

Фоторецепторные родопсины и регуляция движения жгутиковых водорослей

Е. Говорунова



Елена Говорунова, 5-й выпуск биокласса, школа № 57 (1980 г.), закончила кафедру физиологии растений Биофака МГУ (1985 г.), к.б.н., старший научный сотрудник кафедры физико-химической биологии Биофака МГУ, egovoru@yahoo.com

Способность реагировать на внешние стимулы — такое же фундаментальное свойство живой материи, как и способность к питанию или размножению. Но и питание, и размножение были бы невозможны, если бы живые организмы были неспособны к рецепции внешних стимулов: ведь прежде чем поглотить пищу, ее надо сначала разыскать, а делать это, ориентируясь на специфические свойства пищи (например, ее вид или запах) гораздо эффективнее, чем просто бродить в надежде, что рано или поздно наткнешься на что-нибудь съедобное!

Самым важным стимулом для живых организмов служит свет, и это понятно, поскольку для фототрофов он является источником энергии, и, кроме того, для всех организмов, независимо от типа их метаболизма, слишком много света представляет собой опасность для жизни. Наша исследовательская группа на кафедре физико-химической биологии Биологического

факультета МГУ занимается изучением двигательных реакций на свет и другие стимулы внешней среды у жгутиковых водорослей. С главным объектом наших изысканий все хорошо знакомы по учебнику ботаники 5 класса — это хламидомонада (рисунок 1).

Одноклеточные зеленые жгутиконосцы, к которым относится хламидомонада, перемещаются в среде при помощи двух жгутиков (по-английски — *flagella*), расположенных на переднем конце клетки. Это движение регулируется светом, причем клетки реагируют не просто на интенсивность света, а на направление световых лучей. Перемещение клеток параллельно световым лучам называют фототаксисом. Как же клетка хламидомонады определяет направление света? Медленно движущиеся клетки, такие как цианобактерия *Synechococcus*, поступают очень просто: они сравнивают освещенность двух противоположных концов клетки, в один и тот же момент времени и поворачиваются в сторону того из них, на который попадает больше квантов. Однако жгутиконосцы движутся слишком быстро, и такая стратегия для них не работает. У хламидомонады есть только один фоторецептор, расположенный на боковой поверхности клетки, а непосредственно рядом с ним располагается хорошо видимое в световой микроскоп скопление каротиноидных пигментов. Уже первые микроскописты, чуть ли не сам Левенгук, обратили внимание на это образование и поняли, что оно имеет отношение к фоторецепции, почему и назвали его глазком или стигмой (по-английски — *eyespot*). Глазок, однако, не содержит фоторецепторных молекул, а его роль заключается в модуляции освещенности фоторецептора во время движения клетки. Дело в том, что клетки хламидомонады плавают не по прямой, а вращаясь вокруг своей продольной оси. Если при этом ось вращения не совпадает с направлением распространения света, то на единственный фоторецептор хламидомонады попадает то много света — когда клетка повернута к его источнику своей несущей фоторецептор стороной (как клетка, помеченная цифрой 2 на рисунке 2), то мало — в противоположной фазе цикла вращения, когда фоторецептор затенен от света

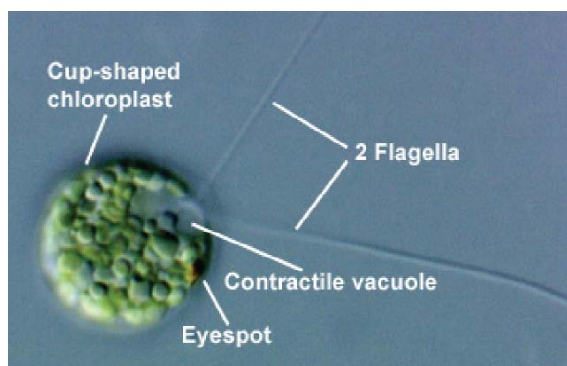


Рисунок 1. Клетка хламидомонады *Chlamydomonas reinhardtii* под световым микроскопом.

Фоторецепторы

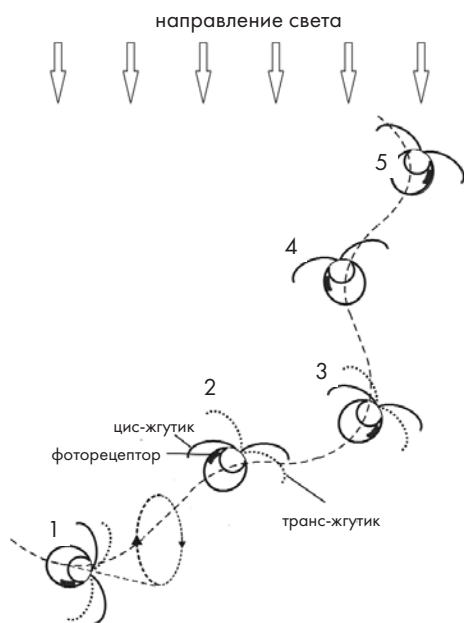


Рисунок 2. Схема ориентации жгутиковых водорослей в соответствии с направлением световых лучей.

глазком (как у клетки, помеченной цифрой 1 на том же рисунке). Вот это периодическое изменение освещенности фоторецептора в цикле вращения клетки и воспринимается как сигнал для изменения направления своего движения. Получив такой сигнал, два жгутика клетки начинают биться по-разному, заставляя ее поворачивать в сторону к источнику света (если интенсивность светового стимула низкая) или от него (если интенсивность высокая). Это продолжается до тех пор, пока ось вращения клетки (совпадающая с направлением ее поступательного движения) не совпадет с направлением световых лучей (как у клеток 3, 4 и 5 на рисунке 2). В такой ситуации освещенность фоторецептора в цикле вращения уже не меняется, и клетка продолжает двигаться в направлении света, пока опять не отклонится от него в силу случайных причин или под действием какого-то другого стимула.

Вывод о том, что глазок, несмотря на свое название, все же не является собственно фоторецептором, окончательно подтвердился, когда были получены и исследованы мутанты хламидомонады, не имеющие глазка. У таких мутантов есть фототаксис, но точность фотоориентации у них гораздо слабее, чем у дикого типа, что и понятно, так как вместо компактного глазка у них в роли затеняющего образования выступает громоздкий хлоропласт. К фототаксису оказались способны и бесхлорофильные мутанты, которые не образуют и полноценного хлоропласта. Правда, эти мутанты, вместо того, чтобы

плыть к источнику света при низкой интенсивности стимула, плывут, наоборот, от него. Их способность определять направление световых лучей основана на фокусирующем («линзовом») эффекте прозрачного тела клетки, так что максимальная освещенность фоторецептора достигается как раз в той фазе цикла вращения, когда он находится на стороне клетки, повернутой от источника света, а не к нему, как у дикого типа. Корректирующие движения жгутиков у этих мутантов приходится поэтому на противоположную по сравнению с диким типом фазу цикла вращения, что и определяет обратный знак их фототаксиса.

Итак, наличие фототаксиса и у мутантов без глазка, и у мутантов без хлоропласта окончательно доказывает, что фоторецепторный пигмент расположен не в этих окрашенных органеллах — иными словами, что его в клетке так мало, что не видно в микроскоп. Как же тогда узнать, что это за вещество? Первоначальные сведения о предполагаемой химической природе фоторецепторного пигмента удалось получить, измерив спектр действия фототаксиса, т.е. зависимость его величины от длины волны светового стимула. Спектр действия фототаксиса хламидомонады и некоторых других жгутиконосцев оказался близок спектру поглощения зрительного пигмента палочек сетчатки животных и человека — родопсина. Родопсин — это комплекс белка (опсина) с ковалентно связанным хромофором — ретиналем. Предположение о наличии фоторецептора родопсиновой природы у одноклеточных водорослей было очень интригующей гипотезой, принимая во внимание филогенетическую удаленность их от животных. Однако для окончательных выводов о химической природе рецептора анализа спектров действия было все же недостаточно, поскольку спектры поглощения многих классов пигментов перекрываются, а в спектр действия фототаксиса вносят вклад другие процессы, кроме поглощения самого фоторецепторного пигмента (в частности, поглощение затеняющего образования).

Первое надежное свидетельство в пользу родопсиновой природы рецепторного пигмента, опосредующего фототаксис, было получено в опытах на мутантах хламидомонады, не способных синтезировать каротиноиды. Сами по себе эти мутанты «слепые», не способные к фототаксису, но они становятся «зрячими», если в среду добавить синтетический ретиналь. Восстановление способности к фототаксису у слепых хламидомонад под действием ретиналя можно было объяснить только тем, что их фоторецепторный белок представляет собой комплекс ретиналя с



Рисунок 3. Массовый рост галоархей в соленых озерах: фиолетовый цвет обусловлен бактериородопсином.

белком. Более детальные эксперименты (а именно сравнение эффективности разных изомеров и аналогов ретиналя) показали, что фоторецептор хламидомонады больше похож даже не на зрительный родопсин животных, а на ретиналь-содержащие белки, обнаруженные у галофильных археобактерий, живущих в очень соленой воде пустынных озер (рисунок 3). Археобактерии — это прокариоты, по своему внешнему виду и строению клетки похожие на обычные бактерии, но по своим генетическим характеристикам, отражающим их эволюционное происхождение, они оказываются ближе к эукариотам, чем к настоящим бактериям. Чтобы подчеркнуть это отличие от бактерий, их часто называют просто «археями».

В начале 1970-х гг. в клеточной мембране одной из архей, *Halobacterium salinarum*, был обнаружен ретинальсвязывающий белок. Это было совершенно сенсационное открытие, потому что до этого такие белки были известны исключительно в фоторецепторных клетках сетчатки животных. Новый белок назвали «бактериородопсином», поскольку в то время принципиальное различие между настоящими бактериями и археями было еще не установлено. При этом оказалось, что хромофор бактериородопсина — изомер ретиналя, у которого все углерод-углеродные двойные связи находятся в *транс*-конфигурации, в то время как зрительный родопсин животных содержит ретиналь, у которого двойная связь между 11-м и 12-м атомами углерода находится в *цис*-положении (рисунок 4). Более того, когда были выяснены первичные последовательности аминокислот этих двух белков, между ними не было обнаружено ровно никакой гомологии, хотя по вторичной структуре они оказались очень похожи: оба они образуют 7 трансмембранных альфа-спиралей, в середине последней из которых расположен остаток лизина, ковалентно связывающий ретиналь.

Выяснилось также, что бактериородопсин — вовсе не фоторецептор, как родопсин зрительный, а светоактивируемая протонная помпа, т.е. он перекачивает протоны через мембрану (изну-

три наружу), используя для этого энергию света. Создаваемый таким образом электрохимический градиент протонов клетка использует для синтеза АТФ или других процессов, требующих затраты энергии. Считается, что такой способ утилизации солнечной энергии одной-единственной молекулой возник в ходе эволюции задолго до появления куда более сложно организованного фотосинтеза на основе хлорофилла. Далее, оказалось, что у того же вида архей кроме бактериородопсина есть еще три других ретинальсвязывающих белка. Один из них под действием света перекачивает через мембрану не протоны, а ионы хлора — в противоположном протонам направлении, запасая дополнительную энергию. А два остальных работают-таки как фоторецепторы, позволяя клеткам *H. salinarum* скапливаться в местах, освещенных оранжевым светом (бактериородопсин лучше всего поглощает именно этот свет), и избегать опасно коротковолнового света.

В течение 30 лет после открытия бактериородопсина считалось, что галофильные археобактерии — единственные организмы, помимо животных, у которых есть ретинальсодержащие белки. Результаты же опытов по восстановлению фототаксиса слепых мутантов хламидомонады после добавления ретиналя показали, что у этих эукариотических водорослей тоже есть ретиналь-содержащие белки, причем именно белки, больше похожие на родопсины галоархей, т.е. прокариотических микроорганизмов, чем на зрительные родопсины. Конечно, ученым сразу же захотелось как можно быстрее получить эти белки в чистом виде, чтобы исследовать их свойства. Но вот это оказалось исключительно трудным делом из-за чрезвычайно низкой концентрации фоторецепторных белков в клетках. Решение этой проблемы было найдено только

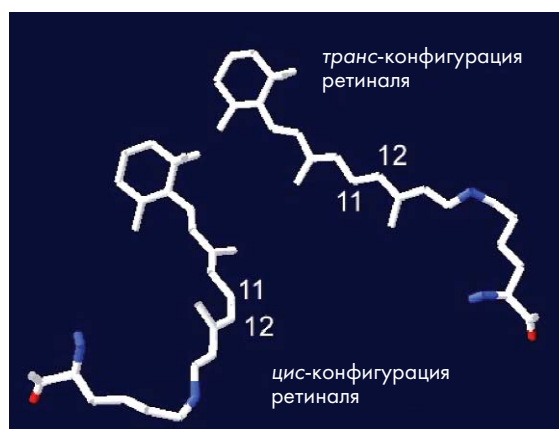


Рисунок 4. Молекулярные модели полностью *транс*- и *цис*-изомеров ретиналя, ковалентно связанных с остатками лизина в (не показанных) полипептидных цепях опсинов.

тогда, когда была установлена полная нуклеотидная последовательность генома хламидомонады. Оказалось, что в нем содержится целых два гена, кодирующих белки, первичные последовательности которых близки к родопсинам галофильных архей. Между собой эти два гена оказались еще более похожи, так что можно было предполагать, что они возникли в результате дубликации одного предшественника. Некоторые детали последовательностей этих генов свидетельствовали о том, что они кодируют белки-фоторецепторы, а не ионные помпы, поэтому этим белкам присвоили имена «сенсорные родопсины хламидомонады А и В».

Но, конечно, точно предсказать функцию белка в клетке на основании одного только знания его первичной последовательности нельзя, требуются дополнительные исследования. Самый надежный способ — разрушить ген того белка, функцию которого надо выяснить, и посмотреть, как изменился фенотип у такого организма. В случае хламидомонады, однако, это сделать было не так-то просто, т.к. особенности ее генома не позволяют направленно разрушать заранее заданные гены. На помощь исследователям пришел метод так называемой РНК-интерференции (РНКи). Сущность этого метода состоит в том, что клетку трансформируют специальной генетической конструкцией, содержащей один и тот же начальный участок данного гена в прямой и обратной ориентации. РНК, транскрибируемая с такой конструкции, замыкается сама на себя и образует двухцепочечную шпильку. В клетке же существует специальная ферментная система, разрушающая не только сами такие шпильки, но и нативную РНК, считываемую с клеточной копии того гена, на основе которого была приготовлена РНКи-конструкция. Таким образом, сам клеточный ген остается активным, но синтез кодируемого им белка существенно подавляется из-за разрушения соответствующих РНК-матриц.

При помощи метода РНКи удалось получить трансформантов хламидомонады с существенно пониженным содержанием либо родопсина А, либо родопсина В — иными словами, обогащенных в первом случае родопсином В, а во втором — родопсином А. При сравнении этих трансформантов с диким типом оказалось, что оба они остались способны к фототаксису, однако количественные характеристики их фототаксиса изменились весьма примечательным образом. Выяснилось, что спектр действия фототаксиса у трансформанта, обогащенного родопсином А, сдвинут в длинноволновую область по сравнению со спектром дикого типа, а спектр действия фототаксиса у трансформанта, обогащенного

родопсином В, — в коротковолновую! Эти сдвиги спектров действия, во-первых, доказывают, что оба родопсина действительно служат в клетке рецепторами фототаксиса, а, во-вторых, свидетельствуют о том, что спектры поглощения этих пигментов различаются приблизительно на 40 нм.

Но наиболее интересные вещи обнаружались при анализе фотоэлектрических ответов этих трансформантов. Дело в том, что еще задолго до обнаружения у хламидомонады генов ретинальсодержащих белков, Олегом Алексеевичем Синешекковым, руководителем нашей группы, было установлено, что фотовозбуждение этих рецепторов приводит к генерации трансмембранных электрических токов в клетках зеленых жгутиковых водорослей. Это была исключительно тонкая работа: клетки эти настолько малы, что разрушаются при введении обычных микроэлектродов. Чтобы обойти эту трудность, О.А. Синешекков изобрел специальный метод электрода-присоски, позволяющий измерять электрические сигналы экстраклеточно (рисунок 5). Засасывая в микроприсоску разные участки клеточной мембраны, он выяснил, что освещение вызывает протекание тока через участок мембраны, непосредственно примыкающий к глазку, — тот самый, где предположительно располагаются фоторецепторные молекулы. Спектр действия этого тока, названного «фоторецепторным», и другие его свойства (в частности, отсутствие этого тока у «слепых» мутантов) не оставляли сомнений, что именно он представляет собой самое первое звено в цепи трансдукции сигнала при фототаксисе. Используя очень короткие лазерные импульсы и систему регистрации с высоким временным разрешением, О.А. Синешекков показал, что фоторецепторный ток на самом деле состоит из по крайней мере двух кинетических компонентов —

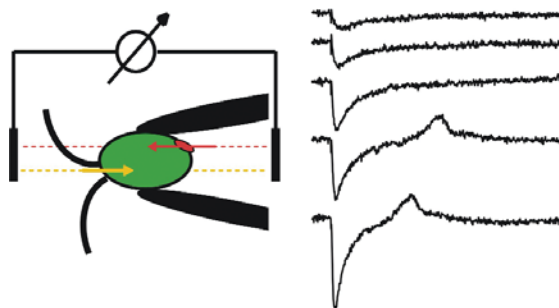


Рисунок 5. Схема метода измерения фотоиндуцированных трансмембранных токов в клетках жгутиковых водорослей методом электрода-присоски (слева) и серия таких токов, регистрируемых в ответ на возбуждение вспышками света возрастающей интенсивности (справа; верхний ответ — на самую слабую вспышку).

быстрого и медленного. Анализ зависимости амплитуды тока от интенсивности светового стимула к тому же выявил, что в его генерации участвуют два процесса, различающиеся на несколько порядков по уровню светового насыщения. Таким образом, стало ясно, что фоторецепторная система зеленых жгутиковых водорослей гетерогенна, но определить, в чем причина этой гетерогенности, при исследованиях на диком типе не удавалось.

Когда же О.А. Синешекон измерил фоторецепторный ток, генерируемый трансформантом хламидомонады, обогащенный родопсином А, то оказалось, что этот ток существенно быстрее, чем ток дикого типа (рисунок 6), и его амплитуда насыщается при более высокой интенсивности света. Ток же у трансформанта, обогащенного родопсином В, наоборот, замедлен по сравнению с диким типом (и уж тем более с током первого трансформанта!) и характеризуется более низким световым насыщением. И сразу стало ясно, что два компонента тока, выявленные еще при исследованиях на диком типе, просто-напросто генерируются двумя различными рецепторными пигментами — сенсорными родопсинами А и В.

Как быстрый, так и медленный компоненты фоторецепторного тока направлены внутрь клетки, так что их протекание деполяризует клеточную мембрану (т.е. уменьшает отрицательный мембранный потенциал). Когда эта деполяризация достигает некоторого порогового уровня под действием светового стимула достаточно высокой интенсивности или дли-

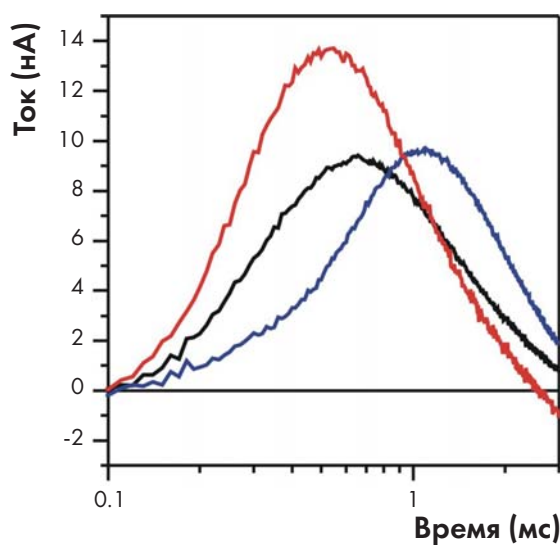


Рисунок 6. Фоторецепторные токи, генерируемые диким типом хламидомонады (черная линия), трансформантом, обогащенным родопсином А (красная линия) и трансформантом, обогащенным родопсином В (синяя линия).

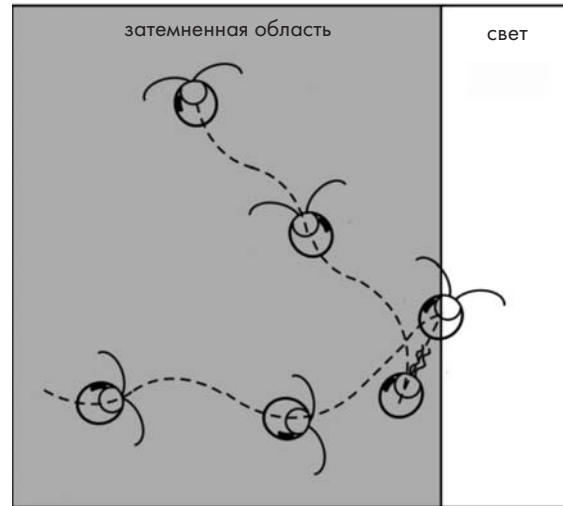


Рисунок 7. Схема фотофобной реакции жгутиковых водорослей.

тельности, в мембране, покрывающей жгутики клетки, открываются кальциевые каналы, и во внутрижгутиковое пространство начинают поступать ионы кальция, что регистрируется как острый импульс так называемого жгутикового тока (на рисунке 5 этот импульс хорошо различим в сигналах, полученных в ответ на вспышки высокой интенсивности). Резкое повышение концентрации ионов кальция внутри жгутов приводит к тому, что вместо обычного биения, в результате которого клетка плывет вперед как бы «брассом», жгутики начинают ундулировать, т.е. совершать волнообразные движения, что заставляет клетку сначала резко остановиться, а потом двигаться назад. Этот «задний ход» длится только короткое время, после чего клетка снова переключается на движение вперед, но уже, как правило, в другом направлении. В природе такое поведение можно наблюдать, когда клетка случайно заплывает в ярко освещенное место из неосвещенной области. Клетку как будто охватывает «испуг» при пересечении границы темноты и света, почему ее поведение в этом случае и назвали «фотофобной», или «фотошоковой», реакцией (рисунок 7).

Понятно, что, раз оба тока, генерируемые при фотовозбуждении и родопсина А, и родопсина В, деполяризуют клеточную мембрану, в принципе оба они могут приводить не только к фототаксису, но и к фотофобной реакции. Это предположение было доказано экспериментально при сравнении спектральной чувствительности у трансформантов, обогащенных каждым из двух белков. Однако вклад тока В, как имеющего более низкое световое насыщение, в фотофобную реакцию относительно меньше, чем вклад высоконасыщающегося

тока А. Иными словами, можно сказать, что родопсин В отвечает в клетке в основном за фототаксис, а родопсин А — за фотофобную реакцию. Такое «разделение труда» может объяснять и различие спектральных характеристик этих двух пигментов. Фототаксис основан на затенении фоторецептора стигмой и хлоропластом, а поглощение этих образований, особенно хлоропласта, лежит в коротковолновой области. Чтобы затенение было эффективным, фоторецептор, отвечающий за фототаксис, также должен поглощать свет в коротковолновой области. Фотофобная же реакция, в отличие от фототаксиса, не зависит от направления света, а значит, нет необходимости «подгонять» спектр поглощения ее фоторецептора под спектральные характеристики затеняющих образований.

Как бы то ни было, наличие в одной и той же клетке нескольких родственных фоторецепторных белков — по-видимому, общее правило, а не исключение: так, в клетках растений может присутствовать целых пять различных фитохромов (рецепторов красного света, обеспечивающих фоторегуляцию многих морфогенетических процессов); рецепторов синего света, криптохромов и фототропинов, обычно тоже бывает несколько. Что же касается родопсиновых пигментов, то, как уже упоминалось, даже в совсем простых клетках галоархей имеется два сенсорных родопсина, а семейство таких белков у многоклеточного животного организма может содержать до тридцати членов — как, например, у гидры. Правда, у многоклеточных эти белки чаще всего избирательно синтезируются только в определенных клетках, причем, как недавно выяснилось, далеко не только в клетках сетчатки глаза. Например, белок меланопсин у шпорцевой лягушки был обнаружен в меланофорах — клетках кожи, обеспечивающих ее окраску за счет содержащегося в них пигмента меланина и способных перемещаться в коже под действием света. При этом меланопсин выступает в качестве фоторецептора этого перемещения. А у крыс тот же меланопсин содержится в сетчатке, но не в фоторецепторных ее клетках, палочках и колбочках, где находятся собственно зрительные пигменты, а в ганглиозных, и отвечает он не за зрение, а за световую регуляцию фазы циркадных (около-суточных) ритмов. Другие «нестандартные» родопсины животных обнаружены в глубине мозга или вообще в семенниках, у клеток которых уж совсем трудно предполагать какую-либо нужду в фоторегуляции. Зачем этим клеткам родопсины, пока что не ясно.

Не установлена пока и клеточная функция многих родопсиновых белков, гены которых

были идентифицированы в геномах разнообразных представителей других царств. Один из самых трудных случаев — это, по-видимому, родопсины, обнаруженные у грибов. Первым таким грибом была нейроспора — особый род плесени, широко используемый для лабораторных исследований. У нейроспоры известно несколько фоторегуляторных реакций, в основном связанных с развитием органов размножения. В отличие от хламидомонады, нейроспора — исключительно удобный объект для направленного разрушения генов, чем в значительной мере и объясняется ее популярность у ученых. Вывести штамм нейроспоры с разрушенным опсиновым геном было нетрудно. Однако оказалось, что все известные фоторегуляторные реакции протекают у этого штамма точно так же, как и у дикого типа, а значит ни одна из них не опосредована родопсиновым рецептором! Разрешение этой загадки — задача для будущих исследователей.

Выяснение клеточной функции конкретного пигмента — это только начало его изучения, потому что интересно знать не только, что он делает, но и как. Поскольку основное свойство пигментов — способность поглощать свет, естественно, что основным инструментом для их изучения служит абсорбционная спектроскопия, а также другие оптические методы, разнообразие и эффективность которых постоянно увеличиваются по мере совершенствования их технического обеспечения. Доступность лазеров, способных генерировать ультракороткие вспышки света, сейчас позволяет исследовать фотохимические процессы с временным разрешением в субфемтосекундном диапазоне (для справки: фемто — это десять в минус пятнадцатой степени). Чувствительность же используемых в настоящее время детекторов света позволяет регистрировать, например, флуоресценцию индивидуальных молекул. Однако для применения большинства самых информативных оптических методов все же требуется достаточно большое количество более или менее очищенного пигмента. В случае, например, фотосинтетических пигментов это очень просто: они присутствуют в клетках в колоссальной концентрации. Но клеточная концентрация пигментов фоторецепторных, как правило, настолько мала, что выделить их в чистом виде никак не удастся. Как уже говорилось, это относится и к сенсорным родопсинам хламидомонады: их наличие в клетках (и в отдельных клеточных фракциях — а именно, во фракции мембран, примыкающих к глазку) удалось показать сверхчувствительными иммунологическими методами, но все попытки их препаративного выделения оказались неудачными.

Альтернативная стратегия, позволяющая обойти эту трудность, заключается в производстве требуемых количеств исследуемого белка в модельном организме — чаще всего в бактерии *Escherichia coli* (кишечной палочке), широко используемой для молекулярного клонирования. Используя специальные генно-инженерные приемы, удается заставить бактерию синтезировать так много заданного чужеродного белка, что он составляет более половины всего ее белкового содержания! Если чужеродный белок — пигмент, то колонии бактерий, синтезирующих такой белок, приобретают его окраску и выглядят на агаре очень красиво. Когда интересующего нас белка в клетке так много, выделить его в чистом виде, конечно, не составляет особого труда. Тем более, что к нему заранее (т.е. еще на уровне генетической конструкции, которую используют для трансформации бактерий) «подшивают» группы, облегчающие очистку. Чаще всего в качестве такой группы используют последовательность из нескольких (от шести до десяти) остатков гистидина — аминокислоты, боковая цепь которой образует прочный комплекс с ионами металлов. Лизат клеток, синтезирующих чужеродный белок с такой дополнительной последовательностью на одном из концов, пропускают через хроматографическую колонку с иммобилизованными на агарозе ионами никеля (рисунок 8). Полигистидиновые «хвостики» удерживают содержащие их молекулы белка на колонке, а все остальные белки легко проходят сквозь нее. Потом колонку с «прилипшими» к ней нашими белками промывают веществом, разрушающим связи гистидина с никелем, и — voila! — мы получили препарат нашего белка, пригодный для оптических или биохимических исследований. Такой способ очистки белка называют аффинной хроматографией («аффинность» означает «сродство», в данном случае химическое). Если же требуется еще более высокая степень очистки белка (например, для выращивания его кристаллов), то полученный с помощью аффинной хроматографии препарат подвергают еще нескольким последовательным процедурам фракционирования, основанным уже на других принципах — например, разделения молекул по массе или по отношению массы к заряду.

Дополнительное преимущество такого подхода состоит в возможности направленного мутагенеза с целью изучения взаимосвязи структуры и функции белка. Ведь бактерию легко трансформировать не только геном дикого типа, но и искусственным геном — в последовательности которого триплет, кодирующий

интересующий нас остаток аминокислоты, заменен на триплет, кодирующий другую аминокислоту. Первичная последовательность белка, транслируемого с этого гена, будет отличаться от белка дикого типа только на одну эту аминокислоту, так что сравнение свойств мутантного белка с белком дикого типа покажет, какое значение имеет данный аминокислотный остаток для функции нашего белка. Действуя последовательно, т.е. мутируя одну аминокислоту за другой и производя сравнительный анализ получаемых мутантов, можно получить очень детальную картину того, как работает наш белок.

Использование кишечной палочки как своеобразного «станка» по производству чужеродных белков оказалось очень эффективным в случае родопсинов прокариотического происхождения. К сожалению, при экспрессии в *E. coli* опсиновых генов эукариотических организмов полипептидная цепь чаще всего сворачивается неправильно, что приводит к образованию

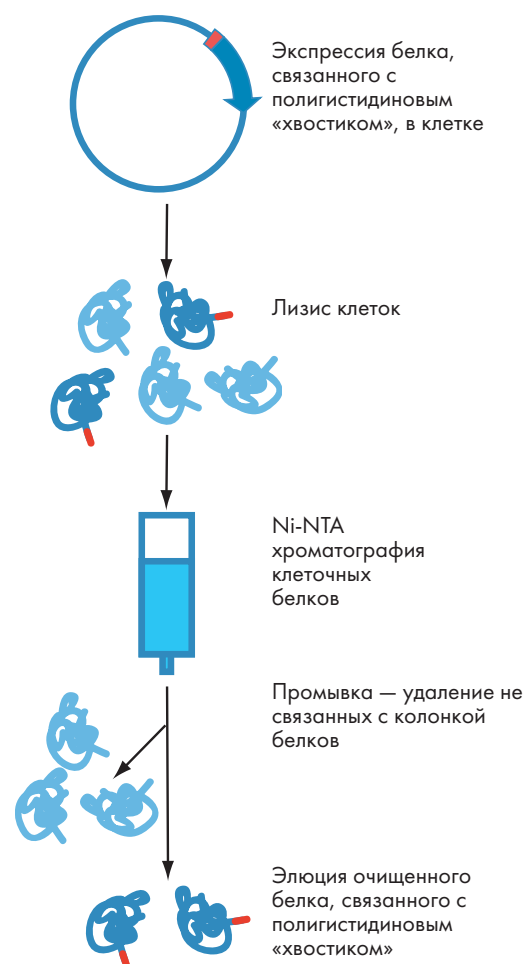
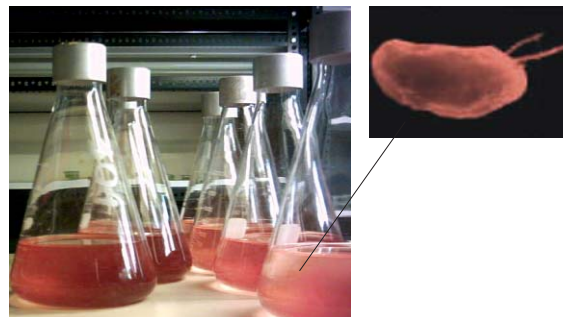


Рисунок 8. Схема очистки белка, содержащего гистидиновый «хвостик», при помощи аффинной хроматографии на никель-агарозной колонке.

Фоторецепторы

функционально неактивного белка, не способного даже связывать ретиналь. В частности, это происходит с сенсорными родопсинами хламидомонады: получить в модельной бактериальной системе полноценный пигмент не удается. А вот в случае другой водоросли, относящейся к отряду криптофитовых, это оказалось возможно. У этой водоросли, латинское название которой *Guillardia theta*, в геноме имеются по крайней мере два опсиновых гена, и, когда мы экспрессировали один из них в *E. coli*, получился полноценный пигмент. У *G. theta* тоже есть фототаксис, как и у хламидомонады. Пик поглощения пигмента, синтезированного в *E. coli*, соответствует плечу спектра действия фототаксиса самой *G. theta*, так что есть основания считать, что этот родопсиновый пигмент выполняет в клетке функцию одного из рецепторов фототаксиса. Для окончательной проверки этой гипотезы необходимы эксперименты с подавлением активности этого гена и исследованием фенотипических последствий этого подавления, как это было сделано для хламидомонады.

Интересно, что криптофитовые водоросли филогенетически очень далеки от зеленых водорослей, к которым принадлежит хламидомонада. Более того, криптофиты представляют собой совершенно уникальные организмы, содержащие четыре генома в клетке. Помимо трех «обычных» геномов — ядерного, хлоропластного и митохондриального — имеющихся также и у хламидомонады, у криптофитов обнаруживается еще один дополнительный геном, геном так называемого «нуклеоморфа». Откуда же он взялся? Дело в том, что криптофиты, так же как и некоторые другие группы водорослей, например диатомеи, — продукты вторичного эндосимбиоза (рисунок 9). В ходе их эволюции процесс поглощения фотосинтезирующего организма гетеротрофным происходил дважды: первый раз, когда один гетеротроф поглотил фотосинтезирующую бактерию, в результате чего образовался первичный эндосимбиотический организм (т.е. такой, какие представляют из себя ныне живущие зеленые водоросли), и второй раз, когда другой гетеротроф (надо полагать, большего размера, чем первый!) поглотил первичный эндосимбиотический организм, что привело к образованию вторичного эндосимбиотического организма. Так вот, криптофиты — одна из только двух групп водорослей (причем вторая — совсем малоизученная), у которых сохраняется, хотя и в редуцированном виде, ядро первого гетеротрофа, в то время как у всех остальных групп, прошедших в эволюции тот же путь вторичного эндосимбиоза, оно начисто исчезает.



нуклеоморф (произошел из ядра красной водоросли)

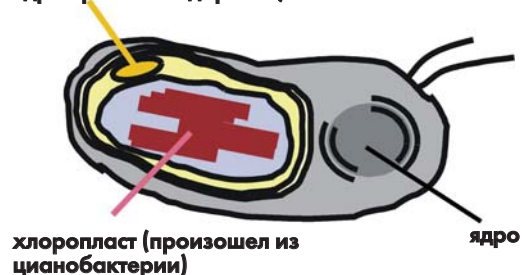


Рисунок 9. Культура криптофитовой водоросли *G. theta*, ее отдельная клетка (изображение получено при помощи сканирующего электронного микроскопа) и схема строения этой клетки, отражающая ее происхождение в результате вторичного эндосимбиоза.

Каким образом опсиновые гены попали в геном криптофитовых водорослей, пока не ясно. Да и вообще распределение этих генов среди организмов различных групп, геномы которых были полностью секвенированы к настоящему времени, совершенно загадочно. Например, среди множества цианобактерий с полностью известными геномами опсиновые гены найдены только у двух видов, находящихся, можно сказать, на противоположных полюсах всего разнообразия цианобактерий: у *Globacter violaceus*, одиночной цианобактерии, считающейся наиболее примитивной, предковой, формой, и у одной из наиболее сложно организованных, нитчатой *Anabaena*, причем только у одного вида (точнее, даже штамма) из этого обширного рода. В довершение сложности картины, между этими двумя цианобактериальными белками очень мало сходства как по структуре (первичной последовательности), так и по функции: родопсин *Globacter* представляет собой протонную помпу, как бактериородопсин, а родопсин *Anabaena* — фоторецептор, но не фототаксиса (которого нет и не может быть у этого неподвижного штамма), а фоторегуляции пигментного состава фотосинтетического аппарата. Так что анализ молекулярной эволюции опсиновых генов — еще одна весьма непростая задача для будущих ученых.

Поскольку родопсины хламидомонады, в отличие от цианобактериальных и других прокариотических, производят в бактериях пока что не удается, для этой цели были опробованы другие модельные системы. Успеха удалось добиться с ооцитами шпорцевой лягушки, которые, в отличие от бактерий, совершенно не годятся для наработки больших количеств чужеродных белков, но зато предоставляют отличные возможности для исследования этих белков электрофизиологическими методами. Ооциты лягушки — это очень большие клетки (икру пусть не шпорцевых, но обыкновенных лягушек все видели в пруду весной), в которые можно легко вводить микроэлектроды (рисунок 10). Сравнивая электрические сигналы, отводимые микроэлектродами от контрольных ооцитов и ооцитов, инъецированных матричной РНК исследуемого белка, можно определить, какую именно электрическую активность проявляет данный белок.

Результаты такого эксперимента для обоих родопсинов хламидомонады оказались совершенно удивительными, а именно оказалось, что эти белки представляют собой фотоактивируемые ионные каналы — единственные в своем роде, поскольку ничего подобного ранее было в природе неизвестно! Разница же между ионным каналом и ионной помпой заключается не только в том, что последняя может перекачивать ионы против их электрохимического градиента, но и в том, что трансмембранные токи, генерируемые помпами, по своей амплитуде обычно меньше токов через ионные каналы. Это и понятно: ионные помпы, такие как бактериородопсин, перекачивают только один протон на каждый поглощенный квант света, а через канал, активированный одним квантом, может пройти последовательно много ионов.

Именно с этой стороны фотоактивируемые ионные каналы, каковыми оказались родопсины хламидомонады, особенно второй из них, — родопсин В, чрезвычайно заинтересовали исследователей: ведь наличие такого канала в мембране клетки означает возможность манипулировать ее мембранным потенциалом просто при помощи света. Немедленно были предприняты попытки экспрессии опсинового гена В хламидомонады в нейронах разнообразных животных организмов — и они оказались успешными! Такие трансформированные нейроны оказались способны генерировать потенциал

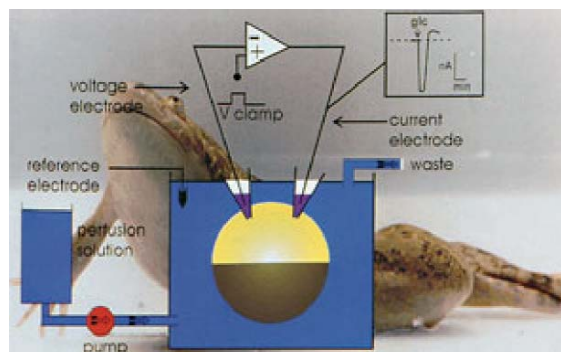


Рисунок 10. Шпорцевая лягушка и схематическое изображение ее ооцита с введенными в него двумя микроэлектродами в цепи измерения электрических токов.

действия в ответ на освещение и запускать таким образом контролируемый ими физиологический ответ — например, сокращение мышц в случае мотонейронов. Но наиболее практически значимый результат был достигнут, когда ген опсинов В экспрессировали в ганглиозных клетках сетчатки слепых крыс, у которых палочки и колбочки совершенно дегенерировали в результате болезни, весьма распространенной также и у людей. Трансгенные крысы приобрели способность если не видеть, то по крайней мере ясно различать свет и темноту, поскольку электрические сигналы, генерируемые родопсином В хламидомонады в мембране ганглиозных клеток, адекватно интерпретировались крысиным мозгом. Так что вполне возможно, что через несколько лет экспрессия родопсинов водорослей в сетчатке глаза станет рутинным способом восстановления зрения и у слепых людей.

Эта история очень наглядно показывает, каким непредсказуемым образом развиваются научные исследования и к каким неожиданным практическим результатам они могут приводить. А ведь родопсины хламидомонады — это только один, хотя и совершенно уникальный, вариант ретинальсодержащего белка, которых к настоящему времени уже известно около тысячи. Вернее, столько известно нуклеотидных последовательностей опсиновых генов, обнаруженных в ходе разнообразных проектов секвенирования геномов культивированных организмов, и особенно — образцов ДНК, выделенных непосредственно из проб морского нанопланктона, преимущественно состоящего из прокариот. Изучение же свойств белков, кодируемых всеми этими генами, ждет будущих исследователей!