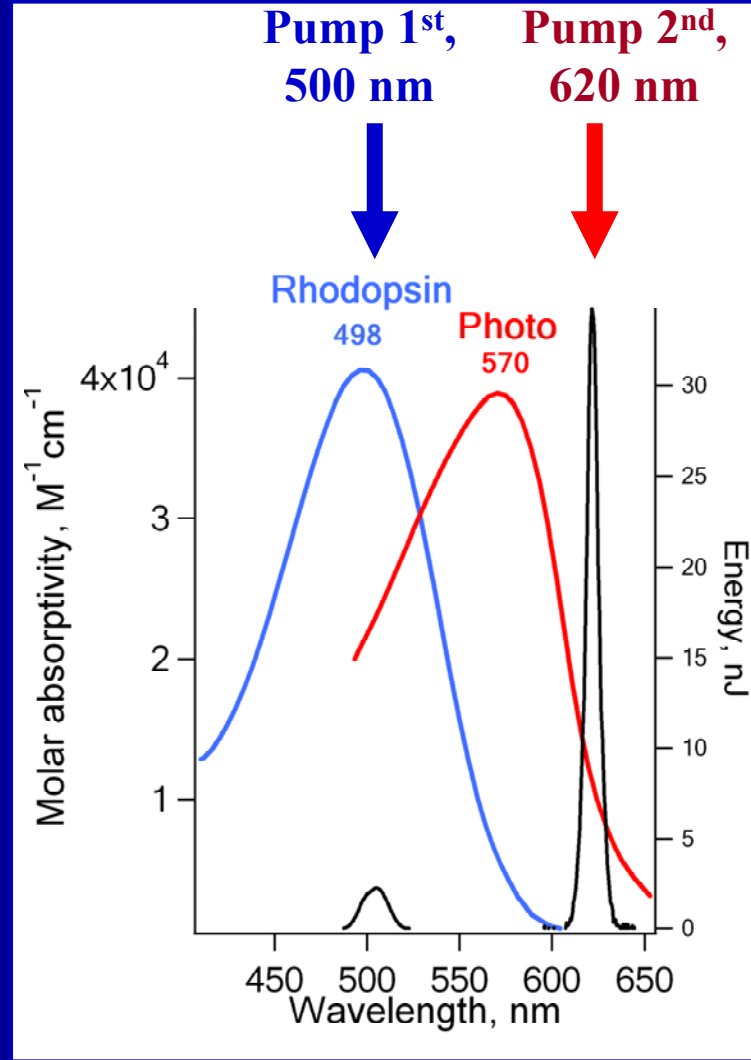
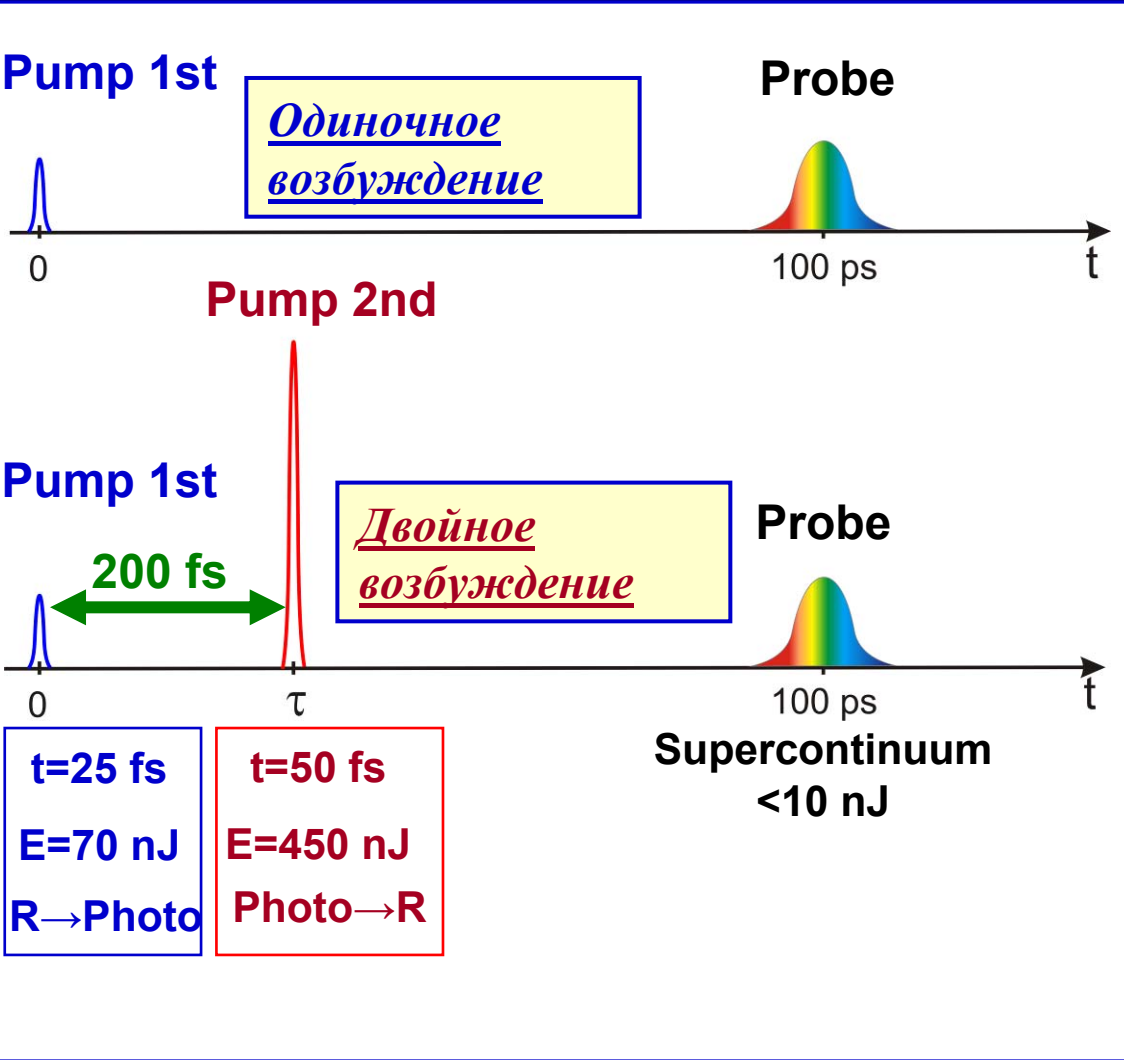
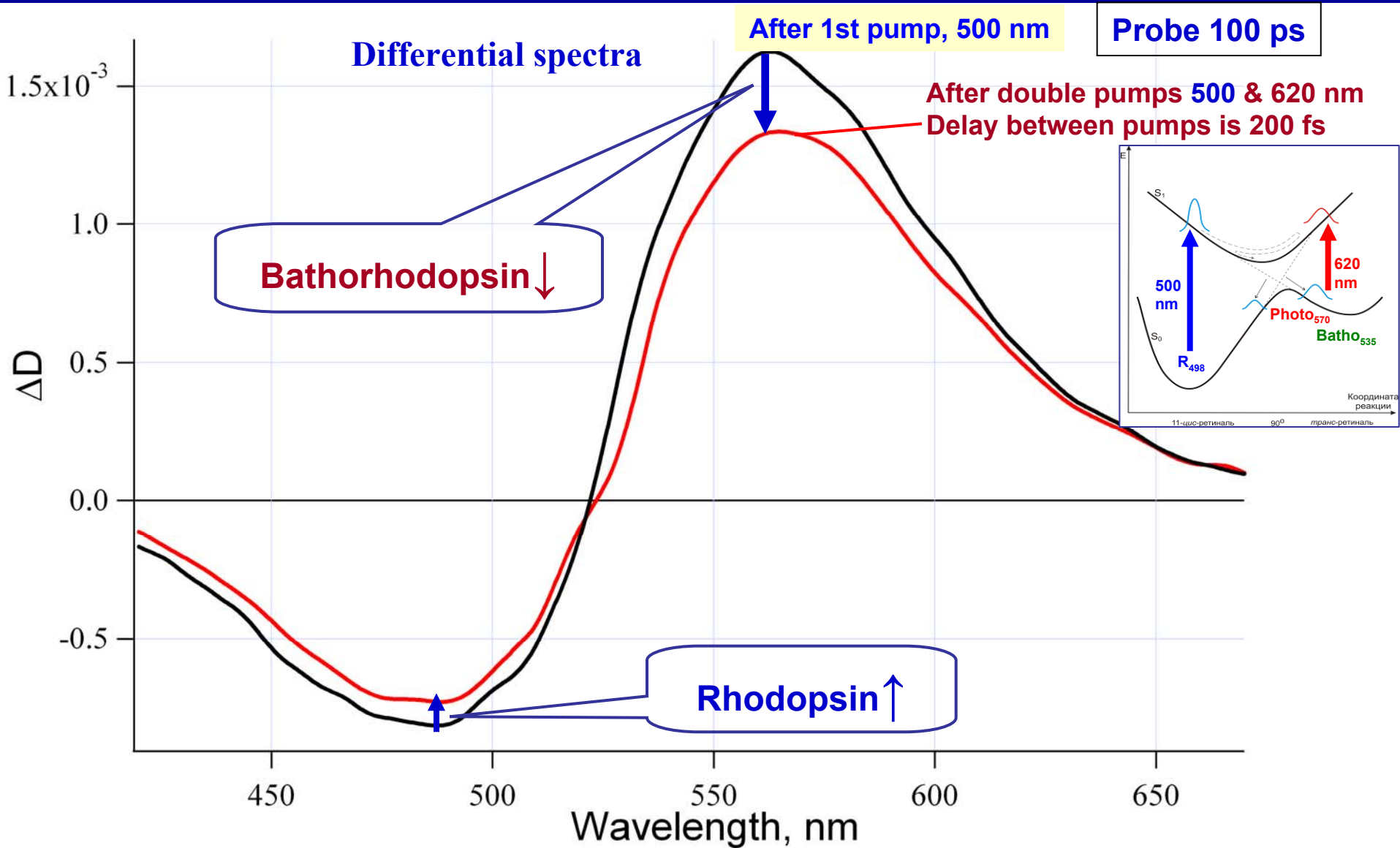


Схема эксперимента с одной и двумя последовательными вспышками
(Время между 1-ой и 2-ой вспышками - 200 фс.
2-ая вспышка возбуждает фотородопсин)

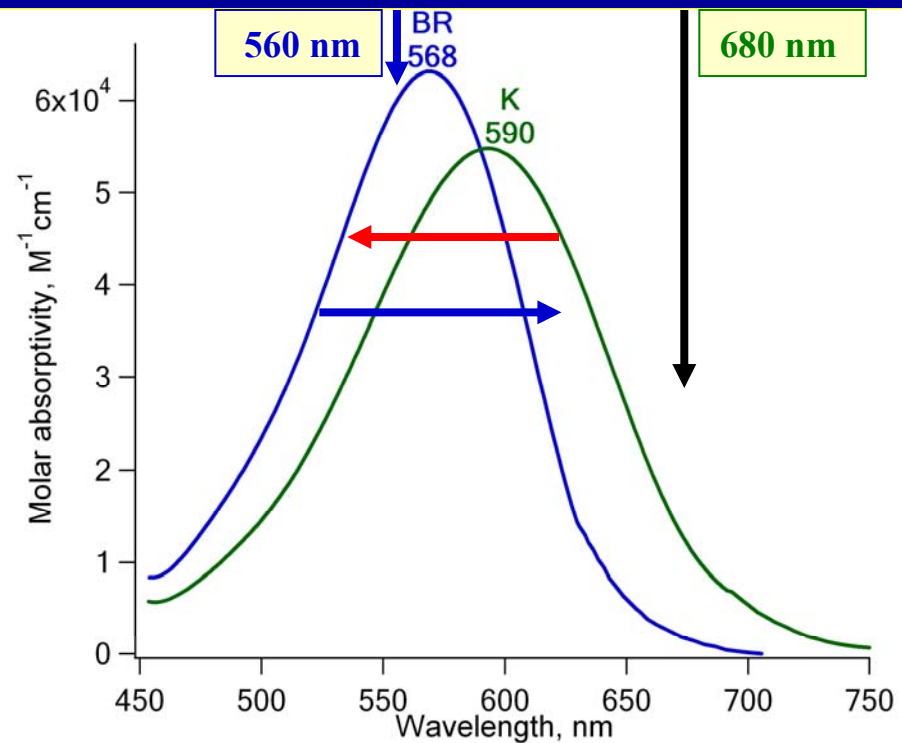
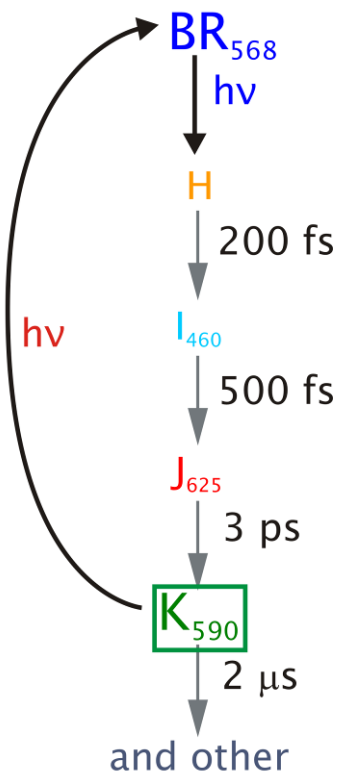
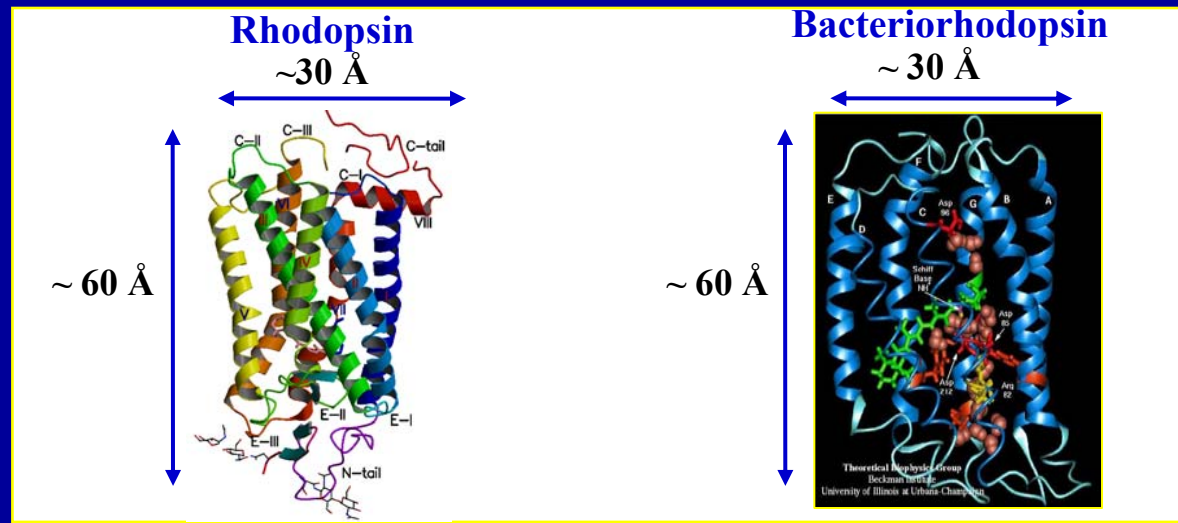


Родопсин:

изменение дифференциального спектра после двойной вспышки

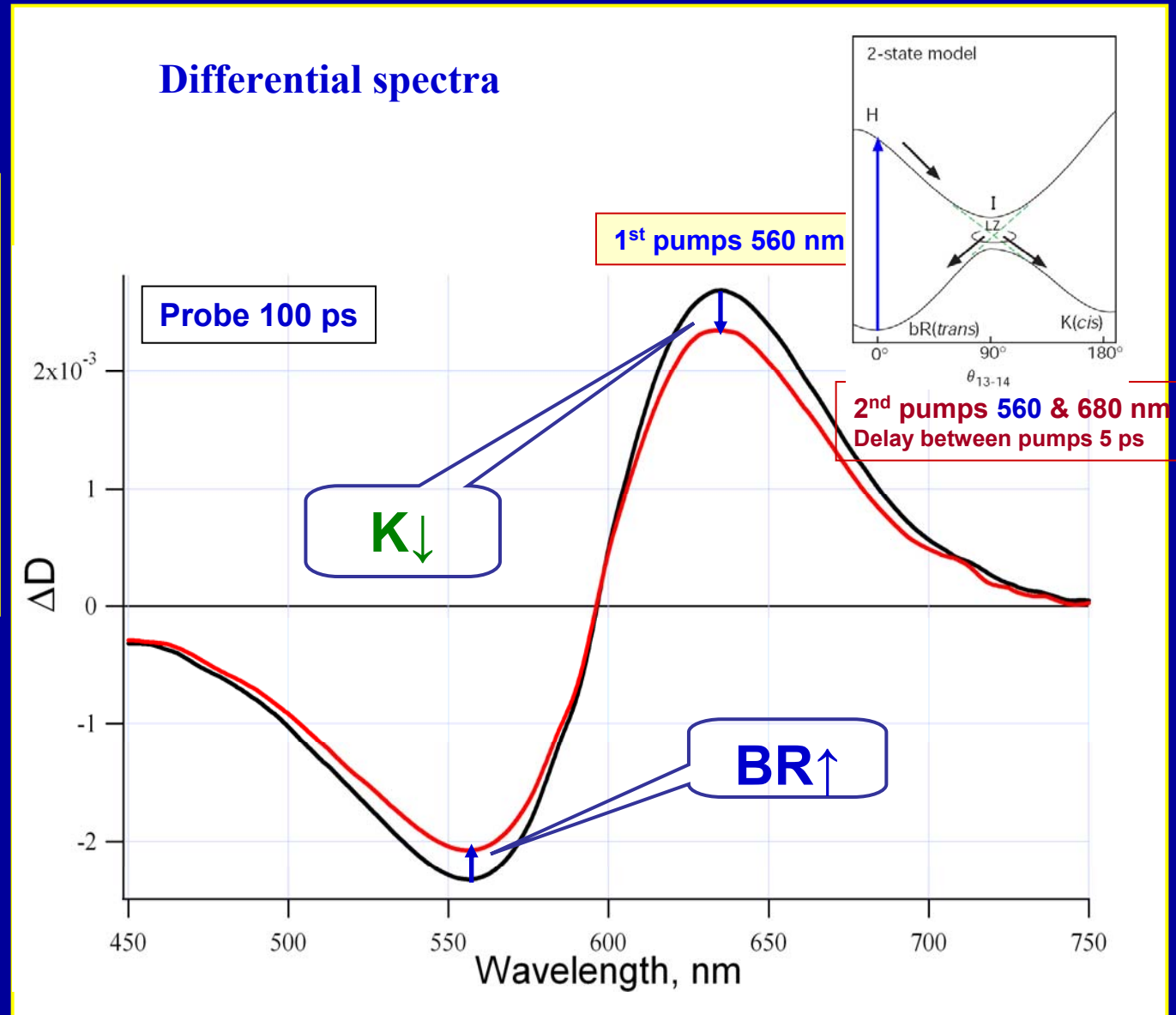
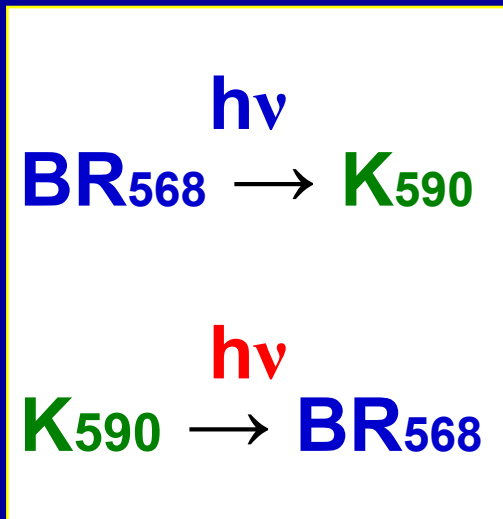


Фотообратимая реакция бактериородопсина при комнатной температуре



Бактериородопсин:

изменение дифференциального спектра после двойной вспышки



**Сверхбыстрые фотообратимые
реакции ретиналь-содержащих
белков могут рассматриваться
в качестве прототипов для
нанотехнологии будущего**