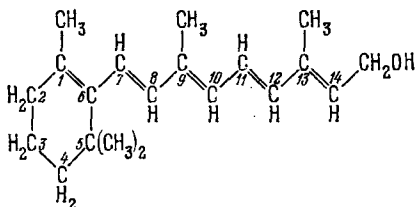


## § 14.6. Молекулярный механизм фоторецепции

Человек и высшие животные воспринимают свет обычной интенсивности в области примерно от 400 до 760 нм. Ультрафиолетовый свет поглощается прозрачными тканями глаза. Инфракрасные лучи не воспринимаются сетчаткой. Если бы они воспринимались, то у теплокровных животных возникал бы сильный фон инфракрасной радиации, препятствующей рецепции информативных сигналов. Следовательно, пигмент или пигменты фоторецепторных клеток должны поглощать свет в видимой области спектра, т. е. быть окрашенными. Поскольку речь идет о молекулах органических соединений, отсюда следует, что это должны быть молекулы с достаточно протяженной системой  $\pi$ -связей — при малом числе сопряженных связей поглощается лишь ультрафиолетовое излучение (с. 140).

Действительно, в 1933 г. Уолд открыл присутствие *витамина А* в сетчатке, в «*зрительном пурпуре*». Структура *витамина А* была установлена несколько раньше. *Витамин А* (точнее, *витамин А<sub>1</sub>*), или *ретинол<sub>1</sub>*, имеет структуру

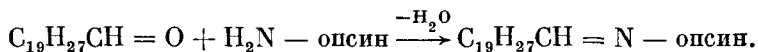


Брутто-формула ретинола<sub>1</sub> C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>CH<sub>2</sub>OH. Эта молекула представляет собой почти не измененную половину молекулы каротина (см. с. 49). Каротиноиды являются источником *витамина А*, отсутствие которого приводит к слепоте. В сетчатке позвоночных фигурирует и *витамин А<sub>2</sub>*, или *ретинол<sub>2</sub>*, структура которого отличается от приведенной наличием двойной связи между углеводами 2 и 3. Брутто-формула ретинола<sub>2</sub> C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>CH<sub>2</sub>OH. Ретинолы — спирты. В фоторецепторах ретинолы трансформированы посредством алкогольдегидрогеназы в альдегиды — в *ретиналь<sub>1</sub>* и *ретиналь<sub>2</sub>* и связаны с фосфолипидами и белками. В ретиналях конечная группа молекулы не =СН—СН<sub>2</sub>ОН, а =СН—СН=О, и брутто-формулы ретиналя<sub>1</sub> и ретиналя<sub>2</sub> C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>СНО и C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>СНО. Число сопряженных  $\pi$ -связей в ретиналях на одну больше, чем в ретинолах.

Ретинали служат хромофорными группами зрительных пигментов, содержащих липопротеины, именуемые *опсинами*. Опсины колбочек и палочек различаются. Соответственно возникают 4 основных вида зрительного пигмента, охарактеризованные в табл. 14.3.

Вслед за поглощением света в фоторецепторе должна возникнуть некая фотохимическая реакция. В *родопсине* ретиналь об-

разует *шиффово основание* в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с аминогруппой опсина, а именно с  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ -группой лизила:



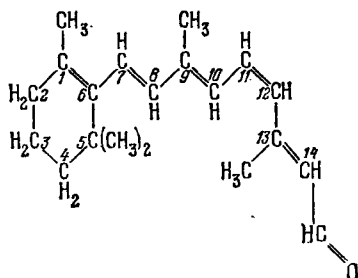
Бычий родопсин имеет м. м. 40 000. Если считать молекулу сферической, то ее диаметр составляет 4 нм. Размеры хромофора всего лишь вдвое меньше.

Под действием света ретиналь отщепляется от родопсина, аналогичные процессы протекают и в трех других случаях (см. табл. 14.3). Одновременно происходит фотоизомеризация ретиналя.

Т а б л и ц а 14.3. Зрительные пигменты

Процесс		Максимум поглощения, нм
$\text{Ретинол}_1 \xrightleftharpoons[\text{ДФН.Н}]{\text{ДФН}^+} \text{Ретиналь}_1$ (Алкогольдегидрогеназа)	$+ \text{Опсин палочек} \xrightleftharpoons{\text{свет}} \text{Родопсин}$	500
$\text{Ретинол}_2 \xrightleftharpoons[\text{ДФН.Н}]{\text{ДФН}^+} \text{Ретиналь}_2$ (Алкогольдегидрогеназа)	$+ \text{Опсин колбочек} \xrightleftharpoons{\text{свет}} \text{Йодопсин}$	562
	$+ \text{Опсин палочек} \xrightleftharpoons{\text{свет}} \text{Порфиросин}$	522
	$+ \text{Опсин колбочек} \xrightleftharpoons{\text{свет}} \text{Цианопсин}$	620

Комплекс опсина с ретиналем возникает за счет  $\text{CH}=\text{N}$ -связи и ряда слабых взаимодействий хромофора с белком. Эти взаимодействия оптимизируются в результате структурного соответствия ретиналя и опсина. Ретиналь может существовать в виде ряда изомеров, так как двойная связь  $\text{C}=\text{C}$  образует *транс*- или *цис*-конформацию. Наиболее устойчива сплошная *транс*-конфигурация, которая и показана для ретинола на с. 470. Установлено, что в комплексе с опсином в темноте ретиналь фигурирует в *ф*рме 11-*цис*:



В этой форме  $\text{CN}_3$ -группа у  $\text{C}_{13}$  и водород у  $\text{C}_{10}$  очень сближены и между ними возникает сильное отталкивание. Благодаря этому молекула несколько скручена, в ней нарушено плоское расположение  $\pi$ -связей. Тем самым уменьшена энергия сопряжения и 11-*цис*-форма должна быть менее стабильной, чем полная *транс*. Однако в комплексе с опсином проигрыш в энергии сопряжения перекрывается выигрышем в энергии взаимодействия с белком, наибольшей для 11-*цис*-формы.

При выцветании пигмента на свету ретиналь отщепляется от опсина и изомеризуется в наиболее устойчивую сплошную *транс*-форму. Цикл *цис-транс*-изомеризации является обязательной частью любой известной фоторецепторной системы.

В фоторецепции мы встречаемся не с конформационной перестройкой ретиналя, а с *цис-транс*-изомеризацией — повороты происходят вокруг двойных связей, а не единичных. Различие между ротамеризацией и *цис-транс*-изомеризацией количественное. В первом случае для конформационного превращения нужно преодолеть барьер порядка десятка кДж/моль (в этане 12,6 кДж/моль), во втором — при переходе 11-*цис*-ретиналя в полностью *транс*-форму — около 105 кДж/моль. Изомеры ретиналя устойчивы в растворе. Разности их энергий невелики — порядка 4—12 кДж/моль.

При возбуждении молекулы поглощаемым светом происходит перестройка  $\pi$ -электронной оболочки и барьер внутреннего вращения снижается до величины, соизмеримой с  $kT$ . Время жизни молекулы в синглетном возбужденном состоянии  $10^{-9}$  с; время, нужное для поворота,  $10^{-11}$ — $10^{-12}$  с. Квантовый выход для реакции изомеризации 11-*цис* → полный *транс* составляет 0,5—0,7. Энергия кванта света более чем достаточна для изомеризации — кванту с  $\lambda = 500$  нм отвечает энергия 210 кДж/моль.

Действуя светом разных длин волн на раствор родопсина в эквимольной смеси глицерина с водой при температуре  $-190^\circ\text{C}$ , можно обратимо смещать равновесие изомеров, что находит свое выражение в сдвигах полосы поглощения. На основе такого рода исследований Уолд построил схему последовательных превращений родопсина, показанную на рис. 14.22. Под действием света ретиналь, находящийся в комплексе с опсином, изомеризуется, образуется прелюмиродопсин. При этом нарушается структурное соответствие ретиналя и опсина и последний вместе со связанным ретиналем испытывает конформационное превращение. Структура опсина постепенно раскрывается, возникают стадии, обозначаемые как люмиродопсин и метародопсин. На заключительной стадии шиффово основание гидролизуется и ретиналь отщепляется от опсина. При раскрытии опсина экспонируются новые химические группы, в частности, две SH-группы и группа, связывающая протон с рК порядка 6,6 (вероятно, имидазольная).

Таким образом, фоторецепция сводится к изомеризации хромофора, за которой следует изменение структуры липопротеи-

да — опсина. Конформационное превращение опсина приводит в конечном счете к возникновению нервного импульса.

Было показано, что выцветание и регенерация родопсина *in vitro* зависят от частоты коротких вспышек лазерного освещения. Поглощается лишь свет, поляризация которого отвечает определенной ориентации молекул родопсина. Тем самым существенно

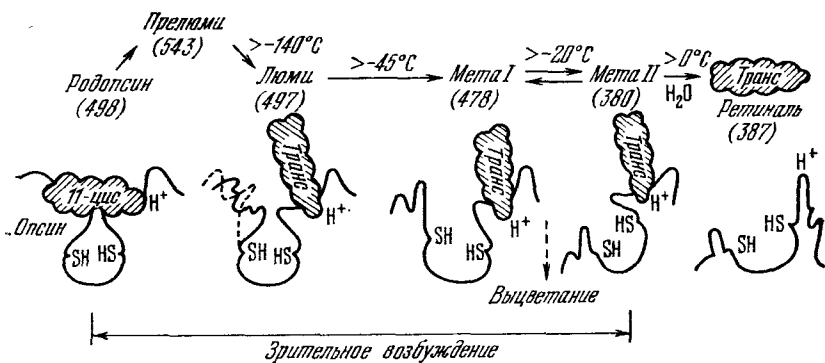


Рис. 14.22. Стадии выцветания родопсина. Ретиналь заштрихован. В скобках — значения  $\lambda_{\text{max}}$  в нм

соотношение между частотой вспышек и временем вращения молекул родопсина в растворе.

Различные формы зрительных пигментов характеризуются различными спектрами поглощения. Эти различия не сводятся к указанным в табл. 14.3. Полоса поглощения хромофора существенно зависит от его взаимодействия с опсином и, следовательно, от состояния липопротеида и его видовых особенностей. Так, сетчатка лягушки содержит два типа палочек («красные» и «зеленые») и два типа колбочек. Красные палочки содержат «классический» родопсин, зеленые — родопсин с полосой поглощения, сдвинутой в коротковолновую сторону. Спектральная чувствительность зрительных пигментов, как правило, коррелирует со спектральным составом света в среде, в которой существует данный организм. При переходе от голубоватой морской воды к желтоватой пресной воде родопсин в палочках рыб постепенно замещается порфиросином. Морские рыбы имеют максимум чувствительности вблизи 505, пресноводные — вблизи 540 нм.

Факты и гипотезы, кратко здесь изложенные, ставят ряд задач, еще далеких от решения. Структура опсина, и тем самым родопсина, изучена недостаточно. Пока невозможно построение детализированной модели родопсина и его превращений на свету. Значительный интерес представляла бы квантовая химия этих явлений.

Основная проблема, относящаяся к зрительной рецепции, состоит в установлении механизма, посредством которого первичный акт поглощения света и определяемое им изменение родо-

псина приводят к появлению нервного импульса. Процессы эти сейчас изучены для палочек, но не для колбочек.

Необходимо объяснить, каким образом поглощение одного фотона — глаз ведь это чувствует — вызывает импульс. Очевидно, что в такой трансдукции должен функционировать медиатор — вещество, создающее громадное усиление. С 1970 по

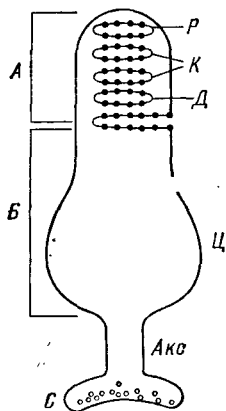


Рис. 14.23. Схема палочки: А — внешний сегмент, Б — внутренний сегмент, Р — молекулы родопсина, К — светочувствительные каналы, Д — диск, Ц — тело клетки, Акс — аксон, С — синапс

1985 г. считалось, что роль медиатора играют ионы кальция. В последнее время, главным образом благодаря работам Фесенко и сотрудников, выяснен — не до конца — иной механизм. Он состоит в следующем.

В плазматической мембране внешнего сегмента палочки (рис. 14.23) имеются каналы, по которым ионы  $\text{Na}^+$  переносятся внутрь. Каналы эти открыты в темноте. При стимуляции палочки освещением каналы закрываются и происходит выключение темнового тока, гиперполяризации палочки, мембранный потенциал которой сдвигается от  $-30$  до  $-70$  мВ. Проводимость открытого канала составляет около 200 пикосименс. Каналы подерживаются в открытом состоянии посредством циклического гуанинмонофосфата цГМФ.

Внешний сегмент палочек содержит  $10^3$  дисков, в каждом из них находится около  $10^6$  молекул родопсина. Поглощение одного фотона изменяет поток ионов

на 1—2%, т. е. один фотон управляет  $10^6$ — $10^7$  ионами.

Родопсин, испытывающий превращение под действием света, уменьшает концентрацию цГМФ в каналах. Обесцвеченный родопсин активирует целый каскад ферментативных процессов, в котором важную роль играет белок трансдуцин. Этот белок распадается на субъединицы при взаимодействии с активированным родопсином — каждая молекула родопсина включает  $10^2$  молекул трансдуцина, которые, в свою очередь, активируют  $10^3$  молекул фосфодиэстеразы, что приводит к гидролизу цГМФ. Усиление, таким образом, достигает  $10^5$  раз. Процесс является скоростным, он проходит за 1 мс. Для срабатывания каскада, по-видимому, существенны жидкостные свойства мембран палочек позвоночных. На рис. 14.24 показана схема молекулы родопсина в мембране диска.

Методами рентгенографии и электронной микроскопии установлено, что в мембране диска при освещении происходят структурные изменения, масштаб которых пропорционален времени экспозиции. Суть этих изменений состоит в транслокации родопсина. В результате освещения родопсин переходит с междиско-

вой гидрофильной поверхности на внутреннюю гидрофобную фазу мембраны. Такого рода транслокации имеют характер фазовых переходов. Фазовые переходы в мембранах фоторецепторных клеток лягушки и кальмара были обнаружены и изучены методом дифференциальной калориметрии.

С помощью электронного парамагнитного резонанса была исследована фоторецепторная мембрана с введенным в нее спиновым зондом. При освещении суспензии мембран наблюдаются

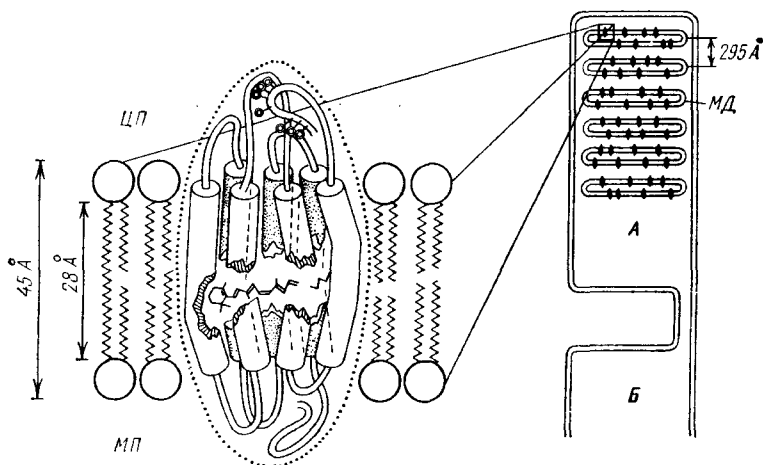


Рис. 14.24. Схема молекулы родопсина внутри мембраны диска: ЦП — цитоплазматическая поверхность, МП — междисковая поверхность, МД — мембрана диска, А — внешний, Б — внутренний сегменты палочки

значительные изменения спектров ЭПР, указывающие на увеличение времени вращательной диффузии зонда в мембране, т. е. Форма кривой зависимости  $\tau$  от длительности освещения свидетельствует о том, что фотолиз пигмента сопряжен с изменением конформационного состояния мембраны, с увеличением вязкости ее гидрофобных областей. Эти результаты можно считать прямым доказательством конформационных превращений мембраны при освещении.

К сходным выводам приводит изучение фоторецепторных мембран методом гамма-резонансной спектроскопии (эффект Мёссбауэра). В качестве метки применялся аскорбат железа, обогащенный изотопом  $^{57}\text{Fe}$ , источником  $\gamma$ -излучения служил  $^{57}\text{Co}$ .

Именно на фоторецепторных мембранах лучше всего изучены жидкостные (жидкокристаллические) свойства мембран (ср. с. 337). Это оказалось возможным потому, что в фоторецепторных мембранах функционирует практически один лишь белок — родопсин, за которым легко следить.

Установлено, что палочки, адаптированные к темноте, обладают дихроизмом. Свет, поляризованный перпендикулярно к

длинной оси палочки, поглощается в несколько раз сильнее, чем свет, поляризованный параллельно этой оси. Следовательно, хромофор родопсина ориентирован параллельно плоскости мембраны диска. Однако на этой плоскости хромофоры ориентированы беспорядочно и дихроизма нет. Можно фотоиндуцировать *дихроизм*, проводя частичное выцветание родопсина с помощью плоско-поляризованного света. В обычных условиях дихроизм не возникает, что объясняется броуновским вращательным движением молекул родопсина в сетчатке. Однако при обработке сетчатки глутаровым альдегидом наблюдается очень сильный фотоиндуцированный дихроизм. Глутаровый альдегид образует сшивки, препятствующие вращению молекул родопсина. Перенос энергии между молекулами родопсина, среднее расстояние между которыми составляет около 7 нм, невозможен. Вращательная подвижность родопсина в сетчатке доказана. О том же свидетельствует изучение переходного фотодихроизма при импульсном фотолизе. При импульсном освещении происходит скачкообразное возрастание поглощения, определяемое превращением родопсина в прелюмиродопсин. Это возрастание значительно больше, если векторы поляризации действующего света и света, поглощение которого измеряется, параллельны, чем в том случае, когда эти векторы перпендикулярны. Вспышка индуцирует дихроизм, который быстро исчезает. Половинное время исчезновения дихроизма при 20°C составляет  $3,0 \pm 1,5$  мкс. С увеличением температуры этот процесс ускоряется. Увеличение вязкости среды замедляет исчезновение фотодихроизма.

Если зависимость от времени действительно определяется вращательной диффузией, то она описывается уравнением

$$\frac{\partial^2 n}{\partial \vartheta^2} = \tau \frac{\partial n}{\partial t}, \quad (14.7)$$

где  $n$  — доля хромофоров, ориентированных в интервале от  $\vartheta$  до  $\vartheta + d\vartheta$ ,  $\vartheta$  — угол, составляемый хромофором с электрическим вектором вспышечного света,  $\tau$  — время релаксации. Для линейного хромофора и вращательной диффузии вокруг оси, перпендикулярной к мембране диска, решение (14.7) имеет вид

$$n = 1 + fe^{-4t/\tau} \cos 2\vartheta. \quad (14.8)$$

Время  $t$  измеряется от начала вспышки,  $f \leq 1$  — эмпирический множитель. Дихроичное отношение равно

$$\frac{\int_0^{n/2} n(\vartheta) \cos^2 \vartheta d\vartheta}{\int_0^{n/2} n(\vartheta) \sin^2 \vartheta d\vartheta} = \frac{2 + fe^{-4t/\tau}}{2 - fe^{-4t/\tau}}. \quad (14.9)$$

В идеальных условиях, когда  $f = 1$ , максимальное начальное отношение равно 3. Это отвечает значению, найденному для сет-

чатки, фиксированной глутаровым альдегидом. В импульсных опытах наблюдалось значение 2, отвечающее  $f = 0,7$ . Значение времени вращательной диффузии  $\tau$  зависит от вязкости среды  $\eta$ , температуры и размеров хромофорной молекулы. Согласно Эйнштейну, для сферы радиуса  $r$ , испытывающей броуновское вращение вокруг некоторой оси,

$$\tau = \frac{8\pi r^3}{\kappa T} \eta. \quad (14.10)$$

При  $20^\circ\text{C}$  время  $\tau$  для родопсина имеет значение около 20 мкс,  $r = 2,2-2,8$  нм, родопсин приближенно сферичен и погружен в мембрану. Отсюда следует, что вязкость мембраны  $\eta$  около  $0,2$  Па·с (интервал от  $0,07$  до  $0,6$  Па·с), т. е. она близка к вязкости легкого масла, такого, как оливковое.

При поворотах молекулы родопсина, возникающих вследствие его конформационных превращений, меняется степень погружения родопсина в жидкую билипидную мембрану, что существенно для изменения ее ионной проницаемости.

Найденная константа диффузии для палочек из сетчатки лягушки равна  $3,5 \pm 1,5 \cdot 10^{-9}$  см<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>. Вязкость мембраны оказалась лежащей в том же интервале значений  $0,1-0,4$  Па·с. Время между столкновениями соседних молекул родопсина в сетчатке  $\tau_c$  находится по формуле

$$s^2 = 4D\tau_c, \quad (14.11)$$

где  $s$  — расстояние между молекулами родопсина. Если эффективный диаметр родопсина  $4,5$  нм, а расстояние между центрами молекул  $7$  нм, то  $s = 2,5$  нм и  $\tau_c = 4$  мкс, что в  $5$  раз меньше времени релаксации вращательной диффузии. Частота соударений составляет  $10^5-10^6$  с<sup>-1</sup>.

Эти результаты, полученные Коном и др., весьма интересны. Они дают основу для построения теории функционирования мембран, исходящей из их жидкостных свойств (ср. с. 337). Мы еще очень мало знаем о событиях, приводящих к возникновению первого импульса в фоторецепторной системе. Можно думать, что эти события тесно связаны с поведением жидкой мембраны.

## § 14.7. Бактериородопсин

Родопсин функционирует не только в сетчатке глаза. В определенной области мембранной поверхности красных галобактерий (*Halobacterium halobium*) содержится белок бактериородопсин (БР). БР имеет м. м. 26 000, он состоит из одной молекулы белка, связанной с молекулой ретиналя через альдиминную связь. Максимум полосы поглощения БР лежит у  $570$  нм. *Галобактерии* — экстремальные галофилы, живущие в соленых озерах. Они обладают положительным фототаксисом на видимый свет и отрицательным — на ультрафиолетовый.