

Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин

М.А.Островский, Т.Б.Фельдман

*Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля Российской академии наук
119334 Москва, ул. Косыгина, 4, факс (499)137–4101*

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12, факс (495)939–4309*

Представлен обзор литературных данных, касающихся структуры, функций и молекулярного моделирования родопсина. Рассмотрены механизмы спектральной настройки зрительных пигментов, фотоизомеризации хромофорной группы родопсина — остатка 11-*цис*-ретинала — и образования физиологически активного состояния родопсина как G-белок-связывающего рецептора. Особое внимание уделено зрительному циклу родопсина и патогенетическим последствиям его нарушения. Показано, что знание структуры и фотохимии родопсина перспективно для использования в нанотехнологиях будущего.

Библиография — 219 ссылок.

Оглавление

I. Введение	1071
II. Структура родопсина	1072
III. Молекулярная физиология родопсина	1076

I. Введение

Свет как источник информации в ходе почти 600 млн лет эволюции животного мира вызвал появление, развитие и совершенствование органов зрения. Кульминацией стали глаз и зрительные системы позвоночных и беспозвоночных. Следует отметить, что еще Чарльз Дарвин¹ в своем классическом труде «Происхождение видов путем естественного отбора» признавался, что он стал в тупик перед объяснением происхождения глаза как органа высочайшего совершенства в ходе естественного отбора.

В последние годы появились работы, в том числе несколько прекрасных обзоров Лэмба и соавт.,^{2–4} посвященные эволюции светочувствительных зрительных белков (зрительных пигментов), фоторецепторных клеток беспозвоночных и позвоночных животных, сетчатки и собственно

глаза как органа зрения. Из совокупности полученных к настоящему времени данных следует, что дарвиновская теория полностью справедлива для понимания эволюции глаза и его фоторецепторного аппарата.

Около 1 млрд лет назад в эукариотических клетках простейших многоклеточных представителей животного мира уже появился родопсин — светочувствительный фотоинформационный белок. Затем эти многоклеточные организмы разделились на две группы: одна имела радиальную, другая — билатеральную симметрию тела. Билатеральные, в свою очередь, около 600 млн лет назад разделились на две принципиально важные группы: одна дала начало большинству существующих сегодня беспозвоночных животных, другая — позвоночным, потомками которых являются высшие позвоночные, включая приматов и человека. В период от 540 до 490 млн лет назад, в эпоху так называемого Кембрийского взрыва, возникло большое количество новых видов животных с небывалым разнообразием органов зрения, включая человеческий глаз. Начиная с этого времени органы зрения разделяют на два основных типа: сложный глаз большинства беспозвоночных (например, членистоногих) и камерный глаз позвоночных животных.

Сложный глаз беспозвоночных состоит из множества маленьких глазков (омматидиев) со своими фоторецепторными клетками (рабдомами). Правда, головоногие моллюски (осьминоги, кальмары) имеют камерный глаз, как и позвоночные, но фоторецепторные клетки у них такие же, как у членистоногих, — рабдомеры. В камерном глазу позвоночных сетчатка содержит фоторецепторные клетки нерабдомерного типа, произошедшие из ресничек. У большинства позвоночных, включая приматов и человека, фоторецептор-

М.А.Островский. Академик, профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией ИБХФ РАН, заведующий кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета МГУ. Телефоны: (499)135–7073, (495)137–4101; e-mail: ostrovsky@sky.chph.ras.ru

Т.Б.Фельдман. Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИБХФ РАН, доцент кафедры молекулярной физиологии Биологического факультета МГУ. Телефон: (499)135–7073; e-mail: feldman@sky.chph.ras.ru

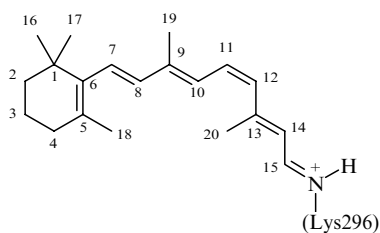
Область научных интересов авторов: молекулярные механизмы зрительной рецепции в норме и при патологии.

Дата поступления 12 марта 2012 г.

ные клетки бывают двух типов — палочки, ответственные за высокочувствительное сумеречное зрение, и эволюционно более древние колбочки, ответственные за дневное и цветное зрение. Однако в разных типах органов зрения и во всех фоторецепторных клетках, начиная со светочувствительных клеток простейших многоклеточных организмов и заканчивая фоторецепторными клетками рабдомерного или реснитчатого (палочки и колбочки) типа у высокоорганизованных беспозвоночных и позвоночных, светочувствительная молекула принципиально одна и та же — это трансмембранный белок родопсин в составе бислоистой фоторецепторной мембраны.

Название «родопсин» происходит от двух греческих слов: «rhodo» — розовый и «opsis» — видеть. До сравнительно недавнего времени (конца 50-х — начала 60-х годов прошлого века) он назывался «зрительным пурпуром», а еще ранее (после его открытия Ференцем Боллем в 1876 г.) — «зрительным веществом» (Sehestoff). Что касается эволюции самого зрительного белка, то очевидно, что родопсин — один из самых древних белков животного мира, ответственных за фоторецепцию (фотонформационный процесс). Его уникальные фотохимические и спектральные свойства обусловлены одним из самых консервативных доменов молекулы — хромофорным центром, в котором остаток 11-*цис*-изомера ретиналя взаимодействует с ближайшим белковым окружением. Основная физиологическая функция центра — запуск процесса фототрансдукции, т.е. преобразование энергии поглощенного кванта света в электрический сигнал зрительной клетки (рабдомерной или реснитчатой), — обеспечивается и другими, также исключительно консервативными доменами молекулы родопсина.

Родопсин (молекулярная масса 40 кД) состоит из апо-белка опсина (348 аминокислотных остатков), в котором атом азота Lys296 ковалентно связан с остатком 11-*цис*-ретиналя. Этот хромофорный фрагмент представляет собой протонированное основание Шиффа (Protonated Schiff Base, PSB).[†]



Молярный коэффициент поглощения родопсина при 500 нм составляет 40 600 л · моль⁻¹ · см⁻¹.

Зрительный пигмент родопсин отвечает за фоторецепцию (фотонформационный процесс) и является типичным представителем светочувствительных ретинальсодержащих белков. К этому же семейству относятся протеородопсин — бактериальная версия родопсина, обнаруженная недавно у протистов динофлагеллят,⁵ сенсорные родопсины, галородопсин и бактериородопсин галофильных архей (см. обзоры^{6,7}). Эти ретинальсодержащие белки действительно одни из самых древних белков биосферы. Бактериородопсин, ответственный за бескислородный фотосинтез (фотоэнергетический процесс), возник в прокариотических клетках около 3.5 млрд лет назад.² Его хромофор-связывающий домен содержит ковалентно связанный с опсином фрагмент пол-

ностью *транс*-ретиналя. Следует отметить, что в состав практически всех зрительных пигментов входит только остаток 11-*цис*-ретиналя. Это подчеркивает консерватизм и совершенство хромофор-связывающего домена ретинальсодержащих белков.

Уникально организованный хромофорный центр, сформировавшийся на самых ранних стадиях эволюции биосферы, обеспечивает исключительно высокую скорость и эффективность фотохимической реакции. Фотоизомеризация ретиналевого хромофора как в родопсине позвоночных (например, быка),⁸ так и в родопсине беспозвоночных (осьминога)⁹ происходит после поглощения кванта света за время порядка 100 фс. Кинетика и эффективность фотоизомеризации хромофора в ретинальсодержащих белках соизмерима с теоретически рассчитанной скоростью изомеризации ретиналя в газовой фазе.¹⁰ Иными словами, изомеризация двойной связи ретиналя в тесном белковом окружении (объем хромофорного центра родопсина, в который погружен фрагмент 11-*цис*-ретиналя, составляет всего 660 Å³)¹¹ соизмерима по скорости с его изомеризацией в свободном объеме. Этот удивительный феномен свидетельствует об идеальном строении хромофорного центра и эффективном взаимодействии хромофорной группы с ее ближайшим белковым окружением.

Зрительный родопсин одновременно является классическим G-белок-связывающим рецептором класса А. В типичном геноме эукариот содержатся гены >800 таких рецепторов, строение которых подобно структуре родопсина. Они играют ключевую роль в передаче внутри- и межклеточных сигналов (информации), включая гормональную, нервную и сенсорные (зрение, вкус, обоняние) системы. Исследование механизмов перехода родопсина из неактивного (темнового) состояния в физиологически активное позволяет понять молекулярные механизмы активации всего класса G-белок-связывающих рецепторов (см., например, один из последних обзоров¹²).

II. Структура родопсина

Родопсин стал первым трансмембранным белком животного происхождения, для которого были определены двумерная (рис. 1)^{13,14} и трехмерная¹⁵ структуры (рис. 2). В молекуле родопсина можно выделить несколько доменов: внутримембранный гидрофобный домен, который образован семью α -спиральными «тяжами», собранными в пучок и пересекающими фоторецепторную мембрану, и два гидрофильных, расположенных по обе стороны мембраны, — цитоплазматический и внутридисковый (экстраклеточный).

В темновом состоянии родопсина остаток 11-*цис*-ретиналя имеет непланарную (искаженную и скрученную) конформацию.^{16,17} В то же время в растворе пространственная структура PSB и свободного 11-*цис*-ретиналя практически планарна.¹⁸ Важность белкового окружения в формировании «энергетически невыгодной» непланарной конфигурации хромофорной группы в молекуле зрительного родопсина не вызывает сомнений (см. обзор¹⁹).

Методом рентгеноструктурного анализа достаточно подробно изучена трехмерная организация кристаллического родопсина и его хромофорного центра.^{15,20} Следует, однако, иметь в виду, что РСА дает статическую картину трехмерной организации молекулы. В кристаллическом состоянии в белке могут быть нарушены некоторые нековалентные связи (водородные, ван-дер-ваальсовы, электростатические), играющие важную роль в осуществлении функций зрительного пигмента.

[†] Запись N-(Lys296) означает, что связь образует атом азота, входящий в состав аминокислоты.

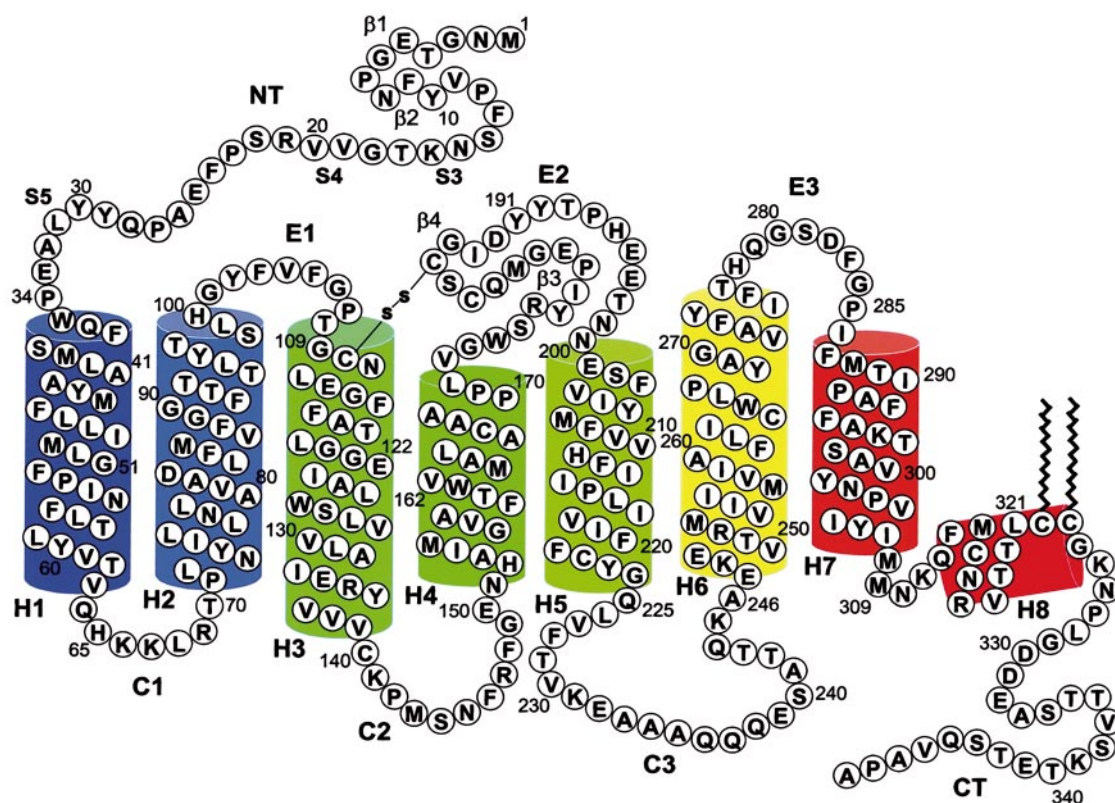


Рис. 1. Двумерная структура родопсина.¹³

За первыми рентгеноструктурными исследованиями последовала серия теоретических работ (квантовомеханических расчетов, молекулярного моделирования), в которых были предприняты попытки описать молекулу родопсина в темновом состоянии и после поглощения ею кванта света.^{21–28}

В настоящее время достаточно подробно описан хромофорный центр, а именно пространственное расположение остатка 11-*цис*-ретиная и его взаимодействие с ближайшими

к нему аминокислотными остатками.^{17,20,21,29–31} Такого рода информация важна для понимания механизмов спектральной настройки зрительных пигментов и для объяснения их уникальных фотохимических и физиологических свойств.

При анализе хромофорного центра особое внимание уделяют двум областям остатка 11-*цис*-ретиная: β -иононому кольцу и ковалентной связи с Lys296. Поскольку фотоиндуцированной динамике β -иононового кольца приписывается важная роль в инициировании последующих конформационных перестроек в белковой части молекулы,^{12,30,32–35} то актуальной задачей является изучение его конформации относительно полиеновой цепи, а также его взаимодействия с ближайшими аминокислотными остатками в темновом и фотоактивированном состоянии молекулы зрительного пигмента.

На сегодняшний день нет единого мнения о пространственной конформации β -иононового кольца (6-*s-цис* или 6-*s-транс*) относительно полиеновой цепи в остатке 11-*цис*-ретиная.^{17,36,37} Согласно данным РСА, β -иононовое кольцо находится в 6-*s-цис*-конформации.²⁰ Однако данные спектроскопии ЯМР ¹H показывают различную ориентацию этой части молекулы: 6-*s-транс* (см.^{37,38}), 6-*s-цис* (см.^{39–41}), смесь 6-*s-цис* (74%) и 6-*s-транс* (26%).³⁶ Авторы работы⁴² считают, что хромофорный центр может содержать обе формы, но энергетически более предпочтительна 6-*s-цис*-конформация.

Одной из нерешенных проблем является также вопрос о роли непланарной пространственной конформации хромофора в приобретении молекулой зрительного пигмента ее уникальных фотохимических свойств. В работах^{16,43–45} предполагается, что такую конформацию остаток 11-*цис*-ретиная в родопсине приобретает благодаря повороту

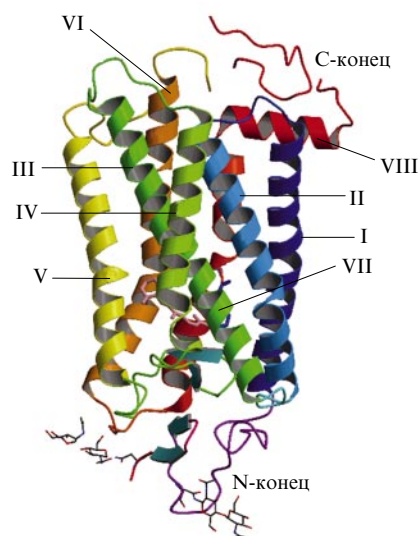


Рис. 2. Трехмерная структура родопсина.¹⁵

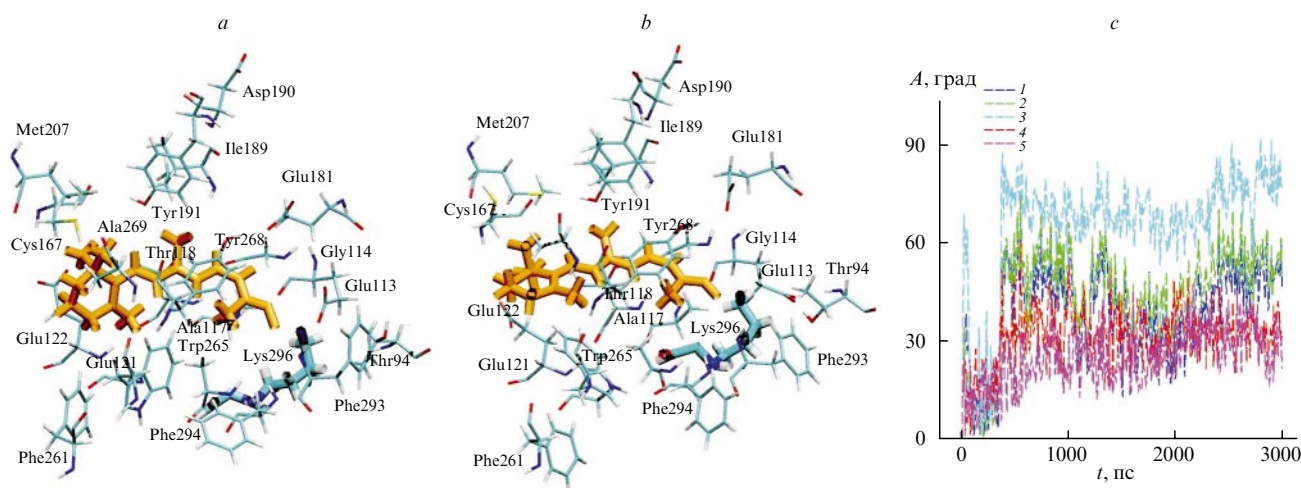


Рис. 3. Конфигурации хромофора родопсина в начальный момент времени моделирования (а) и через 3000 пс (б), рассчитанные методом молекулярной динамики, и диаграмма изменения торсионных углов (A) при повороте в течение 3000 пс пяти метильных групп 11-*цис*-ретинала в положениях 16 (1), 17 (2), 18 (3), 19 (4) и 20 (5) (с).⁴³

β -ионового кольца относительно плоскости полиеновой цепи примерно на $50-65^\circ$.

Используя методы молекулярной динамики, нами была продемонстрирована взаимная «подстройка» остатка 11-*цис*-ретинала и его ближайшего белкового окружения.⁴³⁻⁴⁵ Изменение пространственной конформации 11-*цис*-ретинала, в частности поворот β -ионового кольца вокруг связи C(6)–C(7) на $\sim 60^\circ$ относительно начальной конформации, наблюдалось нами уже через 300–400 пс после начала моделирования (рис. 3). Это хорошо согласуется как с теоретическими расчетами других авторов,²¹ так и с уже упоминавшимися выше экспериментальными данными.¹⁶ Более того, поворот β -ионового кольца относительно плоскости полиеновой цепи может осуществляться, согласно данным теоретической работы⁴⁶, в противоположные стороны, и в результате образуются два энантиомера 6-*s-цис*-11-*цис*-ретинала.

Согласно расчетам, проведенным неэмпирическими методами квантовой химии,⁴⁷ в данной конформации β -ионового кольца происходит сдвиг полосы поглощения родопсина на 10 нм в длинноволновую область. Этот сдвиг соответствует электронному переходу $S_0 \rightarrow S_1$ между основным и первым возбужденным синглетными состояниями хромофорной группы.⁴⁵ Другими словами, поворот β -ионового кольца переводит молекулу родопсина в состояние повышенной фотохимической «готовности», поскольку энергия перехода такой системы в фотовозбужденное синглетное S_1 -состояние меньше, чем в случае, когда β -ионовое кольцо расположено в плоскости полиеновой цепи.

Кроме поворота β -ионового кольца, в образование скрученной и напряженной конформации остатка 11-*цис*-ретинала существенный вклад вносит и центральная часть полиеновой цепи — атомы C(10)–C(13).^{43, 48-50}

До сих пор остается невыясненным вопрос, каким образом и в какой пространственной конформации 11-*цис*-ретиаль попадает в хромофорный центр опсина в ходе регенерации зрительного пигмента после его фотообесцвечивания. Несомненно, конформации 11-*цис*-ретинала, доставляемого к свободному опсину ретиаль-переносщим белком, и хромофорной группы родопсина отличаются друг от друга.

Следует отметить, что хромофорный центр темного родопсина не является специфическим местом связывания только 11-*цис*-ретинала. Он способен включать и другие его изомеры (например, в случае 9-*цис*-ретинала образуется так называемый изородопсин, не найденный в естественных зрительных пигментах⁵¹), а также его модификации.⁵² Вероятно, конформация 11-*цис*-ретинала при попадании его в хромофорный центр близка к планарной, а впоследствии, в ходе взаимодействия с окружающими аминокислотными остатками, происходит поворот β -ионового кольца и скручивание полиеновой цепи. В такой «энергетически невыгодной» конформации остаток 11-*цис*-ретинала, с одной стороны, как хромофорная группа обеспечивает состояние повышенной готовности родопсина к высокоэффективной фотохимической реакции, и с другой — в качестве лиганда-антагониста (*inverse agonist*) стабилизирует родопсин как G-белок-связывающий рецептор в его физиологически неактивном состоянии.

В реализации свойств 11-*цис*-ретинала как лиганда-антагониста важнейшую роль играют нековалентные связи β -ионового кольца с ближайшими ароматическими аминокислотными остатками (Trp265, Phe261 и Tyr268).^{15, 17, 20, 29} Благодаря указанному взаимодействию ограничивается подвижность трансмембранной α -спирали VI и тем самым предотвращается спонтанная активация родопсина в темноте.²⁹ (О ключевой роли этой α -спирали в механизме физиологической активации родопсина см. ниже.) В то же время такой ароматический кластер играет важную роль в сохранении скрученной, напряженной конформации остатка 11-*цис*-ретинала в темном неактивном состоянии родопсина.^{21, 29, 36, 40}

С использованием метода молекулярной динамики нами описано взаимодействие β -ионового кольца с аминокислотными остатками ароматического кластера и Leu266.^{43, 44} В результате торсионных колебаний относительно одинарной связи C(6)–C(7) β -ионовое кольцо поворачивается на $\sim 60^\circ$ относительно плоскости полиеновой цепи, что приводит к его стерическому взаимодействию с Leu266 (наименьшее расстояние между этими группами около 3.5 Å) (рис. 4). Такое положение фиксируется ароматическими кольцами Trp265 и Tyr268 таким образом, что β -ионовое кольцо становится «зажатым» между ними, причем все три кольца

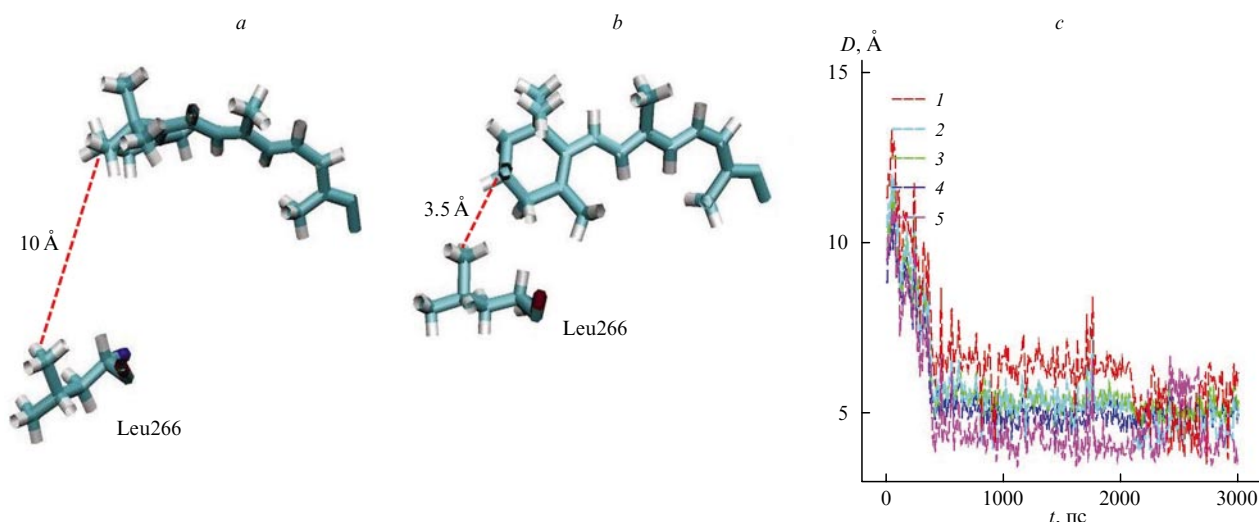


Рис. 4. Относительное расположение 11-*цис*-ретинала и Leu266 в молекуле родопсина в начальный момент времени моделирования (*a*) и через 3000 пс (*b*), рассчитанное методом молекулярной динамики, и диаграмма изменения межатомных расстояний (*D*) между атомом C(3) β -ионового кольца 11-*цис*-ретинала и атомами Leu266 в положениях δ_1 (1), γ (2), β (3), α (4) и δ_2 (5).⁴³

располагаются в параллельных плоскостях друг над другом на достаточно близком расстоянии (4–5 Å) (рис. 5). Это может свидетельствовать об установлении между β -ионовым кольцом, Trp265 и Tyr268 сильных электростатических взаимодействий. Данная картина взаимного расположения Trp265 и β -ионового кольца также подтверждается результатами молекулярного моделирования, выполненного в работе⁵³.

Таким образом, с одной стороны, остаток 11-*цис*-ретинала как лиганд-антагонист стабилизирует α -спираль VI, а с другой стороны — аминокислотные остатки ароматического

кластера удерживают хромофор в скрученной непланарной конформации.

Не менее важным является исследование динамики остатка 11-*цис*-ретинала и окружающих его аминокислотных остатков в области иминиевой связи. Особое внимание уделяется аминокислотному остатку Glu113 как основному противоиону PSB.^{54–56} Роли Glu113 в стабилизации неактивного состояния родопсина в темноте, в повышении эффективности его регенерации, в спектральной настройке и в регуляции времени жизни промежуточных продуктов фотолиты посвящены работы^{57–59}.

До недавнего времени было общепризнанным, что у позвоночных отрицательно заряженный Glu113 является основным и единственным противоионом PSB (см., например,¹³). Однако обнаруженное методом PCA присутствие в хромоформном центре второго Glu в положении 181, в непосредственной близости к 11-*цис*-ретиналу, вызвало повышенный интерес к роли этой аминокислоты в механизмах стабилизации PSB и активации родопсина как G-белок-связывающего рецептора.^{42, 60–62} В настоящее время активно обсуждаются несколько моделей (так называемые «модели переключения противоиона», «counterion switch»), описывающих вклад Glu181 в эти процессы.

В статье⁶³ предполагается, что в темновом родопсине основным противоионом PSB является Glu113, а Glu181 становится противоионом на стадии образования метародопсина I в результате переноса протона от Glu181 к Glu113 через систему водородных связей с участием Ser186 и молекул воды. Авторы работ^{53, 64} считают, что в стабилизации PSB одновременно принимают участие и Glu113, и Glu181. На основании теоретических расчетов⁶⁵ высказано предположение о том, что в темновом состоянии родопсина Glu181 опосредованно, через Ser186, вносит даже больший вклад в стабилизацию PSB, чем Glu113.

До недавнего времени открытым оставался вопрос о противоионе родопсина беспозвоночных животных, так как у них в положении 113 нет отрицательно заряженного аминокислотного остатка, аналогичного Glu113. Предполагалось, что именно это отличие и является ключевым моментом, приводящим к различным механизмам фото-

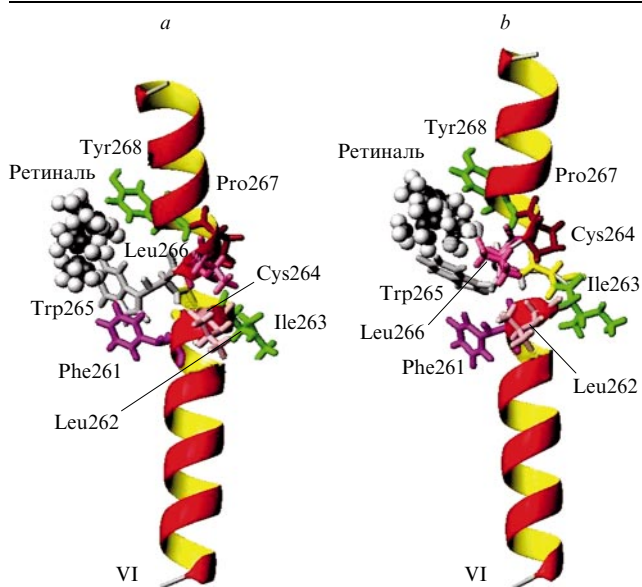


Рис. 5. Конфигурация области VI α -спирали и ее аминокислотных остатков, находящихся рядом с фрагментом 11-*цис*-ретинала, в начальный момент времени моделирования (*a*) и через 3000 пс (*b*), рассчитанные методом молекулярной динамики.⁴³ Атомы хромофора изображены в виде шариков, аминокислотные остатки — в виде объемных структурных формул.

превращения зрительных пигментов у позвоночных (фотолиз) и беспозвоночных (замкнутый цикл).⁶⁶

Недавно группой авторов в серии работ^{67–69} было показано, что у беспозвоночных противоионом PSB является Glu181. Следует отметить, что этот аминокислотный остаток является исключительно консервативным для всех опсинов, в отличие от Glu113, который является консервативным только в случае зрительного пигмента позвоночных.⁶⁷ Согласно этим данным, была выдвинута гипотеза о том, что изначально роль противоиона выполнял Glu181, а в процессе эволюции эта роль перешла к Glu113, появившемуся у позвоночных в результате мутагенеза. Появление Glu113 в родопсине позвоночных, по-видимому, и привело к тому, что на стадии образования метародопсина II остаток Glu113 акцептирует протон от атома азота PSB и способствует тем самым гидролизу этой связи и высвобождению *транс*-ретинала из опсина (см. ниже).

Чрезвычайно интересен и давно обсуждается вопрос о том, почему на самых ранних стадиях фотохимической эволюции светочувствительных зрительных белков именно остаток ретинала в 11-*цис*-конфигурации был отобран в качестве хромофорной группы всего семейства. Одна из последних попыток ответа на этот вопрос была сделана с помощью комплексного метода, сочетающего квантово-механические и молекулярно-динамические расчеты.⁷⁰ Были подробно проанализированы структура, стабильность, энергия и спектры поглощения 7-*цис*-, 9-*цис*-, 11-*цис*- и 13-*цис*-изомеров остатка ретинала в родопсине позвоночных (быка, обезьяны) и беспозвоночных (кальмара). Из этой работы следует, что одним из ключевых факторов в ходе естественного отбора явилась оптимизация электростатического взаимодействия между остатком ретинала и его ближайшим белковым окружением в темновом состоянии родопсина. Хотя, конечно, выбор этого изомера определила и совокупность других факторов. К ним относятся эффективный ферментативный синтез 11-*цис*-ретинала, осуществляемый белком RPE65 (ретинолизомеразой) в клетках ретиального пигментного эпителия; скорости связывания 11-*цис*-ретинала с опсином и его встраивания в хромофорный центр в ходе регенерации родопсина после его обесцвечивания; стабильность темнового родопсина при физиологической температуре; эффективность 11-*цис*-ретинала как лиганда-антагониста, а также квантовый выход и стереоселективность сверхбыстрой реакции фотоизомеризации с его участием.

III. Молекулярная физиология родопсина

Молекула зрительного пигмента родопсина выполняет в процессе фоторецепции несколько физиологических функций, в реализации которых ключевую роль играет взаимодействие хромофорной группы с белковым окружением. Во-первых, это функция спектральной настройки зрительных пигментов. Последние способны поглощать свет в широком спектральном диапазоне — от ультрафиолетовой до красной области спектра (от 360 до 620 нм). Спектральная настройка обеспечивает возможность цветовосприятия.

Во-вторых, это запуск собственно зрительного акта — процесса фототрансдукции. Данный процесс определяют два ключевых внутримолекулярных события: сверхбыстрая реакция фотоизомеризации ретиналевого хромофора и, как следствие, конформационная перестройка белковой части молекулы опсина, приводящая к связыванию и активации G-белка трансдуцина.

В-третьих, это поддержание низкого темнового теплового шума зрительной клетки (палочки). В темноте хромо-

форная группа удерживает родопсин как G-белок-связывающий рецептор в неактивном состоянии, т.е. остаток 11-*цис*-ретинала выступает как эффективный лиганд-антагонист. После поглощения кванта света хромофорная группа обеспечивает пребывание сравнительно долгоживущего продукта метародопсина II (см. ниже) в физиологически активном состоянии. В этом случае фрагмент ретинала, в котором все двойные связи полиеновой цепи находятся в *транс*-конфигурации, выступает как мощный лиганд-агонист.

Наконец, это патогенетическая роль самой молекулы родопсина (описано более ста ее мутаций) или так называемого «зрительного цикла» родопсина. В частности, накопление в фоторецепторной мембране (фото)токсичного *транс*-ретинала, высвобождающегося на последней стадии фотолиза родопсина, связано как с потенциальной опасностью повреждающего действия света на сетчатку и ретиальный пигментный эпителий (РПЭ), так и с развитием дегенеративных заболеваний сетчатки, в первую очередь болезни Штаргардта и возрастной макулярной дегенерации.^{71,72}

1. Спектральная настройка зрительных пигментов

Спектральная настройка (различное положение максимума в спектре поглощения) зрительного пигмента возможна в двух временных шкалах: длительной эволюционной и сравнительно краткосрочной адапционной (физиологической). Эволюционная настройка обеспечивается заменами аминокислотных остатков в хромофорном центре опсина вокруг хромофорной группы — остатка 11-*цис*-ретинала или 11-*цис*-3,4-дегидроретинала — и его взаимодействием с комплексом противоиона. Адапционная настройка, сезонная или зависящая от световой среды обитания, определяется заменой хромофорной группы — остатка 11-*цис*-ретинала (альдегида витамина A₁) на фрагмент 11-*цис*-3,4-дегидроретинала (альдегида витамина A₂) (см. обзоры^{59,73,74}).

Одним из примеров настройки, зависящей от световой среды обитания, может служить зрительный пигмент двух популяций финских креветок *Mysis relicta* — морской и озерной, разделившихся в конце ледникового периода (около 9000 лет назад). Они обитают при разных условиях освещения и заметно различаются по световой и спектральной чувствительности. Нами показано, что максимумы поглощения родопсина у этих креветок различаются: 530 нм в случае морской креветки, живущей при относительно высоких освещенностях, и 560 нм для озерной, обитающей на большой глубине.^{75–78} Это различие, скорее всего, связано с заменой не аминокислотных остатков, а остатка 11-*цис*-ретинала на остаток 11-*цис*-3,4-дегидроретинала.

Принципиально важной является эволюционная настройка. В ходе эволюции в фоторецепторных клетках сетчатки позвоночных сформировалось пять классов зрительных пигментов. Это класс палочковых пигментов и четыре класса колбочковых. Почти у всех наземных позвоночных максимум поглощения палочковых пигментов (родопсина) расположен при 500 нм. Спектральная настройка колбочковых пигментов гораздо разнообразнее. Среди них выделяют длинноволновые (с максимумом поглощения в области 500–570 нм), средневолновые (480–530 нм) и два коротковолновых (400–470 и 355–445 нм). Утраченное у млекопитающих разнообразие колбочковых пигментов восстановилось в ходе эволюции только у приматов и человека, обеспечив им цветовосприятие.

Что касается взаимодействия хромофора с белковым окружением, то достаточно всего одной аминокислотной замены в хромофорном центре, чтобы обеспечить сдвиг

спектра поглощения коротковолнового колбочкового пигмента из ультрафиолетовой в фиолетово-синюю область спектра (см. обзоры^{73, 74}). В случае спектральной настройки длинноволновых колбочковых пигментов требуется несколько аминокислотных замен, включающих анион-связывающие центры. Речь идет о хлор-связывающих аминокислотных остатках в «красных» колбочках рептилий, птиц и млекопитающих.^{73, 74, 79–81} Как нами было показано на изолированной сетчатке золотой рыбки, удаление ионов хлора не только смещает максимум поглощения красночувствительных колбочек на ~30 нм в более коротковолновую (зеленую) область, но и приводит к уменьшению или даже исчезновению их электрического ответа (так называемого позднего рецепторного потенциала) на красную световую вспышку.⁸¹

Накапливается все больше сведений о роли молекул воды в спектральной настройке колбочковых зрительных пигментов. В связи с этим следует отметить по крайней мере два обстоятельства. Во-первых, в отличие от родопсина позвоночных и беспозвоночных, ни один из колбочковых зрительных белков не был выделен в кристаллическом виде и, следовательно, не определена их третичная структура. Во-вторых, если о роли связанной воды в поддержании структуры и осуществлении функций родопсина позвоночных (быка) и беспозвоночных (кальмара) известно довольно много, то в отношении колбочковых пигментов такие сведения единичны.

В родопсине связанные молекулы воды были обнаружены и весьма подробно исследованы с помощью ряда современных методов: РСА,^{15, 82} Фурье-ИК-спектроскопии,^{69, 83} радиоактивного мечения.^{84, 85}

В одной из последних работ⁸⁶, посвященной красно- и зеленочувствительным колбочковым пигментам обезьяны, методом низкотемпературной Фурье-ИК-спектроскопии было показано, что вблизи 11-*цис*-ретиналевого хромофора находятся от 3 до 8 молекул связанной воды. В то же время в родопсине вблизи хромофорной группы обнаружено 6 молекул связанной воды. Иными словами, количество молекул связанной воды в колбочковых пигментах и палочковом родопсине в темновом состоянии примерно одинаково. Одно из обнаруженных различий состояло в том, что после фотоизомеризации остатка 11-*цис*-ретиналя в колбочковых пигментах связанная вода в области хромофора сохранялась, а в родопсине исчезала. Авторы объясняют этот факт наличием в колбочковых пигментах вблизи атомов углерода C(11) и C(9) остатка ретиналя хлор-связывающего центра, которого в родопсине нет. Очевидно, что исследование корреляции между количеством, локализацией и ролью связанной воды и спектральной настройкой колбочковых пигментов должно быть продолжено. Интересно, что в отношении характера связывания воды и палочковые, и колбочковые зрительные белки существенным образом отличаются от протон-переносящего ретинальсодержащего белка архей — бактериородопсина, в котором молекулы воды сильно связаны.⁸⁷

Обсуждая внутримолекулярные механизмы спектральной настройки зрительных пигментов, следует упомянуть серию недавних работ^{88–91} японских авторов, в которых использовались комбинированные методы квантовомеханических расчетов и моделирования методом молекулярной механики (QM/MM). Хромофорная группа молекулы рассматривалась в этих работах в рамках квантовомеханического подхода, а белковое окружение — в рамках методов молекулярной механики. Результаты этих расчетных работ показывают, что спектральная настройка определяется взаи-

модействием ретиналевого хромофора с комплексом противоиона и белковым окружением. Влияние же изменения структуры самого хромофора (наличие остатка 11-*цис*-ретиналя или 11-*цис*-3,4-дегидроретиналя) несущественно.

Таким образом, рассмотрены три фактора, от которых зависит положение максимума поглощения зрительного пигмента:

- 1) природа хромофора и его конфигурация;
- 2) взаимодействие хромофора с комплексом противоиона;
- 3) взаимодействие хромофора с ближайшим белковым окружением.

Спектральную настройку пигмента определяют два последних. Природа хромофора и его изомерная конфигурация для всех пигментов одни и те же — это остаток ретиналя с 11-*цис*-конфигурацией. Следовательно, одной из важнейших физиологических функций ретиналевого хромофора в хромофорном центре является «настройка» спектральной чувствительности зрительного пигмента. Такая внутримолекулярная настройка обеспечивает адаптацию фоторецепторных клеток органов зрения беспозвоночных и позвоночных животных к световой среде обитания и формирование механизма цветовосприятия.

2. Фотохимия родопсина

Фототрансдукция начинается с реакции фотоизомеризации хромофорной группы родопсина. Превращение 11-*цис*-ретиналевого хромофора в его *транс*-форму в качестве фотохимической реакции в зрении было установлено Уолдом с соавт.⁹² еще в 60-х годах прошлого века (Нобелевская премия по физиологии и медицине 1967 г.), затем подробно исследовано в 90-е годы (см., например,⁹³). Однако детали механизма этой важнейшей фотохимической реакции до сих пор остаются предметом экспериментальных и теоретических исследований, которые в последнее время особенно активизировались в связи с развитием техники фемтосекундной спектроскопии.

Следует отметить, что барьер тепловой изомеризации ретиналевого хромофора исключительно высок (45 ккал·моль⁻¹).^{94, 95} Функциональный смысл столь высокого теплового барьера, а также высоких скорости и эффективности фотоизомеризации состоит в том, чтобы, с одной стороны, практически исключить ложное срабатывание родопсина в темноте, а с другой — использовать энергию поглощенного кванта именно для этой фотохимической реакции с минимальной возможностью ее потери в виде тепла или флуоресценции. Физиологически важным в этой связи является вопрос о природе темнового «шума» фоторецепторной клетки.

Как известно, сумеречное или ночное бесцветное зрение обеспечивается работой палочек сетчатки. Палочка — это счетчик одиночных квантов, поскольку способна уверенно детектировать один поглощенный квант видимого света. Такая способность прямо зависит от уровня теплового темнового «шума». Источником темнового «шума», мешающего физиологическому механизму возбуждения палочки одиночным квантом, является тепловая спонтанная активация родопсина. Следует подчеркнуть, что темновой «шум» родопсина, т.е. спонтанный переход пигмента в физиологически активное состояние, исключительно низок: в палочке сетчатки глаза приматов при 36°C одна изомеризация может произойти раз в 420 лет.⁹⁵

Ранее было показано^{96–98} и совсем недавно подтверждено,⁹⁹ что источником темнового «шума» является тепловая

изомеризация остатка 11-*цис*-ретиная, которая инициирует точно такой же физиологический сигнал в палочке, как и фотоизомеризация хромофорной группы. Молекулярный механизм, лежащий в основе возникновения этого «шума», до последнего времени оставался неясным. Количественное соотношение между энергией фотоактивации родопсина и положением его максимума поглощения подтверждает, что источником темного «шума» является именно изомеризация хромофора. Чем дальше в длинноволновую область спектра смещается максимум поглощения, тем выше становится уровень темного «шума» фоторецепторной клетки. Этим объясняется, почему в обширном семействе зрительных пигментов отсутствуют пигменты, поглощающие в инфракрасной области спектра.⁹⁹ Иными словами, родопсин как зрительный пигмент сумеречного зрения приобрел в ходе эволюции уникальные фотохимические свойства, позволяющие фоторецепторной клетке оптимизировать чувствительность к свету, — это высокий для фотобиологического процесса квантовый выход фотоизомеризации ретиная и минимизация его тепловой темновой изомеризации, т.е. подавление темного «шума».

Согласно данным недавно опубликованной работы¹⁰⁰, сеть внутримолекулярных водородных связей, образованная 20 молекулами воды, иминиевая связь PSB и пептидные фрагменты в трансмембранном домене принципиально важны для уменьшения вероятности тепловой изомеризации фрагмента 11-*цис*-ретиная как источника темного «шума». Иными словами, сеть водородных связей и совершенное стерическое взаимодействие («адаптация») хромофора с его ближайшим белковым окружением в хромофорном центре опсина — два ключевых фактора, которые обеспечивали возникновение в ходе эволюции молекулярного механизма сумеречного палочкового зрения, оптимизирующего соотношение между высоким квантовым выходом фотоизомеризации и низкой вероятностью тепловой изомеризации. Оптимизация этого соотношения явилась ключевым эволюционным фактором происхождения физиологически более совершенных родопсинсодержащих палочек как рецепторов сумеречного зрения из эволюционно более древних, менее совершенных и менее светочувствительных колбочек — рецепторов дневного зрения, содержащих колбочковые пигменты с различной спектральной настройкой.

Об исключительно высокой скорости и эффективности фотоизомеризации ретинового хромофора свидетельствует совокупность следующих фактов. Во-первых, высокий квантовый выход реакции: сначала его значение было определено как 0.67,¹⁰¹ позднее уточнено как 0.65.¹⁰² Следует обратить внимание на то, что квантовый выход *цис*–*транс*-изомеризации хромофорной группы родопсина в тесном белковом окружении почти на порядок выше, чем в случае свободного ретиная в растворе.^{103–105} Во-вторых, образование в течение 200 фс первого нестабильного продукта фотолиза — фотородопсина — в основном состоянии (см.^{93,106–111}). В-третьих, запасание значительной энергии поглощенного кванта (35 ккал·моль⁻¹) в первом промежуточном продукте, устойчивость которого зависит от температуры, — батородопсине, стабильном при температуре жидкого азота.^{112,113}

На рис. 6 представлена обобщенная схема фотолиза родопсина. При поглощении кванта света хромофорная группа родопсина — остаток 11-*цис*-ретиная — изомеризуется в полностью *транс*-форму с образованием первого продукта — фотородопсина. Затем в темноте в ходе зависящих от температуры конформационных перестроек последовательно формируются промежуточные продукты с характерными спектрами поглощения. В результате полу-

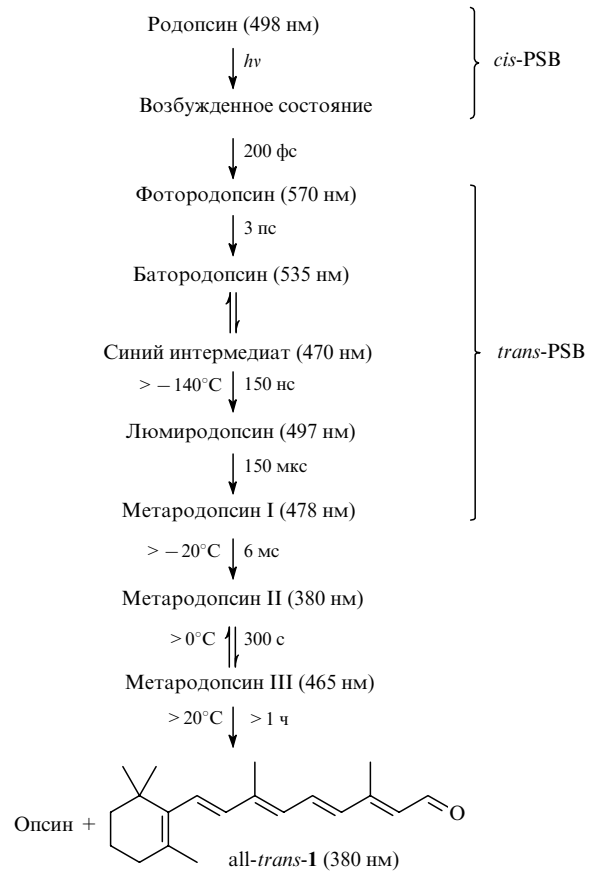


Рис. 6. Схема фотолиза родопсина позвоночных. В скобках приведены положения максимумов поглощения, справа указана конфигурация хромофора.

чается сравнительно долгоживущий промежуточный продукт — метародопсин II, который способен связывать и активировать G-белок. Фотолиз родопсина завершается гидролизом ковалентной связи шиффового основания и высвобождением свободного *транс*-ретиная (*all-trans-I*).

Следует отметить, что первый продукт фотолиза родопсина сначала получил название «прайм-родопсин» (prime-Rho),¹¹⁴ которое ряд авторов использует до сих пор,⁹ хотя более общепринятым считается название фотородопсин (photo-Rho), предложенное примерно в то же время.¹¹⁵ Хотя батородопсин образуется из фотородопсина, первый был обнаружен и подробно исследован намного раньше.⁹² При исследовании фотородопсина стало ясно, что хромофор в нем также находится в искаженной *транс*-конфигурации, однако стабильность этого интермедиата не зависит от температуры, в отличие от батородопсина.^{116–119}

В 90-х гг. XX в. и начале 2000-х гг. появились работы^{93,107–111,120,121}, в которых исследовалась сверхбыстрая динамика перехода зрительного родопсина в фото- и затем в батородопсин. Из полученных результатов следовало, что время образования фотородопсина с остатком *транс*-ретиная в сильно искаженной конформации действительно составляет ~200 фс. Последующее исследование¹²² методом спектроскопии координационного рассеяния (КР) с пикосекундным временным разрешением подтвердило, что фотородопсин превращается в батородопсин в течение нескольких пикосекунд.

Все эти данные и ряд других сведений в совокупности указывали на то, что ключевая роль в осуществлении этой

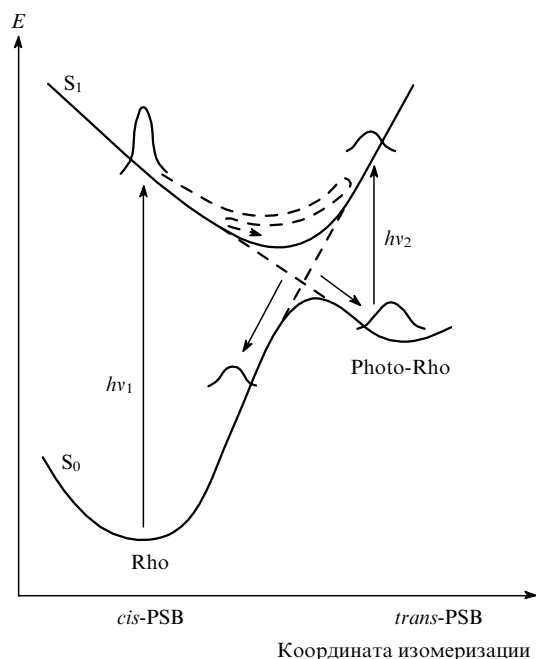


Рис. 7. Схема поверхностей потенциальной энергии молекулы родопсина, описывающая протекание фотоизомеризации остатка 11-*цис*-ретинала в области конического пересечения.¹²¹

исключительно эффективной и стереоселективной реакции фотоизомеризации хромофора в молекуле родопсина принадлежит коническому пересечению поверхностей потенциальной энергии (ППЭ) основного и возбужденного электронных состояний ретинала (рис. 7).^{123–125} Однако до самого последнего времени не было получено прямых экспериментальных доказательств, поскольку для того чтобы проследить изменение спектров поглощения молекулы при переходе с ППЭ возбужденного состояния на ППЭ продуктов, необходима сверхбыстрая оптическая спектроскопия высокого разрешения.

Экспериментальные доказательства существования точки конического пересечения ППЭ в реакции фотоизомеризации остатка 11-*цис*-ретинала в молекуле родопсина были получены недавно группой американских⁸ и японских⁹ авторов с помощью современного метода фемтосекундной спектроскопии. Было показано, что время достижения этой точки для родопсина как позвоночных животных,⁸ так и беспозвоночных⁹ составляет ~ 80 фс, а затем, через ~ 200 фс, образуется фотородопсин в основном состоянии, в котором хромофор находится в искаженной, но уже полностью *транс*-конфигурации. Следует отметить, что, в отличие от реакции фотоизомеризации остатка ретинала в хромоформном центре родопсина, для свободного ретинала в растворе время достижения конического пересечения ППЭ намного больше и составляет 2.9–3.8 пс.¹²⁶

Недавно с использованием метода фемтосекундной лазерной спектроскопии в поляризованном свете с временным разрешением 27 фс нами были подробно исследованы дифференциальные спектры фотоиндуцированного поглощения родопсина при разных временах задержки, кинетика фотоизомеризации 11-*цис*-ретинала и анизотропия сигнала дифференциального поглощения.¹²⁷ Полученные экспериментальные данные позволили альтернативным способом оценить время достижения конического пересечения ППЭ в реакции изомеризации фрагмента 11-*цис*-ретинала в родоп-

сине. Согласно оценке, это время составляет от 60 до 100 фс. Другими словами, достижение конического пересечения ППЭ основного и возбужденного состояний хромофора в родопсине при фотоизомеризации происходит за время 80 ± 20 фс. Таким образом, эти данные в сочетании с результатами квантовомеханических расчетов и молекулярного моделирования свидетельствуют о реальном существовании и важности области конического пересечения ППЭ в осуществлении фотохимической реакции.

Однако при сравнении результатов и их интерпретаций, полученных в экспериментах на родопсине позвоночных⁸ и беспозвоночных,⁹ выявляются различия. Согласно данным авторов работы⁸, энергия поглощенного кванта света используется исключительно для небольшого смещения атомов в системе двойных связей $C(9)=C(10)-C(11)=C(12)$. Поскольку хромофорная группа находится в тесном белковом окружении,²⁰ то, по мнению авторов, это ограничивает возможность смещения остатка 11-*цис*-ретинала в области иминиевой связи с белком и в области β -иононового кольца. После того как произошло локальное смещение атомов в центре полиеновой цепи ретинала, вся высоконапряженная структура хромофора быстро релаксирует, превращаясь в структуру с еще более выраженной *транс*-конфигурацией хромофора (переход фотородопсин \rightarrow батородопсин). Это превращение и является основным путем фотореакции.¹²⁸ В то же время имеется и побочное направление, когда при релаксации высоконапряженной структуры хромофора двойная связь $C(11)=C(12)$ приобретает исходную *цис*-конфигурацию.

Следует отметить, что время достижения конического пересечения ППЭ, равное 80 фс как для зрительного родопсина осьминога,⁹ так и бычьего родопсина,⁸ почти вдвое меньше, чем в случае родопсина архей — бактериородопсина.¹²⁹ Такая разница может объясняться как типом структурного перехода ретиналевого хромофора в зрительном (из 11-*цис*- в полностью *транс*-конфигурацию) и в бактериальном (из полностью *транс*- в 13-*цис*-конфигурацию) родопсинах, так и различной структурой хромофорного центра этих двух совершенно разных ретинальсодержащих белков. Представляет интерес дальнейшее сравнение динамики фотоизомеризации ретиналевого хромофора в различных ретинальсодержащих белках животного и микробиального родопсина, а также родопсина простейших.

Время достижения области конического пересечения ППЭ в бычьем и осьминожем родопсинах фактически совпадает с временем, которое было предсказано при теоретическом моделировании изомеризации свободного ретинала в газовой фазе.^{130–132} Такое совпадение представляется поразительным, поскольку фотоизомеризация хромофора совершается не в свободном, ничем не ограниченном пространстве, а в теснейшем белковом окружении. Как уже отмечалось выше, объем хромофорного центра опсина составляет всего 660 \AA^3 , причем поверхность взаимодействия остатка 11-*цис*-ретинала с окружающими аминокислотами равна $\sim 230 \text{ \AA}^2$ (см.¹¹). Это означает, что хромофорный центр опсина идеально организован, поскольку тесное белковое окружение остатка 11-*цис*-ретинала не только не препятствует, а активно способствует сверхбыстрому и эффективному процессу фотоиндуцированного изменения геометрии хромофорной группы. Задача дальнейших исследований — выяснить, каким именно образом белковое окружение родопсина способствует ускорению и повышению эффективности первой и единственной фотохимической реакции в зрении.

В этой связи можно выделить по крайней мере два перспективных направления: 1) исследование и сравнение

прямой и обратной (фотохромной) реакций родопсина; 2) получение генетически модифицированного в области хромофорного центра родопсина и изучение особенностей его фотореакций. Исследования по первому направлению были начаты еще в начале 60-х годов прошлого века, когда в лаборатории Уолда⁹² было показано, что при температуре жидкого азота возможно фотопревращение батородопсина (хромофорная группа — *транс*-форма остатка ретиналя) обратно в родопсин (11-*цис*-изомер) с незначительной примесью изородопсина (9-*цис*-изомер).

Действительно, промежуточные продукты фотолиза родопсина также фотоактивны. Поглощение кванта света интермедиатом может приводить к обратной *транс*–*цис*-изомеризации остатка ретиналя и регенерации стабильных при комнатной температуре родопсина или, в меньшей степени, изородопсина. Этот процесс носит название фоторегенерации зрительного пигмента, причем более поздние продукты (см. рис. 5) регенерируют в родопсин или изородопсин с меньшей эффективностью, чем ранние. Так, батородопсин регенерирует практически полностью,⁹² а метародопсин II, как недавно было показано в палочке сетчатки лягушки, — лишь на 45%.¹³³ Существенно, что при обратной реакции никаких промежуточных продуктов не образуется, о чем свидетельствует наличие изобестической точки в спектрах поглощения, записанных в различные моменты времени.^{92, 134}

Следует отметить, что в отличие от беспозвоночных, где процесс фоторегенерации является физиологической реакцией и необходим для восстановления зрительного пигмента, у позвоночных животных процесс физиологической регенерации является темновым и представляет собой сложный каскад биохимических реакций. Поглощение второго кванта света молекулой зрительного пигмента *in vivo* у позвоночных сведено практически к нулю.

Тем не менее фоторегенерация является хорошим инструментом для исследования *in vitro* конформационных изменений в зрительном пигменте на разных стадиях фотолиза. Именно изучение прямых и обратных фотореакций при низких температурах позволило впервые предложить механизм *цис*–*транс*-изомеризации хромофора при поглощении родопсином света в качестве первичного акта фотопревращения.⁹² Позднее этот механизм был подтвержден с помощью различных спектrophотометрических методов,¹³⁵ а также структурных исследований синтетических аналогов родопсина, содержащих остаток ретиналя с фиксированной структурой в области атома С(11) полиеновой цепи.^{117, 136}

Именно в опытах по изучению прямых и обратных реакций зрительного пигмента было открыто явление изохромии самого родопсина и продуктов его фотолиза. Было показано, что в ходе обесцвечивания образуются две спектрально неразличимые формы метародопсина I, одна из которых способна к фоторегенерации, а другая — нет.¹³⁷ Результаты исследований фотохромных реакций родопсина при низких температурах свидетельствуют о том,^{134, 138, 139} что при фоторегенерации зрительного пигмента начиная со стадии образования метародопсина I образуются две спектрально идентичные изохромные формы родопсина, одна из которых является стабильной при комнатной температуре, а вторая — нет.

Интерес к изучению фотообратимых реакций родопсина в последнее время возрос в связи с тем, что эти реакции могут рассматриваться в качестве прообраза оптических устройств для записи, передачи и хранения информации. Другими словами, ретинальсодержащий белок представляет собой сверхбыстрый молекулярный фотопереклюатель, обла-

дающий высоким квантовым выходом и спектрально различимыми темновой и фотоиндуцированной формами. Например, естественная способность продукта поздней стадии фотолиза зрительного пигмента беспозвоночных животных (метародопсина) к обратному превращению в родопсин лежит в основе как физиологического механизма регенерации пигмента, так и использования фотообратимости в биотехнологии.^{140, 141} Так, в работе¹⁴⁰ был показан многократный фотопереход родопсина осьминога в метародопсин и обратно при комнатной температуре даже в экспериментах *in vitro*. Предпринимались попытки (правда, не слишком успешные) осуществить этот процесс, помещая родопсин осьминога в полимерную матрицу.¹⁴¹ Сравнительно недавно удалось воспроизвести обратимую реакцию фотоизомеризации родопсинового хромофора в искусственной системе — между двумя слоями очищенной натуральной глины (монтмориллонита).¹⁴² Продолжение работ в этом направлении может быть перспективным для использования в современных нанотехнологиях.

Наиболее привлекательными с точки зрения возможности достижения максимального быстродействия в такого рода устройствах являются ранние стадии фотоиндуцированных превращений родопсина, например стадии образования фото- и батородопсина. В работе¹⁴³ описана попытка осуществления обратимого сверхбыстрого фотопереключения интермедиатов бычьего родопсина, в частности батородопсина, под действием фемтосекундных (300 фс) лазерных импульсов. Однако в указанной статье не содержится убедительных подтверждений того, что фотопереключение действительно происходит в субпикосекундной шкале времени.

Нами начаты работы по сравнительному анализу прямой и обратной фотореакций родопсина в фемтосекундном диапазоне времени.^{111, 121} Методом лазерной абсорбционной спектроскопии высокого разрешения исследована динамика когерентного процесса фотоизомеризации 11-*цис*-ретиналевого хромофора в бычьем родопсине. С использованием двухимпульсной системы зарегистрировано изменение спектров поглощения родопсина в пикосекундной временной шкале под действием возбуждающего фемтосекундного светового импульса (рис. 8).¹¹¹

Исследованы осцилляции разрешенных во времени сигналов поглощения первого продукта фотореакции — фотородопсина, содержащего хромофор в *транс*-форме, и родопсина в основном состоянии, содержащего колебательно-возбужденный остаток 11-*цис*-ретиналя (рис. 9). Сравнение ненормированных кинетических кривых фотоиндуцированного поглощения родопсина проводили на длинах волн зондирования 480 (поглощение родопсина) и 610 нм (поглощение фотородопсина). Эти осцилляции были интерпретированы как динамика когерентных колебательных волновых пакетов в продуктах реакции. Иными словами, были получены дополнительные сведения, подтверждающие и уточняющие когерентную природу реакции фотоизомеризации ретиналевого хромофора в молекуле родопсина.

С помощью специально разработанной трехимпульсной фемтосекундной лазерной системы нами впервые зарегистрирована сверхбыстрая фотохромная обратимая реакция зрительного пигмента родопсина в фемтосекундном диапазоне времени: переход родопсина из темнового состояния (11-*цис*-изомер хромофора) в первичный фотоиндуцированный промежуточный продукт — фотородопсин в основном электронном состоянии (*транс*-изомер) — и затем обратный фотоиндуцированный процесс — превращение фотородопсина в родопсин.¹²¹ Показано, что можно осуществлять когерентное управление обратным процессом посредством

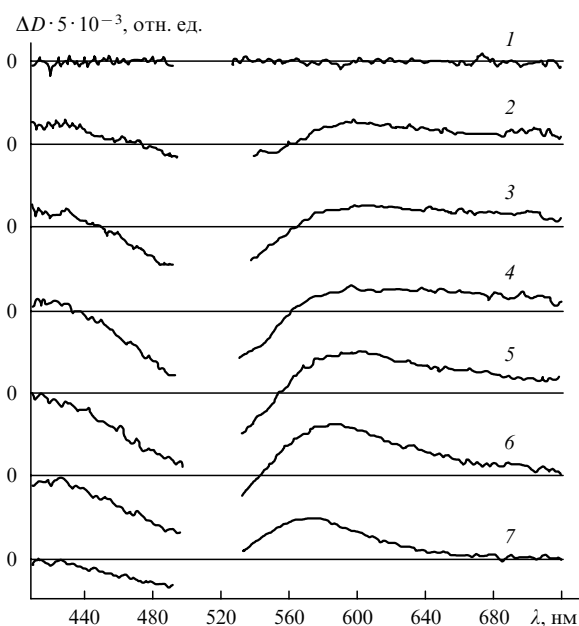


Рис. 8. Спектры фотоиндуцированного поглощения бычьего родопсина, полученные при возбуждении импульсами излучения с $\lambda = 500$ нм в спектральном диапазоне 410–720 нм при временах задержки, пс: –0.11 (1), 0.06 (2), 0.08 (3), 0.10 (4), 0.15 (5), 0.20 (6) и 3.0 (7).¹¹¹

ΔD — разность поглощения образца после возбуждения и невозбужденного образца.

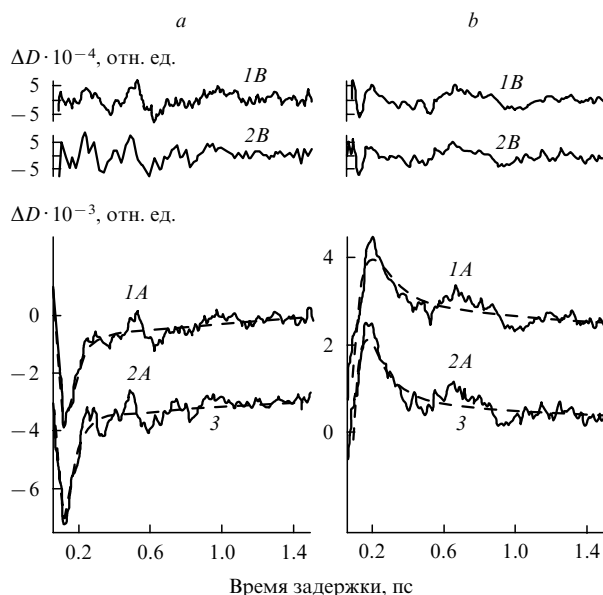


Рис. 9. Кинетические кривые фотоиндуцированного поглощения родопсина, полученные при возбуждении импульсами 500 (1A) и 560 нм (2A) при временах задержки 0.06–1.5 пс на длинах волн зондирования 480 (a) и 610 нм (b), а также модельные кривые (3) и осцилляционные составляющие кинетических кривых (1B, 2B).¹¹¹

Штриховыми линиями показаны модельные кривые.

облучения фотородопсина в когерентном колебательно-возбужденном состоянии в различные моменты времени в пределах времени жизни этого интермедиата.

Таким образом, нам впервые удалось продемонстрировать возможность осуществления сверхбыстрой фотохромной реакции родопсина при комнатной температуре.¹²¹ Этот результат доказывает, что зрительный пигмент родопсин можно рассматривать как прообраз сверхбыстрого молекулярного фотопереклювателя.

Новым и чрезвычайно перспективным направлением исследований с использованием метода фемтосекундной спектроскопии может стать изучение особенностей фото-реакций родопсина, генетически модифицированного в области хромофорного центра. Работы такого рода будут направлены на попытку понимания особенностей структуры опсина как идеального белкового окружения хромофорного центра, обеспечивающего высокую скорость и эффективность реакции фотоизомеризации ретиналевого хромофора.

3. Физиологическая активация родопсина

Фотохимическая реакция изомеризации хромофора в родопсине инициирует переход молекулы зрительного пигмента в физиологически активное состояние. Стадии этого перехода представлены на рис. 5. Как уже отмечалось выше, фотородопсин в течение 1 пс превращается в следующий промежуточный продукт фотолиза — батородопсин. Запасенная на стадии батородопсина энергия поглощенного кванта света (~ 35 ккал · моль⁻¹, что составляет около 60% энергии поглощенного кванта¹¹²) используется для конформационных перестроек сначала ближайшего белкового окружения хромофорной группы, а затем, на последующих стадиях фотолиза, — всей белковой части молекулы: внутримембранного (семи α -спиральных «тяжей») и цитоплазматического доменов. До стадий образования люмиродопсина и метародопсина I конформационные изменения ограничиваются в основном хромофорным доменом.

Наиболее важные внутримолекулярные события происходят при переходе от метародопсина I к метародопсину II: а) перенос протона от PSB к противоположному Glu113; б) смещение III, V и особенно VI α -спиральных «тяжей» во внутримембранном домене; в) поглощение протона ионным «замком», расположенным между III и VI α -спиральными «тяжами». При переходе от метародопсина I к метародопсину II (миллисекундная шкала времени) последовательно образуются спектрально идентичные формы последней — Meta IIa, Meta IIb и Meta IIbH⁺ (см.¹⁴⁴).

Что касается поглощения протона ионным «замком», то впервые этот феномен был обнаружен нами еще в середине 80-х годов прошлого века.¹⁴⁵ Было показано, что образование метародопсина II сопровождается поглощением и связыванием протона, а не его переносом через мембрану, как это происходит в случае бактериородопсина. Впоследствии стало ясно, что внутримолекулярный перенос протона лежит в основе двухстадийного процесса переключения родопсина из его темнового (неактивного) в физиологически активное состояние.¹⁴⁶

В работах^{147, 148} для исследования фотолиза родопсина использовали метод спектроскопии ЭПР с переносом насыщения и спиновые метки, ковалентно связанные с доступными (гидрофильными) SH-группами цистеиновых остатков (Cys140 и Cys316). Нам впервые удалось зарегистрировать увеличение конформационной подвижности цитоплазматических петель при превращении родопсина в метародопсин II

и уменьшение их подвижности при обратном фотопереходе из метародопсина II в смесь продуктов, включающую фоторегенерированный родопсин и метародопсин III. Тот факт, что именно эти два остатка цистеина — Cys140 и Cys316 — доступны в темновом родопсине для связывания со спиновыми метками, позже был подтвержден другими авторами.¹⁴⁹

Темновая регенерация родопсина — возвращение 11-цис-ретиналя в хромофорный центр опсина — приводит, как нами недавно было показано, к восстановлению темнового конформационного состояния родопсина. В то же время при действии света вновь регистрируется фотоиндуцированный конформационный ответ регенерированного родопсина.¹⁵⁰

Ковалентное связывание спиновых меток с SH-группами проводили как для нативных цистеиновых остатков (Cys140/Cys167/Cys185/Cys222/Cys264/Cys316), присутствующих в полипептидной цепи родопсина, так и для цистеиновых остатков, искусственно введенных в эту цепь с помощью современных методов направленного мутагенеза. Такой подход позволил определить ключевые конформационные изменения, которые совершаются в молекуле родопсина в ходе ее физиологической активации (см. статьи^{26, 151–153}, а также обзоры^{154, 155}).

Одними из принципиально важных конформационных перестроек являются смещения III, V и VI, а также других α -спиральных трансмембранных «тяжей» при превращении родопсина в метародопсин II. Эти смещения прямо сопряжены с формированием в цитоплазматическом домене мест связывания с С-концевым полипептидным фрагментом α -субъединицы трехсубъединичного G-белка трансдуцина.

Авторы опубликованной недавно работы¹⁵¹, используя современные методы мутагенеза и осуществив 28 точечных цистеиновых замен, показали, что при переходе родопсина в фотоактивированное состояние метародопсина II становятся доступными для молекул воды аминокислотные остатки III α -спирального трансмембранного «тяжа», расположенные вблизи хромофорной группы. Иными словами, было отчетливо продемонстрировано увеличение пространства вокруг лиганда-агониста (остатка *транс*-ретиналя) при переходе родопсина в физиологически активное состояние. Увеличение объема хромофорного центра было обнаружено и при рентгеноструктурных исследованиях (см. ниже).

По крайней мере два обстоятельства объясняют успехи последних лет в исследовании структуры активированного состояния родопсина. Они принципиально важны для понимания механизмов активации как самого родопсина, так и родопсинподобного семейства G-белок-связывающих рецепторов класса А. Первое обстоятельство — это реальная возможность сравнения получаемой структуры родопсина в темновом и активированном светом состояниях с огромным массивом уже существующих спектроскопических, биохимических и генетических данных (см., например,^{156, 157}). Второе обстоятельство состоит в том, что для кристаллизации и определения трехмерной структуры родопсин может быть получен в достаточных количествах как из нативных фоторецепторных мембран, так и в виде рекомбинантного белка.

Этими обстоятельствами объясняется тот факт, что родопсин стал первым трансмембранным белком животного происхождения, структура которого надежно установлена. В то же время первым мембранным белком, для которого была определена первичная структура, был бактериородопсин — мембранный белок бактериального происхождения.^{158, 159} Для зрительного родопсина сначала была получена трехмерная структура в темновом состоянии,^{11, 15} затем структуры термостабильного рекомбинантного

мутанта родопсина¹⁶⁰ и его нескольких метастабильных промежуточных продуктов, содержащих остаток *транс*-ретиналя в хромофорном центре,^{161, 162} и, наконец, физиологически активированного апобелка опсина, не включающего ретиналь.¹⁶³

Довольно долго не удавалось кристаллизовать родопсин в его физиологически активном состоянии (метародопсин II), поскольку он оказался крайне нестабильным. Однако было установлено, что метародопсин II образует устойчивый комплекс с С-концевым пептидом α -субъединицы трансдуцина. В 2008 г. была опубликована первая работа¹⁶⁴ с использованием такого комплекса, в которой описывалась кристаллизация опсина. После выхода этой статьи появилась надежда на кристаллизацию и самого метародопсина II в комплексе. Действительно, в 2011–2012 гг. были описаны стабильные структуры активированного родопсина, содержащие остаток *транс*-ретиналя как агониста, подобно нативному метародопсину II.^{35, 165, 166}

Следует помнить, что в нативной фоторецепторной мембране метародопсин II образуется в результате фотоиндуцированного превращения антагониста, т.е. ковалентно связанного с опсином (точнее, с Lys296) остатка 11-цис-ретиналя, в мощный лиганд-агонист — остаток полностью *транс*-ретиналя. Важно, что полностью *транс*-ретиналь также ковалентно связан с тем же аминокислотным остатком опсина и остается в тесном белковом окружении хромофорного центра. Однако на стадии метародопсина II становятся существенно больше и объем хромофорного центра (850 \AA^3 против 660 \AA^3 в темновом состоянии родопсина), и поверхность взаимодействия остатка ретиналя с аминокислотным окружением ($\sim 300 \text{ \AA}^2$ против $\sim 230 \text{ \AA}^2$).¹¹ Результаты других работ также указывают на то, что превращение лиганда-антагониста в лиганд-агонист сопровождается увеличением объема хромофорного центра (см., например,¹⁵¹). На самом деле увеличение объема этого центра после фотоизомеризации остатка 11-цис-ретиналя происходит раньше, чем образуется метародопсин II, а именно на стадии образования люмиродопсина, в котором объем хромофорного центра составляет $\sim 890 \text{ \AA}^3$ (см.¹⁶²).

Возвращаясь к комплексу α -субъединицы трансдуцина с метародопсином II, содержащим остаток полностью *транс*-ретиналя, следует отметить, что стратегия его получения в указанных выше работах несколько различалась. В работе¹⁶⁶ сначала был получен кристалл опсина, в который вводили *транс*-ретиналь (*all-trans*-I). Однако положение остатка ретиналя в хромофорном центре опсина оставалось при этом неясным.

В двух других работах комплекс содержал родопсин с определенными точечными мутациями.^{35, 165} Одна из них была в хромофорном центре — Glu113Gln.¹⁶⁵ Она позволяла нейтрализовать противоион шиффова основания Glu113, предотвращая тем самым диссоциацию *транс*-ретиналя из хромофор-связывающего центра. Однако при такой мутации ковалентная связь между ретиналем и опсином, в отличие от нативного метародопсина II, не сохранялась. В работе³⁵, опубликованной в 2012 г., мутация находилась вблизи G-белок-связывающего центра — Met257Tyr. При этом и сам хромофорный центр, и ковалентная связь остатка 11-цис-ретиналя с Lys296 опсина оставались такими же, как в нативном метародопсине II. Более того, при введении в этот комплекс извне лиганда-антагониста (11-цис-ретиналя) активация трансдуцина была полностью подавлена. В то же время при фотоизомеризации 11-цис-ретиналя в *транс*-форму, т.е. в лиганд-агонист, комплекс метародопсина II с С-концевым пептидом активировался, подобно тому как

активируется по механизму фототрансдукции нативный метародопсин II. Таким образом, был получен стабильный, обладавший постоянной активностью комплекс метародопсина II с C-концевым пептидом α -субъединицы трансдуцина. Структура этого комплекса была подробно изучена.

Следует отметить, что постоянно активированное состояние мутированных G-белок-связывающих рецепторов описано довольно давно. Оно может возникать вследствие даже незначительного нарушения взаиморасположения α -спиральных «тяжей» в трансмембранном домене, что приводит к ненормальному повышению их конформационной подвижности. Такое состояние мутированных рецепторов является причиной целого ряда заболеваний,¹⁶⁷ например в случае родопсина вызывает серьезные глазные заболевания: врожденную стационарную ночную слепоту («куриную слепоту»)¹⁶⁸ и пигментный ретинит.⁵⁸ В этой связи мутация Met257Tyr, не вызывающая существенных структурных перестроек, но приводящая к возникновению постоянно активированного состояния родопсина,³⁵ может служить ярким примером драматического изменения функциональных свойств G-белок-связывающего рецептора в результате всего лишь одной точечной мутации.

На основании результатов трех последних работ^{35, 165, 166}, которые находятся в хорошем соответствии друг с другом, а также большого количества других исследований, выполненных с помощью спектроскопии ЯМР, ЭПР, Фурье-ИК-спектроскопии и ряда других методов, можно описать структурные перестройки в родопсине, происходящие после фотоизомеризации остатка 11-цис-ретиналя и приводящие к его взаимодействию с G-белком трансдуцином.

Изомеризация и вращение ретиналя в хромофорном центре приводит к смещению на 4 Å β -иононового кольца в пространстве между V и VI трансмембранными α -спиральными «тяжами». Далее происходит «расхождение» II, VI и VII «тяжей» вблизи хромофорного центра и увеличение объема последнего по сравнению с темновым состоянием. В совокупности с одновременным смещением Ser298 в VII и Trp265 в VI «тяжах» появляется «свободное» пространство между хромофорным центром и кластером молекул связанной воды. Участие связанной воды в механизме активации родопсина сейчас активно исследуется и обсуждается.^{15, 69, 82–85}

Таким образом, можно перечислить несколько ключевых событий в процессе перехода родопсина в физиологически активное состояние. Одно из них — внутримолекулярный перенос протона от PSB к противоположному Glu113 в III трансмембранном «тяже».^{146, 169} Расстояние между атомом азота основания Шиффа и δ -атомом углерода остатка Glu113 возрастает до 6.6 Å,³⁵ что находится в хорошем соответствии с рядом других рентгеноструктурных данных.^{163–166, 169} Это обстоятельство еще раз доказывает принципиальную важность существования и сохранения ковалентной связи между ретиналем и опсином в метародопсине II для физиологической активации родопсина.

Другое ключевое событие — внутримолекулярное смещение и вращение β -иононового кольца ретиналя в пространстве между V и VI α -спиральными «тяжами». Именно эти «тяжи» трансмембранного домена претерпевают наибольшие конформационные изменения в ходе физиологической активации родопсина. Согласно данным РСА и спектроскопии ЯМР, при этом увеличивается расстояние между III и V α -спиральными «тяжами» и смещается вторая внутрискладчатая петля.^{35, 170, 171} Вращение β -иононового кольца приводит к высвобождению триптофана Trp265 в α -спирали VI, что, в свою очередь, вызывает перестройку

сети водородных связей. Такая перестройка существенно облегчает изменение угла наклона VI трансмембранного «тяжа», и, главное, она распространяется от остатка ретиналя в хромофорном центре до места связывания G-белка трансдуцина в гидрофильном цитоплазматическом домене родопсина, т.е. на расстояние порядка 40 Å (рис. 10). Следует отметить, что аминокислотные остатки, вовлеченные в перестройку сети водородных связей (кластера молекул воды, объединенных водородными связями), исключительно консервативны во всем родопсин-подобном классе A G-белок-связывающих рецепторов (см. обзор¹²).

Таким образом, фрагмент полностью *транс*-ретиналя, «не помещающийся» после изомеризации 11-цис-двойной связи в хромофорном «кармане», инициирует каскад активированных конформационных состояний белковой части молекулы, что, в конечном счете, приводит к формированию в области гидрофильного цитоплазматического домена «щели», в которую «входит» C-полипептидный конец α -субъединицы G-белка трансдуцина.^{19, 27, 144, 155} Далее конформационный сигнал распространяется до нуклеотид-связывающего центра трансдуцина, что приводит к обмену гуанозиндифосфата (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ) и диссоциации трансдуцина на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы (см. рис. 10). Детали механизма передачи этого конформационного сигнала к трансдуцину пока остаются неясными.

Установление молекулярных механизмов связывания и активации G-белка на примере родопсина имеет принципиальное значение для понимания механизмов работы обширного семейства G-белок-связывающих рецепторов и для поиска на этой основе новых лекарственных средств. В настоящее время современной фарминдустрией прилагаются исключительные усилия и вкладываются огромные средства для поиска новых препаратов, направленных на регуляцию работы G-белок-связывающих рецепторов и их взаимодействия с G-белком.

4. Гидролиз C=N-связи шиффова основания с образованием опсина и *транс*-ретиналя

а. Свободный опсин

На последней стадии фотолиза родопсина происходит гидролиз иминиевой связи и высвобождение в липидный бислой фоторецепторной мембраны свободного ретиналя all-*транс*-1 (см. рис. 6). В результате в мембране остается апобелок опсин, не содержащий хромофорной группы, а *транс*-ретиналь удаляется из мембраны. При обесцвечивании значительного количества родопсина в наружном сегменте фоторецепторной клетки соответственно накапливается значительное количество опсина. Как выяснилось, этот белок сам обладает способностью связывать и активировать трансдуцин, однако его эффективность как G-белок-связывающего рецептора исключительно низка и составляет около 10^{-6} от активности метародопсина II.¹⁴⁴ Тем не менее даже такая чрезвычайно низкая эффективность имеет для фоторецепторных клеток физиологическое значение, прежде всего для процесса их световой адаптации.

Связывая и активируя трансдуцин, свободный опсин способен инициировать процесс фототрансдукции, что создает в зрительной клетке так называемый «эквивалентный фоновый свет», существование которого было предположено еще в начале 30-х годов прошлого века.¹⁷² «Эквивалентный фоновый свет» понижает чувствительность фоторецепторной клетки к свету (десенситизирует палочку) и, таким образом, служит важным звеном в молекулярном механизме ее

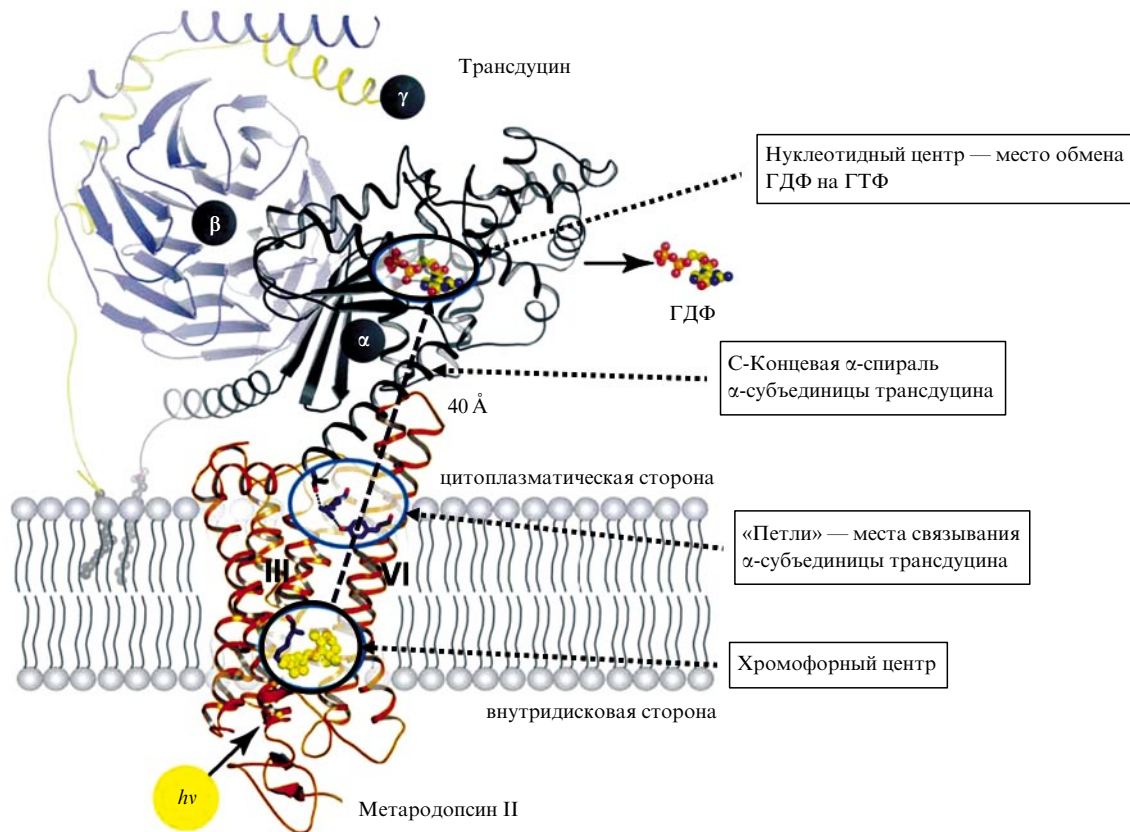


Рис. 10. Схема взаимодействия метародопсина II с трансдуцином (модифицированный рисунок из работы¹⁴⁴). α , β , γ — субъединицы трансдуцина.

световой адаптации. Последующая регенерация зрительного пигмента приводит к исчезновению неспецифического сигнала, поскольку в темновом состоянии родопсина, как обсуждалось выше, хромофорная группа является мощным лигандом-антагонистом. Иными словами, регенерация зрительного пигмента является ключевым звеном в механизме темновой адаптации зрительных клеток.

Отсутствие в адаптированной к темноте палочке свободного опсина и, следовательно, «эквивалентного фонового света», а также чрезвычайно низкой темновой, тепловой «шум» (см. выше) позволяет ей детектировать всего один поглощенный квант света и передавать информацию об этом событии следующим нервным клеткам сетчатки, а затем в мозг.^{97, 173–175}

б. Свободный *транс*-ретиналь

Свет выступает в зрении не только как носитель информации, но и потенциально опасный повреждающий фактор. Это так называемый фотобиологический парадокс зрения.⁷² В ходе эволюции он был успешно разрешен: наряду с системой фоторецепции в органах зрения сформировалась многоуровневая система защиты от опасности повреждения.^{72, 176, 177} Эпидемиологические данные свидетельствуют об усугубляющем действии света (в первую очередь ближней ультрафиолетовой и коротковолновой видимой областей спектра) на развитие дегенеративных заболеваний сетчатки, прежде всего такого тяжелого и распространенного, как возрастная макулярная дегенерация сетчатки (см.^{71, 178}).

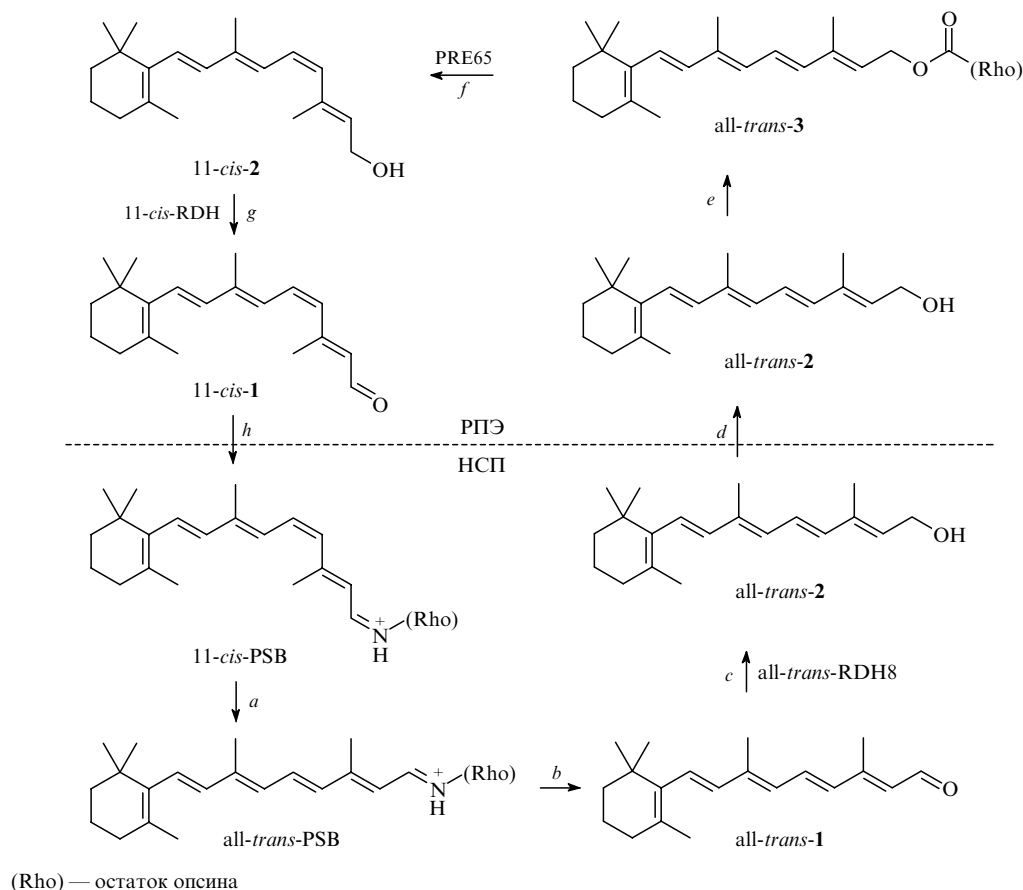
Фоторецепторные клетки и клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) высокочувствительны к фото-

окислительному стрессу. В них присутствуют все три фактора, определяющие развитие такого стресса по механизму свободнорадикального фотоокисления: фотосенсибилизаторы, кислород и легко окисляющиеся субстраты (полиненасыщенные жирные кислоты, ПНЖК). Фотосенсибилизаторами в основном являются ретиноиды — продукты превращения высвободившегося в результате фотолиза *транс*-ретиналя (1). Это соединение и продукты его превращения являются довольно токсичными и фототоксичными. Выступая в качестве фотосенсибилизаторов, они способны повредить искусственные мембраны,^{179–181} белки (например, родопсин) и липиды в фоторецепторной мембране,^{182, 183} а также фоторецепторные клетки сетчатки, что показывают эксперименты на генетически модифицированных мышцах.^{184, 185}

Для удаления из фоторецепторной мембраны и детоксикации свободного *транс*-ретиналя, синтеза и доставки к опсину нового 11-*цис*-изомера и, в конечном счете, восстановления (регенерации) темнового состояния зрительного пигмента в ходе эволюции органов зрения позвоночных сформировался так называемый зрительный цикл родопсина (схема 1) (см. обзор¹⁸⁶). В этом цикле принимают участие две клеточные структуры — наружный сегмент палочки и колбочки и прилежащие к ним клетки монослоя РПЭ, в которых большое количество ферментов ответственны за удаление *транс*-ретиналя, синтез и доставку нового 11-*цис*-изомера. Нарушение любой стадии зрительного цикла, как правило, приводит к дистрофическим заболеваниям сетчатки.

На стадии *a* (см. схему 1) происходит фотоизомеризация хромофорной группы родопсина, 11-*цис*-ретиналя, в *транс*-изомер, на стадии *b* — высвобождение полностью *транс*-

Схема 1



ретиная из опсина на последней стадии фотолиза и переход его в липидную фазу мембраны. Удаление из фоторецепторной мембраны *транс*-ретиная обеспечивают в зрительном цикле два фермента — полностью-*транс*-ретинолдегидрогеназа 8 (*all-trans*-RDH8) и АТФ-зависимый переносчик — мембранный белок ABCR4. Фермент RDH8 в реакции, катализируемой никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (NADPH), восстанавливает соединение *all-trans*-1 до нетоксичной спиртовой формы — *транс*-ретинола (*all-trans*-2). Стадия *c* осуществляется на наружной (цитоплазматической) стороне фоторецепторной мембраны. Затем происходит перенос *транс*-ретинола из наружного сегмента фоторецепторной клетки в клетку РПЭ с помощью ретинол-переносящего белка. За стадией образования *транс*-изомера эфира **3** (стадия *e*) следуют темновая изомеризация и гидролиз до 11-*цис*-ретинола (11-*cis*-2) под действием изомерогидролазы RPE65 (стадия *f*). Образовавшийся при участии изомерогидролазы 11-*цис*-ретинол **2** окисляется ферментом 11-*цис*-ретинолдегидрогеназой в 11-*цис*-ретинаяль (стадия *g*). Перенос последнего из клетки РПЭ в наружный сегмент фоторецепторной клетки (НСП) осуществляется с помощью ретинаяль-переносящего белка. Доставка 11-*цис*-ретинаяля к апобелку и встраивание его в хромоформный центр опсина завершает зрительный цикл (см. схему 1).

Как недавно было показано в экспериментах на генетически модифицированных мышах, восстановление *транс*-ретиная в *транс*-ретинол не зависит от присутствия АТФ-зависимого кассетного переносчика (ABCR4), арестина, родопсиновой киназы и пальмитилирования родопсина, т.е. факторов, влияющих на удаление *транс*-ретиная из фоторецепторной мембраны.¹⁸⁷ Функция ABCR4 состоит также в

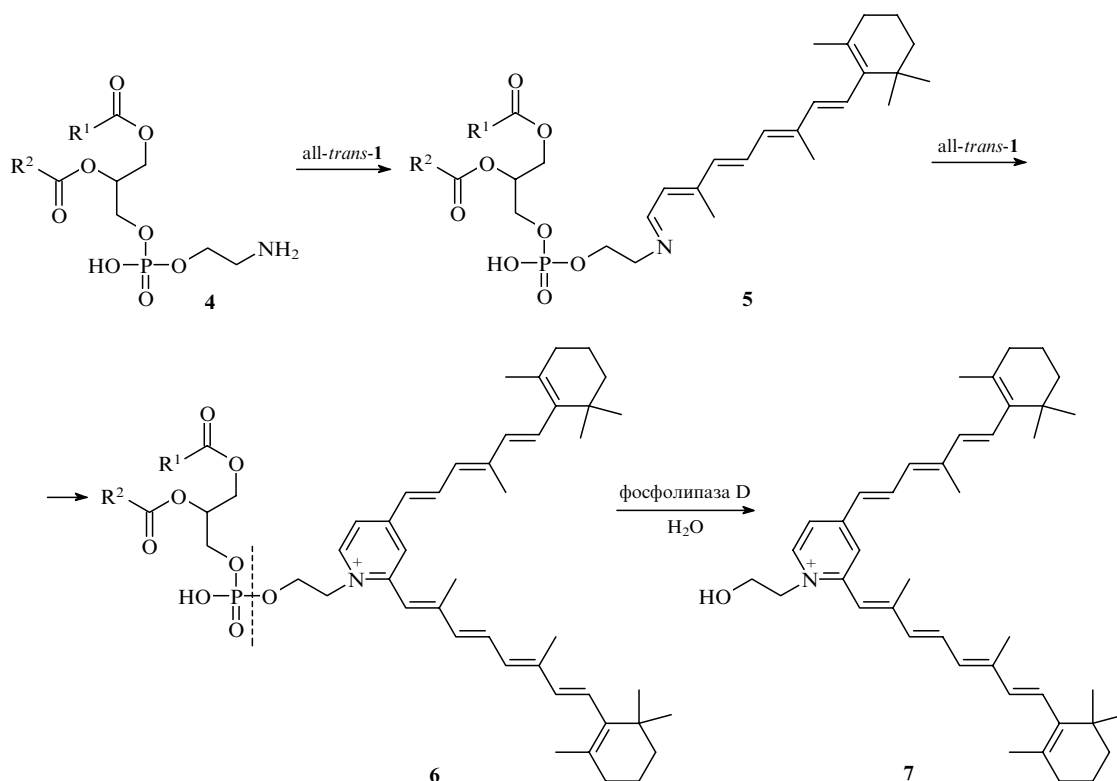
переносе соединения *all-trans*-1 через мембрану, однако механизм такого переноса до конца не ясен (см. обзор¹⁸⁸). Вопрос о том, как именно в зрительном цикле согласована работа этих двух ферментов (RDH8 и ABCR4), локализованных в различных частях фоторецепторного диска, тоже остается открытым (см. обзор¹⁸⁸).

Следует отметить, что естественным субстратом для ABCR4 является не столько *транс*-ретинаяль, сколько продукт его взаимодействия с одним из трех основных фосфолипидов фоторецепторной мембраны — фосфатидилэтаноламинамином (**4**). Этот продукт — *N*-ретинилиденфосфатидилэтаноламин (**5**) (формулу см. на схеме 2).^{189–191}

Большое внимание к белку ABCR4 объясняется тем, что с его дефектами связаны дегенеративные заболевания сетчатки, в первую очередь уже упоминавшаяся болезнь Штаргардта (см. обзор⁷¹). Дефекты ABCR4 приводят к массивному накоплению в клетках РПЭ внутриклеточных включений — «пигмента старости», или липофусциновых гранул (ЛГ), которые содержат более десятка флуорофоров ретиноидной природы — конъюгатов *транс*-ретинаяля.^{192–194} На схеме 2 представлен путь образования из *транс*-ретинаяля ретиноидов — *N*-ретинилиденфосфатидилэтаноламина (A2PE, **5**), бис(ретинилиден)фосфатидилэтаноламина (**6**) и бис(ретинилиден)этаноламина (A2E, **7**). Первым из флуорофоров был идентифицирован и охарактеризован A2E.

Токсическое и фототоксическое действие на клетку РПЭ способны оказывать как сами ЛГ, так и неокисленные, окисленные и/или фотоокисленные формы содержащихся в них флуорофоров, образование которых было показано в экспериментах *in vitro*^{193, 195} и *in vivo*.^{196, 197}

Схема 2



R¹, R² — углеводородные остатки ПНЖК

К факторам риска при нарушении зрительного цикла родопсина относятся в первую очередь фотоиндуцированное видимым светом генерирование флуорофорами активных форм кислорода;^{196, 198–200} высвобождение из ЛГ при освещении фотоокисленных продуктов А2Е, способных инициировать апоптоз клеток РПЭ;²⁰¹ нарушение «переваривающей» функции лизосом, что приводит к образованию и накоплению ЛГ в клетках РПЭ;²⁰² способность А2Е специфически ингибировать RPE65 (ключевой фермент зрительного цикла)²⁰³ и ряд других факторов. Фотосенсибилизаторами хорошо известной опасности повреждающего действия на сетчатку и РПЭ коротковолновой области видимого света (blue light hazard)^{204, 205} могут выступать ретиноиды, поглощающие в этой области спектра. Об этом свидетельствует, в частности, спектр действия фотоповреждения, определенный в многочисленных биохимических, цитологических, электрофизиологических и психофизиологических исследованиях (см. обзоры^{72, 206–209}).

Поскольку спектры поглощения и, соответственно, флуоресценции неокисленных и окисленных продуктов флуорофоров ЛГ различаются, то на регистрации этих различий мог бы быть основан компонентный анализ картины аутофлуоресценции глазного дна. В основе этого нового неинвазивного метода диагностики старческих изменений и дегенеративных заболеваний сетчатки лежит регистрация аутофлуоресценции флуорофоров, в основном содержащихся в ЛГ.

В последнее время появились работы^{210, 211}, согласно которым клетки, являющиеся источником 11-*цис*-ретинала, необходимого для заключительной стадии регенерации зрительных пигментов палочек и колбочек, неодинаковы. Клетки РПЭ важны и для тех, и для других, однако для регенерации пигментов колбочек дополнительным источ-

ником 11-*цис*-ретинала являются также глиальные мюллеровские клетки самой сетчатки.^{212, 213}

Как уже отмечалось выше, ключевую роль в синтезе 11-*цис*-ретинала для обоих типов фоторецепторных клеток играет фермент RPE65 — изомерогидролаза, находящаяся в клетке РПЭ и изомеризующая *транс*-ретинол (all-*trans*-2) в 11-*цис*-форму (см. схему 1). Следует подчеркнуть, что механизм работы данного фермента остается не совсем ясным, хотя попытки его объяснения активно предпринимаются.²¹⁴ Этот вопрос представляет большой интерес для химии стереоспецифически изомеризующих ферментов. Как показано совсем недавно,²¹⁵ изомерогидролаза в глиальных мюллеровских клетках, предназначенная для регенерации колбочковых пигментов, в определенной степени отличается от изомерогидролазы RPE65 (например, 22% аминокислотной последовательности не совпадают).

На ингибировании активности RPE65 основана в последнее время стратегия поиска препаратов, способных задерживать развитие дегенеративных заболеваний сетчатки, в первую очередь болезни Штаргардта и так называемой «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации сетчатки. Речь идет о том, чтобы замедлить работу зрительного цикла и таким образом уменьшить накопление в наружных сегментах фоторецепторных клеток (фото)токсичных побочных продуктов фотолиза — ретиноидов. Показано, что перехватчик свободных радикалов α -фенил-*N*-трет-бутилнитрон (PBN), способный защитить сетчатку от фотоповреждения, ингибирует ферментативную активность RPE65, замедляя тем самым скорость регенерации родопсина.²¹⁶ На этом же принципе — подавлении зрительного цикла и регенерации родопсина — основано действие нового лекарственного препарата ACU-4429, недавно выпущенного на рынок американской фирмой Acucela.

Механизм встраивания и превращения 11-*цис*-ретинала в хромофорную группу (стадия *h* на схеме 1) также требует дальнейших экспериментальных и теоретических исследований. Предложена «туннельная гипотеза», пытающаяся объяснить этот механизм.^{217,218} Согласно этой гипотезе, в молекуле родопсина существуют «входной» (для 11-*цис*-ретинала) и «выходной» (для *транс*-изомера) хромофорные сайты, где встраивание 11-*цис*-ретинала в хромофорный центр сопряжено с освобождением «выходного» сайта. Однако, судя по появляющимся данным,²¹⁹ такое предположение вызывает определенные сомнения. Поскольку реакция образования в хромофорном центре ковалентной связи между хромофором и белком является необратимой, то поток 11-*цис*-ретинала, доставляемого из РПЭ и мюллеровских клеток к наружным сегментам палочек и колбочек, и, соответственно, зрительный цикл фактически регулируются количеством свободного опсина в фоторецепторной мембране зрительных клеток.

Таким образом, зрительный цикл демонстрирует, каким путем высободившийся в ходе фотолиза *транс*-ретинол в результате внутри- и межклеточного переносов и каскада ферментативных реакций вновь превращается в 11-*цис*-ретинол, который возвращается затем в хромофорный центр опсина. В итоге завершается процесс восстановления (регенерации) темного состояния родопсина в палочке и зрительного пигмента в колбочке сетчатки глаза позвоночных животных и человека.

* * *

Зрительный пигмент родопсин выполняет в механизме зрительной рецепции несколько ключевых физиологических функций, обеспечивающих спектральную чувствительность фоторецепторных клеток, процессы фототрансдукции, световой и темновой адаптации. Генетически обусловленные дефекты как самой молекулы зрительного пигмента, так и белков, вовлеченных в механизмы фототрансдукции и адаптации или в механизм зрительного цикла, прямо связаны с патогенезом различных форм дегенеративных заболеваний сетчатки. Понимание структуры и физико-химических механизмов функционирования светочувствительных зрительных пигментов открывает путь для направленного исследования патогенеза тяжелых глазных заболеваний и создания на этой основе современных нанотехнологических устройств.

Литература

1. C.Darwin. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London, 1859. P. 186
2. T.D.Lamb, S.P.Collin, E.N.Pugh Jr. *Nature Rev. Neurosci.*, **8**, 960 (2007)
3. T.D.Lamb. *Philos. Trans. R. Soc. London, B: Biol. Sci.*, **364**, 2911 (2009)
4. T.D.Lamb. *Sci. Am.*, **305**, 64 (2011)
5. J.A.Fuhrman, M.S.Schwalbach, U.Stingl. *Nature Rev. Microbiol.*, **6**, 488 (2008)
6. M.Grote, M.A.O'Malley. *FEMS Microbiol. Rev.*, **35**, 1082 (2011)
7. C.Consani, O.Braem, A.A.Oskouei, R.M.van der Veen, A.Elnahas, A.Cannizzo, G.Auböck, F.van Mourik, M.Chergui. *Chimia (Aarau)*, **65**, 683 (2011)
8. D.Polli, P.Altoè, O.Weingart, K.M.Spillane, C.Manconi, D.Brida, G.Tomasello, G.Orlandi, P.Kukura, R.A.Mathies, M.Garavelli, G.Cerullo. *Nature (London)*, **467**, 440 (2010)
9. A.Yabushita, T.Kobayashi, M.Tsuda. *J. Phys. Chem. B*, **116**, 1920 (2012)
10. T.J.Martinez. *Nature (London)*, **467**, 412 (2010)
11. J.Li, P.C.Edwards, M.Burghammer, C.Villa, G.F.Schertler. *J. Mol. Biol.*, **343**, 1409 (2004)
12. X.Deupi, J.Standfuss. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 541 (2011)
13. Ю.А.Овчинников, Н.Г.Абдулаев, М.Ю.Фейгина, И.Д.Артамонов, А.С.Золотарев, М.Б.Костина, А.С.Богачук, А.И.Мирошников, В.И.Мартынов, А.Б.Куделин. *Биоорг. химия*, **8**, 1424 (1982)
14. P.A.Hargrave, J.H.Mcdowell, D.R.Curtis, J.K.Wang, E.Juszczak, S.L.Fong, J.K.Rao, P.Argos. *Biophys. Struct. Mech.*, **9**, 235 (1983)
15. 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. *Science*, **289**, 739 (2000)
16. G.F.J.Salgado, A.V.Struts, K.Tanaka, N.Fujioka, K.Nakanishi, M.F.Brown. *Biochemistry*, **43**, 12819 (2004)
17. D.C.Teller, T.Okada, C.A.Behnke, K.Palczewski, R.E.Stenkamp. *Biochemistry*, **40**, 7761 (2001)
18. M.Sugihara, V.Buss, P.Entel, M.Elstner, T.Frauenheim. *Biochemistry*, **41**, 15259 (2002)
19. S.O.Smith. *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 309 (2010)
20. T.Okada, M.Sugihara, A.-N.Bondar, M.Elstner, P.Entel, V.Buss. *J. Mol. Biol.*, **342**, 571 (2004)
21. J.Saam, E.Tajkhorshid, S.Hayashi, K.Schulten. *Biophys. J.*, **83**, 3097 (2002)
22. P.S.Crozier, M.J.Stevens, L.R.Forrest, T.B.Woolf. *J. Mol. Biol.*, **333**, 493 (2003)
23. R.S.H.Liu, L.U.Colmenares. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14639 (2003)
24. A.Cordomi, J.J.Perez. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **27**, 127 (2009)
25. S.Hayashi, E.Tajkhorshid, K.Schulten. *Biophys. J.*, **96**, 403 (2009)
26. V.Hornak, S.Ahuja, M.Eilers, J.A.Goncalves, M.Sheves, P.J.Reeves, S.O.Smith. *J. Mol. Biol.*, **396**, 510 (2010)
27. B.Mertz, A.V.Struts, S.E.Feller, M.F.Brown. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 241 (2012)
28. I.Schapiro, M.N.Ryazantsev, L.M.Frutos, N.Ferre, R.Lindh, M.Olivucci. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 3354 (2011)
29. S.T.Menon, M.Han, T.P.Sakmar. *Physiol. Rev.*, **81**, 1659 (2001)
30. W.L.Hubbell, C.Altenbach, C.M.Hubbell, H.G.Khorana. *Adv. Protein Chem.*, **63**, 243 (2003)
31. Y.Liang, D.Fotiadi, S.Filipek, D.A.Saperstein, K.Palczewski, A.Engel. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21655 (2003)
32. B.Borhan, M.L.Souto, H.Imai, Y.Shichida, K.Nakanishi. *Science*, **288**, 2209 (2000)
33. T.Okada, O.P.Ernst, K.Palczewski, K.P.Hofmann. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 318 (2001)
34. J.E.Kim, D.Pan, R.A.Mathies. *Biochemistry*, **42**, 5169 (2003)
35. X.Deupi, P.Edwards, A.Singhal, B.Nickle, D.Oprian, G.Schertler, J.Standfuss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 119 (2012)
36. P.J.R.Spooner, J.M.Sharple, S.C.Goodall, P.H.M.Bovee-Geurts, M.A.Verhoeven, J.Lugtenburg, A.M.A.Pistorius, W.J.De Grip, A.Watts. *J. Mol. Biol.*, **343**, 719 (2004)
37. G.Gröbner, I.J.Burnett, C.Glaubit, G.Choi, A.J.Mason, A.Watts. *Nature (London)*, **405**, 810 (2000)
38. P.L.Yeagle, G.Choi, A.D.Albert. *Biochemistry*, **40**, 11932 (2001)
39. S.O.Smith, J.Courtin, H.J.M.de Groot, R.Gebhard, J.Lugtenburg. *Biochemistry*, **30**, 7409 (1991)
40. A.F.L.Creemers, S.Kühne, P.H.M.Bovee-Geurts, W.J.De Grip, J.Lugtenburg, H.J.M.de Groot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9101 (2002)
41. S.Ahuja, M.Eilers, A.Hirshfeld, E.C.Y.Yan, M.Ziliox, T.P.Sakmar, M.Sheves, S.Smith. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 15160 (2009)
42. J.A.Gascon, E.M.Sproviero, V.S.Batista. *Acc. Chem. Res.*, **39**, 184 (2006)

43. K.T.Kholmurodov, T.B.Feldman, M.A.Ostrovsky. *Mendeleev Commun.*, 1 (2006)
44. Т.Б.Фельдман, Х.Т.Холмуродов, М.А.Островский. *Письма в ЭЧАЯ (Элементарные частицы атомного ядра)*, **5**, 226 (2008)
45. Т.Б.Фельдман, Х.Т.Холмуродов, М.А.Островский, М.Г.Хренова, А.В.Немухин. *Биофизика*, **54**, 660 (2009)
46. P.W.Lau, A.Grossfield, S.E.Feller, M.C.Pitman, M.F.Brown. *J. Mol. Biol.*, **372**, 906 (2007)
47. K.B.Bravaya, A.V.Bochenkova, A.A.Granovsky, A.V.Nemukhin. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13035 (2007)
48. P.J.E.Verdegem, P.H.M.Bovee-Geurts, W.J.de Grip, J.Lugtenburg, H.J.M.de Groot. *Biochemistry*, **38**, 11316 (1999)
49. S.W.Lin, M.Groesbeek, I.van der Hoef, P.Verdegem, J.Lugtenburg, R.A.Mathies. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 2787 (1998)
50. G.Gröbner, G.Choi, I.J.Burnett, C.Glaubitz, P.J.Verdegem, J.Lugtenburg, A.Watts. *FEBS Lett.*, **422**, 201 (1998)
51. D.Singh, B.S.Hudson, C.Middleton, R.R.Birge. *Biochemistry*, **40**, 4201 (2001)
52. Y.Imamoto, M.Sakai, Y.Katsuta, A.Wada, M.Ito, Y.Shichida. *Biochemistry*, **35**, 6257 (1996)
53. B.Isin, K.Schulten, E.Tajkhorshid, I.Bahar. *Biophys. J.*, **95**, 789 (2008)
54. J.Nathans. *Biochemistry*, **29**, 937 (1990)
55. T.P.Sakmar, R.R.Franke, H.G.Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8309 (1989)
56. E.A.Zhukovsky, D.D.Oprian. *Science*, **246**, 928 (1989)
57. K.Tsutsui, Y.Shichida. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 1426 (2010)
58. P.R.Robinson, G.B.Cohen, E.A.Zhukovsky, D.D.Oprian. *Neuron*, **9**, 719 (1992)
59. A.Altun, S.Yokoyama, K.Morokuma. *Photochem. Photobiol.*, **84**, 845 (2008)
60. T.Andruniow, N.Ferre, M.Olivucci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17908 (2004)
61. S.Sekharan, V.Buss. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 17220 (2008)
62. M.N.Sandberg, T.L.Amora, L.S.Ramos, M.H.Chen, B.E.Knox, R.R.Birge. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2808 (2011)
63. E.C.Y.Yan, M.A.Kazmi, Z.Ganim, J.-M.Hou, D.Pan, B.S.W.Chang, T.P.Sakmar, R.A.Mathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9262 (2003)
64. S.Ludeke, M.Beck, E.C.Yan, T.P.Sakmar, F.Siebert, R.Vogel. *J. Mol. Biol.*, **353**, 345 (2005)
65. T.B.Feldman, K.T.Kholmurodov, M.A.Ostrovsky. In *Molecular and Nanoscale Systems for Energy Conversion*. (Ed. S.Varfolomeev). Nova Science Publishers, New York, 2008. P. 157
66. M.Nakagawa, T.Iwasa, S.Kikkawa, M.Tsuda, T.G.Ebrey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6189 (1999)
67. A.Terakita, M.Koyanagy, H.Tsukamoto, T.Yamashita, T.Miyata, Y.Shichida. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **11**, 284 (2004)
68. A.Terakita, T.Yamashita, Y.Shichida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14263, (2000)
69. T.Ota, Y.Furutani, A.Terakita, Y.Shichida, H.Kandori. *Biochemistry*, **45**, 2845 (2006)
70. S.Sekharan, K.Morokuma. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19052 (2011)
71. М.А.Островский, Т.Б.Фельдман, М.А.Яковлева, Е.Р.Ловягина, Л.А.Чуркина, М.П.Кирпичников, Д.А.Долгих, О.В.Некрасова, В.А.Коршун, Х.П.Тахчиди, С.А.Борзенко, М.Ф.Шурыгина, Е.К.Гинтер, О.В.Хлебникова, А.В.Поляков. В кн. *Постгеномные исследования и технологии*. (Под ред. С.Д.Варфоломеева). Изд-во МГУ, Москва, 2011. С. 376
72. М.А.Островский. *Успехи биол. химии*, **45**, 173 (2005)
73. D.M.Hunt, L.S.Carvalho, J.A.Cowing, J.W.Parry, S.E.Wilkie, W.L.Davies, J.K.Bowmaker. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 303 (2007)
74. L.S.Carvalho, W.L.Davies, P.R.Robinson, D.M.Hunt. *Proc. Biol. Sci.*, **279**, 387 (2012)
75. A.E.Dontsov, I.B.Fedorovich, M.Lindström, M.A.Ostrovsky. *J. Comp. Physiol. B*, **169**, 157 (1999)
76. M.Jokela-Maatta, J.Pahlberg, M.Lindström, P.P.Zak, M.Porter, M.A.Ostrovsky, Th.W.Cronin, K.Donner. *J. Comp. Physiol. A*, **191**, 1087 (2005)
77. А.Е.Абу Хамидах, Ю.В.Демчук, П.П.Зак, М.Линдстром, М.А.Островский. *Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология*, **2**, 9 (2010)
78. T.Feldman, M.Yakovleva, M.Lindström, K.Donner, M.Ostrovsky. *J. Crustacean Biol.*, **30**, 636 (2010)
79. Е.М.Слободянская, Е.В.Абрашин, А.М.Островский. *Биоорг. химия*, **6**, 223 (1980)
80. И.Ю.Новицкий, П.П.Зак, М.А.Островский. *Спектральная неоднородность красночувствительных колбочек сетчатки. Микроспектрофотометрическое и электрофизиологическое исследование*. Препринт Института химической физики АН СССР, Черноголовка, 1986
81. P.P.Zak, M.A.Ostrovsky, J.K.Bowmaker. *Vision Res.*, **41**, 1755 (2001)
82. M.Murakami, T.Kouyama. *Nature (London)*, **453**, 363 (2008)
83. Y.Furutani, Y.Shichida, H.Kandori. *Biochemistry*, **42**, 9619 (2003)
84. T.E.Angel, M.R.Chance, K.Palczewski. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8555 (2009)
85. T.E.Angel, S.Gupta, B.Jastrzebska, K.Palczewski, M.R.Chance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14367 (2009)
86. K.Katayama, Y.Furutani, H.Imai, H.Kandori. *Biochemistry*, **51**, 1126 (2012)
87. H.Kandori. *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 177 (2000)
88. A.Altun, S.Yokoyama, K.Morokuma. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 16883 (2008)
89. A.Altun, S.Yokoyama, K.Morokuma. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 6814 (2008)
90. S.Sekharan, A.Altun, K.Morokuma. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15856 (2010)
91. S.Sekharan, K.Morokuma. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4734 (2011)
92. T.Yoshizawa, G.Wald. *Nature (London)*, **197**, 1279 (1963)
93. R.W.Schoenlein, L.A.Peteanu, R.A.Mathies, C.V.Shank. *Science*, **4**, 412 (1991)
94. D.A.Baylor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**, 34 (1987)
95. D.A.Baylor, B.J.Nunn, J.L.Schnapf. *J. Physiol.*, **357**, 575 (1984)
96. L.Lagnado, D.Baylor. *Neuron*, **8**, 995 (1992)
97. D.Baylor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 560 (1996)
98. T.D.Lamb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 566 (1996)
99. D.G.Luo, W.W.Yue, P.Ala-Laurila, K.W.Yau. *Science*, **332**, 1307 (2011)
100. J.Liu, M.Y.Liu, J.B.Nguyen, A.Bhagat, V.Mooney, E.C.Y.Yan. *J. Biol. Chem.*, **286**, 27622 (2011)
101. H.J.A.Dartnall. *Vision Res.*, **8**, 339 (1967)
102. J.E.Kim, M.J.Tauber, R.A.Mathies. *Biochemistry*, **40**, 13774 (2001)
103. R.S.Becker, K.Freedman. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1477 (1985)
104. Y.Koyama, K.Kubo, M.Komori, H.Yasuda, Y.Mukai. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 433 (1991)
105. H.Kandori, Y.Katsuda, M.Ito, H.Sasabe. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2669 (1995)
106. G.Haran, E.A.Morlino, J.Matthes, R.H.Callender, R.M.Hochstrasser. *J. Phys. Chem. A*, **103**, 2202 (1999)
107. H.Chosrowjan, N.Mataga, Y.Shibata, S.Tachibana, H.Kandori, Y.Shichida, T.Okada, T.Kouyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9706 (1998)
108. H.Kandori, Y.Furutani, S.Nishimura, Y.Shichida, H.Chosrowjan, Y.Shibata, N.Mataga. *Chem. Phys. Lett.*, **334**, 271 (2001)
109. G.G.Kochendoerfer, R.A.Mathies. *J. Phys. Chem.*, **100**, 14526 (1996)
110. О.А.Смитиенко, И.В.Шелаев, Ф.Е.Гостев, Т.Б.Фельдман, В.А.Надточено, О.М.Саркисов, М.А.Островский. *Докл. АН*, **421**, 277 (2008)
111. О.А.Смитиенко, М.Н.Мозговая, И.В.Шелаев, Ф.Е.Гостев, Т.Б.Фельдман, В.А.Надточено, О.М.Саркисов, М.А.Островский. *Биохимия*, **75**, 34 (2010)
112. A.Cooper. *Nature (London)*, **282**, 531 (1979)

113. G.A.Schick, T.M.Cooper, R.A.Holloway, L.P.Murray, R.R.Birge. *Biochemistry*, **26**, 2556 (1987)
114. H.Ohtani, T.Kobayashi, M.Tsuda, T.G.Ebrey. *Biophys. J.*, **53**, 17 (1988)
115. Y.Shichida, S.Matsuoka, T.Yoshizawa. *Photobiochem. Photobiophys.*, **7**, 221 (1984)
116. Y.Fukada, Y.Shichida, T.Yoshizawa, M.Ito, A.Kodama, K.Tsukida. *Biochemistry*, **23**, 5826 (1984)
117. B.Mao, M.Tsuda, T.G.Ebrey, H.Akita, V.Balogh-Nair, K.Nakanishi. *Biophys. J.*, **35**, 543 (1981)
118. T.Kobayashi, M.Kim, M.Tajji, T.Iwasa, M.Nakagawa, M.Tsuda. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 272 (1998)
119. L.Zhu, J.Kim, R.A.Mathies. *J. Raman Spectrosc.*, **30**, 777 (1999)
120. H.Kandori, H.Sasabe, K.Nakanishi, T.Yoshizawa, T.Mizukami, Y.Shichida. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1002 (1996)
121. М.Н.Мозговая, О.А.Смитиенко, И.В.Шелаев, Ф.Е.Гостев, Т.Б.Фельдман, В.А.Надточено, О.М.Саркисов, М.А.Островский. *Докл. АН*, **435**, 1 (2010)
122. J.E.Kim, R.A.Mathies. *J. Phys. Chem. A*, **106**, 8508 (2002)
123. V.G.Levine, T.M.Martinez. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **58**, 613 (2007)
124. G.Tomasello, G.Olaso-González, P.Altoè, M.Stenta, L.Serrano-Andrés, M.Merchán, G.Orlandi, A.Bottoni, M.Garavelli. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5172 (2009)
125. I.Schapiro, F.Melaccio, E.N.Laricheva, M.Olivucci. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10**, 867 (2011)
126. G.Zgrablić, A.M.Novello, F.Parmigiani. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 955 (2012)
127. В.А.Надточено, О.А.Смитиенко, Т.Б.Фельдман, М.Н.Мозговая, И.В.Шелаев, Ф.Е.Гостев, О.М.Саркисов, М.А.Островский. *Докл. АН*, (2012) (в печати)
128. Q.Wang, R.W.Schoenlein, L.A.Peteanu, R.A.Mathies, C.V.Shank. *Science*, **266**, 422 (1994)
129. T.Kobayashi, T.Saito, H.Ohtani. *Nature (London)*, **414**, 531 (2001)
130. A.M.Virshup, C.Punwong, T.V.Pogorelov, B.A.Lindquist, C.Ко, T.J.Martinez. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 3280 (2009)
131. O.Weingart. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10618 (2007)
132. L.M.Frutos, T.Andruniow, F.Santoro, N.Ferri, M.Olivucci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7764 (2007)
133. А.В.Колесников, Д.А.Кореньяк, С.А.Шуколюков, В.И.Говардовский. *Сенсорные системы*, **25**, 55 (2011)
134. В.А.Кронгауз, Р.Р.Шифрина, И.Б.Федорович, М.А.Островский. *Биофизика*, **20**, 219 (1975)
135. D.S.Kliger, J.S.Horwitz, J.W.Lewis, C.M.Einterz. *Vision Res.*, **24**, 1465 (1984)
136. T.Mizukami, H.Kandori, Y.Shichida, A.-H.Chen, F.Derguini, C.G.Caldwell, C.Biffe, K.Nakanishi, T.Yoshizawa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4072 (1993)
137. B.N.Baker, T.P.Williams. *Vision Res.*, **11**, 449 (1971)
138. В.А.Кронгауз, Р.Р.Шифрина, И.Б.Федорович, М.А.Островский. *Биофизика*, **20**, 419 (1975)
139. В.А.Кронгауз, Р.Р.Шифрина, И.Б.Федорович, М.А.Островский. *Биофизика*, **20**, 426 (1975)
140. M.A.Ostrovsky, H.H.Weetall. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 61 (1998)
141. C.Paternolli, M.Neebe, E.Stura, F.Barbieri, P.Ghisellini, N.Hampf, C.Nicolini. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **88**, 947 (2009)
142. H.Kandori, T.Ichioka, M.Sasaki. *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 251 (2002)
143. M.Yan, L.Rothberg, R.J.Callender. *Phys. Chem. B*, **105**, 856 (2001)
144. K.P.Hofmann, P.Scheerer, P.W.Hildebrand, H.W.Choe, J.H.Park, M.Heck, O.P.Ernst. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 540 (2009)
145. Т.Ф.Шевченко, Г.Р.Каламаров, М.А.Островский. *Сенсорные системы*, **1**, 117 (1987)
146. M.Mahalingam, K.Martinez-Mayorga, M.F.Brown, R.Vogel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17795 (2008)
147. И.Д.Погожева, В.А.Кузнецов, В.А.Лившиц, И.Б.Федорович, М.А.Островский. *Биол. мембраны*, **2**, 880 (1985)
148. И.Д.Погожева, В.А.Кузнецов, В.А.Лившиц, М.А.Островский. *Биол. мембраны*, **2**, 897 (1985)
149. K.Cai, R.Langen, W.L.Hubbell, H.G.Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14267 (1997)
150. П.В.Шелякин, А.Л.Коварский, В.В.Каспаров, Т.Б.Фельдман, М.А.Островский. *Хим. физика*, (2012) (в печати)
151. W.Ou, T.Yi, J.-M.Kim, H.G.Khorana. *PLoS ONE*, **6**, e17398 (2011)
152. J.Klein-Seetharaman, J.Hwa, K.W.Cai, C.Altenbach, W.L.Hubbell, H.G.Khorana. *Biochemistry*, **38**, 7938 (1999)
153. K.Yang, D.L.Farrens, W.L.Hubbell, H.G.Khorana. *Biochemistry*, **35**, 12464 (1996)
154. D.L.Farrens. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 1466 (2010)
155. B.Jastrzebska, Y.Tsybovsky, K.Palczewski. *Biochem. J.*, **428**, 1 (2010)
156. S.Ye, E.Zaitseva, G.Caltabiano, G.F.Schertler, T.P.Sakmar, X.Deupi, R.Vogel. *Nature (London)*, **464**, 1386 (2010)
157. X.E.Zhou, K.Melcher, H.E.Xu. *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 291 (2012)
158. Y.A.Ovchinnikov, N.G.Abdulaev, M.Y.Feigina, A.V.Kiselev, N.A.Lobanov. *FEBS Lett.*, **84**, 1 (1977)
159. H.G.Khorana, G.E.Gerber, W.C.Herlihy, C.P.Gray, R.J.Anderegg, K.Nihei, K.Biemann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046 (1979)
160. J.Standfuss, G.Xie, P.C.Edwards, M.Burghammer, D.D.Oprian, G.F.Schertler. *J. Mol. Biol.*, **372**, 1179 (2007)
161. H.Nakamichi, T.Okada. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 4270 (2006)
162. H.Nakamichi, T.Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12729 (2006)
163. J.H.Park, P.Scheerer, K.P.Hofmann, H.W.Choe, O.P.Ernst. *Nature (London)*, **454**, 183 (2008)
164. P.Scheerer, J.H.Park, P.W.Hildebrand, Y.J.Kim, N.Krauss, H.W.Choe, K.P.Hofmann, O.P.Ernst. *Nature (London)*, **455**, 497 (2008)
165. J.Standfuss, P.C.Edwards, A.D'Antona, M.Fransen, G.Xie, D.D.Oprian, G.F.Schertler. *Nature (London)*, **471**, 656 (2011)
166. H.W.Choe, Y.J.Kim, J.H.Park, T.Morizumi, E.F.Pai, N.Krauss, K.P.Hofmann, P.Scheerer, O.P.Ernst. *Nature (London)*, **471**, 651 (2011)
167. M.J.Smit, H.F.Vischer, R.A.Bakker, A.Jongejan, H.Timmerman, L.Pardo, R.Leurs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 53 (2007)
168. V.R.Rao, G.B.Cohen, D.D.Oprian. *Nature (London)*, **367**, 639 (1994)
169. J.M.Kim, C.Altenbach, M.Kono, D.D.Oprian, W.L.Hubbell, H.G.Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12508 (2004)
170. S.Ahuja, E.Crocker, M.Eilers, V.Hornak, A.Hirshfeld, M.Ziliox, N.Syrett, P.J.Reeves, H.G.Khorana, M.Sheves, S.O.Smith. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10190 (2009)
171. S.Ahuja, V.Hornak, E.C.Yan, N.Syrett, J.A.Goncalves, A.Hirshfeld, M.Ziliox, T.P.Sakmar, M.Sheves, P.J.Reeves, S.O.Smith, M.Eilers. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **16**, 168 (2009)
172. W.S.Stiles, B.H.Crawford. In *Report of a Joint Discussion on Vision*. Physical Society of London; Cambridge University Press, Cambridge, 1932. P. 194
173. J.Chariton, C.A.Lea. *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **122**, 304 (1929)
174. С.И.Вавилов. *Микроструктура света*. Изд-во АН СССР, Москва, 1950. С. 198
175. S.Hecht, S.Shlaer, M.H.Pirenne. *J. Gen. Physiol.*, **25**, 819 (1942)
176. М.А.Островский, И.Б.Федорович. *Системы органов чувств. Морфофункциональные аспекты эволюции*. Наука, Ленинград, 1987. С. 4

177. М.А.Островский. В кн. *Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты.* (Под ред. А.Б.Рубина). НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Москва; Ижевск, 2007. С. 133
178. K.V.Chalam, V.Khetpal, R.Rusovici, S.Balalaya. *Eye Contact Lens*, **37**, 225 (2011)
179. А.В.Соколов, В.С.Соколов, Т.Б.Фельдман, М.А.Островский. *Биол. мембраны*, **25**, 499 (2008)
180. E.A.Sokolenko, V.S.Sokolov, A.V.Sokolov, O.A.Finogenova, A.E.Dontsov, M.A.Ostrovsky. *Eur. Biophys. J.*, **34**, 772 (2005)
181. А.Е.Донцов, Н.Л.Сакина, М.А.Островский. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1 (2012)
182. М.Ю.Логонова, Е.В.Ростовцева, Т.Б.Фельдман, М.А.Островский. *Докл. АН*, **419**, 838 (2008)
183. М.Ю.Логонова, Е.В.Ростовцева, Т.Б.Фельдман, М.А.Островский. *Биохимия*, **73**, 162 (2008)
184. A.Maeda, M.Golczak, T.Maeda, K.Palczewski. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 5435 (2009)
185. A.Maeda, T.Maeda, M.Golczak, S.Chou, A.Desai, C.L.Hoppel, S.Matsuyama, K.Palczewski. *J. Biol. Chem.*, **284**, 15173 (2009)
186. P.D.Kiser, K.Palczewski. *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 428 (2010)
187. L.R.Blakeley, C.Chen, C.K.Chen, J.Chen, R.K.Crouch, G.H.Travis, Y.Koutalos. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **5**, 3483 (2011)
188. Y.Tsybovsky, R.S.Molday, K.Palczewski. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **703**, 105 (2010)
189. R.S.Molday, M.Zhong, F.Quazi. *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 573 (2009)
190. J.M.Sullivan. *Exp. Eye Res.*, **89**, 602 (2009)
191. V.Vasiliou, K.Vasiliou, D.W.Nebert. *Hum. Genomics*, **3**, 281 (2009)
192. М.А.Островский. В кн. *Клиническая физиология зрения.* (Под ред. А.М.Шамшиновой). Науч.-мед. фирма МБН, Москва, 2006. С. 109
193. М.А.Яковлева, Т.Б.Фельдман, А.С.Крупеникова, С.А.Борзенко, М.А.Островский. *Изв. АН. Сер. хим.*, 2252 (2010)
194. J.R.Sparrow, Y.Wu, C.Y.Kim, J.Zhou. *J. Lipid Res.*, **51**, 247 (2010)
195. М.А.Яковлева, Т.Б.Фельдман, З.М.Полонская, А.Е.Донцов, С.А.Борзенко, Х.П.Тахчиди, М.А.Островский. *Офтальмохирургия*, (5), 59 (2009)
196. Y.P.Jang, H.Matsuda, Y.Itagaki, K.Nakanishi, J.R.Sparrow. *J. Biol. Chem.*, **280**, 39732 (2005)
197. A.R.Wielgus, R.J.Collier, E.Martin, F.B.Lih, K.B.Tomer, C.F.Chignell, J.E.Roberts. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 1505 (2010)
198. М.А.Островский, А.Е.Донцов, Н.Л.Сакина, М.Боултон, Дж.Джарвис-Эванс. *Сенсорные системы*, **6**, 51 (1992)
199. M.Boulton, A.Dontsov, J.Jarvis-Evans, M.Ostrovsky, D.Svistunenko. *J. Photochem. Photobiol. B*, **19**, 201 (1993)
200. R.A.Radu, N.L.Mata, A.Bagla, G.H.Travis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5928 (2004)
201. А.Е.Донцов, Н.Л.Сакина, А.М.Голубков, М.А.Островский. *Докл. АН*, **425**, 683 (2009)
202. F.G.Holz, F.Schutt, J.Kopitz, G.E.Eldred, F.E.Kruse, H.E.Volcker, M.Cantz. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 737 (1999)
203. G.Moiseyev, O.Nikolaeva, Y.Chen, K.Farjo, Y.Takahashi, J.X.Ma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17551 (2010)
204. W.T.Ham Jr., H.A.Mueller, D.H.Sliney. *Nature (London)*, **260**, 153 (1976)
205. W.T.Ham Jr., H.A.Mueller, J.J.Ruffolo Jr., D.Guerry III, R.K.Guerry. *Am. J. Ophthalmol.*, **93**, 299 (1982)
206. S.M.Meyers, M.A.Ostrovsky, R.F.Bonner. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **102**, 83 (2004)
207. D.T.Organisciak, D.K.Vaughan. *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 113 (2010)
208. P.N.Youssef, N.Sheibani, D.M.Albert. *Eye (London)*, **25**, 1 (2011)
209. D.van Norren, T.G.Gorgels. *Photochem. Photobiol.*, **87**, 747 (2011)
210. T.M.Redmond, S.Yu, E.Lee, D.Bok, D.Hamasaki, N.Chen, P.Goletz, J.X.Ma, R.K.Crouch, K.Pfeifer. *Nat. Genet.*, **20**, 344 (1998)
211. M.L.Batten, Y.Imanishi, D.C.Tu, T.Doan, L.Zhu, J.Pang, L.Glushakova, A.R.Moise, W.Baehr, R.N.Van Gelder, W.W.Hauswirth, F.Rieke, K.Palczewski. *PLoS Med.*, **2**, e333 (2005)
212. N.L.Mata, R.A.Radu, R.C.Clemmons, G.H.Travis. *Neuron*, **36**, 69 (2002)
213. J.S.Wang, V.J.Kefalov. *Prog. Retin. Eye Res.*, **30**, 115 (2011)
214. E.Poliakov, T.Parikh, M.Ayele, S.Kuo, P.Chander, S.Gentleman, T.M.Redmond. *Biochemistry*, **50**, 6739 (2011)
215. Y.Takahashi, G.Moiseyev, Y.Chen, O.Nikolaeva, J.X.Ma. *FEBS J.*, **278**, 2913 (2011)
216. M.N.Mandal, G.P.Moiseyev, M.H.Elliott, A.Kasus-Jacobi, X.Li, H.Chen, L.Zheng, O.Nikolaeva, R.A.Floyd, J.X.Ma, R.E.Anderson. *J. Biol. Chem.*, **286**, 32491 (2011)
217. S.A.Schadel, M.Heck, D.Maretzki, S.Filipek, D.C.Teller, K.Palczewski, K.P.Hofmann. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24896 (2003)
218. M.Heck, S.A.Schadel, D.Maretzki, K.P.Hofmann. *Vision Res.*, **43**, 3003 (2003)
219. D.A.Korenyak, V.I.Govardovskii. In *Proceedings of the Visionarium IX*. Tvarminne, Finland, 2010. P. 20

Свидетельство о регистрации № 0110235 от 08.02.93 в Министерстве печати и информации Российской Федерации.
Учредители: Российская академия наук, Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

Номер набран и сверстан с использованием системы **Advent 3B2 Total Publishing System** на оборудовании, поставленном фирмой «Turpion Ltd».

Подписано к печати с оригинал-макета 08.11.12. Формат 60 × 90 1/8. Печать цифровая.
Печатные листы 13.5. Тираж 330 экз. Заказ 1679.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленных диапозитивов в ППП «Типография «Наука»
121099 Москва, Шубинский пер., 6.