

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗРЕНИЯ: КАЛЬЦИЙ И КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

П. П. ФИЛИППОВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

MOLECULAR MECHANISMS OF VISION: CALCIUM AND CALCIUM-BINDING PROTEINS

P. P. PHILIPPOV

Ca²⁺ and cGMP have been considered candidates for the role of a photoreceptor second messenger until 1985, when the cGMP-gated conductivity of visual cell plasma membranes was discovered. However, quite recently Ca²⁺ had its revenge as a signal for processes underlying the photoreceptor cell recovery. The role of Ca²⁺ in the visual cell signalling is described.

Рассказано о роли ионов кальция в регуляции зрительных сигнальных процессов. В течение многих лет Ca²⁺ и cGMP рассматривали в качестве кандидатов на роль фоторецепторного вторичного мессенжера. С открытием в 1985 году способности cGMP прямо изменять проводимость катионных каналов, присутствующих в плазматической мембране зрительных клеток, победу одержал этот циклический нуклеотид. Однако благодаря исследованиям последних лет Ca²⁺ взял реванш как сигнал для процессов, обуславливающих возврат фотозабужденных зрительных клеток к темновому состоянию.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

В статье “Как мы видим” (с. 18–25) рассказано о строении глаза, сетчатки, фоторецепторных (зрительных) клеток и в общем виде о молекулярных механизмах зрения. В настоящей статье, при написании которой использованы экспериментальные работы и монография [1], остановимся на участии ионов кальция в регуляции работы фоторецепторных клеток и на Ca²⁺-связывающих белках, опосредующих действие катиона на некоторые зрительные процессы. Поскольку палочки сетчатки, отвечающие, как известно, за сумеречное зрение, изучены несравнимо лучше фоторецепторных клеток другого типа – колбочек, обеспечивающих зрение на ярком свете, предметом нашего рассмотрения будут события, происходящие именно в палочках, точнее, в особой их структуре – наружных сегментах палочек (НСП).

НСП представляют собой мешок, образованный наружной (плазматической) мембраной клетки, в который помещена стопка так называемых фоторецепторных дисков (см. рис. 2 на с. 21). В НСП, выполняющих в палочках функцию световой антенны, сосредоточены все компоненты зрительной сигнальной машины, в том числе зрительный пигмент родопсин, подавляющая часть которого локализована в мембранах фоторецепторных дисков. Плазматическая мембрана НСП содержит катионные каналы, которые в темноте открыты и пропускают извне в цитоплазму НСП ионы натрия и кальция; на свету каналы закрываются, и входящий катионный ток прекращается. Так что плазматическая мембрана НСП, деполаризованная в темноте, гиперполяризуется на свету, и это изменение мембранного потенциала означает первое электрофизиологическое событие из многих последующих на пути зрительного сигнала от фоторецепторной клетки – через нейроны более высокого порядка и зрительный нерв – в головной мозг.

Необходимо подчеркнуть, что фоторецепторные диски, а значит, и присутствующий в них родопсин не контактируют с плазматической мембраной и локализованными в ней катионными каналами. Следовательно, должен существовать специальный механизм,

который обеспечивает передачу зрительного сигнала от фотовозбужденного родопсина через зазор между фоторецепторными дисками и плазматической мембраной к катионным каналам.

Вопрос о механизме этой передачи, или зрительной трансдукции, оставался открытым в течение длительного времени — примерно с начала 1970-х до середины 1980-х годов. Основными претендентами на роль медиаторов внешнего сигнала в фоторецепторной клетке были в равной степени циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) и ионы кальция. С открытием в 1985 году [2] способности сGMP прямо связываться с катионными каналами, присутствующими в плазматической мембране НСП, и поддерживать их в открытом состоянии победу одержал этот циклический нуклеотид. И сегодня общепринято, что зрительный сигнал в пределах НСП передается с помощью каскада родопсин \rightarrow трансдуцин \rightarrow сGMP-фосфодиэстераза. Последняя представляет собой фермент, который, будучи в активированном состоянии (а это происходит при передаче сигнала в каскаде), гидролизует сGMP и снижает его цитоплазматическую концентрацию, что и приводит к закрыванию катионных каналов и соответственно гиперполяризации плазматической мембраны НСП. Иными словами, сGMP выполняет в зрительных клетках функцию вторичного посредника, или мессенжера.

Ca²⁺ СЛУЖИТ СИГНАЛОМ ДЛЯ ПЕРЕХОДА ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКИ ИЗ ВОЗБУЖДЕННОГО В ТЕМНОВОЕ СОСТОЯНИЕ

Проиграв в споре с сGMP как претендент на роль вторичного мессенжера, Ca²⁺, однако, взял реванш в качестве сигнала для перехода фоторецепторной клетки из возбужденного в исходное темновое состояние, иначе для завершения зрительного ответа на уровне НСП. (Далее ввиду отсутствия иного обозначения будем называть этот переход релаксацией, что соответствует используемому в англоязычной литературе термину “recovery”). Дело в том, что в плазматической мембране НСП присутствует свето- и потенциалнезависимый Na⁺/K⁺, Ca²⁺-обменник, который продолжает работать и откачивать Ca²⁺ из НСП наружу после вызванных светом падения цитоплазматического уровня сGMP, закрывания катионных каналов и прекращения входа Ca²⁺ в НСП. В результате спустя некоторое время после закрывания катионных каналов концентрация Ca²⁺ в цитоплазме НСП также снижается, и именно это снижение запускает большинство процессов, обеспечивающих релаксацию фоторецепторной клетки из возбужденного в исходное темновое состояние, в котором она находилась до поглощения кванта света родопсином.

В реальных условиях через фоторецепторную клетку проходит поток фотонов, каждый из которых вызы-

вает единичное срабатывание зрительной сигнальной машины, состоящее из двух основных событий. Первое из них — передача светового сигнала через каскад родопсин \rightarrow трансдуцин \rightarrow сGMP-фосфодиэстераза, вызывающая гиперполяризацию плазматической мембраны НСП; второе — последующая релаксация фоторецепторной клетки к темновому состоянию. В свою очередь, процесс релаксации складывается из: а) перехода активированных компонентов зрительного каскада в исходное неактивированное состояние (назовем этот переход выключением) как условия для готовности каскада к новому ответу на следующий световой квант и б) восстановления исходно высокого уровня сGMP в цитоплазме НСП как условия для открывания катионных каналов и депольяризации плазматической мембраны НСП.

Ca²⁺ И ЗРИТЕЛЬНЫЙ КАСКАД

Родопсин, видимо, единственный компонент каскада родопсин \rightarrow трансдуцин \rightarrow сGMP-фосфодиэстераза, чувствительный к действию Ca²⁺. Механизмы действия катиона на эффективность работы родопсина, однако, принципиально различны при передаче зрительного сигнала и его выключении.

Передача зрительного сигнала. Получены данные о том, что повышение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме НСП сопровождается увеличением количества активированного трансдуцина, образующегося в расчете на одно и то же количество фотовозбужденного родопсина. Механизм обнаруженного эффекта остается, однако, неустановленным. В частности, неясно, действует ли Ca²⁺ на каталитическую активность фотовозбужденного родопсина (Rho*), или он увеличивает квантовый выход реакции темновой родопсин \rightarrow Rho* при том, что усиление сигнала на стадии Rho* \rightarrow трансдуцин остается неизменным. Видимо, эффект катиона направлен непосредственно на родопсин, а не опосредован каким-либо Ca²⁺-связывающим белком. Если это действительно так, то можно предположить, что зрительный родопсин позвоночных животных сам по себе обладает Ca²⁺-связывающими свойствами.

Выключение зрительного сигнала. Многочисленные данные говорят о возможном участии кальция в регуляции выключения зрительного каскада опять же на уровне родопсина. Однако в этом случае действие катиона не является прямым: оно направлено на Ca²⁺-связывающий белок рековерин, а через него на активность родопсинкиназы — фермента, катализирующего фосфорилирование родопсина и тем самым снижающего каталитическую эффективность зрительного рецептора.

Ca²⁺ И СИНТЕЗ сGMP

Для того чтобы произошла релаксация палочки сетчатки из фотовозбужденного в темновое состояние, в

цитоплазме НСП в дополнение к выключению компонентов зрительного каскада должен быть восстановлен исходно высокий уровень сGMP. Последний синтезируется из GTP под действием чувствительной к ионам кальция гуанилилциклазы (или иначе гуанилатциклазы), активность которой возрастает при низких и соответственно падает при высоких концентрациях катиона. Эффект Ca^{2+} на гуанилилциклазную активность опосредуют Ca^{2+} -связывающие белки, получившие название GCAP (от *guanylate cyclase activating protein*). В фоторецепторных клетках найдено два GCAP: GCAP1 с молекулярной массой M_r , равной 21 К, и GCAP2 ($M_r = 24$ К), структура и свойства которых как энзимологических объектов мало изучены. Более того, нет единого мнения относительно их локализации и возможного участия в зрительном ответе. Согласно одной точке зрения, в НСП локализован (преимущественно или исключительно) GCAP1, который и обеспечивает восстановление темнового уровня сGMP в цитоплазме НСП после передачи зрительного сигнала, тогда как GCAP2 сосредоточен в структурах сетчатки, отличных от НСП, и прямого отношения к зрительному ответу не имеет. Согласно другой точке зрения, возможно, что оба GCAP функционируют в НСП, действуя как активаторы гуанилилциклазы и тем самым участвуя в релаксации фотовозбужденной палочки. Последние данные говорят о том, что GCAP1 присутствует по большей части в наружных сегментах колбочек и во много меньшей степени в НСП, в то время как GCAP2 выявляется примерно одинаково и в колбочках и в палочках, причем как в наружных, так и во внутренних сегментах фоторецепторных клеток обоих типов.

Вне зависимости от того, какая из приведенных выше точек зрения верна, оба GCAP способны активировать гуанилилциклазу только при концентрациях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ свободного Ca^{2+} , не превышающих 250 нМ, что соответствует физиологическому уровню кальция в цитоплазме НСП. При более высоких значениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активация прекращается, и активность фермента падает.

Необходимо также упомянуть о присутствии в палочках сетчатки гуанилилциклазной активности, стимулируемой ионами кальция в микромолярном диапазоне. Хотя это, скорее всего, гуанилилциклаза, локализованная не в НСП, а во внутреннем сегменте палочек. В данном случае эффект Ca^{2+} на гуанилилциклазную активность опосредует белок S-100 β , принадлежащий к обширному семейству S-100 Ca^{2+} -связывающих белков. Фоторецепторный S-100 β представляет собой короткий полипептид с молекулярной массой 6–7 К, который в неденатурирующих условиях образует олигомеры с M_r около 40 К. В настоящее время Ca^{2+} -связывающие белки, принадлежащие к семейству S-100 белков, интенсивно исследуют, однако о их роли в фоторецепторной клетке известно совсем немного.

Ca^{2+} , КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ И Na^+/K^+ , Ca^{2+} -ОБМЕННИК

Катионные каналы, локализованные в плазматической мембране НСП, изменяют свою проводимость светозависимым образом благодаря их способности связывать сGMP, концентрация которого, как уже было сказано, зависит от функционального состояния фоторецепторной клетки. Дополнительная модуляция проводимости каналов, видимо, может происходить под действием ионов кальция при участии кальмодулина (кальмодулин – Ca^{2+} -связывающий белок, широко распространенный в клетках различных типов, в том числе он найден и в фоторецепторных клетках). Неясно, как действует комплекс Ca^{2+} -кальмодулин при высокой концентрации сGMP (что соответствует темновому состоянию НСП), однако на фоне низкой концентрации сGMP (что соответствует состоянию НСП после освещения) комплекс Ca^{2+} -кальмодулин увеличивает чувствительность катионных каналов к малым изменениям уровня сGMP. А это означает, что падение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, сопровождающее передачу зрительного сигнала, должно приводить к диссоциации кальмодулина из комплекса с каналами и тем самым способствовать их открыванию по мере повышения уровня сGMP при переходе (релаксации) палочки от фотовозбужденного к темновому состоянию.

Нельзя, однако, исключить, что на самом деле эффект ионов кальция на катионные каналы, присутствующие в плазматической мембране НСП, опосредует не кальмодулин, а присутствующий в его препаратах неустановленный белковый фактор. Дело в том, что в экспериментах, выполненных, правда, на колбочках, а не на палочках, не удалось воспроизвести эффект Ca^{2+} на проводимость катионных каналов с использованием очищенного кальмодулина. Было высказано предположение, что, по крайней мере в колбочках, эффект ионов кальция на проводимость катионных каналов опосредован не кальмодулином, а каким-то другим неидентифицированным белком.

Na^+/K^+ , Ca^{2+} -обменник представляет собой белок с молекулярной массой 215 К, локализованный в плазматической мембране НСП. Функция этого обменника состоит в откачивании наружу ионов кальция, входящих в цитоплазму НСП извне через открытые в темноте катионные каналы с тем, чтобы не допустить повышения концентрации Ca^{2+} внутри НСП сверх допустимого уровня. Однако на свету, когда каналы закрыты, работа обменника приводит к падению уровня Ca^{2+} , служащего, как уже было сказано, сигналом для запуска релаксации фотовозбужденной клетки к темновому состоянию. Когда величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ достигает примерно 100 нМ, обменник становится неспособным к дальнейшему откачиванию Ca^{2+} . Сродство Na^+/K^+ , Ca^{2+} -обменника к

ионам кальция регулируется каким-то цитоплазматическим фактором, возможно протеинкиназой.

Na^+/K^+ , Ca^{2+} -обменник — последний из известных в настоящее время Ca^{2+} -чувствительных компонентов зрительной сигнальной машины, итоговая схема которой и места действия в ней ионов кальция представлены на рис. 1.

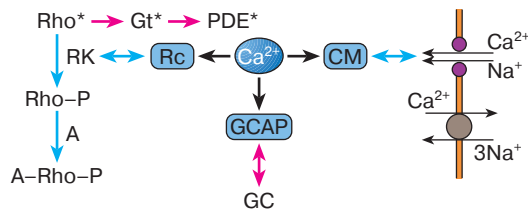


Рис. 1. Схема действия Ca^{2+} на релаксацию палочки: А – аррестин, CM – кальмодулин, GC – гуанилилциклаза, GCAP – активатор гуанилилциклазы, Gt – трансдуцин, PDE – сGMP-фосфодиэстераза, Rho – родопсин, Rho-P – фосфорилированный родопсин; Rс – рековерин, RK – родопсинкиназа, значком * обозначено активированное состояние компонентов каскада $\text{Rho} \rightarrow \text{Gt} \rightarrow \text{PDE}$. Голубым цветом выделены Ca^{2+} -связывающие белки; красные стрелки демонстрируют пути активации компонентов, голубые – пути их выключения

Ca²⁺, РЕКОВЕРИН И РЕГУЛЯЦИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

Фосфорилирование рецепторов, сопряженных с G-белками, под действием специфических протеинкиназ снижает их чувствительность к внешним сигналам (такое снижение чувствительности обозначают термином “десенситизация”). Родопсин как типичный представитель сопряженных с G-белками рецепторов ведет себя подобным же образом: его способность активировать трансдуцин (фоторецепторный G-белок) уменьшается по мере включения фосфатных остатков в С-концевой фрагмент молекулы фотовозбужденного родопсина. К настоящему времени получено большое количество экспериментальных данных о том, что активность родопсинкиназы – фермента, катализирующего фосфорилирование фотовозбужденного родопсина, регулируется Ca^{2+} -зависимым образом белком рековерином. При высокой концентрации ионов кальция родопсинкиназа находится в комплексе с рековерином, который действует как ингибитор фермента, при низких концентрациях катиона комплекс родопсинкиназа–рековерин диссоциирует, и ингибирование снимается.

Рековерин [3], первоначальное наименование «р26» [4] (по величине его кажущейся молекулярной массы, равной 26 К), был впервые обнаружен нами как фоторецепторный белок, способный прочно связываться с родопсином, иммобилизованным (то есть прочно присоединенным) к нерастворимому носителю. Первоначально

полагали [3], что рековерин Ca^{2+} -зависимым образом модулирует активность гуанилатциклазы, но позднее были получены данные, что мишенью для него в НСП, скорее всего, служит родопсинкиназа [5].

К N-концу рековерина ковалентно присоединен остаток жирной миристиновой кислоты, который благодаря своей гидрофобности придает белку способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами, гидрофобными по своей природе. Рековерин обладает тем замечательным свойством, что *in vitro* в суспензии фоторецепторных мембран при отсутствии ионов кальция он находится в растворимом состоянии, а в присутствии катиона переходит из раствора на мембрану. Такое поведение рековерина обусловлено тем, что в бескальциевой среде его миристоилированный N-конец спрятан в так называемом гидрофобном кармане белковой молекулы. Связывание Ca^{2+} с рековерином изменяет его конформацию таким образом, что миристоилированный N-конец белка экспонируется наружу и, погружаясь в липидный бислой фоторецепторной мембраны, заякоривает рековерин (рис. 2). Этот механизм изменения распределения миристоилированного рековерина между двумя фазами (раствор ↔ мембрана) в зависимости от присутствия ионов кальция получил название кальций-миристоильного переключателя (в оригинальной работе [6] calcium-myristoyl switch).

Остается неясным, однако, как этот миристоильный переключатель работает (и работает ли он вообще) в условиях *in vivo*. Складывается впечатление, что не только родопсин, который интегрирован в фоторецепторную мембрану, но и другие компоненты зрительной молекулярной машины (рис. 3) работают в слое цитоплазмы, прилегающем к поверхности дисков, вне зависимости от функционального состояния палочки. Если это действительно так, то и рековерин оперирует в двумерном пространстве этого слоя, не выходя из него. Но в зависимости от функционального состояния палочки и соответственно концентрации ионов кальция в цитоплазме НСП рековерин может находиться в двух состояниях: либо в комплексе с родопсинкиназой, либо в свободном виде, причем в первом случае активность

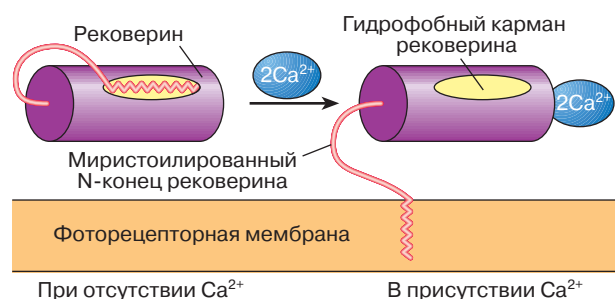


Рис. 2. Схема кальций-миристоильного переключателя

родопсинкиназы подавлена, а во втором фермент активен и катализирует фосфорилирование родопсина.

К настоящему времени в клетках нервной системы, отличных от фоторецепторных клеток, найдены родственные рековерину Ca^{2+} -связывающие белки, которые образуют семейство рековерина. Функция этих белков, однако, остается неизвестной, хотя по аналогии с рековерином можно предположить, что они участвуют в Ca^{2+} -зависимой регуляции фосфорилирования пока не установленных внутриклеточных мишеней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье “Как мы видим” зрительная молекулярная машина была описана в общих чертах. Теперь с учетом тех деталей, которые стали нам известны, можно предложить следующий гипотетический сценарий, подробно описывающий цикл работы зрительной молекулярной машины (см. рис. 3).

В темноте компоненты каскада родопсин → трансдуцин → cGMP-фосфодиэстераза выключены; уровень cGMP и Ca^{2+} в цитоплазме НСП высокий; родопсинкиназа, находящаяся в комплексе с рековерином, и гуанилилциклаза, свободная от GCAP, неактивны; катионные каналы в плазматической мембране НСП открыты, и мембрана деполяризована. Передача сигнала инициируется родопсином, который, поглотив квант света, переходит в фотовозбужденное состояние (Rho^*) и передает сигнал по зрительному каскаду; активированная cGMP-фосфодиэстераза гидролизует cGMP, цитоплазматическая концентрация которого снижается; катионные каналы закрываются, вход Na^+ и Ca^{2+} в НСП прекращается, и плазматическая мембрана палочки гиперполяризуется. Релаксация запускается падением цитоплазматического уровня Ca^{2+} (исключение составляют трансдуцин и cGMP-фосфодиэстераза, которые выключаются с помощью Ca^{2+} -независимой ГТФазы трансдуцина): родопсинкиназа диссоциирует из комплекса с рековерином; свободная родопсинкиназа фосфорилирует фотовозбужденный родопсин, что снижает его эффективность как активатора зрительного каскада. Связывание аррестина с фосфорилированным Rho^* приводит к его выключению и в конечном счете к прекращению передачи сигнала в каскаде; гуанилилциклаза активируется под действием GCAP; синтез cGMP ускоряется, и его концентрация в цитоплазме НСП возрастает (чему способствует прекращение гидролиза cGMP); кальмодулин диссоциирует из комплекса с канальными белками, что способствует взаимодействию с ними cGMP.

Цикл завершается открыванием катионных каналов и повышением цитоплазматического уровня Ca^{2+} , что создает условия для ингибирования родопсинкиназы рековерином и прекращения активации гуанилилциклазы под действием GCAP.

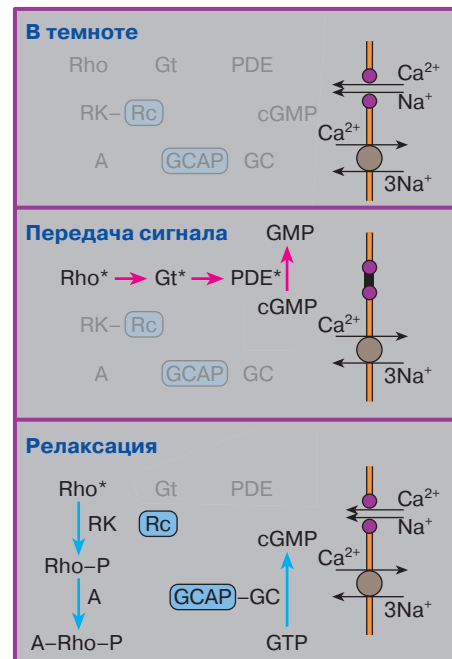


Рис. 3. Цикл работы зрительной молекулярной машины: темновое состояние → передача сигнала → релаксация. Условные обозначения см. на рис. 1

ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппов П.П., Аршавский В.Ю., Дижур А.М. Биохимия зрительной рецепции. М.: ВИНТИ, 1987.
2. Fesenko E.E., Kolesnikov S.S., Lyubarsky A.L. Induction by Cyclic GMP of Cationic Conductance in Plasma Membrane of Retinal Rod Outer Segment // Nature (London). 1985. Vol. 313. P. 310–313.
3. Dizhoor A.M. et al. Recoverin: A Calcium Sensitive Activator of Retinal Rod Guanylate Cyclase // Science. 1991. Vol. 251. P. 915–918.
4. Дижур А.М., Некрасова Э.Р., Филиппов П.П. Новый специфичный для фоторецепторных клеток белок с молекулярной массой 26 кДа // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 225–229.
5. Gorodovikova E.N. et al. Recoverin Mediates the Calcium Effect Upon Rhodopsin Phosphorylation and cGMP Hydrolysis in Bovine Retinal Rod Cells // FEBS Lett. 1994. Vol. 349. P. 187–190.
6. Zozulya S., Stryer L. Calcium-myristoyl Protein Switch // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11569–11573.

Рецензент статьи А.Я. Потапенко

Павел Павлович Филиппов, доктор биологических наук, профессор, зав. отделом энзимологии и зам. директора НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, лауреат премии им. Ю.А. Овчинникова РАН. Область научных исследований – молекулярные механизмы зрения. Автор более 80 научных работ и одной монографии.