

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Ротов Александр Юрьевич**

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И БЫСТРОДЕЙСТВИЕ ПАЛОЧЕК И  
КОЛБОЧЕК: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.б.н., чл.-корр. РАН  
Фирсов Михаил Леонидович

Санкт-Петербург  
2023

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Строение и электрический ответ фоторецепторных клеток .....	11
1.2 Структура и свойства зрительных пигментов .....	15
1.2.1 <i>Общая характеристика зрительных пигментов .....</i>	15
1.2.2 <i>Фотолиз – распад зрительного пигмента после обесцвечивания ...</i>	17
1.2.3 <i>Спонтанные изомеризации зрительного пигмента .....</i>	20
1.3 Каскад фототрансдукции и его основные этапы .....	22
1.3.1 <i>Механизмы активации каскада фототрансдукции .....</i>	22
1.3.2 <i>Механизмы выключения каскада фототрансдукции .....</i>	25
1.3.3 <i>Начальная задержка фоторецепторного ответа .....</i>	28
1.4 Примеры функциональных переходов фоторецепторов позвоночных.....	33
1.4.1 <i>Теория трансмутаций фоторецепторов .....</i>	33
1.4.2 <i>Зеленые палочки амфибий .....</i>	39
1.4.3 <i>Палочкоподобные рецепторы круглоротых .....</i>	42
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1 Объекты исследования и подготовка препаратов .....	46
2.2 Регистрация и анализ электрических ответов фоторецепторов.....	48
2.2.1 <i>Регистрация тока изолированных клеток .....</i>	48
2.2.2 <i>Регистрация фоторецепторного потенциала сетчатки .....</i>	50
2.2.3 <i>Анализ кинетики различных этапов фототрансдукции .....</i>	52
2.2.4 <i>Анализ дискретного темнового шума .....</i>	55
2.3 Микроспектрофотометрия зрительных пигментов .....	57
2.3.1 <i>Регистрация и анализ спектров .....</i>	57
2.3.2 <i>Анализ спектров и кинетики фотолиза .....</i>	58
2.4 Статистическая обработка данных.....	62
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	63
3.1 Анализ спектральных свойств зрительных пигментов и их чувствительности к падающему свету.....	63

3.2 Выявление этапов активации каскада фототрансдукции, вносящих основной вклад в задержку фотоответа.....	67
3.3 Сравнительный анализ длительности задержки в различных фоторецепторах .....	71
3.4 Сравнительный анализ чувствительности различных фоторецепторов ....	75
3.5 Кинетика ответов различных фоторецепторов на этапах включения и выключения каскада фототрансдукции .....	79
3.6 Кинетика фотолиза зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками .....	86
3.7 Стабильность зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками .....	91
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	98
4.1 Задержка фотоответа в колбочках: проблема скорости активации фосфодиэстеразы.....	98
4.2 Зеленые палочки бесхвостых амфибий: сверхспециализированные рецепторы ночного зрения .....	102
4.2.1 <i>Повышенная чувствительность зеленых палочек и ее функциональное значение .....</i>	102
4.2.2 <i>Необычные свойства зрительного пигмента зеленых палочек .....</i>	105
4.3 Палочкоподобные рецепторы круглоротых: переходная форма между колбочками и палочками? .....	108
4.3.1 <i>Морфологическая и функциональная классификация коротких рецепторов миноги .....</i>	108
4.3.2 <i>Эволюционное происхождение участников каскада фототрансдукции коротких рецепторов миноги.....</i>	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	115
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	118
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	120
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	138
Приложение 1: Математическая модель фотоответа .....	138

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Зрительная система позвоночных способна функционировать в широком диапазоне интенсивностей природного освещения благодаря двум принципиально различным типам фоторецепторов: палочкам и колбочкам. Палочки функционируют при ночных и сумеречных интенсивностях света, в то время как колбочки отвечают за дневное зрение. Изначально принадлежность фоторецептора к одной или другой категории определялась в первую очередь по его специфической морфологии: палочки имеют цилиндрическую форму, а колбочки – коническую, и они, как правило, меньшего размера (Каламкарров, Островский, 2002). Однако в ходе многолетних исследований накопилось много примеров позвоночных, у которых морфология фоторецептора не позволяет однозначно отнести его к палочкам или колбочкам. Также известны случаи, когда морфология не соответствует физиологической функции фоторецептора, например, колбочкоподобные рецепторы ночного зрения некоторых рептилий (Walls, 1934).

Существование фоторецепторов с промежуточной палочко-колбочковой морфологией хорошо объяснялось в рамках концепции, сформулированной Г. Уоллсом в 1942 г., и получившей название «теория трансмутаций фоторецепторов» (Walls, 1942). Согласно ей, фоторецепторы в ходе эволюции подстраивают свою морфологию под условия окружающей среды, а если какой-либо тип рецептора оказывается бесполезным, он теряется. При необходимости, аналог утраченного рецептора может образоваться за счет преобразования («трансмутации») сохранившегося типа – таким образом, палочки и колбочки возникали неоднократно и независимо в разных группах позвоночных. Согласно современным представлениям, функциональная роль фоторецептора в большей степени, чем морфологией, обуславливается биохимией сигнального каскада, преобразующего свет в электрический ответ клетки – каскада фототрансдукции. Большая часть белков этого каскада существуют в палочко- и колбочко-специфичной форме, и образуют, с одной

стороны, принципиально одинаковые биохимические каскады, с другой – сильно различные по кинетике тех или реакций (Lamb, 2020). В ходе эволюции линии палочко- и колбочко-специфичных изоформ не прерывались и не переходили одна в другую, как предполагал Уоллс, однако очевидно имеют место отдельные случаи трансмутации колбочек в палочкоподобные клетки и наоборот (Говардовский, 1983). При таких переходах, помимо морфологических изменений, принадлежность имеющихся в клетке фототрансдукционных белков к палочковой или колбочковой изоформе сохраняется, но изменяется уровень их экспрессии и/или происходят локальные аминокислотные замены в функциональных доменах. В результате на базе элементов колбочкового каскада может быть построен типичный рецептор ночного зрения (Zhang et al., 2006).

Таким образом, по морфологии и палочко-колбочковой специфике белков сигнального каскада не всегда возможно определить истинную функциональную роль фоторецептора. Поэтому некоторыми авторами предлагается определение понятий «палочка» и «колбочка» через их физиологические свойства, без привязки к морфологии (Lamb, 2013). В такой формулировке типичными палочками считаются фоторецепторы, способные к детекции одиночных фотонов, и насыщающиеся при умеренных дневных освещенностях (10 – 100 лк). Типичные же колбочки могут функционировать, не насыщаясь, при максимальных природных освещенностях (до 100000 лк и выше), а их ответ на вспышку света примерно на порядок быстрее, чем у палочек (Говардовский с соавт., 2015).

Несомненно, такой подход отражает лишь внешние проявления физиологических и биохимических механизмов, обеспечивающих выполнение фоторецепторами их специфических функций. В частности, быстрый фотоответ колбочек, обеспечивающий зрение с высоким временным разрешением, напрямую связан с особенностями работы их каскада фототрансдукции. колбочках реакции выключения и кальциевой обратной связи протекают примерно в 10 раз быстрее, чем в палочках (Astakhova et.al., 2015), что помогает

избегать насыщения даже при высоких уровнях освещенности. Также у колбочек повышена по сравнению с палочками скорость распада зрительного пигмента после обесцвечивания, благодаря чему он быстрее выводится из трансдукционного оборота и оказывается готов к регенерации (Golobokova, Govardovskii, 2006). Способность же палочек к детектированию одиночных фотонов во многом обеспечивается медленной кинетикой ответа – при этом увеличивается время интегрирования и повышается чувствительность к фоновым засветкам низкой интенсивности. Сумеречное зрение также требует высокого соотношения сигнал/шум для надежной реакции на единичные фотоны. Неизбежно возникающие спонтанные термические изомеризации зрительного пигмента создают собственный шум клетки, снижающий это отношение (Baylor et al., 1980). Однако, зрительный пигмент палочек значительно более стабилен, чем у колбочек, его спонтанные изомеризации происходят сравнительно редко, что позволяет сохранять высокую чувствительность (Donner et al., 1990).

Приведенные физиологические и биохимические параметры чувствительности и быстродействия могут быть оценены количественно, что потенциально позволяет сопоставить известные примеры трансмутированных фоторецепторов позвоночных с типичными палочками и колбочками и подтвердить или опровергнуть их переходный характер. Также такой анализ может выявить конкретные физиологические изменения, сопровождающие переход клетки от одного типа к другому. В рамках данной работы, помимо описанных выше характеристик чувствительности и быстродействия клетки, была дополнительно рассмотрена физиологическая природа начальной задержки фотоответа и определены определяющие ее величину элементы фототрансдукционного каскада. Затем, кинетика фотоответов и биохимия зрительных пигментов были описаны для классических палочек холонокровных позвоночных, а также для трех типов фоторецепторов, обладающих переходными свойствами – коротких палочкоподобных

рецепторов круглоротых (Govardovskii, Lychakov, 1984), и зеленых палочек бесхвостых амфибий (Matthews, 1983).

### **Цель и задачи исследования**

Цель данного исследования – проведение сравнительного анализа основных физиологических параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответов различных фоторецепторов позвоночных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить этапы активации фототрансдукционного каскада, определяющие длительность задержки электрического ответа фоторецепторов.
2. Оценить параметры, определяющие кинетику фотоответа коротких рецепторов миноги и зеленых палочек амфибий и сравнить их с величинами, характерными для палочек и колбочек холоднокровных.
3. Определить скорость фотолиза зрительного пигмента и частоту его спонтанных изомеризаций у коротких рецепторов миноги и зеленых палочек амфибий и сопоставить их со значениями типичных палочковых и колбочковых пигментов.

### **Научная новизна исследования**

В рамках данной работы впервые изучается вопрос о происхождении задержки фотоответа и выявляются конкретные этапы, определяющие длительность этой стадии. Дается оценка скорости активации фосфодиэстеразы G-белком трансдуцином, причем значение для колбочек оказывается необъяснимым в рамках текущих представлений об активации каскада.

В сетчатке речной миноги имеется два типа фоторецепторных клеток, короткие и длинные рецепторы, функционально близкие к палочкам и колбочкам, соответственно (Govardovskii, Lychakov, 1984; Asteriti et al., 2015). В представленной работе впервые проводится сравнение коротких рецепторов с типичными палочками холоднокровных позвоночных. Также впервые исследуется их способность к спонтанной генерации фотоответов в темноте, и кинетика фотолиза их зрительного пигмента.

Бесхвостые амфибии, помимо типичных палочек и колбочек, имеют уникальный тип фоторецепторов – так называемые «зеленые палочки». Они обладают высокой чувствительностью и насыщаются при умеренных засветках, то есть, функционально, являются рецепторами сумеречного зрения (Matthews, 1983; Matthews, 1984). Однако оценка частоты спонтанных изомеризаций пигмента полученная в ранних работах позднее подвергалась сомнению (Luo et al., 2011). Данное исследование разрешает данное противоречие. Также мы впервые дали оценку кинетическим параметрам фотоответа зеленых палочек и сравнили их с типичными, «красными» палочками, присутствующими в сетчатке того же вида амфибий.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Разработка вопроса об источнике возникающей задержки в каскаде фототрансдукции разрешает вопрос о том, какая стадия активации каскада является лимитирующей, но также ставит перед научным сообществом новый вопрос: какие отличия на молекулярном уровне позволяют колбочкам поддерживать столь короткую задержку по сравнению с палочками?

Использованный в рамках данной работы подход – количественная характеристика параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответа фоторецепторов и сравнение с типичными палочками и колбочками – позволяет подтвердить или опровергнуть переходный характер рецепторов некоторых позвоночных, традиционно считающихся примерами «трансмутации». Такой анализ также может помочь в определении ключевых перестроек, и конкретных значений биохимических параметров, необходимых для функционирования клетки в роли рецептора ночного или дневного зрения. Подобные знания могут оказаться полезными при разработке искусственных трансдукционных каскадов, направленных на протезирование утраченной зрительной функции.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Задержка в каскаде фототрансдукции определяется кинетикой этапа активации фосфодиэстеразы трансдуцином, причем скорость этого процесса в колбочках оказывается в 10 раз выше, чем в палочках.

2. Зеленые палочки бесхвостых амфибий являются высокоспециализированными рецепторами ночного зрения, повышая чувствительность за счет замедления выключения в каскаде фототрансдукции.

3. Зрительный пигмент зеленых палочек совмещает высокую стабильность, характерную для родопсина типичных палочек, с высокой скоростью фотолиза, типичной для колбочковых пигментов.

4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный тип фоторецептора, поскольку эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них приближена к типичным колбочкам, кинетика выключения – к палочкам.

5. Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги по стабильности и скорости фотолиза занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми.

### **Апробация результатов исследования**

Основные результаты исследования были представлены на Российских и Международных конференциях: XV и XVI Всероссийском совещании с международным участием по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016, 2020); 9-ой и 11-ой Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017, 2021); конференции, посвященной 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелева «Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу» (Москва, 2022); XV, XVI, XVII и XX Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2016, 2017, 2018, 2022).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 работ в печатных изданиях, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными базами данных научного цитирования Scopus и Web of Science Core Collection; 10 тезисов конференций.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в планировании экспериментов, поддержании популяции лабораторных животных. Экспериментальные результаты и их анализ, приведенные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автором проведена статистическая обработка полученных данных и их обобщение, также он принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (190 источников) и приложения. Работа проиллюстрирована 37 рисунками и включает 4 таблицы.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

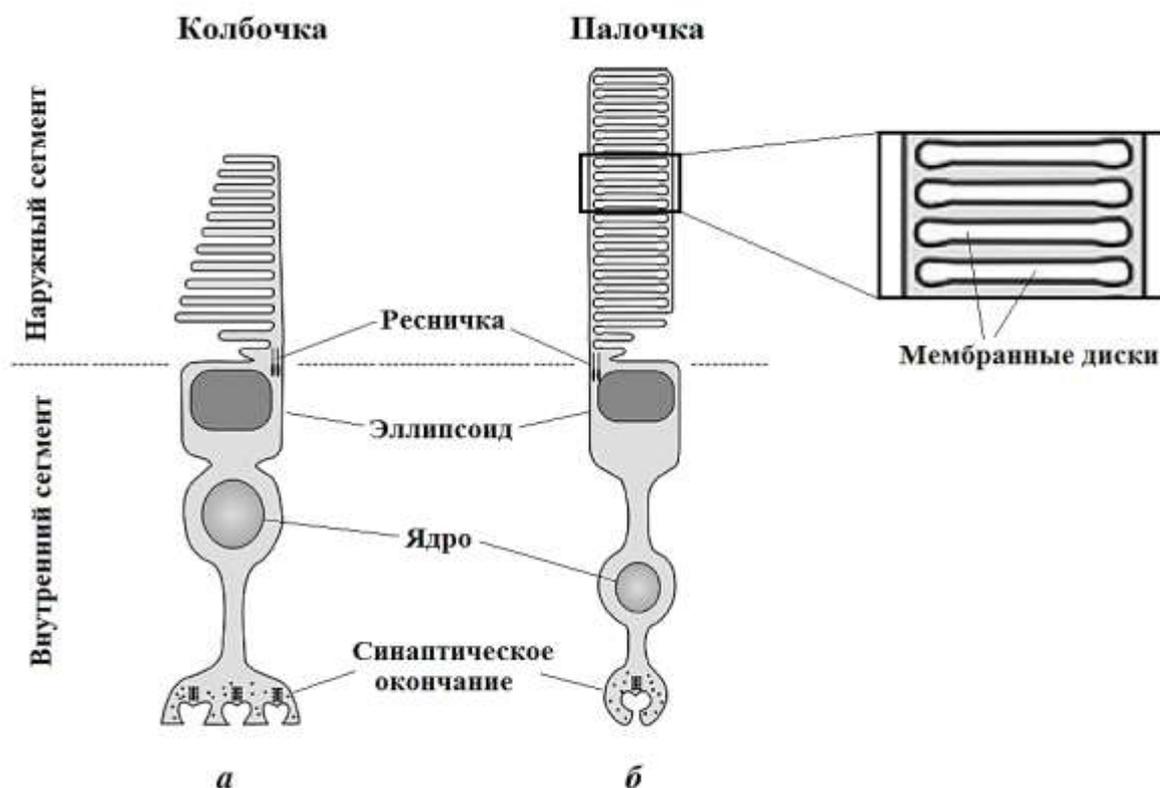
### 1.1 Строение и электрический ответ фоторецепторных клеток

Фоторецепторы – сенсорные клетки сетчатки глаза, обеспечивающие восприятие светового стимула и генерацию электрического ответа, передающегося в последующие отделы нервной системы. У позвоночных они делятся на два типа – палочки и колбочки. Палочки обеспечивают ночное зрение, обладают высокой чувствительностью к свету, реагируя даже на одиночные кванты света, но обеспечивают довольно низкую временную и пространственную разрешающую способность (Pugh, Lamb, 2000). Дневные рецепторы – колбочки – имеют чувствительность на 2-3 порядка ниже, чем у палочек, но они обеспечивают высокую остроту зрения при дневных уровнях освещенности (от 100-1000 лк и выше, см. Каламкаров, Островский 2002; Говардовский с соавт., 2015).

Фоторецепторные клетки принято делить на два основных сегмента – внутренний и наружный (Рис. 1). Во внутреннем сегменте отдельно выделяется эллипсоид – область, содержащая большое количество митохондрий. Между эллипсоидом и ядром располагается аппарат белкового синтеза. От области, занятой ядром, отходит синаптический отросток. В его окончании происходит химическая передача сигнала от фоторецептора к другим нейронам сетчатки. Внутренний сегмент связан с наружным тонкой соединительной ресничкой. В наружном сегменте происходит поглощение света и реализуется фототрансдукция – процесс преобразования светового сигнала в электрический.

Наружные сегменты палочек имеют цилиндрическую форму, их характерные размеры варьируют от 20 до 60 мкм в длину и от 2 до 15 мкм в диаметре (Pugh, Lamb, 2000). Плазматическая мембрана наружного сегмента ограничивает объем, заполненный большим количеством плоских мембранных дисков (Рис. 1Б). Диски полностью отделены от наружной мембраны, поддерживаются цитоскелетом и образуют упорядоченную периодическую

структуру, с расстоянием между центрами соседних дисков 30 нм. Количество дисков варьирует от нескольких сотен до нескольких тысяч, что определяется размерами наружного сегмента. Большой размер наружного сегмента и большое количество дисков характерны для животных, ведущих ночных образ жизни (Каламкарров, Островский 2002). У колбочек наружные сегменты конической формы, и, как правило, меньше, чем у палочек. Мембранные диски колбочек представляют собой складки плазматической мембраны наружного сегмента и сообщаются с внеклеточным пространством.



**Рис. 1.** Схема строения палочки (а) и колбочки (б) позвоночных (по Lamb, 2013).

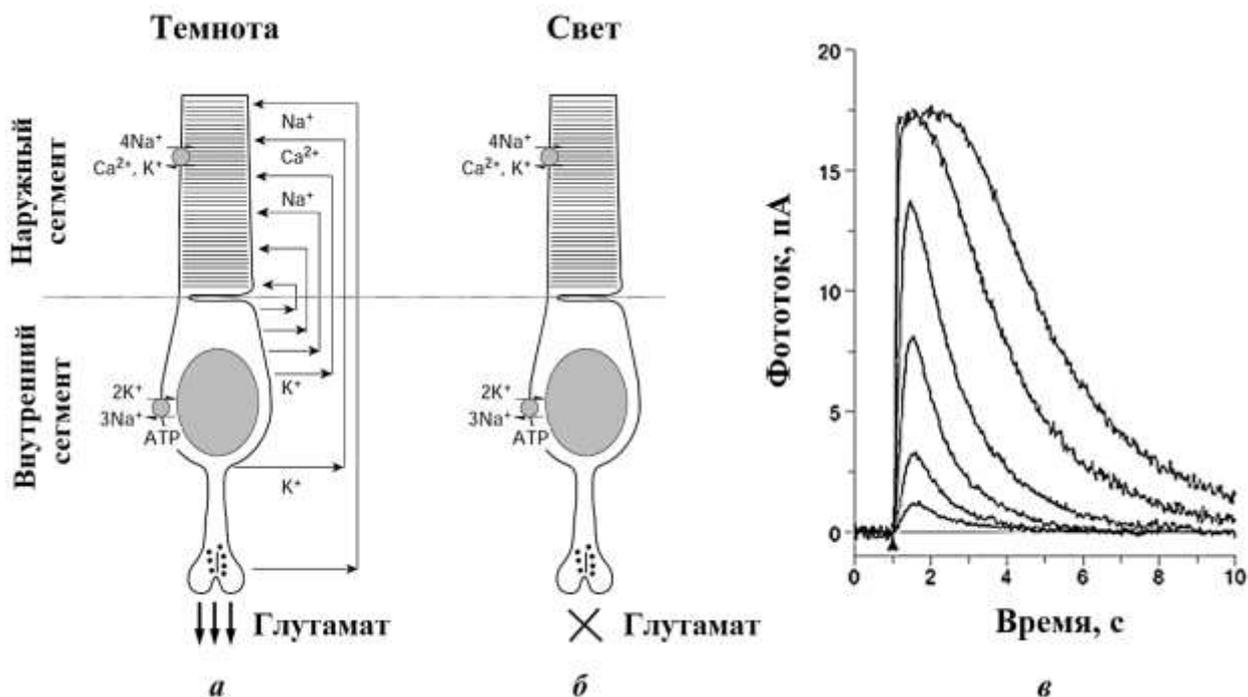
В плазматической мембране палочек и колбочек находится большое число ионных каналов. Наружный сегмент содержит каналы, управляемые циклическими нуклеотидами (cyclic nucleotide channels, CNGCs), через которые по градиенту концентрации во внутриклеточное пространство поступают катионы, преимущественно ионы  $\text{Na}^+$  (около 85% тока) и  $\text{Ca}^{2+}$  (около 15%, см. Nakatani, Yau 1988). Также в наружном сегменте присутствует  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -  $\text{K}^+$

обменник ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$  exchanger, NCKX), который осуществляет активный транспорт ионов. Он выкачивает из внутриклеточного пространства ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ , доставляя внутрь 4 иона  $\text{Na}^+$ . Во внутреннем сегменте преобладают  $\text{K}^+$ -каналы, кроме того, в его мембране присутствует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФаза, которая поддерживает стационарную концентрацию ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в цитоплазме клетки (Molday, Kaupp, 2000).

CNGCs и  $\text{K}^+$ -каналы пространственно разнесены и открыты, когда клетка находится в состоянии покоя, поэтому в темноте ионы  $\text{Na}^+$  входят в наружный сегмент, а ионы  $\text{K}^+$  выходят из внутреннего (Рис. 2А, Б). Таким образом, вдоль клетки течет ток величиной 20-70 пА, проходящий по внеклеточному пространству и замыкающийся через цитоплазму. В результате в покое наружная мембрана фоторецептора деполяризована, и мембранный потенциал составляет около -40 мВ, а из синаптического окончания активно выделяется нейромедиатор – глутамат (Трифонов с соавт., 1971; Lasater, Dowling, 1982).

При освещении фоторецептора CNGCs в наружном сегменте закрываются, ток через мембрану уменьшается и происходит ее гиперполяризация. Это приводит к генерации фотоответа, амплитуда которого градуально изменяется в соответствии с силой светового стимула (Рис. 2В). Амплитуда ответа (фототок) определяется как разность между максимальным (темновым) и текущим значениями тока, и растет до тех пор, пока не окажутся закрытыми все каналы плазматической мембраны наружного сегмента. В результате, протекающий через фоторецептор ток становится нулевым и ответ насыщается. Дальнейшее увеличение силы стимула приводит к тому, что ответ находится в насыщении все большее время, а освещение постоянным светом приводит к некоторому снижению тока до некоторого стационарного уровня, который также градуально зависит от силы стимула. В результате фоторецепторы, в отличие от типичных нейронов, не генерируют нервных импульсов (спайков), а кодируют интенсивность стимула величиной сдвига мембранного потенциала. В синаптическом окончании гиперполяризация приводит к уменьшению скорости

высвобождения глутамата в синаптическую щель и тем самым последующим нейронам сетчатки передается сигнал.



**Рис. 2.** Механизм генерации электрического ответа в фоторецепторе. (а) Ионный ток, протекающий через клетку в темноте. (б) На свету ионные каналы закрываются и ток прекращается (по Pugh, Lamb, 2000). (в) Набор ответов палочки лягушки на короткие вспышки разной интенсивности (от 1 до 260 фотонов/мкм<sup>2</sup> на вспышку). Треугольником отмечен момент вспышки (по Говардовскому с соавт., 2015).

Фотоответы палочек и колбочек имеют существенные различия. Палочки полностью насыщаются и перестают отвечать на стимуляцию при стационарных уровнях освещенности от 10 до 100 лк. Колбочки не насыщаются при максимальных природных освещенностях до 100000 лк и выше, а их ответ на короткую вспышку света примерно в 10 раз быстрее, чем у палочек (Говардовский с соавт., 2015).

Таким образом, освещение фоторецепторной клетки приводит к закрытию части или всех катионных каналов в плазматической мембране наружного сегмента. Связь между этими двумя событиями осуществляется

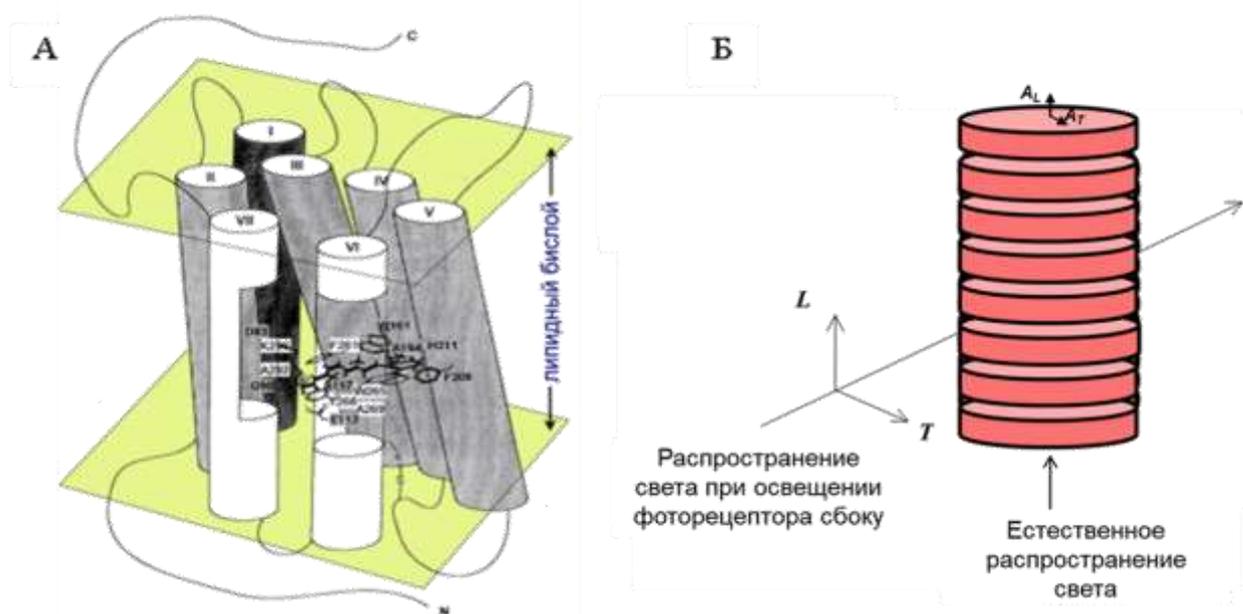
через многоступенчатый каскад биохимического усиления, который начинается с поглощения фотона молекулой зрительного пигмента, что приводит к изменению концентрации внутриклеточного посредника – циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ, см. Fesenko et al., 1985).

## **1.2 Структура и свойства зрительных пигментов**

### ***1.2.1 Общая характеристика зрительных пигментов***

Первым этапом в генерации фоторецептором ответа на световой стимул является поглощение фотона светочувствительной молекулой зрительного пигмента (при описании последующих биохимических реакций в общем случае подразумевается палочковый пигмент – родопсин, R). Зрительные пигменты представляют собой комплекс, состоящий из белковой части (опсина) и хромофорной группы – 11-цис-изомера ретиналя или дегидроретиналя (альдегида витамина А<sub>1</sub> или А<sub>2</sub> для обзора см. Rao & Oprian, 1996, Palczewski K., 2006). Альдегид ковалентно привязан к альфа-аминогруппе лизина-296 в аминокислотной цепи опсина посредством альдиминной связи. Ни апобелок, ни хромофорная группа в отдельности не окрашены, то есть не обладают заметным поглощением в видимой части спектра. Способность поглощать видимый свет возникает только после соединения ретиналя с опсином. Спектры поглощения зрительных пигментов отличаются за счет различного аминокислотного состава белковой части и используемого хромофора, и длина волны, соответствующая максимуму поглощения разных пигментов варьирует от 360 до 620 нм (Bowmaker, 1999; Nathans, 1999; Govardovskii et al., 2000). Согласно современной классификации, выделяется 5 групп опсинов: палочковые (родопсины, RHO или RH1) и 4 группы колбочковых – ультрафиолет-чувствительные (short wavelength-sensitive, SWS1), синечувствительные (SWS2), зеленочувствительные (middle wavelength-sensitive, MWS или RH2) и красночувствительные (long wavelength-sensitive, LWS), разделившиеся еще на ранних этапах эволюции позвоночных (Lamb, 2013).

Зрительный пигмент является наиболее распространенным белком в наружном сегменте фоторецептора, его концентрация составляет в среднем около 3 мМ, а плотность упаковки в мембранных дисках – 25000 молекул/мкм<sup>2</sup>. Полипептидная цепь опсина, состоящая из 340 – 350 аминокислотных остатков, имеет молекулярный вес около 40 кДа. Она содержит 7 гидрофобных альфа-спиральных участков, соединенных гидрофильными отрезками, пронизывающими толщу липидного бислоя мембранных дисков (Bownds et al., 1971; Daemen et al., 1972; Robinson, 1972, см. Рис. 3А). С-конец полипептидной цепи обращен в цитоплазму между дисками и играет важную роль во взаимодействии зрительного пигмента с остальными компонентами каскада фототрансдукции. N-конец находится внутри диска (в случае незамкнутых дисков колбочек – во внутриклеточном пространстве). Хромофорная группа в изогнутой 11-цис конформации расположена в гидрофобном пространстве между альфа-спиралями внутри липидного бислоя (Овчинников и др., 1982).



**Рис. 3.** Расположение зрительного пигмента в мембранах дисков фоторецепторов. (а) Схематическая модель расположения молекулы в мембране (по Tang et al., 1995). (б) Схема ориентации поглощающих хромофорных моментов зрительного пигмента в мембране диска. Т и L – два направления поляризации светового луча при освещении рецептора сбоку,

например, во время экспериментов на изолированных клетках.

Поглощение света молекулой пигмента определяется взаимодействием электрического вектора света с дипольным моментом хромофора. Поглощение максимально, когда электрический вектор лежит в плоскости фоторецепторного диска (Т, transversal – поперек оси наружного сегмента) и уменьшается в 4 – 5 раз при ориентации этого вектора перпендикулярно плоскости (L, longitudinal – вдоль оси, см. Denton, 1959; Liebman, 1972). Следовательно, дипольный момент хромофора пигмента А можно разложить на два компонента: параллельный плоскости мембраны  $A_T$  и перпендикулярный к ней  $A_L$  (см. Рис. 3Б). Двигаясь хаотично в фоторецепторной мембране, молекулы фотопигмента сохраняют при этом ориентацию своих хромофорных групп практически параллельно плоскости мембраны. Такая ориентация хромофора в составе пигмента обеспечивает в 1.5 раза более высокое поглощение света, распространяющегося вдоль вдоль оси наружного сегмента, по сравнению с ситуацией в растворе.

Активация зрительного пигмента происходит при поглощении хромофором кванта света путем его фотоизомеризации и перехода из 11-цис-ретналя в полностью транс-ретиналь. Это приводит к конформационным изменениям в белковой части, которые влекут за собой инициацию его каталитической активности (Pugh, Lamb, 2000). Поскольку зрительные пигменты относятся к группе рецепторов, связанных с G-белками (G-protein coupled receptors, GPCRs), на следующем этапе передачи сигнала они активируют специфичный для фоторецепторных клеток G-белок трансдуцин.

### ***1.2.2 Фотолиз – распад зрительного пигмента после обесцвечивания***

Единственным прямым результатом действия света на молекулу зрительного пигмента является перевод 11-цис конформации хромофора в полностью транс-форму (Hubbard, Wald, 1952; Wald, 1968). Фотоизомеризация хромофора инициирует последовательность конформационных изменений в белковой

части молекулы, в результате которых зрительный пигмент распадается на хромофор и опсин. Этот процесс получил название фотолиза и наилучшим образом к настоящему моменту этот процесс зрительного пигмента палочек – родопсина (Wald, 1968; Yoshizawa, Shichida, 1982; Kolesnikov et al., 2003).

Последовательность продуктов фотолиза родопсина, чаще всего приводимая в современных публикациях, изображена на Рис. 4 (DeGrip & Rothschild, 2000; Каламкаров и Островский, 2002). Продукты от фотородопсина до метародопсина I при комнатной температуре живут очень недолго, от <100 фемтосекунд до 1 мс и приводят к появлению относительно долгоживущего (секунды и минуты) продукта, называемого метародопсином II. Установлено, что именно метародопсин II является тем состоянием опсина, которое активирует G-белок трансдуцин и запускает дальнейшие реакции каскада фототрансдукции (Bennett, 1982; Liebman et al., 1987; Knowles, Pepe, 1988).

В метародопсине II хромофорная группа, находящаяся в полностью транс-форме, по-прежнему ковалентно связана с опсином. Последующие реакции приводят к гидролизу альдиминной связи ретиналя с опсином и к освобождению полностью транс-ретиналя и апобелка, что может происходить как напрямую, так и через образование еще одного промежуточного продукта – метародопсина III (Matthews et al., 1963; Kolesnikov et al., 2003). Освободившийся же транс-ретиналь восстанавливается до ретинола, превращается в 11-цис форму, опять окисляется до ретиналя и реагирует с опсином, восстанавливая исходный «темновой» зрительный пигмент.

Результаты спектроскопического анализа экстрактов различных зрительных пигментов, а также экстраполяция данных криоспектроскопии к физиологическим температурам указывают на то, что в колбочках процесс фотолиза должен происходить гораздо быстрее, чем в палочках. Скорости распада метародопсина II и метародопсина III (если он обнаруживается) у всех типов колбочек примерно одинаковы и на один-два порядка превышают таковые у родопсина палочек (Yoshizawa, 1994; Imai et al., 1995; Kojima et al., 1996). Анализ спектров, зарегистрированных с помощью высокоскоростной

микроспектрофотометрии на целых выделенных фоторецепторах рыб и амфибий подтверждает, что колбочковые и палочковые пигменты условно подразделяются на две группы с характерным временем полураспада суммы метапродуктов в  $\sim 5$  и  $\sim 300$  мс (Kolesnikov et al., 2003, 2007; Golobokova, Govardovskii, 2006). Предполагается, что высокая скорость распада зрительного пигмента в колбочках обусловлена необходимостью сопротивляться высоким уровням освещенности, чтобы механизмы регенерации 11-цис-ретинала успевали восстанавливать темновой пигмент прежде чем он будет обесцвечен во всем наружном сегменте.

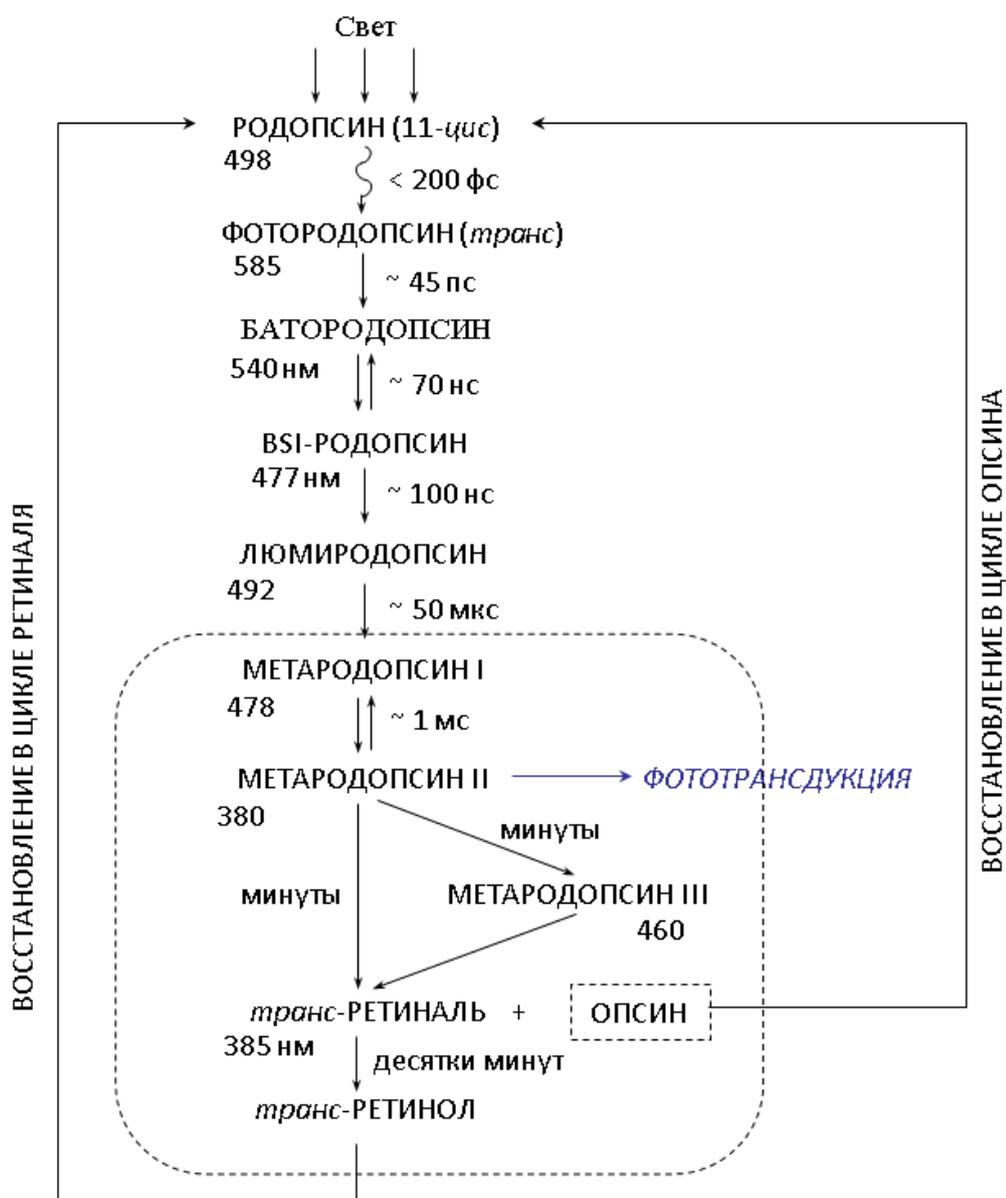
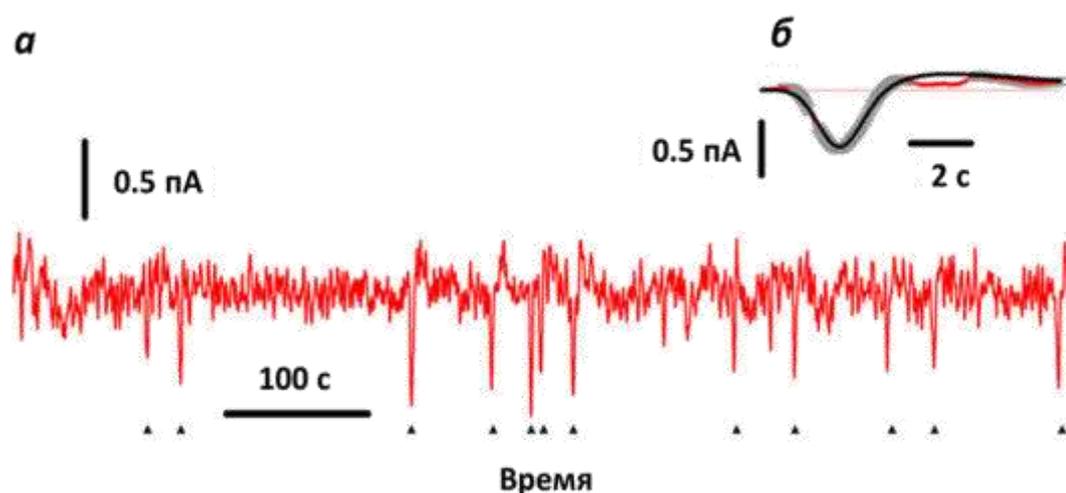


Рис. 4. Схема фотолиза родопсина быка, на которой указаны только

спектрально различимые продукты. Для каждого состояния даны время его жизни и длина волны, соответствующая максимальному поглощению, долгоживущие продукты фотолиза обведены рамкой (по Каламкарову, Островскому, 2002).

### 1.2.3 Спонтанные изомеризации зрительного пигмента

Другой характеристикой зрительного пигмента, принципиально важной для палочек как рецепторов ночного зрения, является его способность к спонтанным тепловым изомеризациям. Известно, что палочки позвоночных в полной темноте генерируют случайные колебания тока – темновой шум. Шум состоит из двух компонентов, непрерывного и дискретного. Непрерывный шум состоит из симметричных колебаний низкой (десятые доли пикоампера) амплитуды, и, вероятно связан со спонтанными колебаниями активности фермента, регулирующего внутриклеточную концентрацию цГМФ (Rieke and Baylor, 1996, Lamb et al., 2018). Дискретный шум состоит из случайно возникающих однонаправленных волн тока достаточно большой амплитуды (до нескольких пикоампер), идентичных по форме ответам палочки на обесцвечивание единичных молекул зрительного пигмента (Baylor et al., 1979a, см. Рис. 5).



**Рис. 5.** Темновой шум палочки лягушки. (а) Запись тока клетки в темноте. Дискретные волны тока отмечены черными треугольниками. (б) Красная линия внутри серой полосы (среднее  $\pm$  ст. ошибка среднего) показывает

усреднение из 12 дискретных волн, вырезанных из записи с панели (а). Наложённая черная линия представляет собой усреднённый ответ той же клетки на одиночный квант света (по Govardovskii et al., 2019).

В настоящее время считается, что активация вызывается внутренним тепловыми флуктуациями в молекуле зрительного пигмента (Baylor et al., 1980; Donner et al., 1990; Barlow et al., 1993; Luk et al., 2016), приводящими к ее активации и запуску каскада фототрансдукции без поглощения фотона. Из этого следует, что свойства зрительного пигмента будут определять характер и частоту дискретного темнового шума. Поскольку при низкой освещенности темновые события невозможно отличить от реальных фотоответов, они составляют неснижаемый источник шума и ограничивают предельную чувствительность фоторецептора.

В соответствии с вышеописанной гипотезой происхождения дискретного темнового шума следует ожидать, что его уровень будет увеличиваться вместе со смещением максимума поглощения зрительного пигмента сторону большей длины волны. Это связано с тем, что энергия длинноволновых фотонов меньше энергии коротковолновых, что означает более низкий энергетический барьер, который с большей вероятностью будет преодолеваться в ходе тепловых флуктуаций в молекуле зрительного пигмента. Предположительно, более высокая скорость тепловой изомеризации как индивидуальное свойство зрительного пигмента может определять различную чувствительность фоторецепторов и задавать верхнюю границу положения пика чувствительности для пигментов палочек, поскольку красночувствительные пигменты очевидно невыгодны при низких уровнях освещенности из-за низкой тепловой стабильности. Принципиальная справедливость этого утверждения, известного как гипотеза Барлоу (Barlow, 1957) была экспериментально подтверждена (Фирсов, Говардовский, 1990; Luo et al., 2011, см. однако Donner et al., 1990). Также она получила дальнейшее развитие в ряде работ по теоретическому описанию возможных внутримолекулярных механизмов,

лежащих в основе спонтанной активности пигмента, а также прогнозированию их влияния на зрительную функцию (Luo et al., 2011; Gozem et al., 2012; Yanagawa et al., 2015).

Следует отметить, что справедливость гипотезы Барлоу подтверждена только для зрительных пигментов, относящихся к группе палочковых родопсинов. Поскольку колбочки обладают крайне низкой чувствительностью, их ответы на одиночные изомеризации/обесцвечивания зрительного пигмента, имеют крайне низкую амплитуду. Надежно регистрировать темновые события на фоне шума на изолированных клетках не представляется возможным. Однако, существуют оценки стабильности колбочковых зрительных пигментов при их искусственной экспрессии в палочках трансгенных животных (шпорцевых лягушек, мышей). Согласно результатам этих работ, скорость тепловой изомеризации колбочковых пигментов превосходит палочковую на два-три порядка (Sakurai et al., 2007; Fu et al., 2008; Luo et al., 2011).

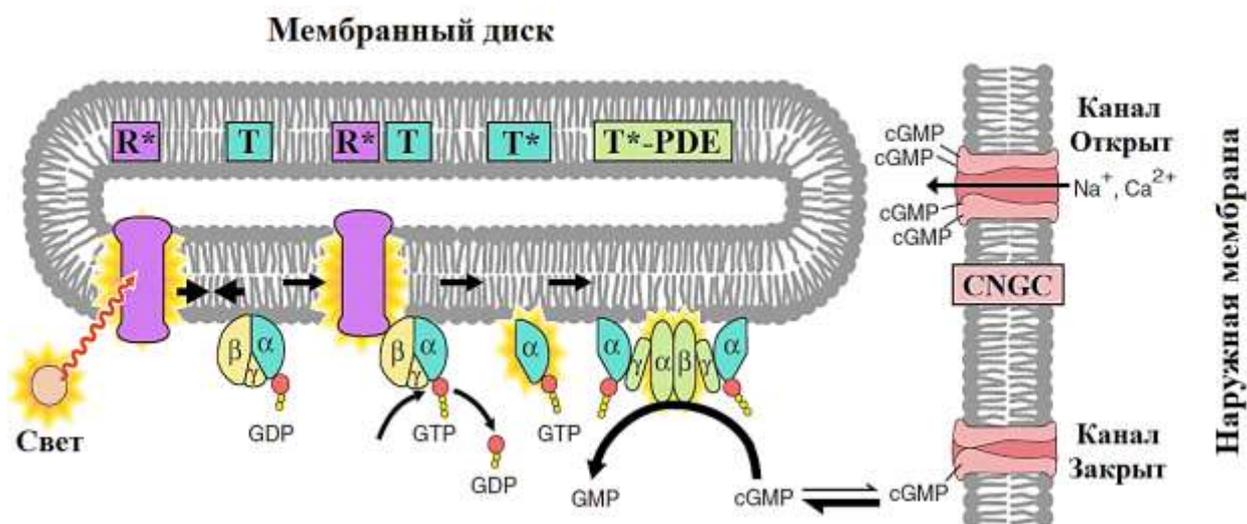
### **1.3 Каскад фототрансдукции и его основные этапы**

#### ***1.3.1 Механизмы активации каскада фототрансдукции***

Поглощение молекулой зрительного пигмента кванта света запускает многоступенчатый биохимический каскад (Рис. 6, см. обзоры: Pugh, Lamb, 2000; Каламкаров, Островский, 2002; Arshavsky, Burns, 2014; Abbas, Vinberg, 2021), который в итоге приводит к генерации электрического ответа фоторецептора. Переходя в активную конфигурацию, зрительный пигмент связывается с тримерным G-белком трансдуцином (Т) и переводит его в активную форму (Т\*). Тримерный комплекс трансдуцина включает  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -субъединицы (Т $\alpha\beta\gamma$ ), причем  $\alpha$ -субъединица связана с молекулой гуанозиндифосфата (ГДФ).

Трансдуцин заякорен в мембране за счет фарнезильной группы, присоединенной к С-концу  $\gamma$ -субъединицы, а также с помощью остатка жирной кислоты на N-конце  $\alpha$ -субъединицы (Ohguro et al., 1991; Bigay et al., 1994). Плотность упаковки трансдуцина в мембране дисков обычно составляет около

10% от плотности упаковки родопсина. В результате латеральной диффузии  $T$  и  $R^*$  встречаются и связываются, после чего  $R^*$  катализирует процесс диссоциации ГДФ (Pugh, Lamb, 2000). Потеря ГДФ приводит к еще более жесткому связыванию  $T$  с  $R^*$  до тех пор, пока комплекс не встречает в цитоплазме молекулу гуанозинтрифосфата (ГТФ, см. Vornancin et al., 1989). Связывание ГТФ приводит к отделению  $R^*$  от комплекса  $T\alpha\beta\gamma$ -ГТФ, а также к разделению трансдуцина на  $T\beta\gamma$  и  $T\alpha$ -ГТФ.  $T\alpha$ -ГТФ представляет собой активную форму трансдуцина  $T^*$ , передающую сигнал в каскаде далее к эффекторному белку. В свою очередь, свободившийся  $R^*$  может связаться с другим неактивным комплексом  $T\alpha\beta\gamma$ -ГДФ, и начать новый цикл активации. В результате одна активированная молекула  $R^*$  может инициировать активацию сотен молекул  $T$  в секунду (Leskov et al., 2000; Lamb & Pugh, 2006).



**Рис. 6.** Схема активации каскада фототрансдукции.  $R$  – родопсин,  $T$  – трансдуцин,  $PDE$  – фосфодиэстераза, CNGC – цГМФ-управляемые каналы. Греческими буквами обозначены субъединицы белковых комплексов (по Pugh, Lamb, 2000).

Каждый  $T^*$  активирует одну каталитическую субъединицу эффекторного белка – фосфодиэстеразы цГМФ 6 типа (phosphodiesterase, PDE). Фосфодиэстераза представляет собой тетрамерный комплекс из  $\alpha$ ,  $\beta$  и двух  $\gamma$ -

субъединиц, который закрепляется на мембране диска за счет изопренилированных и карбоксиметилированных С-концевых аминокислот  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц, и перемещается также, как и Т – за счет латеральной диффузии в мембране (Catty et al., 1992). Плотность упаковки фосфодиэстеразы в мембране диска примерно в 10 раз меньше, чем у трансдуцина и в 100 раз меньше, чем у зрительного пигмента.

Две каталитически идентичные  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединицы регулируются каждая своей ингибирующей  $\gamma$ -субъединицей и активируются независимо, что позволяет считать их отдельными функциональными ферментами (Muradov et al., 2010). Связывание Т\* с одной из  $\gamma$ -субъединиц снимает ингибирование, тем самым вызывая активацию каталитической  $\alpha$  или  $\beta$ -субъединицы (Fung et al., 1981). Это приводит к значительному увеличению скорости гидролиза цГМФ (по сравнению с темновым состоянием фосфодиэстеразы), выступающего в роли вторичного посредника сигнального каскада. Концентрация цГМФ падает, что приводит к закрытию регулируемых им ионных каналов плазматической мембраны – CNGC – и возникновению электрического ответа.

Каскад фототрансдукции не просто передает зрительный сигнал, но и многократно усиливает его. В палочках одна молекула зрительного пигмента (родпсина) может катализировать обмен ГДФ на ГТФ для нескольких сотен молекул трансдуцина в секунду, то есть коэффициент усиления внешнего сигнала составляет около 100. На второй стадии передачи сигнала каждая активированная молекула трансдуцина взаимодействует только с одной молекулой фосфодиэстеразы, однако активированная каталитическая субъединица фермента гидролизует 100 – 150 молекул цГМФ в секунду (Burns et al., 2002) – в результате сигнал усиливается еще в 100 раз. Итоговый биохимический коэффициент усиления – число молекул цГМФ, гидролизованных за время фотоответа после поглощения одного кванта света, – достигает величины порядка 10000. Кроме того, дополнительное усиление создается кооперативным характером взаимодействия цГМФ с ионными каналами (Fesenko et al., 1985; Yau & Nakatani, 1985). Другими словами,

относительно небольшое изменение концентрации цГМФ вызывает значительное изменение ионного тока, протекающего через каналы мембраны фоторецептора.

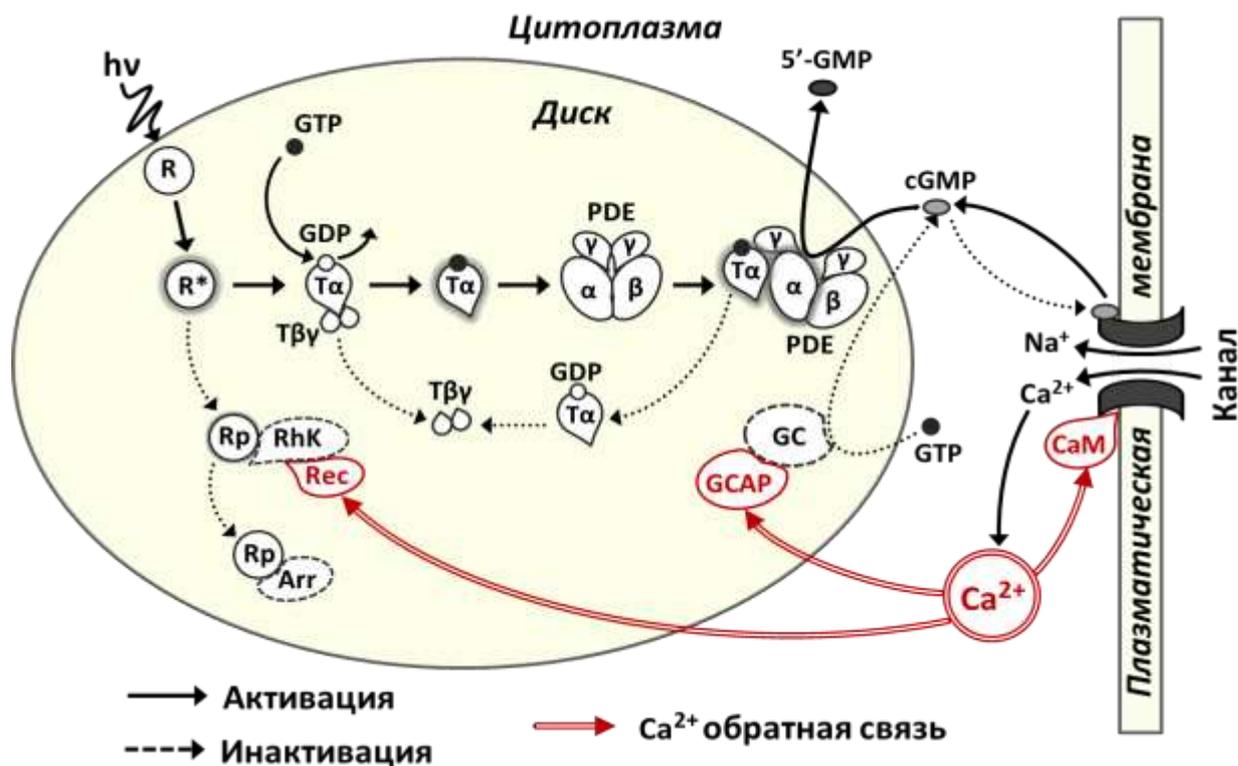
Большинство белков-участников каскада фототрансдукции существует в палочко- или колбочко-специфичной форме, однако считается, что механизмы, которые палочки и колбочки используют для генерации ответа на свет принципиально одни и те же (Говардовский с соавт., 2015). Кинетика процессов активации каскада фототрансдукции в палочках и колбочках различна. В частности, показано, что вся последовательность этапов активации трансдуцина – связывание Та $\beta$  $\gamma$ -ГДФ с R\*, высвобождение ГДФ, связывание ГТФ и разделение субъединиц с образованием T\* - занимает в среднем 5 мс в палочках холоднокровных (Leskov et al., 2000). В колбочках же скорость активации T в среднем в несколько раз ниже (Tachibanaki et al., 2012). Однако, описанные различия не могут объяснить различия в чувствительности между палочками и колбочками на несколько порядков – это ключевое различие между двумя типами фоторецепторов определяется спецификой процессов выключения в каскаде.

### ***1.3.2 Механизмы выключения каскада фототрансдукции***

Выключение светоактивированного каскада происходит на каждом его этапе и ускоряется за счет отрицательной обратной связи, управляемой цитоплазматической концентрацией ионов Ca<sup>2+</sup>. Ионы Ca<sup>2+</sup> входят в наружный сегмент фоторецептора через CNGC и непрерывно откачиваются при помощи ионного обменника NCKX (Nakatani, Yau 1988; Lagnado, McNaughton, 1990). Закрытие каналов на свету уменьшает входящий поток Ca<sup>2+</sup>, и его внутриклеточная концентрация снижается, что приводит к активации ряда Ca<sup>2+</sup>-чувствительных белков, которые ускоряют процессы выключения в каскаде фототрансдукции (Рис. 7). Эти процессы – световая адаптация – способствуют возвращению фоторецептора в темновое состояние, а также предотвращают насыщение фотоответа при достаточно интенсивном и/или длительном

освещении, за счет регулировки коэффициента усиления каскада фототрансдукции (см. обзоры Фирсов, Говардовский, 2001; Arshavsky, Burns, 2012; Vinberg et al., 2018).

Первым приложением кальциевой обратной связи является процесс инактивации светоактивированного зрительного пигмента. Активность  $R^*$  со временем уменьшается в результате его фосфорилирования ферментом родопсинкиназой (Kühn, Wilden, 1987; Chen et al., 1995) и полностью гасится последующим связыванием со специфическим белком аррестином (Kühn, Wilden, 1987; Palczewski et al., 1991). Активность родопсинкиназы регулируется кальций-чувствительным белком рековерином (Dizhoor et al., 1991; Makino et al., 2004). В темноадаптированном фоторецепторе рековерин, образуя комплекс с родопсинкиназой, ингибирует ее активность. Когда катионные каналы в наружном сегменте закрываются и концентрация ионов  $Ca^{2+}$  снижается, это ингибирование снимается, что дополнительно ускоряет фосфорилирование  $R^*$ .



**Рис. 7.** Схема механизмов активации (сплошные линии) и инактивации (штриховые линии) каскада фототрансдукции (по Ротову с соавт., 2020). Цепи кальциевой обратной связи и их мишени показаны красными.  $R$  – зрительный

пигмент (родопсин), T – трансдуцин, PDE – фосфодиэстераза, GC – гуанилатциклаза, RhK – родопсинкиназа, Rec – рекоерин, Arr – аррестин, GCAP – белок, активирующий GC, CaM – кальмодулин-подобный белок.

Активный комплекс  $T\alpha$ -ГТФ-PDE постепенно выключается в результате собственной гидролитической активности  $T\alpha$ -субъединицы, так как ГТФ гидролизуется до ГДФ, трансдуцин утрачивает активность и диссоциирует из комплекса с фосфодиэстеразой (Arshavsky et al., 1987). Скорость этого процесса дополнительно увеличивается за счет связывания с активирующим комплексом RGS9/G $\beta$ 5 (Regulator of G-protein Signaling/G $\beta$ -subunit 5, Регулятор G-белкового сигналинга с G $\beta$ -субъединицей 5 типа, см. Berman, Gilman, 1998; Ross, Wilkie 2000).

Второй мишенью кальциевой обратной связи является синтез цГМФ ферментом гуанилатциклазой (GC). Активность гуанилатциклазы регулируется цитоплазматическим белком GCAP (Guanilate Cyclase Activating Protein, см. Dizhoor, Harley, 1999; Dizhoor et al., 2010). В темноте, при высокой внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , GCAP ингибирует активность гуанилатциклазы. После светоиндуцированного понижения цитоплазматической концентрации кальция GCAP превращается в активатор фермента и тем самым ускоряет синтез цГМФ, в противовес эффекту фосфодиэстеразы. Светоиндуцированная активности фосфодиэстеразы в свою очередь также снижается быстрее в ходе световой адаптации, однако механизм этой регуляции остается неизвестным (Astakhova et al., 2008).

Дополнительно, ионы  $Ca^{2+}$ , действуя через кальмодулин-подобный белок (CaM), модулируют сродство CNGC к цГМФ. Понижение цитоплазматической концентрации кальция при освещении приводит к повышению сродства, так что каналы остаются открытыми при более низкой концентрации вторичного посредника (Gordon et al., 1995). Таким образом, описанные механизмы работают на восстановление внутриклеточного уровня цГМФ, достаточного для поддержания CNGC в открытом состоянии. Действуя совместно, эти

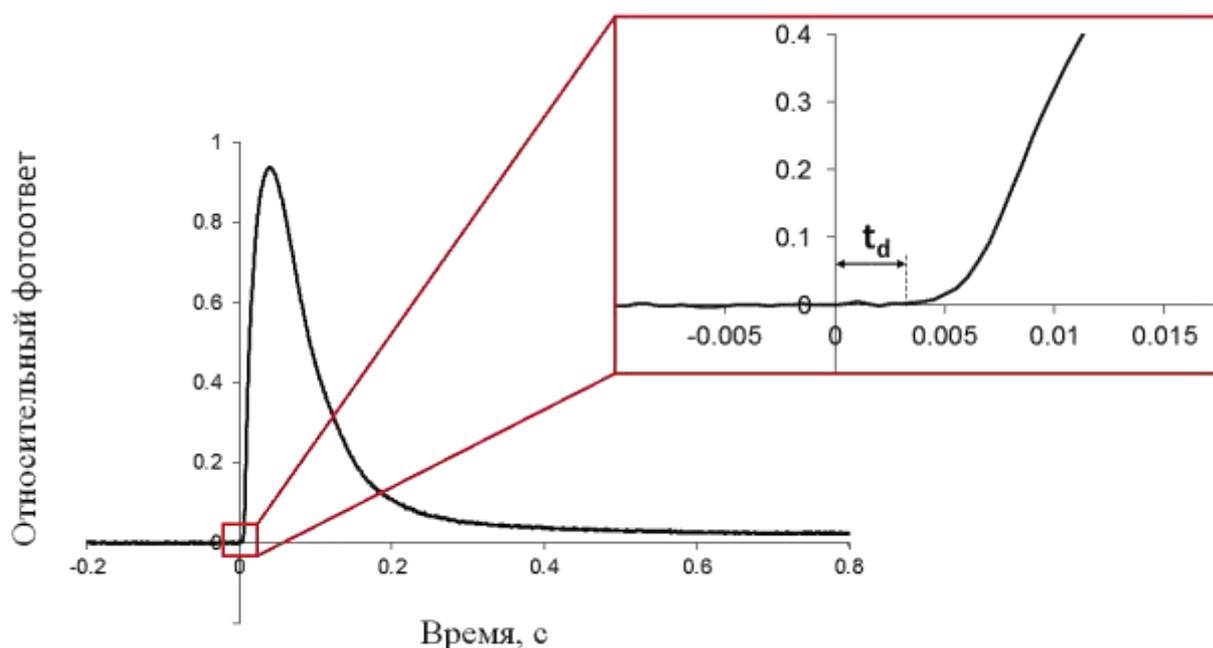
механизмы способствуют довольно быстрому (секунды и десятки секунд) восстановлению способности фоторецепторов реагировать на изменение освещения.

Выдающаяся способность колбочек к световой адаптации и более быстрая кинетика фотоответов обеспечиваются на порядок более быстрыми процессами инактивации каскада (Astakhova et al., 2015; Говардовский с соавт., 2015). Колбочко-специфичная опсинкиназа (GRK7) имеет удельную активность и уровень экспрессии выше, чем у палочковой родопсинкиназы (GRK1), за счет чего обеспечивается более быстрое выключение  $R^*$  (Tachibanaki et al., 2001, 2005). Также в колбочках выше экспрессия комплекса RGS9/G $\beta$ 5, повышающего ГТФазную активность активного трансдуцина (Zhang et al., 2003). Кинетика обмена цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , как и остальные реакции выключения каскада, в колбочках происходит примерно на порядок быстрее, чем в палочках (постоянные времени обмена  $Ca^{2+} \approx 50$  и  $\approx 400$  мс соответственно, см. Astakhova et al., 2015). Таким образом, колбочки эффективно обменивают чувствительность на быстроедействие и способность избегать насыщения при дневных уровнях освещения.

### ***1.3.3 Начальная задержка фоторецепторного ответа***

Электрические ответы фоторецепторов имеют отчетливую фазу задержки ( $t_d$ ), длительность которой в палочках и колбочках холоднокровных составляет от 3 до 10 мс (Рис. 8). Возникновение задержки вполне ожидаемо, поскольку генерация фотоответа опосредуется многоступенчатым биохимическим каскадом. Полная задержка фототрансдукции от поглощения кванта света родопсином до закрытия катионных каналов в наружном сегменте может быть представлена как сумма временных промежутков, занимаемых различными этапами активации каскада (Pugh, Lamb, 2000). Поскольку эти этапы имеют разную длительность, поэтому можно выделить только те из них, что вносят наиболее существенный вклад в длительность задержки, исключив из рассмотрения остальные.

Время активации родопсина квантом света можно оценить с помощью спектрофотометрических методов, поскольку спектр поглощения зрительного пигмента изменяется при его переходе в активную форму. Показано, что в палочках  $t_R$  составляет примерно 1 мс, а в колбочках – 0.5 мс и может являться одним из компонентов задержки (Baumann, 1976; Фирсов, Говардовский, 1988).



**Рис. 8.** Задержка колбочкового фотоответа лягушки (усреднение по 100 записям). Вспышка (длительность 1 мс) происходит в момент времени 0 с. Интенсивность вспышки соответствует обесцечиванию  $252 R^*/\mu\text{км}^3$  (число активированных молекул зрительного пигмента на единицу объема клетки). Относительный фотоответ – нормированный на темновой ток клетки.

Задержка на этапе диффузии цГМФ от наружной мембраны до участков гидролиза на поверхности диска состоит из двух фаз. Она начинается с радиальной диффузии в междисковом пространстве, а затем снижение концентрации цГМФ должно распространиться продольно вдоль плазматической мембраны наружного сегмента. Время, затрачиваемое на продольную диффузию существенно лишь при слабых световых стимулах (несколько фотонов на палочку). При интенсивностях же, используемых в

стандартных экспериментальных протоколах для регистрации фотоответов (десятки фотонов на каждый диск), уменьшение концентрации цГМФ вдоль наружного сегмента практически равномерно, и продольной диффузией можно пренебречь (Pugh, Lamb, 2000). Радиальная диффузия в междисковом пространстве палочек также предполагается очень быстрой (Lamb et al., 1981; Gross et al., 2012). Полагая коэффициент диффузии для цГМФ в цитоплазме равным  $40 \text{ мкм}^2/\text{с}$  (Koutalos et al., 1995) и расстояние между центрами дисков 30 нм, можно оценить время падения концентрации цГМФ на плазматической мембране в два раза по сравнению с темновым уровнем в 8.5 мкс, что пренебрежимо мало по сравнению с регистрируемым временем задержки (Rotov et al., 2017).

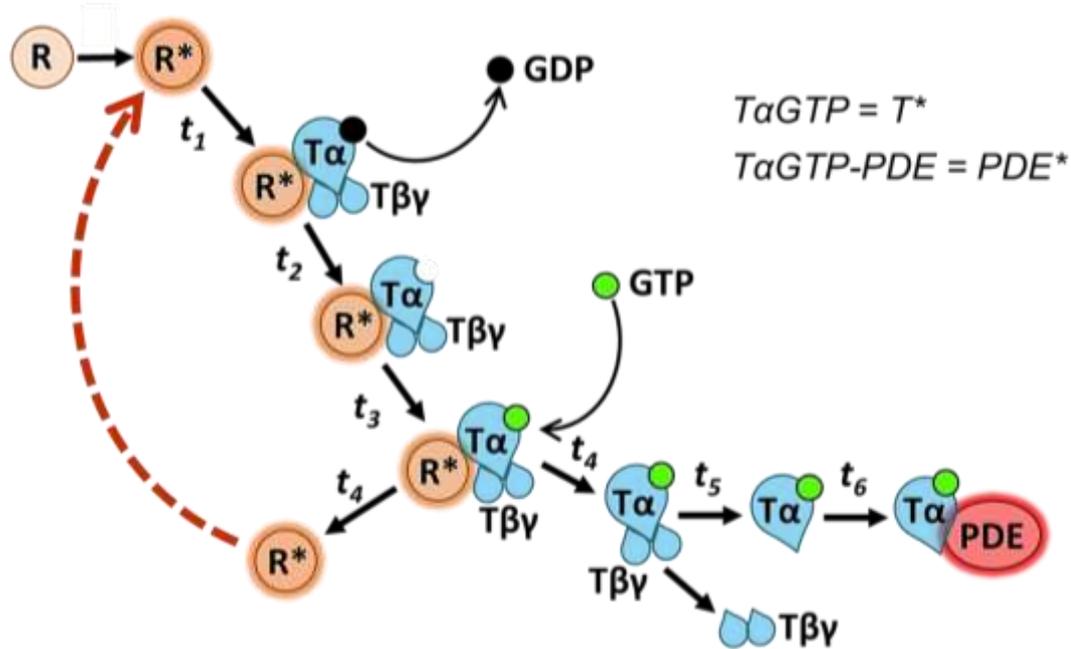
Буферизация цГМФ и его освобождение от ионных каналов с их последующим закрытием плазматической мембраны также предполагаются быстрыми процессами. Показано, что взаимодействие цГМФ с каналами занимает менее 1 мс (Karpen et al., 1988) и, хотя и вносит большой вклад, чем описанные выше этапы каскада, не может быть определяющим фактором задержки фотоответа (длительностью до 10 мс).

Таким образом, начальная задержка в каскаде фототрансдукции связана с реакциями от активации зрительного пигмента квантом света до появления первой активной субъединицы фосфодиэстеразы PDE\* (Pugh, Lamb, 1993). Этот процесс можно разделить на 6 основных этапов (Рис. 9):

1.  $R^*$  встречает неактивный тример трансдуцина ( $T\alpha\beta\gamma\text{ГДФ}$ ) и связывается с ним, образуя комплекс  $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma\text{ГДФ}$  ( $t_1$ ).
2. Из комплекса  $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma\text{ГДФ}$  освобождается молекула ГДФ ( $t_2$ ).
3. ГДФ связывается с освободившимся сайтом связывания нуклеотида в комплексе  $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma$  ( $t_3$ ).
4. Молекула зрительного пигмента освобождается из комплекса  $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma\text{ГТФ}$ . После этого  $R^*$  возвращается к этапу 1, инициируя следующий цикл активации трансдуцина ( $t_4$ ).

5. Комплекс  $T\alpha\beta\gamma$ ГТФ диссоциирует на  $T\beta\gamma$  и  $T\alpha$ ГТФ, представляющий собой активную форму трансдуцина ( $T^*$ ) ( $t_5$ ).

6.  $T\alpha$ ГТФ связывается с фосфодиэстеразой и активирует ее. Таким образом, активная фосфодиэстераза ( $PDE^*$ ) – это комплекс  $T\alpha$ ГТФ-PDE ( $t_6$ ).



**Рис. 9.** Схема начальных этапов каскада фототрансдукции. Номера внутри фигур обозначают промежуточные состояния компонентов каскада. R – родопсин, T – трансдуцин, PDE – фосфодиэстераза,  $t_1 \dots t_6$  – времена соответствующих им переходов.

Таким образом, временной интервал между поглощением фотона и генерацией фотоответа примерно равен суммарной длительности этапов  $t_1 - t_6$ , плюс время активации зрительного пигмента после поглощения фотона  $t_R$ , плюс пренебрежимо малая задержка на этапах гидролиза цГМФ и закрытия ионных каналов. Тогда задержка  $t_d$  определяется как время, когда может быть обнаружено минимальное отклонение  $PDE^*$  от ее темнового уровня.

Согласно современным представлениям, наибольший вклад в задержку вносит цикл активации трансдуцина молекулой активного зрительного пигмента ( $t_{cycle}$ ), то есть время между связыванием  $R^*$  с  $T\alpha\beta\gamma$ ГТФ на этапе  $t_1$ , до его высвобождения на этапе  $t_4$  (Lamb, Pugh, 1992; Pugh, Lamb, 1993). Имеются

данные о том, что в цикле активации трансдуцина присутствует лимитирующая стадия, длительность которой значительно превышает остальные этапы – этап взаимодействия между  $R^*$  и  $T\alpha\beta\gamma$ ГДФ ( $t_1$ ). Было показано, что скоость активации каскада увеличивается в палочках мышей с пониженным содержанием родопсина, что предположительно связано с уменьшением плотности упаковки молекул в мембранах дисков и появления свободного пространства для латеральной диффузии, из-за чего увеличивается частота столкновений  $R^*$  с  $T$  (Calvert et al., 2001). Кроме того, частота столкновений  $R^*$  с  $T$  и, соответственно, усиление в каскаде уменьшаются в 10 раз в ходе длительной световой адаптации, когда 90%  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц трансдуцина транслоцируются во внутренний сегмент (Sokolov et al., 2002). Если считать, что весь цикл активации трансдуцина примерно равен по длительности этапу  $t_1$ , то он должен занимать примерно 5 мс, поскольку в палочках холоднокровных комплекс  $R^*$ - $T\alpha\beta\gamma$ ГДФ образуется со скоростью  $200 \text{ c}^{-1}$  (Leskov et al., 2000).

Пью и Лэмб предположили, что временной ход индуцируемой световым стимулом продукции  $PDE^*$  можно приблизительно описать линейной зависимостью от времени с определенной эффективной задержкой  $t_{eff}$  (Lamb, Pugh, 1992; Pugh, Lamb, 1993, 2000) Поскольку такая модель сильно упрощает реальный процесс активации каскада фототрансдукции, параметр  $t_{eff}$  не соответствует реальной задержке фототрансдукции  $t_d$ . Далее предсказывается, что временной ход гидролиза cGMP (и, следовательно, электрический ответ  $r(t)$ ) описывается квадратичной функцией:

$$r(t) = \frac{1}{2} \Phi \cdot v_{RE} \cdot \beta_{sub} \cdot n_{cG} \cdot (t - t_{eff})^2, \quad t \geq t_{eff}$$

(1)

Здесь,  $\Phi$  – число активированных световым стимулом молекул зрительного пигмента,  $v_{RE}$  – скорость активации фосфодиэстеразы,  $\beta_{sub}$  – каталитическая активность одной субъединицы фосфодиэстеразы в расчете на цитоплазматический объем наружного сегмента, а  $n_{cG}$  - коэффициент Хилла для

связывания cGMP с ионными каналами. Произведение этих четырех параметров определяет усиление каскада фототрансдукции.

Строго говоря,  $v_{RE}$  должна быть меньше чем скорость активации трансдуцина  $v_{RG}$ , однако утверждается, что эффективность связывания  $T^*$  и PDE близка к единице, поэтому можно принять (Lamb, 1994):

$$V_{RE} \approx V_{RG} = \frac{1}{t_{cycle}} = \frac{1}{t_1 + t_2 + t_3 + t_4}$$

(2)

То есть скорость образования PDE\* и, следовательно, усиление в каскаде фототрансдукции задается длительностью цикла активации трансдуцина  $t_{cycle}$ . В колбочках скорость активации трансдуцина, а также  $v_{RE}$ , характеризующая скорость образования PDE\* в среднем в несколько раз меньше, чем в палочках (Tachibanaki et al., 2012; Astakhova et al., 2015), поэтому следует ожидать, что задержка фотоответа  $t_d$  в колбочках будет более длительной. Однако результаты Каваками и Кавамуры, полученные на фоторецепторах карпа, говорят об обратном: в колбочках эффективная задержка  $t_{eff}$  оказалась меньше, чем в палочках (Kawakami, Kawamura, 2014). Возникшее противоречие ставит под сомнение предположение о том, что длительность задержки фотоответа определяется именно циклом активации трансдуцина. Разрешение данного противоречия и идентификация этапов активации каскада, которые в действительности создают задержку и усиление, представляет значительный интерес. Это поможет более детально описать кинетику основных реакций фототрансдукции и углубить понимание их молекулярных механизмов.

## **1.4 Примеры функциональных переходов фоторецепторов позвоночных**

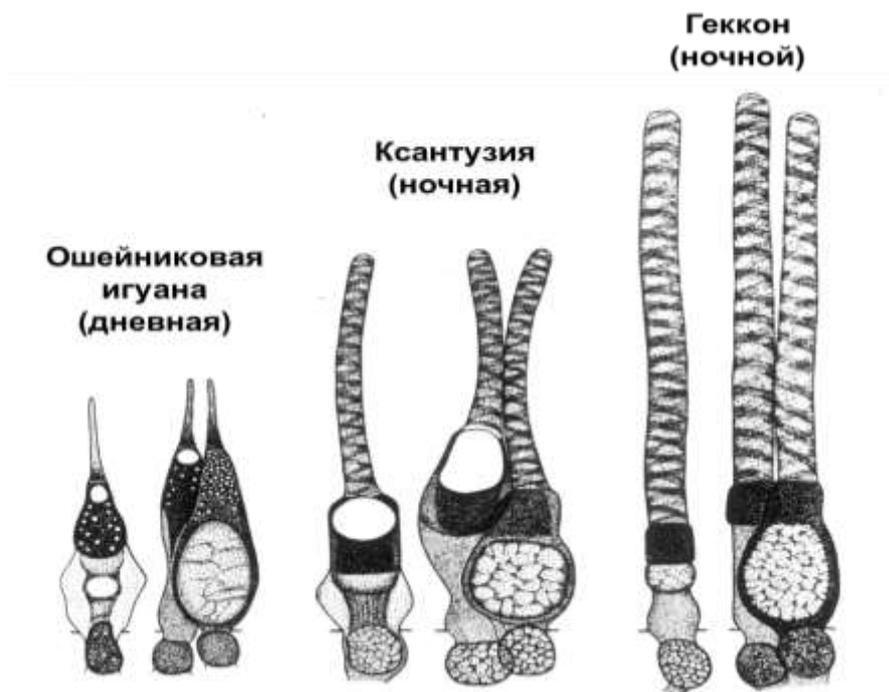
### **1.4.1 Теория трансмутаций фоторецепторов**

Определение того или иного фоторецептора как функционально переходного упирается в фундаментальную проблему физиологии зрения – отсутствие четкого определения понятий «палочка» и «колбочка». Изначальное

морфологическое определение было дано на основе микроскопических наблюдений. Позднее оно было дополнено функциональным определением палочек и колбочек как рецепторов ночного и дневного зрения, соответственно. Однако, по мере роста числа исследуемых видов позвоночных пришло понимание, что морфологическая и функциональная роли совпадают далеко не всегда. В качестве примеров таких исключений можно привести фоторецепторы круглоротых, все типы которых имеют типично колбочковую морфологию наружного сегмента и, напротив, единообразно палочкоподобные фоторецепторы дневного грызуна – песчанки. Впоследствии было показано, что один из типов рецепторов миног является функционально палочкой (Govardovskii, Lychakov, 1984; подробнее см. раздел 1.4.3), а в сетчатке песчанки были иммуногистохимически обнаружены колбочки нескольких спектральных типов (Govardovskii et al., 1992). По мере накопления примеров подобных фоторецепторов с неясным определением к 1930-м годам, выдвигались предложения о смене терминологии и замене терминов «палочки» и «колбочки» на «скотоциты» и «фотоциты», которые характеризовали бы только физиологическую роль фоторецептора, без отсылок к морфологическим признакам (Walls, 1934). Решение сложившейся проблемы было предложено Гордоном Уоллсом, опубликовавшим в 1943 году книгу «The vertebrate eye and its adaptive radiation», посвященную функциональной изменчивости зрительной системы и фоторецепторов в частности при адаптации к условиям окружающей среды (Walls, 1942). Проанализировав большое количество сравнительного материала, Уоллс постулировал, что в ходе эволюции позвоночных внутри практически всех крупных таксонов неоднократно происходила смена образа жизни с дневного на ночной и обратно. При этом фоторецепторы подстраивали свою морфологию под новые требования, по сути меняя функциональную принадлежность. В случае, если какой-либо тип рецептора оказывался бесполезным в новых условиях, он утрачивался. А затем при необходимости (новой смене условий освещенности) возникал заново на основе

сохранившихся, опять же, посредством функционального перехода. Уоллс назвал это положение «теорией трансмутаций».

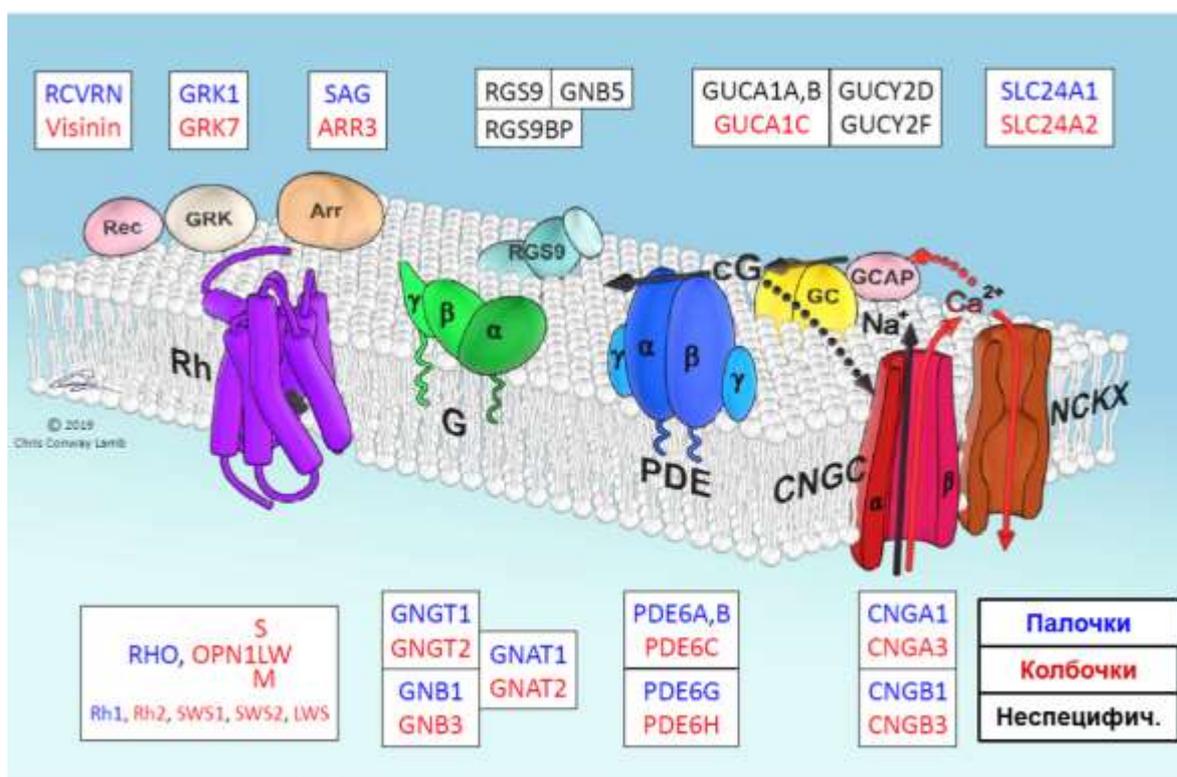
Согласно Уоллсу, особенно богатой трансмутациями – переходами от дневных рецепторов к ночным и обратно – была эволюция сетчаток рептилий (Walls, 1934). Предполагаемые предки современных рептилий имели дуплексную палочко-колбочковую сетчатку, которая возможно сохранилась у черепаха. Далее, например, ящерицы, ведущие дневной образ жизни утратили палочки и получили чисто колбочковую сетчатку. Группы ящериц, перешедших к ночному образу жизни должны были трансмутировать колбочки в палочки, что наглядно демонстрируется межвидовыми различиями в морфологии наружного сегмента (Рис. 10). Наибольшая степень специализации колбочек к роли рецепторов ночного зрения наблюдается у гекконов: они, несомненно, имеют палочковидную форму, ультраструктура их наружных сегментов также типично палочковая (Laties et al., 1976; Röhl, 2000). Однако, форма их синаптического окончания осталась колбочковой – в виде крупной ножки, контактирующей с большим числом постсинаптических дендритов от вторичных нейронов сетчатки (Pedler, Tilly, 1964).



**Рис. 10.** Колбочки различных видов ящериц, морфология которых

видоизменяется в соответствии с их образом жизни (дневной или ночной активностью, по Walls, 1942).

Развитие методов современной физиологии и молекулярной биологии в конечном итоге опровергли основной постулат теории трансмутаций о многократном исчезновении и возникновении в эволюции палочек и колбочек. В настоящее время известно, что фоторецепторы всех изученных позвоночных используют принципиально один и тот же каскад фототрансдукции. Большая часть белков этого каскада существуют в палочко- и колбочко-специфичных формах (Рис. 11). Филогенетические линии этих изоформ – а значит, и линии палочек и колбочек – разделились в эволюции еще на стадии самых ранних позвоночных, и существуют по настоящее время, не прерываясь и не возникая заново (Говардовский, 1983, Lamb, 2013, 2019).



**Рис. 11.** Схематическое изображение основных участников каскада фототрансдукции в колбочках и палочках. Rh – зрительный пигмент, G – G-белок трансдуктин, PDE – фосфодиэстераза, CNGC – нуклеотид-управляемый ионный канал, NCKX - обменник натрия/кальция-калия. Rec - реCOVERин.

GRK – роопсинкиназа, Arr – аррестин, RGS9 – регулятор сигнальной активности G-белка, GC – гуанилилциклаза, GCAP – белок, активирующий гуанилатциклазу. cG – вторичный посредник, цГМФ. Синим цветом обозначены палочковые, красным – колбочковые изоформы белков, черным – экспрессирующиеся в обоих типах рецепторов. (по Lamb, 2020).

Во многих случаях палочковые и колбочковые изоформы белков фототрансдукции заметно различаются по своим биохимическим свойствам, либо одна и та же изоформа может иметь разный уровень экспрессии в разных типах рецепторах (Говардовский с соавт., 2015). В итоге, эти различия обуславливают функциональную роль фоторецептора, задавая свойства, необходимые для успешной работы в роли ночного или дневного рецептора. Так, быстрые реакции выключения каскада фототрансдукции, а также обмена кальция в наружном сегменте у колбочек с одной стороны, существенно уменьшают их чувствительность, но с другой – быстрый фотоответ позволяет создать зрение с высоким временным разрешением, а также избегать насыщения при высоких уровнях освещенности. (Astakhova et al., 2015). Напротив, медленная кинетика фотоответа палочек, способствует повышению их чувствительности к слабым фоновым засветкам за счет увеличения времени интегрирования. Таким образом, типичные палочки и колбочки следуют одной из двух взаимоисключающих эволюционных стратегий – разменивают скоростные механизмы адаптации на высокую чувствительность или наоборот.

То же касается и биохимии зрительного пигмента: согласно современным представлениям, как тепловая стабильность, так и кинетика распада после обесцвечивания связаны со степенью открытости сайта связывания ретиналя в молекуле опсина. У палочковых родопсинов хромофор закреплен достаточно жестко, вследствие чего у него остается меньше степеней свободы для тепловых флуктуаций, а с другой – он сравнительно медленно высвобождается после обесцвечивания (Imai et al., 1995; Yanagawa et al., 2015; Yue et al., 2017).

Хромофор колбочковых пигментов напротив, склонен к колебаниям, вследствие чего крайне термически нестабилен, но быстро освобождается из комплекса с апобелком.

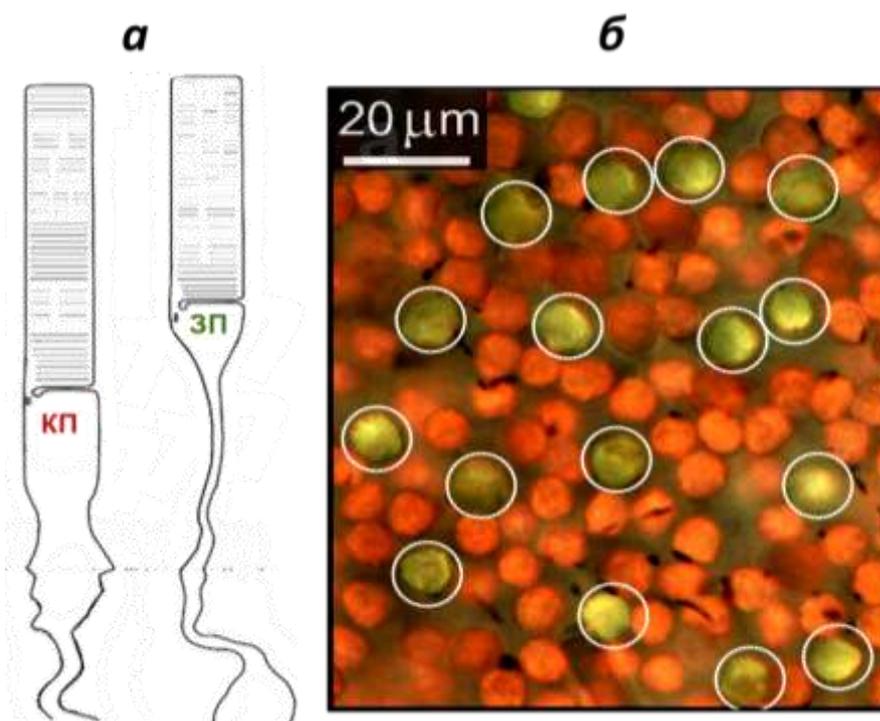
Несмотря на опровержение основного положения теории трансмутаций, невозможно отрицать существование частных случаев рецепторов переходного типа (Говардовский, 1983). При таких переходах, принадлежность имеющихся в клетке фототрансдукционных белков к палочковой или колбочковой изоформе сохраняется, но изменяется уровень их экспрессии и/или происходят локальные аминокислотные замены в функциональных доменах, что влияет на их биохимию. В результате на базе элементов колбочкового каскада и изменений в морфологии, может быть построен типичный рецептор ночного зрения (Zhang et al., 2006).

Наиболее изученными среди переходных рецепторов можно считать палочкоподобные колбочки ночных гекконов. Их фотоответ медленный и высокочувствительный, и основан на трансдукционных белках колбочкового типа, видоизменившихся для достижения палочковой физиологии (Zhang, et al., 2006; Schott et al., 2019). Зрительные пигменты гекконов принадлежат к колбочковым LWS, RH2 и SWS1 (Yokoyama, 2000; Schott et al., 2019; Pinto et al., 2019), но поглощение пигментов LWS и RH2 существенно смещено в сторону более коротких длин волн по сравнению с к типичными красно- и зеленочувствительным пигментам дневных животных (Crescitelli, 1977; Loew et al., 1996). Предположительно, это связано с увеличением их стабильности в соответствии с гипотезой Барлоу (см. раздел 1.2.3). Скорость фотолиза красночувствительного пигмента LWS у геккона смещена в промежуточное положение между типичными палочками и колбочками (Kolesnikov et al., 2007), то же касается и константы скорости спонтанных изомеризаций для пигментов RH2 и SWS1 (Kojima et al., 2021). Таким образом, фоторецепторы гекконов прошли трансмутацию из колбочек в функциональные палочки, в полном соответствии с теорией Уоллса.

Подводя итог, можно сказать, что нынешний уровень знаний о фоторецепции позволяет определять тип клетки согласно классификации, основанной на двойственности физиологических и биохимических функций (рецептор дневного или ночного зрения), а также генетических данных (палочковый или колбочковый набор белков фототрансдукции). Соответственно, переходными рецепторами следует считать клетки, сменившие функциональную роль путем адаптации своего набора белков под новую задачу. Однако, проблему нельзя считать полностью решенной, поскольку известны фоторецепторы с необычными свойствами, не вписывающимися в описанную классификацию. О них пойдет речь в последующих разделах.

#### ***1.4.2 Зеленые палочки амфибий***

В сетчатке бесхвостых, а также некоторых видов хвостатых амфибий содержится уникальный тип фоторецепторов, так называемые зеленые палочки. В отличие от типичных родопсин-содержащих палочек, которые при наблюдении под микроскопом выглядят красными (далее, «красные палочки»), более редкие зеленые палочки (около 10% от числа красных) выделяются на их фоне своей зеленоватой окраской (Рис. 12А; Boll, 1877). Максимум поглощения их зрительного пигмента расположен около 435 нм (Denton, 1955; Donner, Reuter, 1962), поэтому можно было бы ожидать, что для наблюдателя они будут казаться желтыми. Их кажущаяся зеленая окраска, скорее всего, обусловлена светопроводящими свойствами их внутренних сегментов и особенностями цветовосприятия человека (Govardovskii, Reuter, 2014).



**Рис. 12.** Зеленые палочки травяной лягушки (*Rana temporaria*). (а) Схематичное изображение красной (КП) и зеленой (ЗП) палочки. (б) Микрофотография препарата сетчатки лягушки, вид сверху, зеленые палочки выделены белыми окружностями (по Govardovskii, Reuter, 2014).

Зеленые и красные палочки имеют сходную морфологию наружного сегмента – он характеризуется цилиндрической формой, относительно большими размерами (объем 1000-3000 мкм<sup>3</sup>), мембранные диски отделены от плазматической мембраны. В то же время, наружный сегмент зеленых палочек примерно в 1.5-2 раза короче, чем у соответствующей красной, а внутренние сегменты, тонкие и вытянутые формы, подобно типично колбочковым (Рис. 12Б; Arey, 1916; Nilsson, 1964). Эта морфологическое противоречие привело к предположению, что зеленые палочки относятся к трансмутированным фоторецепторам, которые в процессе эволюции заняли промежуточное положение между типичными колбочками и палочками (Walls, 1942). В дальнейшем, их переходный статус был дополнительно подтвержден на уровне белков-участников каскада фототрансдукции: зрительный пигмент этих клеток относится к группе колбочковых синечувствительных опсинов (SWS2, Hisatomi

et al., 1999). С другой стороны, было показано, что в то время как зеленые палочки тигровой амбистомы (*Ambistoma tigrinum*) содержат тот же зрительный пигмент, что и синечувствительные колбочки, они экспрессируют палочко-специфичную изоформу трансдуцина (Ma et al., 2001). Несмотря на то, что природа других белков фототрансдукции неизвестна, можно утверждать, что зеленые палочки амфибий содержат смесь колбочко- и палочко-специфичных изоформ фототрансдукционных белков, что делает их уникальным объектом для исследования колбочково-палочковой трансмутации, не вписывающимся в стандартную классификацию (см. обзоры Mohun, Davies, 2019; Donner, Yovanovich, 2020).

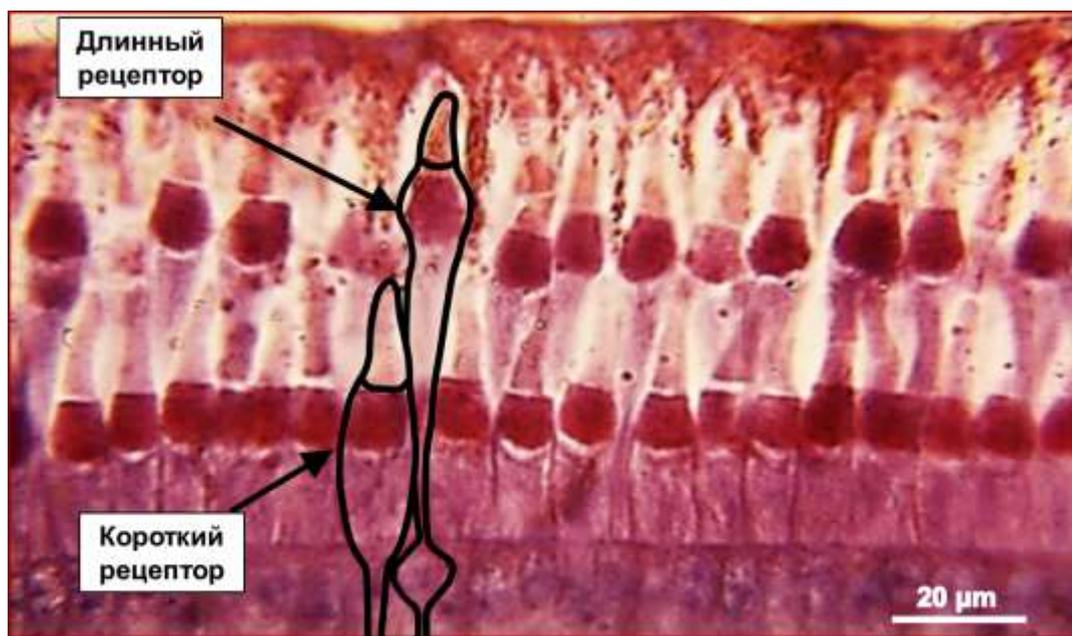
В 1983 году были Мэттьюзом было проведено подробное электрофизиологическое исследование зеленых палочек жабы-аги (*Rhinella marina*, ранее *Bufo marinus*), по результатам которого они были однозначно определены как типичные рецепторы ночного зрения, реагирующие на одиночные фотоны и насыщающиеся при умеренном уровне освещенности (Matthews, 1983). Также, зеленые палочки жабы, подобно красным, генерируют хорошо различимые дискретные темновые события (Matthews, 1984). Как уже было указано, пигменты колбочек в целом имеют частоту спонтанной изомеризации на 2–3 порядка выше, чем у палочкового родопсина (см. раздел 1.2.3), но в соответствии с гипотезой Барлоу наиболее коротковолново-чувствительные могут приближаться к стабильности пигментов палочек (Rieke, Baylor, 2000; Shi et al., 2007). Недавние эксперименты показали, что синечувствительные зрительные пигменты зеленых палочек бесхвостых амфибий, экспрессируемый в культуре клеток НЕК293, демонстрирует даже большую стабильность, чем аналогичные SWS2-пигменты колбочек других позвоночных (Kojima et al., 2017). Исходя из этого, можно было бы ожидать, что частота дискретных темновых событий в зеленых палочках будет сравнима стаковой для красных. Однако два независимых исследования на палочках жаб дали оценки скорости тепловой изомеризации пигмента, различающиеся в 400 раз (Matthews, 1984; Luo et al., 2011). Такие значительные различия в

результатах для фоторецепторов одного и того же вида вряд ли можно объяснить различным генетическим фоном у популяций животных, использованных в экспериментах, несмотря на то, что этот фактор, вероятно, все же вносит определенный вклад в вариабельность оценок стабильности зрительных пигментов (см. обзор Donner, 2020). Учитывая, что частота дискретного темнового шума определяет пороговую чувствительность палочек, данное несоответствие не позволяет надежно оценить ее для зеленых палочек и требует проведения независимого измерения.

Строгая оценка порогов светочувствительности зеленых и красных палочек амфибий имеет большое значение в рамках исследования скотопического цветного зрения. Поскольку для успешного цветоразличения требуется как минимум два различных спектральных типа ночных фоторецепторов, амфибии, имеющие красные и зеленые палочки, представляют собой уникальный объект для изучения цветоразличения в условиях экстремально низких освещенностей. Возможность кооперации зеленых и красных палочек была подтверждена для бесхвостых амфибий электрофизиологическими записями от ганглиозных клеток сетчатки (Bäckström, Reuter, 1974) и в поведенческих экспериментах (Yovanovich et al., 2017), однако границы диапазона освещенности, при котором доступно цветоразличение на основе палочек, пока не ясны. Следует отметить, что верхняя граница рабочего диапазона зеленых палочек принципиально важна для понимания уровня освещенности, когда они насыщаются и их роль в цветовом зрении на себя принимают спектрально идентичные синечувствительные колбочки (Кондрашев, Гнубкин, 1978; Maximov et al., 1985). Таким образом, подробный сравнительный анализ красных и зеленых палочек амфибий представляется важным для понимания возможностей сумеречного цветного зрения.

### ***1.4.3 Палочкоподобные рецепторы круглоротых***

Миноги — самые примитивные среди современных позвоночных, обладающие типичными для позвоночных глазами камерного типа и упорядоченно расположенной сетчаткой; у родственных им миксин глаза и сетчатка в частности сильно редуцированы вследствие специализированного паразитического образа жизни, см. Lamb, 2013). Сетчатка миног содержит все основные типы нейронов, характерные для челюстноротых позвоночных: фоторецепторы, биполярные, горизонтальные, амакриновые и ганглиозные клетки (Fain, 2019). Сетчатка речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) содержит два типа фоторецепторов, так называемые короткие и длинные рецепторы, располагающиеся в два яруса (Рис. 13). Их функциональная роль — рецепторов дневного или ночного зрения — долгое время оставалась предметом дискуссий из-за их неясной, переходной морфологии (Tretjakoff, 1916; Walls, 1942). Их общая морфология сходна и больше напоминает колбочковую, чем палочковую, а различаются два типа рецепторов в основном длиной внутренних сегментов. Электронно-микроскопические исследования в 1970-е годы также не обнаружили у речной миноги четких признаков, позволяющих разделить их на палочки и колбочки. Напротив, было показано, что ультраструктура наружных сегментов обоих типов фоторецепторов напоминает структуру колбочек высших позвоночных: их мембранные диски являются складками наружной плазматической мембраны (Öhman, 1971, 1976; Dickson и Graves, 1979).



**Рис.13.** Фоторецепторный слой сетчатки речной миноги, окрашенный водным синим + тиазиновым красным. По одному короткому и длинному рецептору обведено черным контуром, для демонстрации их общей морфологии (по Лычакову, 1976).

Эта проблема, по-видимому, была решена, когда Говардовский и Лычаков с помощью микроспектрофотометрии на одиночных клетках показали, что короткие рецепторы содержат родопсин-подобный зрительный пигмент с максимумом поглощения ( $\lambda_{max}$ ) при 517 нм, а длинные рецепторы содержат пигмент, близкий по спектру к колбочковым красночувствительным (LWS) пигмент с  $\lambda_{max}$  при 555 нм (Govardovskii, Lychakov, 1984). Кроме того, с помощью электроретинографии авторы показали, что клетки с родопсин-подобным пигментом служат рецепторами для зрения при низкой освещенности, то есть являются физиологическими палочками. Клетки же с более красночувствительным пигментом оказались менее чувствительны и функционировали только при дневных освещенностях, как типичные физиологические колбочки.

За последние годы три независимые лаборатории провели детальный анализ физиологических свойств фоторецепторов миног северного полушария

(европейская речная минога *Lampetra fluviatilis*, Asteriti et al., 2015; арктическая японская минога *Lethenteron japonicum* /*Lampetra japonica*, Sakurai, 2017; американская морская минога *Petromyzon marinus*, Morshedian and Fain, 2015, 2017) с использованием методов регистрации токов одиночных клеток. Несмотря на небольшие количественные различия, результаты однозначно подтверждают, что короткие рецепторы относительно длинных представляют собой типичные физиологические палочки. Они демонстрируют медленную кинетику фотответа, высокую чувствительность и склонны к насыщению при умеренном уровне постоянного освещения. С другой стороны, длинные клетки на два порядка менее чувствительны, а их фотответы примерно в 10 раз быстрее чем у коротких клеток. Также они быстро восстанавливаются после насыщения при постоянном освещении, как и колбочки других позвоночных.

Физиологическая идентификация согласуется с более поздним генетическим анализом, который показывает, что зрительный пигмент длинных рецепторов принадлежит к линии красочувствительных колбочковых пигментов (LWS, см. Collin et al., 2003a, b; Lamb, 2013). Пигмент коротких рецепторов близок к родопсинам (RHO, Yokoyma, 2000), однако некоторые авторы склонны выделять его и аналогичные пигменты других видов миног в самостоятельную линию которая разошлась с родопсинами челюстноротых очень рано в эволюции позвоночных (Collin et al., 2003b; Lamb, 2013).

Следует отметить, что сетчатка миног южного полушария (например, австралийской миноги *Geotria australis*) может содержать до пяти морфологически и спектрально различимых типов колбочек (Collin et al., 2003a; Warrington et al., 2021). Таким образом, сетчатка миног, несомненно, дуплексная, а ее палочки и колбочки биохимически и физиологически сходны со специализированными палочками и колбочками высших позвоночных. Среди признаков, которые могли бы свидетельствовать об их близости к некоему примитивному недифференцированному фоторецептору предка позвоночных, можно отметить колбочковую ультраструктуру наружных сегментов коротких рецепторов, а также их профиль экспрессии палочко-

колбочковых изоформ белков каскада фототрансдукции, многие из которых в равной степени удалены от колбочковых и палочковых изоформ челюстноротых и представляют отдельную эволюционную линию (Muradov et al. 2007, 2008; Lagman et al., 2016). Другое потенциальное свидетельство переходного характера коротких рецепторов миноги было обнаружено Говардовским и Лычаковым: они показали, что при определенных уровнях освещенности электроретинограмма речной миноги проявляет признаки цветоразличения, при этом не удается подобрать интенсивности стимулов двух цветов так, чтобы их замена не вызывала бы ответ у сетчатки (Govardovskii, Luchakov, 1984). Этот результат говорит о возможности одновременной работы и коротких, и длинных рецепторов миноги в условиях умеренной освещенности. Авторы предположили, что короткие рецепторы могли сохранить способность сопротивляться насыщению фотоответа подобно колбочкам. Таким образом, короткие рецепторы миноги потенциально могут рассматриваться как рецепторы переходного типа, экспрессирующие изоформы некоторых белков фототрансдукции, удаленные филогенетически как от палочковых, так и от колбочковых. Поскольку относительно длинных рецепторов они однозначно определяются как функциональные рецепторы ночного зрения, интерес представляет их сравнение с высокоспециализированными палочками других позвоночных.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объекты исследования и подготовка препаратов**

Для проведения сравнительного анализа в качестве типичных палочек были выбраны родопсин-содержащие («красные») палочки озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*, ранее *Rana ridibunda*), типичных колбочек – красночувствительные колбочки серебряного карася (*Carassius gibelio*). Фоторецепторы этих животных являются классическими объектами многолетних исследований зрительной трансдукции в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН и многие их физиологические (Astakhova et al., 2008; Astakhova et al., 2012; Astakhova et al., 2015) и биохимические (Kolesnikov et al., 2003; Golobokova, Govardovskii, 2006) особенности подробно охарактеризованы. Также проводились дополнительные эксперименты на палочках стерляди (*Acipenser ruthenus*). В качестве трансмутированных фоторецепторов были выбраны короткие рецепторы речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) и зеленые палочки озерной лягушки как представителя бесхвостых амфибий. Работа с животными проводилась в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (24 ноября 1986 года, 86/609 / ЕЕС) и протоколом, одобренным комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН.

Перед началом эксперимента все животные проходили темновую адаптацию в течение как минимум 12 часов. Все дальнейшие манипуляции проводились при тусклом темно-красном освещении. Животных умерщвляли путем декапитации с последующим разрушением спинного и головного мозга. Глаза извлекались, и под бинокулярной лупой с инфракрасной подсветкой из них выделяли сетчатку и путем ее диссекции офтальмологическими пинцетами получали суспензию изолированных фоторецепторов. В ходе экспериментов все манипуляции с препаратами производились в растворе Рингера. Для препаратов, полученных от разных животных использовались соответствующие подходящие по составу растворы (Фирсов, Говардовский, 1990; Govardovskii, Luchakov, 1984; Astakhova et al., 2015), их список приведен в Табл. 1. Для приготовления растворов использовались реактивы фирмы Sigma Aldrich.

**Табл. 1.** Состав растворов Рингера для препаратов сетчатки разных экспериментальных животных.

<b>Животное</b>	<b>Состав раствора (концентрация в мМ)</b>	<b>pH</b>
Озерная лягушка	NaCl 90, KCl 2.5, MgCl <sub>2</sub> 1.4, CaCl <sub>2</sub> 1.05, NaHCO <sub>3</sub> 5, HEPES 5, D-глюкоза 10, EDTA 0.05	7.6
Серебряный карась	NaCl 102, KCl 2.6, MgCl <sub>2</sub> 1, CaCl <sub>2</sub> 1, NaHCO <sub>3</sub> 28, HEPES 5, D-глюкоза 5	7.8
Речная минога	NaCl 120, KCl 3.6, MgSO <sub>4</sub> 1.2, CaCl <sub>2</sub> 1.1, NaHCO <sub>3</sub> 22.6, HEPES 10, D-глюкоза 6	7.5
Стерлядь	NaCl 90, KCl 2.5, MgCl <sub>2</sub> 1.0, CaCl <sub>2</sub> 1.0, NaHCO <sub>3</sub> 5, HEPES 5, D-глюкоза 10	7.6

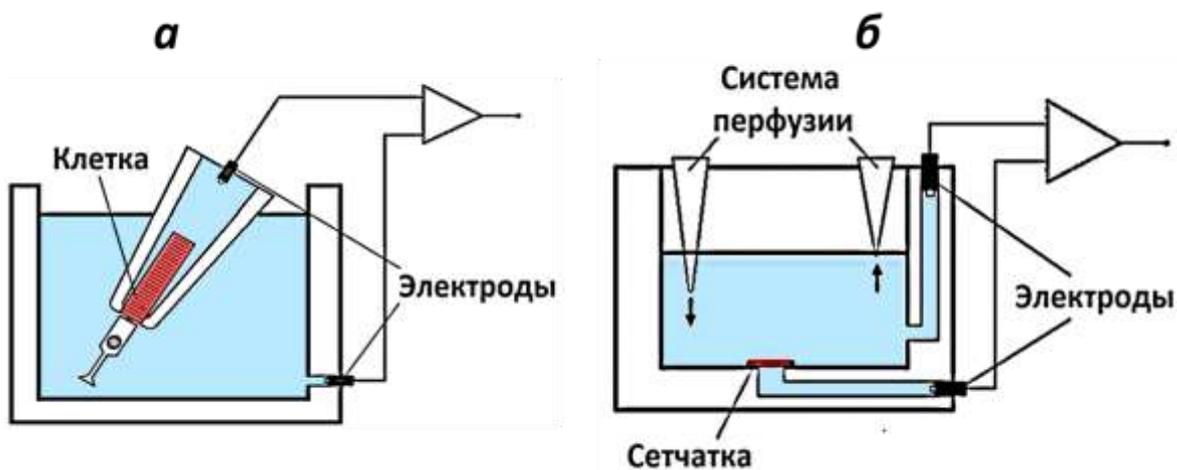
## **2.2 Регистрация и анализ электрических ответов фоторецепторов**

### **2.2.1 Регистрация тока изолированных клеток**

Кинетику включения и выключения каскада фототрансдукции анализировали по токовым ответам одиночных клеток на световые стимулы. В темноте вдоль фоторецептора течет ионный ток, проходящий через внеклеточное пространство и замыкающийся через цитоплазму клетки. Этот ток можно зарегистрировать с помощью всасывающей микропипетки (Baylor et al. 1979b). Микропипетки изготавливались с помощью пуллера Р-97 (Sutter Instrument co.). Полученные заготовки обжигались на микрокузнице для тонкой корректировки диаметра микропипетки, чтобы наружный сегмент палочки или колбочки входил в нее максимально плотно. Также края заготовок оплавливались, чтобы предотвратить механические повреждения клеток. Суспензия изолированных фоторецепторов загружается в камеру с системой протока раствора Рингера, и клетки затягиваются наружным или внутренним сегментом внутрь пипетки. В ходе эксперимента в стеклянную пипетку всасывались наружные сегменты фоторецепторов, одиночных или прикрепленных к

небольшим фрагментам сетчатки. Рабочая температура растворов 17-19 °С (для миноги – 12-15 °С).

Микропипетка закрепляется в держателе, вместе с трубкой, соединяющейся с системой регулировки давления и хлорсеребряным электродом (World Precision Instruments, Inc., США). Второй электрод контактирует с раствором Рингера в экспериментальной камере. Положение держателя и, следовательно, пипетки, погруженной в раствор в камере, изменяется с помощью микроманипулятора. Поскольку и держатель, и микропипетка заполнены раствором Рингера, в результате размещения клетки в пипетке образуется замкнутый электрический контур (Рис. 14А), по которому фоторецепторный ток отводится на усилитель. Вся установка расположена в затемненном экранирующем боксе, а визуализация микропипетки и клеток происходит с помощью инфракрасной подсветки и видеокамеры, передающей изображение на экран монитора.



**Рис. 14.** Регистрация электрических ответов фоторецепторов. (а) схема регистрации тока одиночного фоторецептора с помощью всасывающей микропипетки. (б) Устройство экспериментальной камеры для регистрации потенциала целой сетчатки.

Система световой стимуляции включает в себя три светодиода с максимумами излучения 525 нм (зеленый), 630 нм (красный) и 460 нм (синий). Сравнивая чувствительность клеток к стимулам с разными длинами волн, мы

различали спектральные типы фоторецепторов (красно-, зелено- и синечувствительные колбочки карася; красные и зеленые палочки лягушки). Интенсивности стимулов регулировались в ходе эксперимента путем изменения подаваемой на светодиоды силы тока и с помощью набора нейтральных светофильтров. Калибровка интенсивности, выраженной как число обесцвеченных молекул зрительного пигмента за вспышку, была выполнена с использованием оптосенсора Burr-Brown OPT-301, и, дополнительно, на основе статистики одноквантовых ответов (Baylor et al., 1979a), а размеры клетки, необходимые для дальнейшего пересчета интенсивности на объем определялись по фотографиям, сделанным инфракрасной камерой.

Фоторецепторы стимулировали вспышками света длительностью 10 или 2 мс, и фотоответы регистрировали с дискретизацией 10 или 2 мс на точку (для палочек и колбочек, соответственно), в полосе фильтрации 0 - 30 Гц. Длительные (20-30 минут) записи тока клетки в темноте, необходимые для анализа спонтанных активаций зрительного пигмента, писали с дискретизацией 2 мс на точку, а минимальную задержку определяли по записям фотоответов на вспышки длительностью 1-2 мс, с дискретизацией 1-2 мс на точку, в полосе фильтрации 0 - 300 Гц. Все записи были скорректированы на введенную фильтром задержку в 1 мс. Процесс записи данных, интенсивность и длительность световых стимулов контролируются при помощи программ, разработанных в лаборатории эволюции органов чувств на базе обеспечения LabView (National Instruments, США).

### ***2.2.2 Регистрация фоторецепторного потенциала сетчатки***

Изменение тока, текущего вдоль фоторецепторов, приводит и к изменениям внеклеточной разности потенциалов, которую можно зарегистрировать. Для этого использовалась два хлорсеребряных электрода (World Precision Instruments, Inc., США), подключенных к перфузируемой камере Уссинга по разные стороны от сетчатки и контактирующих через раствор Рингера (Рис.

14Б). В составе целой сетчатки фоторецепторы функционируют лучше и дольше сохраняют работоспособность, и ограничения, которые в случае метода всасывающей микропипетки сужают выбор типа исследуемых клеток, для данного подхода не значимы. Следует отметить, что в такой конфигурации невозможно записать ответ только палочек на яркую вспышку, так как в препарате будут активироваться оба типа фоторецепторов. Однако при включении фоновой засветки, насыщающей палочки, становится возможно регистрировать чисто колбочковые фотоответы. Это было реализовано для анализа задержки фотоответов колбочек карася и лягушки.

Трансретинальный электрический ответ на свет – электроретинограмма (ЭРГ) – создается всеми клетками сетчатки. Фоторецепторный потенциал выделяется из тотальной ЭРГ путем добавления к подаваемому в систему перфузии раствору 12 мМ аспартата натрия, блокирующего глутаматергическую передачу сигнала между фоторецепторами и остальными клетками сетчатки. В результате при световой стимуляции регистрируется только сдвиг потенциала, пропорциональный рецепторному фототоку.

Осветительная система состояла из трех независимых оптических каналов: одного с зеленым (525 нм), и двух с белыми светодиодами с набором сменных цветных светофильтров. В результате становится возможным выделить ответ колбочек определенного спектрального типа. В частности, фотоответы красночувствительных колбочек лягушки возбуждались оранжевыми стимулами (светофильтр, обрезающий длины волн меньше 600 нм) при постоянном фоне 525 нм. Для стимуляции красночувствительных колбочек карася использовался фильтр, обрезающий длины волн меньше 640 нм. Интенсивность света была откалибрована с помощью оптосенсора Burr-Brown OPT-301. Чтобы выразить интенсивность стимула как относительное обесцвечивание на вспышку, проводилась дополнительная калибровка: с помощью микроспектрофотометра было измерено обесцвечивание родопсина в палочках препарата сетчатки лягушки. Стимуляция фоторецепторов осуществлялась вспышками света длительностью 1 мс, ответы

регистрировались с дискретизацией 0.5 мс на точку, с аналоговой фильтрацией в полосе 0 - 700 Гц. Все записи были скорректированы на задержку в 1 мс, введенную фильтрацией. Контроль эксперимента осуществлялся с помощью платы ввода-вывода PCI-DAS-1602 (Measurement Computing, Norton). Управляющая программа была написана в лаборатории в Microsoft Visual Basic 96.

### ***2.2.3 Анализ кинетики различных этапов фототрансдукции***

Первичная обработка электрофизиологических данных производилась при помощи программного обеспечения LabView или Microsoft Visual Basic 96. Она включала в себя усреднение нескольких ответов, коррекцию нулевой линии и сглаживание спектра методом скользящего среднего (по 7 точкам).

Для моделирования фотоответа и последующего анализа вклада различных этапов активации каскада фототрансдукции в задержку использовалась модель, представляющая собой систему дифференциальных уравнений. Такая модель была разработана в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН и реализована в программной среде MathCad15 (см. Приложение 1). Следует отметить, что в исходной минимальной модели фотоответа (Astakhova et al., 2015) этап от поглощения фотона молекулой пигмента до активации фосфодиэстеразы считается одноступенчатым процессом с фиксированной скоростью. Поэтому, чтобы учесть многоступенчатый характер активации каскада модель была дополнена дифференциальными уравнениями которые подробно описывают начальные этапы каскада от образования активной формы зрительного пигмента  $R^*$  до активации фосфодиэстеразы трансдуцином (см. раздел 1.3.3). Существует также дополнительный путь активации через цикл, проводимый частично инактивированным родопсином ( $R_p$ ), который подвергся фосфорилированию родопсинкиназой (Рис. 15). Фосфорилирование происходит за время  $t_p$  и замедляет переход на этапе 1 ( $t_1$ ) с некоторым коэффициентом  $a_p$ , большим, чем

единица. Все описанные этапы активации каскада задаются системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dR^*}{dt} = \frac{R}{t_0} - \frac{R^*}{t_1} + \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} - \frac{R^*}{t_P} \quad (3)$$

$$\frac{d(R^*T_{\alpha\beta\gamma}GDP)}{dt} = \frac{R^*}{t_1} - \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}GDP}{t_2} \quad (4)$$

$$\frac{d(R^*T_{\alpha\beta\gamma})}{dt} = \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}GDP}{t_2} - \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}}{t_3} \quad (5)$$

$$\frac{d(R^*T_{\alpha\beta\gamma}GTP)}{dt} = \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}}{t_3} - \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} \quad (6)$$

$$\frac{dT_{\alpha\beta\gamma}GTP}{dt} = \frac{R^*T_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} - \frac{T_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_5} + \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} \quad (7)$$

$$\frac{dT_{\alpha}GTP}{dt} = \frac{T_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_5} - \frac{T_{\alpha}GTP}{t_6} \quad (8)$$

$$\frac{dPDE^*}{dt} = \frac{T_{\alpha}GTP}{t_6} - \frac{PDE^*}{t_E} \quad (9)$$

$$\frac{dRp}{dt} = \frac{R^*}{t_P} + \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} - \frac{Rp}{t_{Ar}} - \frac{a_P \cdot Rp}{t_1} \quad (10)$$

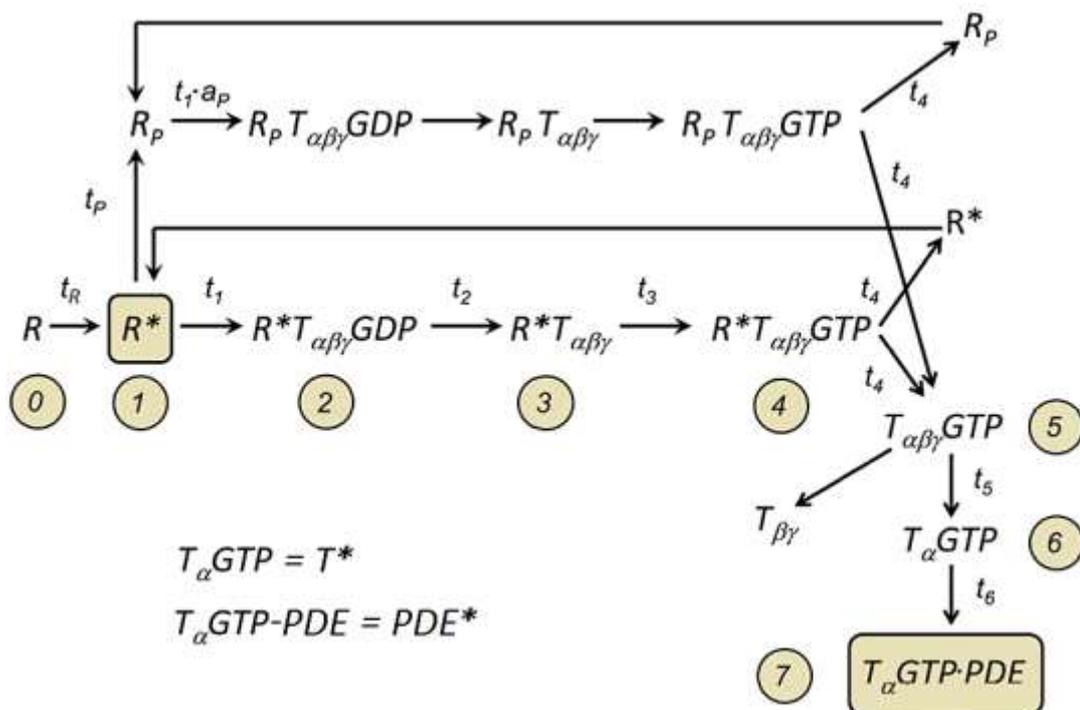
$$\frac{dRpT_{\alpha\beta\gamma}GDP}{dt} = \frac{a_P \cdot Rp}{t_1} - \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}GDP}{t_2} \quad (11)$$

$$\frac{dRpT_{\alpha\beta\gamma}}{dt} = \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}GDP}{t_2} - \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}}{t_3} \quad (12)$$

$$\frac{dRpT_{\alpha\beta\gamma}GTP}{dt} = \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}}{t_3} - \frac{RpT_{\alpha\beta\gamma}GTP}{t_4} \quad (13)$$

Здесь параметры  $t_1, \dots, t_6, t_R, t_P$  соответствуют постоянным времени переходов на Рис. 15.  $t_{Ar}$  – постоянная времени связывания фосфорилированного родопсина с ингибирующим его активность аррестином, а  $t_E$  – постоянная времени выключения  $PDE^*$ . Поскольку фосфорилирование не ингибирует активность  $R^*$  полностью, уравнения (10)-(13) характеризуют ход активации фосфодиэстеразы

фосфорилированными, но еще не связавшимися с аррестином молекулами зрительного пигмента. В уравнениях (10)-(11)  $a_p$  – коэффициент, отражающий сниженную активность формы пигмента  $R_p$  по сравнению с  $R^*$ .



**Рис. 15.** Схема начальных этапов каскада фототрансдукции. Номера в кружках обозначают промежуточные состояния компонентов каскада.  $t_1 \dots t_6$ ,  $t_p$ ,  $t_R$  – времена соответствующих им переходов.  $R$  – родопсин,  $T$  – трансдуцин,  $PDE$  – фосфодиэстераза.

Анализу с помощью модели подвергались ответы на умеренные ненасыщающие вспышки с амплитудой на уровне 50-70% от уровня насыщения. Для более точного определения задержки и улучшения соотношения сигнал/шум ответы усредняли от 20-40 (палочки, всасывающая микропипетка) до 100-200 (колбочки, фоторецепторный потенциал) раз, а затем нормировали на величину соответствующего темнового тока. Во избежание искажений длительности задержки, сглаживание методом скользящего среднего для таких записей не проводилось. Начальные значения большинства параметров модели для типичных палочек и колбочек были взяты из работы Астаховой с соавторами (Astakhova et al., 2015). Поскольку для

рассматриваемых в данной работе трансмутированных фоторецепторов значения ряда параметров неизвестны, для них подробное описание минимальной моделью фотоответа не проводилось.

Оценку их кинетики для сравнения с типичными палочками и колбочками осуществляли путем упрощенного описания: так, нисходящий фронт ответа, соответствующий многоэтапному выключению каскада фототрансдукции, аппроксимировали одноэкспоненциальной функцией. Скорость активации каскада фототрансдукции обычно оценивается по крутизне нарастающей фазы фотоответа. Согласно общепринятой модели биохимической амплификации при фототрансдукции, крутизна начального участка ответа пропорциональна количеству активированных родопсинов, т.е. интенсивности стимула (Pugh, Lamb, 1993, 2000). Поэтому, после корректировки на интенсивность стимула, восходящий фронт (активация каскада) анализировали путем расчета домножающего коэффициента, необходимого для максимального приближения к эталону - усредненному восходящему фронту красных палочек лягушки (см. Nikolaeva et al., 2019). Мы применили этот анализ к ответам на слабые ненасыщающие вспышки с амплитудой на уровне 15-30% от уровня насыщения, усредненным 6-10 раз для каждой клетки, и нормированных на величину соответствующего темнового тока. Для подгонки рассматривался начальный участок ответа длительностью 100-200 мс. Полученные значения домножающих коэффициентов соответствуют соотношению скоростей активации в изучаемой клетке и эталоне, если считать процессы инактивации пренебрежимыми на начальной стадии фотоответа. Анализ восходящей и нисходящей фаз фотоответа осуществлялся с помощью программного обеспечения MathCad 15 (MathSoft, Cambridge, США).

#### ***2.2.4 Анализ дискретного темнового шума***

Для оценки стабильности зрительных пигментов были проанализированы длительные (15-30 мин) записи темнового тока различных фоторецепторов.

Среднюю частоту дискретных темновых волн определяли путем анализа гистограммы плотности вероятности темнового тока. Такие гистограммы обычно имели асимметричное плечо, отражающее однонаправленные дискретные события, и аппроксимировались следующей функцией:

$$p(i) = A \cdot \int_0^{1/f} \exp\left(\frac{(i - k * r(t))^2}{2\sigma^2}\right) dt,$$

(14)

Здесь  $A$  — нормировочный коэффициент,  $\sigma$  — дисперсия непрерывного шума,  $r(t)$  — одноквантовый ответ (ОКО), а  $k$  — масштабирующий коэффициент, используемый для корректировки амплитуды ОКО в ходе аппроксимации. Таким образом,  $p(i)$  выражается как свертка гистограммы плотности вероятности ОКО, и гауссова распределения, характеризующего непрерывный темновой шум клетки (Donner et al., 1990; Astakhova et al., 2017).

Из длительных записей были удалены медленные колебаний базовой линии. Необходимый для аппроксимации гистограммы плотности вероятности темнового тока ОКО был получен из статистики примерно 100 ответов на слабые вспышки, записанных для каждой исследуемой клетки (от 2 до 4 обесцвеченных молекул пигмента на клетку, см. Baylor et al., 1979a). Стандартное отклонение для распределения Гаусса  $\sigma$  может быть определено по записям тока с вырезанными дискретными темновыми событиями (см. раздел 3.7). Таким образом, единственными переменными параметрами, которые можно найти путем аппроксимации функции (14), являются частота ОКО-подобных темновых событий ( $f$ ) и поправочный коэффициент для ОКО ( $k$ ). Аппроксимация проводилась с помощью программного обеспечения MathCad 15 (MathSoft, Cambridge, США).

Константу скорости спонтанной активации пигмента определяли путем нормировки частоты темновых событий к общему количеству молекул зрительного пигмента в клетке. Это число было рассчитано по среднему объему клеток и концентрации пигмента, известной для амфибий из литературных

данных (3.1 мМ для красных и 3.5 мМ для зеленых палочек, см. Hárosi, 1975). Для других типов фоторецепторов концентрация принималась равной 3 мМ.

## **2.3 Микроспектрофотометрия зрительных пигментов**

### ***2.3.1 Регистрация и анализ спектров***

Чтобы охарактеризовать свойства зрительных пигментов в различных фоторецепторах, были выполнены измерения спектров с наружных сегментов изолированных фоторецепторов с помощью скоростного дихроичного микроспектрофотометра (Говардовский, Зуева, 2000; Kolesnikov et al., 2003). Данный прибор был разработан в лаборатории эволюции органов чувств и позволяет записывать спектр в диапазоне 330-760 нм с дискретизацией 1 нм со скоростью 250 нм/с. Оптическая схема прибора создает измерительный луч микронного размера, с помощью которого можно регистрировать спектры отдельных наружных сегментов. В качестве препарата выступает суспензия изолированных фоторецепторов в капле раствора Рингера, запечатанная между двумя покровными стеклами и закрепленная на предметном столике прибора.

Ширина измерительного светового зонда выбиралась так, чтобы она составляла примерно 30-50% от диаметра наружного сегмента, а длина – около 90% от его длины. Перед измерением спектра поглощения препарата световой зонд устанавливается на свободное пространство рядом с клеткой, и выходной сигнал фотоэлектронного умножителя, пропорциональный интенсивности света и соответствующий базовой линии, записывался в память компьютера. Сканирование спектра производилось 4 раза в направлении от длинноволновой части спектра к коротковолновой и обратно при двух ортогональных линейных поляризациях света в измерительном луче: перпендикулярном (Т-поляризации) и параллельном (L-поляризации) оси наружного сегмента. Накопление и усреднение нескольких записей базовой линии снижает результирующий шум. Затем под контролем инфракрасной телевизионной системы наружный сегмент фоторецептора вводился в измерительный луч, сканирование повторялось один раз, и записывались два массива значений поглощения клетки: при Т- и L-

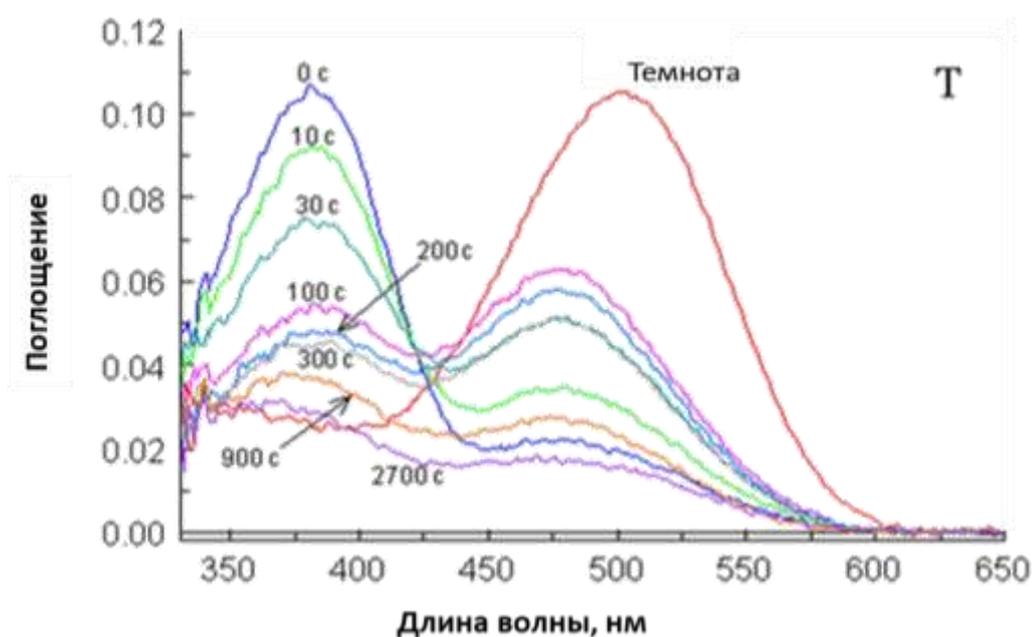
поляризации. Оптическая плотность препарата на каждой длине волны автоматически рассчитывается компьютерной программой отдельно для Т- и L-поляризации. Калибровка по длинам волн проводилась с помощью эталона – пурпурного стекла ПС-7. Управление прибором осуществлялось с помощью программного обеспечения, разработанного в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН в среде Microsoft Visual Basic 96.

Первичная обработка экспериментальных данных производилась при помощи программного обеспечения, разработанного в лаборатории эволюции органов чувств в среде Microsoft Visual Basic 96. В его функции входит усреднение спектров, коррекция нулевой линии и аппроксимация экспериментального спектра стандартной кривой, описывающей поглощение зрительного пигмента (Govardovskii et al., 2000). Поскольку зрительный пигмент обесцвечивается в ходе самой процедуры измерения спектра, его многократная запись для одной и той же клетки с целью усреднения и улучшения соотношения сигнал/шум не представляется возможным. Таким образом, анализ проводился для спектров зрительных пигментов и продуктов их распада, усредненных по нескольким клеткам одного типа. Коррекция нулевой линии, необходимая для нивелирования эффектов светорассеяния, проводилась по участку спектра от 650 и 760 нм, где поглощение зрительных пигментов и продуктов их распада можно считать нулевым.

### ***2.3.2 Анализ спектров и кинетики фотолиза***

Для изучения кинетики фотолиза зрительных пигментов, клеткам предъявляли яркой обесцвечивающую вспышку (светодиод, максимум излучения 525 нм, Marl International Ltd., Великобритания) длительностью 1 с, после чего записывали серию спектров, первый – непосредственно после вспышки, остальные – через заранее заданные интервалы времени. Следует отметить, что первая запись после обесцвечивания (в дальнейшем она будет обозначаться как 0 с) начиналась через 20 мс после окончания засветки, а полное сканирование спектра при двух направлениях поляризации измерительного луча занимало

около 1.7 с. Запись при двух поляризациях позволяет однозначно различать продукты фотолиза, которые имеют схожие спектры поглощения, но различаются по ориентации в фоторецепторной мембране, и таким образом оценить временной ход их концентрации (Рис. 16). Так, поскольку молекулы зрительного пигмента и его метапродукты сохраняют при этом ориентацию своих хромофорных групп в плоскости мембранных дисков, для них характерны высокие значения дихроизма (отношения поглощений при Т- и L-поляризациях измерительного луча). Молекулы ретиналя и его производных, напротив, не имеют преимущественной ориентации в фоторецепторной мембране, и легко отличимы по отсутствию наблюдаемого дихроизма (см. Kolesnikov et al. 2003).



**Рис. 16.** Пример изменений спектра поглощения темнового родопсина (красные палочки травяной лягушки) в разные моменты времени после обесцвечивающей вспышки. Приведены спектры для Т-поляризации измерительного луча (по Kolesnikov et al., 2003).

Поскольку на всех стадиях фотолиза в наружном сегменте фоторецептора присутствует смесь различных продуктов распада, это отражается на форме записываемого спектра. Любой спектр, записанный в процессе фотолиза зрительного пигмента, в общем случае можно представить как комбинацию

спектров метародопсинов I, II и III и ретиналя. Также, в анализ обычно включается возникающий на поздних стадиях фотолиза продукт с пиком поглощения при 440 нм (P440), P440 представляет собой неспецифические протонированные шиффовы основания транс-ретиналя, образовавшиеся при взаимодействии с различными аминогруппами опсина и липидами фоторецепторных мембран (Kolesnikov et al. 2003). Поскольку равновесие между метародопсинами I и II устанавливается очень быстро (~ 1 мс, Baumann, 1976), в рамках временного разрешения прибора их можно рассматривать как единый продукт  $M$ , спектр которого определяется записью непосредственно после обесцвечивания (момент времени 0 с). Спектрально различимые продукты фотолиза родопсина имеют максимумы поглощения около 380 нм (метародопсин II и ретиналь) и 475 нм (метародопсины I и III, а также P440). Экспериментальные значения поглощения при T- и L- поляризации на этих двух длинах волн, можно выразить следующим образом (Kolesnikov et al. 2003):

$$T(380) = M(380) + Ral(380) + f_3 \cdot MIII(475) + f_4 \cdot P(475) \quad (15)$$

$$T(475) = f_1 \cdot M(380) + f_2 \cdot Ral(380) + MIII(475) + P(475) \quad (16)$$

$$L(380) = \frac{M(380)}{D_M(380)} + \frac{Ral(380)}{D_{Ral}(380)} + f_3 \cdot \frac{MIII(475)}{D_{MIII}} + f_4 \cdot \frac{P(475)}{D_P} \quad (17)$$

$$L(475) = f_1 \cdot \frac{M(380)}{D_M(475)} + f_2 \cdot \frac{Ral(380)}{D_{Ral}(475)} + \frac{MIII(475)}{D_{MIII}} + \frac{P(475)}{D_P} \quad (18)$$

Здесь,  $M$  – поглощение суммы метародопсинов I и II,  $Ral$  – ретинального компонента,  $MIII$  – метародопсина III и  $P$  – P440.  $D_M$ ,  $D_{Ral}$ ,  $D_{MIII}$  и  $D_P$  – значения дихроизма соответствующих продуктов. Параметры  $f$  определяют соотношения поглощений различных продуктов на 380 и 475 нм:  $f_1 = M(475)/M(380)$ ,  $f_2 = Ral(475)/Ral(380)$ ,  $f_3 = MIII(380)/MIII(475)$ ,  $f_4 = P(380)/P(475)$ . Значения максимальных поглощений на 380 и 475 нм определялись полиномиальной подгонкой к экспериментальным точкам, расположенным в диапазоне  $\pm 20$  нм от соответствующего пика поглощения.

Оценка поглощения каждого продуктов фотолиза  $M$ ,  $Ral$ ,  $MIII$  и  $P$  возможна при решении приведенной системы уравнений. При этом  $D_M$ ,  $D_{Ral}$ , и  $D_P$  определяются непосредственно из экспериментальных спектров,  $D_{MIII}$ ,  $f_2$  и  $f_3$  известны из литературных данных для палочек амфибий (Knowles & Dartnall, 1977, Kolesnikov et al., 2003),  $f_1$  – из экспериментального Т-спектра на 0 с, а  $f_4$  принимается равным нулю (в соответствии со спектром P440). Необходимо отметить, что дихроизм  $M$  имеет разное значение при 380 и 475 нм, так как соответствует в первом случае дихроизму метародопсина II, а во втором – метародопсина I. Также, в зависимости от возможности наблюдения пиков, характерных для различных продуктов распада, некоторые из них могут быть исключены из системы уравнений (Golobokova, Govardovskii, 2006).

Решая систему уравнений (15-18) для каждого момента времени, можно найти значения Т-поглощений каждого из продуктов фотолиза в их максимумах. Учитывая дихроизмы и коэффициенты молярной экстинкции, можно перевести Т-поглощения в относительные концентрации продуктов, нормированные на количество темнового зрительного пигмента, которое было обесцвечено в ходе вспышки по следующей формуле:

$$Q = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \frac{E_T(\lambda_m) \cdot (2 + 1/D)}{R_T(\lambda_m) \cdot (2 + 1/D_R)} \quad (19)$$

Здесь,  $E_T(\lambda_m)$  – Т-поглощение продукта фотолиза при  $\lambda_{max}$ ,  $D$  – экспериментально определенный дихроизм продукта,  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции по отношению к темновому зрительному пигменту,  $R_T(\lambda_m)$  – Т-поглощение зрительного пигмента в его максимуме (по Knowles & Dartnall, 1977),  $D_R$  – дихроизм зрительного пигмента. Коэффициент молярной экстинкции для суммы метародопсинов I и II ( $\varepsilon_M$ ) может быть определен из условия, что их общее количество сразу после вспышки (на 0 с) равно количеству обесцвеченного родопсина. Коэффициенты молярных экстинкций метародопсина III, ретинального компонента и P440 подбираются таким образом, что суммарное количество всех продуктов в начальный период после

обесцвечивания родопсина (от 0 до 300 с) сохраняется постоянным. Для расчетов и решения систем уравнений использовались программы, реализованные в среде MathCad 15 (MathSoft, Cambridge, США).

#### **2.4 Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных производилась с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp., США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Проверку нормальности значений в выборках проводили по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения чувствительности фоторецепторов, кинетических параметров их ответов и частоты спонтанных изомеризаций зрительного пигмента в случае данных, имевших нормальное распределение, использовался либо однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post hoc критерием Тьюки для попарного сравнения (в случае однородности дисперсий по тесту Брауна-Форсайта), либо дисперсионный анализ Уэлча с post hoc критерием Даннетта (если дисперсии были неоднородны). Для данных, распределенных не нормально, применялся непараметрический критерий Краскела-Уоллеса и post hoc критерий Данна. Различия считались достоверными при уровне значимости нулевой гипотезы  $p \leq 0.05$  (с учетом поправок на множественные сравнения групп). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение или как медиана и межквартильный интервал.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1 Анализ спектральных свойств зрительных пигментов и их чувствительности к падающему свету

При предъявлении фоторецепторным клеткам сетового стимула, их чувствительность к нему обусловлена двумя факторами. Первый связан со спектральными свойствами фоторецептора – то есть его зрительного пигмента, – относительно стимулирующего света, второй – биохимическими особенностями механизмов фототрансдукции, таких как усиление на этапе от  $R^*$  до  $PDE^*$  и скорости процессов выключения. С точки зрения сравнения физиологии фоторецепторов наибольший интрес представляет абсолютная чувствительность, зависящая только от кинетики сигнального каскада и выраженная через число обесцвеченных в ходе световой стимуляции молекул зрительного пигмента в единице объема наружного сегмента фоторецептора. Перейти от полученного путем прямых измерений выражения интенсивности стимула в фотонах, падающих на единицу площади  $I(\lambda)$ , к такой «эффективной» интенсивности  $I_e(\lambda)$ , можно по следующей формуле (Baylor et al., 1979b):

$$I_e(\lambda) = 2.303 * I(\lambda) * q * f * a_{max} * S(\lambda) \quad (20)$$

Здесь,  $q = 0.67$  – квантовый выход реакции обесцвечивания зрительного пигмента (по Dartnall, 1968),  $a_{max}$  – удельное (нормированное на толщину наружного сегмента) поглощение в максимуме соответствующего пигмента при Т-поляризации падающего света. Коэффициент  $f$  определяется дихроизмом зрительного пигмента в мембранах дисков (отношение поглощений при L- и Т-поляризациях) как  $f = 0.5*(1+L/T)$ .  $S(\lambda)$  – относительная спектральная чувствительность пигмента по отношению к используемому световому стимулу.

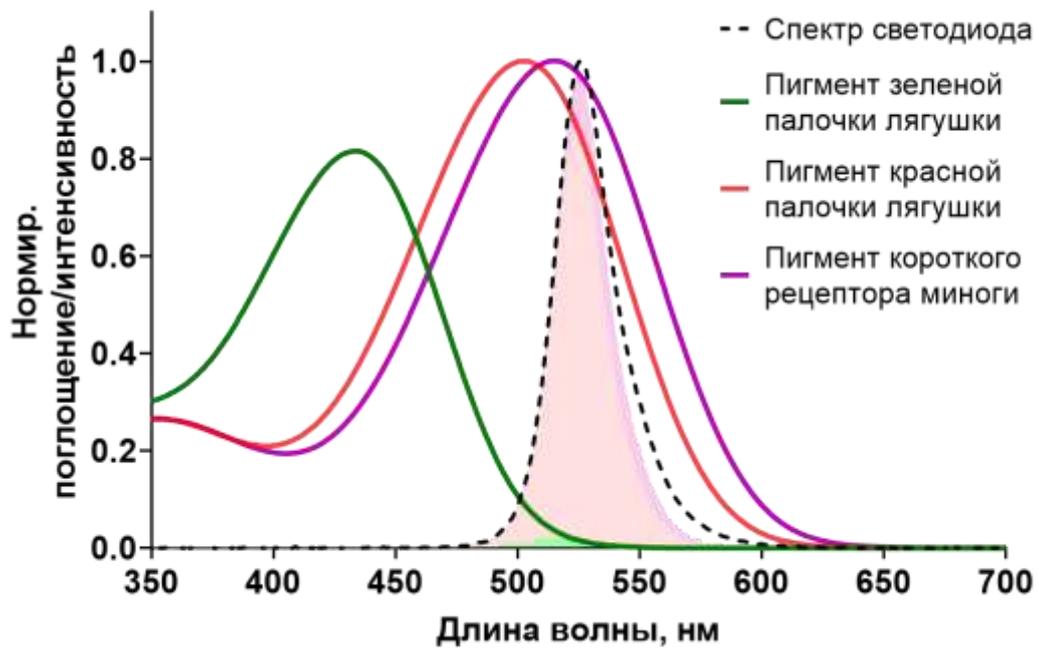
Для оценки значений приведенных выше параметров был проведен микроспектрофотометрический анализ спектров исследуемых типов

рецепторов. Положение максимума поглощения для каждого типа зрительных пигментов составило 502 нм – родопсин красных палочек лягушки, 433 нм – синечувствительный опсин зеленой палочки лягушки, 515 нм – пигмента короткого рецептора миноги, и хорошо соответствовало известным литературным данным (Govardovskii, Lychakov, 1984; Govardovskii et al., 2000).

Однако, в отличие от родопсина, пигмент зеленых палочек не аппроксимировался должным образом с помощью кривой, основанной на 100% содержании пигмента на основе витамина A1, и требовал 2-15% вклада A2-хромофора (5% для усредненного спектра, использовавшегося в расчетах). Присутствие витамина A2 в не противоречит известным данным, поскольку известно, что у бесхвостых амфибий он является доминантным типом хромофора на стадии головастика (Muntz, Reuter, 1966; Bridges, 1972), а у лягушки-быка *Lithobates catesbeianus* сохраняется и на взрослой стадии (Reuter et al., 1971). В отдельных коротких рецепторах миноги также была обнаружена небольшая (до 8%) примесь A2-хромофора, несмотря на то, что средний спектр хорошо аппроксимировался моделью для 100% пигмента на основе витамина A1. Возможность переключения между двумя хромофорами в ходе сезонных миграций между водоемами известна достаточно давно для проходных рыб, а также для морской миноги (Wald, 1957; Bridges, 1972; Harosi, Kleinschmidt, 1993). Оно реализуется за счет изменений в уровне экспрессии фермента Cyp27c1, который превращает 11-цис-ретиаль в 11-цис-дегидроретиаль (Enright et al, 2015; Morshedjian et al., 2017), что, по всей видимости, возможно и в случае речной миноги.

Оценка удельного поглощения дала значения  $a_{max} = 0.014 \text{ мкм}^{-1}$  для красных палочек лягушки и коротких рецепторов миноги. Для зеленых палочек лягушки  $a_{max} = 0.012 \text{ мкм}^{-1}$ . Коэффициент  $f$  составил около 0.65 для всех типов рецепторов и необходим для пересчета поглощений поляризованного света измерительного луча микроспектрофотометра в значения для освещения неполяризованным светом в электрофизиологических установках. Спектральная чувствительность пигмента  $S(\lambda)$  была определена по перекрытию

спектра излучения зеленого светодиода и модельных спектров поглощения пигментов (Рис. 17), полученных на основе микроспектрофотометрических записей (Govardovskii et al., 2000). Относительная эффективность зеленого светодиода в качестве стимула для красных и зеленых палочек, и коротких рецепторов дает соотношение 1:0.03:1.17, соответственно. Оценка параметров, характеризующих поглощение света различными фоторецепторами, приведена в сводной Табл. 2.



**Рис. 17.** Расчет интегралов перекрытия (окрашенные области) спектра излучения зеленого светодиода ( $\lambda_{\max}$  525 нм) и модельных спектров поглощения родопсина красной палочки, синечувствительного опсина зеленой палочки и пигмента короткого рецептора миноги ( $\lambda_{\max}$ , соответственно, 502, 433 и 515 нм).

Интерес также представляет оценка биохимических параметров каскада в расчете на целую клетку, поскольку, очевидно, что один и тот же каскад, инициируемый поглощением одного фотона, будет производить больший эффект в меньших по объему клетках (Pugh, Lamb, 1993). Для пересчета чувствительности, выраженной в  $R^*/\mu\text{км}^3$  на клетку, достаточно определить ее

объем (Табл. 2). Для палочек лягушки линейные размеры и затем объем определялись по формуле объема цилиндра по фотографиям в электрофизиологической установке непосредственно для тех клеток, что были использованы для дальнейшего анализа чувствительности. Фоторецепторы миноги оказались слишком малы для надежной оценки их размеров в электрофизиологической установке и для дальнейших расчетов использовался средний объем клеток, наблюдавшихся при микроспектрофотометрическом анализе. Расчет их объема выполнялся по линейным размерам, согласно формуле для усеченного конуса.

**Табл. 2.** Параметров, характеризующих поглощение света различными фоторецепторами. Здесь,  $a_{\max}$  – Т-поглощение зрительного пигмента на длине волны, соответствующей его пику ( $\lambda_{\max}$ ),  $V$  – объем наружного сегмента,  $f$  – коэффициент поправки на дихроизм,  $S(\lambda_{\text{LED}})$  – относительная чувствительность зрительного пигмента к стимулирующему светодиоду (525 нм). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение,  $n$  – число клеток, для которых производились расчеты. \* – данные по колбочкам карася по Astakhova et al., 2015.

Тип фоторецептора	$\lambda_{\max}$ , нм	$a_{\max}$ , мкм <sup>-1</sup>	$V$ , мкм <sup>3</sup>	$f$	$S(\lambda_{\text{LED}})$
Красные палочки лягушки	502	0.014 $\pm$ 0.003 (n=75)	2339 $\pm$ 622 (n=8)	0.62 $\pm$ 0.02 (n=20)	0.749
Зеленые палочки лягушки	433	0.012 $\pm$ 0.002 (n=90)	1242 $\pm$ 397 (n=8)	0.64 $\pm$ 0.03 (n=20)	0.025
Короткие рецепторы миноги	515	0.014 $\pm$ 0.003 (n=20)	81 $\pm$ 38 (n=20)	0.68 $\pm$ 0.08 (n=17)	0.876

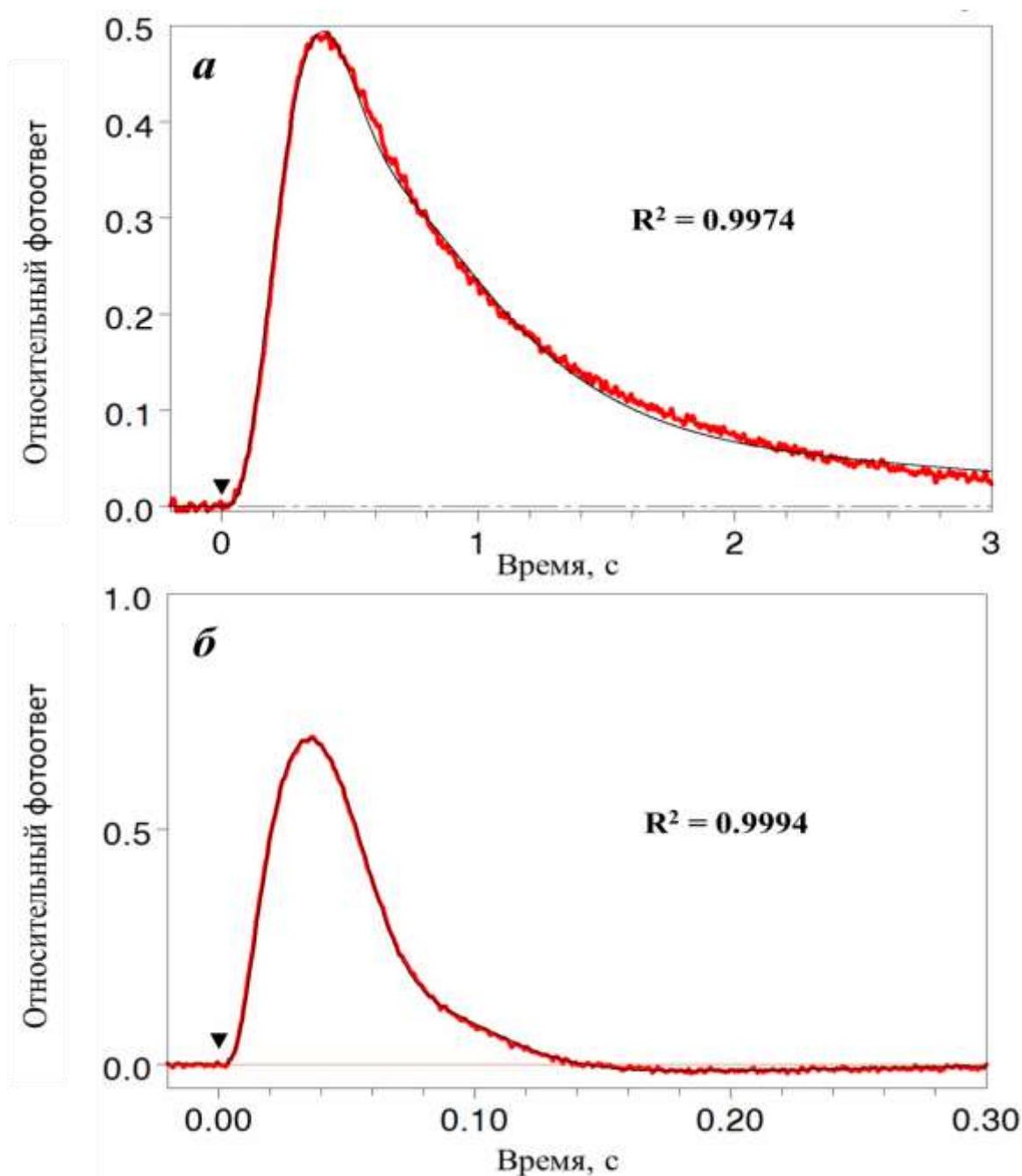
Красночувств. колбочки карася*	613	0.012	68	0.64	0.498
--------------------------------------	-----	-------	----	------	-------

### 3.2 Выявление этапов активации каскада фототрансдукции, вносящих основной вклад в задержку фотоответа

Предполагается, что цикл активации трансдуцина определяет длительность задержки и значение скорости активации PDE ( $v_{RE}$ , Pugh, Lamb, 2000). Экспериментальные значения  $v_{RE}$  в колбочках имеют большой разброс, и (в некоторых клетках  $v_{RE}$  может быть такой же высокой, как и в палочках, см. Astakhova et al., 2015). Однако, в среднем она в 2-4 раза ниже, поэтому следовало бы ожидать, что задержка в колбочках будет больше, или, по крайней мере, не меньше, чем в палочках (однако, см. Kawakami, Kawamura, 2014; Koshitani et al., 2014). При этом предполагается, что взаимодействие между  $T^*$  и фосфодиэстеразой происходит с одинаковой скоростью в обоих типах фоторецепторов. Поскольку, согласно литературным данным, единственной лимитирующей стадией в цикле активации трансдуцина является этап взаимодействия ( $t_1$ ), между  $R^*$  и  $T\alpha\beta\gamma$ ГДФ (Calvert et al., 2001; Sokolov et al., 2002), а общая длительность цикла остается постоянной, наличие наиболее медленной стадии длительность трех других ( $t_2...t_4$ ) уменьшается, что в конечном итоге делает их несущественными.

Математическая модель, воспроизводящая фоторецепторный ответ, была использована для количественного анализа кинетических параметров активации каскада фототрансдукции и определения тех из них, что определяют наблюдаемую задержку начальной фазы фотоответа. Варьирование параметров модели позволило добиться высокого качества аппроксимации экспериментальных ответов моделью ( $R^2 > 0.95$ ) На Рис. 18 приведены результаты подгонки модели к экспериментальным ответам палочки и суммарному ответу красночувствительных колбочек лягушки, нормированным

на величину темнового тока. Параметры модельных кривых, определяющие скорость этапов активации фототрандукции, приведены в Табл. 3.



**Рис. 18.** Моделирование фотосоответов палочек и колбочек лягушки. Красные линии – экспериментальные записи, черные – модельные ответы. (а) Запись ответа палочки методом всасывающей пипетки. Интенсивность стимула  $0.022 R^*/\text{мкм}^3$ , среднее из 30 ответов. (б) Запись рецепторного потенциала колбочек. Интенсивность стимула  $122 R^*/\text{мкм}^3$ , среднее из 100 ответов.  $R^2$  –

коэффициент детерминации между экспериментальной и модельной кривыми. Треугольники обозначают момент вспышки (1 мс).

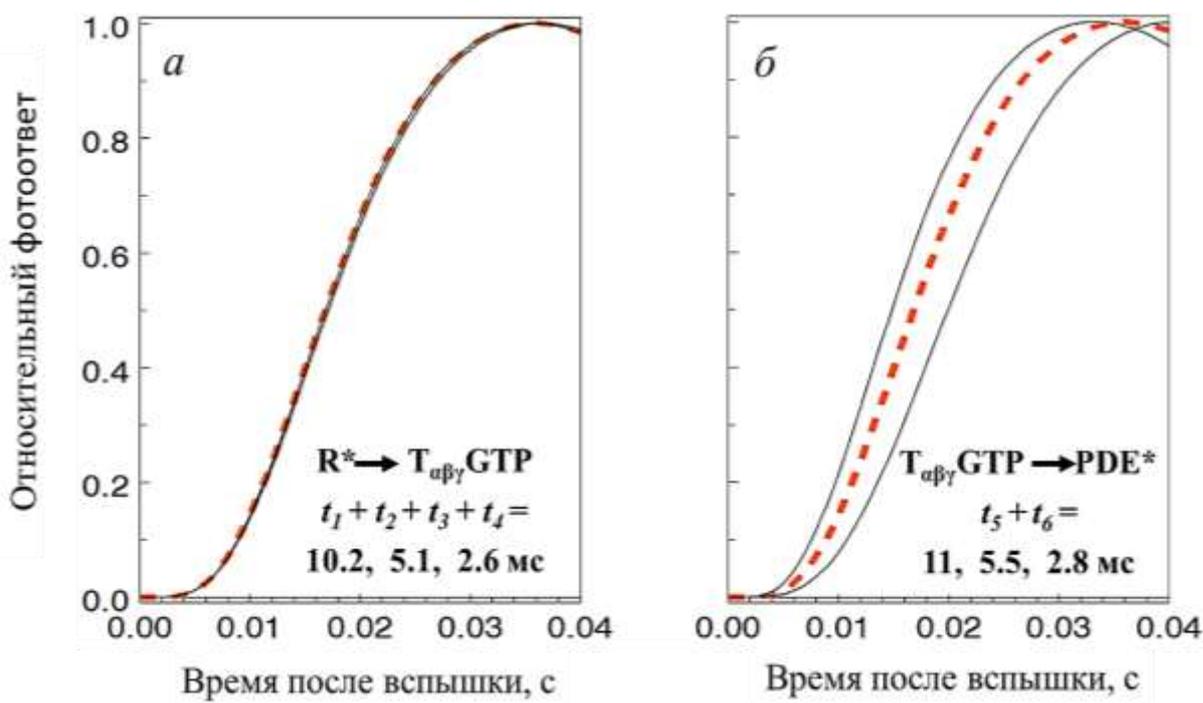
**Табл. 3.** Параметры подгонки экспериментальных фотоответов, показанных на рис. 3.5, математической моделью.  $t_R$ ,  $t_P$ ,  $t_1 \dots t_6$  – длительности этапов активации каскада фототрансдукции, согласно схеме на Рис. 15 (раздел 2.2.3).  $t_E$  – время выключения PDE\*. Длительность этапа  $t_R$  принята в соответствии с литературными данными (Baumann, 1976; Фирсов, Говардовский, 1988).

Постоянная времени (мс)	$t_R$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_5$	$t_6$	$t_P$	$t_E$
Палочка лягушки	1	5.1	0.1	0.1	0.1	12.5	53	565	450
Колбочка лягушки	0.5	4.8	0.1	0.1	0.1	0.5	5	23	38

Для выявления того, какой из этапов активации – цикл активации трансдуцина ( $t_1+t_2+t_3+t_4$ ) или активация фосфодиэстеразы ( $t_5 + t_6$ ) определяет длительность задержки фотоответа, была проведена оценка влияния их длительности на форму ответа, задаваемую моделью. Величина этих временных параметров варьировалась двукратно в сторону и увеличения, и уменьшения, и полученная модель фотоответа нормировалась по амплитуде, чтобы оценить сдвиг восходящей фазы по временной оси. Для цикла активации трансдуцина варьировался конкретный параметр модели – длительность лимитирующей стадии  $t_1$  при сохранении длительности этапов  $t_2 \dots t_4$  равными 0.1 мс. В случае этапа активации фосфодиэстеразы изменялась также лимитирующая стадия – взаимодействие  $G\alpha$ GTP и PDE ( $t_6$ ).

Пример такого анализа приведен на Рис. 19, применительно к ответу колбочек лягушки с Рис. 18Б. Видно, что изменение в 2 раза в большую и меньшую сторону длительности цикла активации трансдуцина не оказало заметного влияния на задержку. Она влияла только на величину

относительного ответа, задавая усиление в каскаде фототрансдукции (на Рис. 19А изменение величины не показано вследствие нормировки). Аналогичные изменения времени активации фосфодиэстеразы привели к сдвигу начальной части ответа и существенно изменили длительность задержки (Рис. 19Б).



**Рис. 19.** Влияние различных этапов активации на задержку фотоответа. На обоих графиках пунктирная красная линия показывает наилучшую подгонку колбочкового фотоответа математической моделью (в соответствии с Рис. 17Б). После изменения в длительность тех или иных этапов каскада, все ответы нормировались к одной амплитуде. (а) Продолжительность цикла активации трансдуцина изменялась в два раза в обе стороны от оптимального значения. Это не привело к заметному изменению задержки. (б) Двукратное изменение времени активации PDE сильно изменяет задержку.

Таким образом, вопреки текущим представлениям, средняя продолжительность цикла активации трансдуцина не имеет существенного влияния на задержку фотоответа. Вместо этого основная задержка происходит после цикла, на этапе активации фосфодиэстеразы. Длительность задержки фотоответа как кинетический параметр позволяет дать оценку эффективности

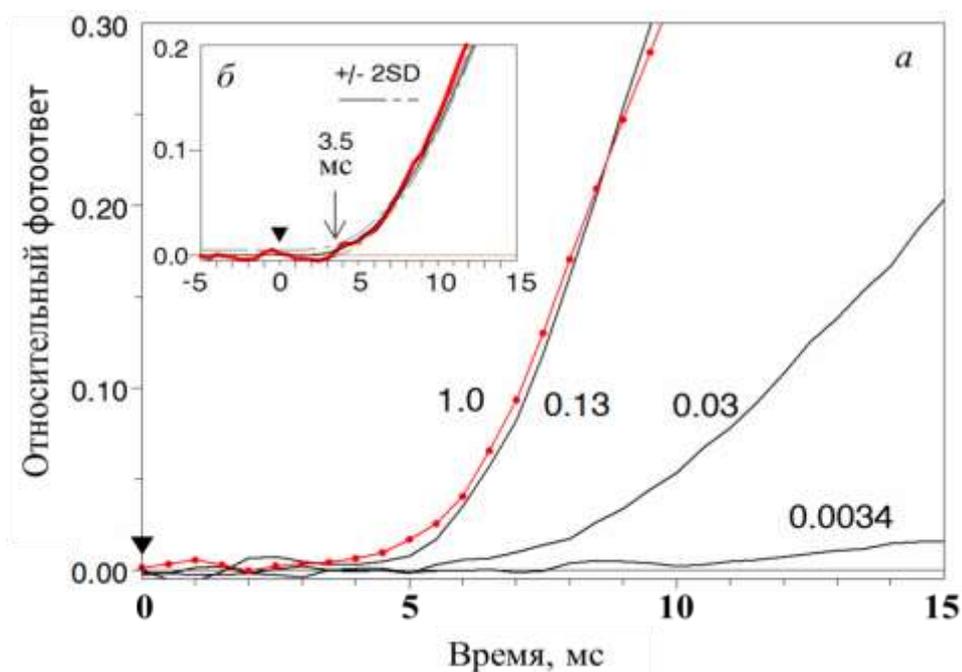
работы каскада фототрансдукции на этапе взаимодействия трансдуцина и фосфодиэстеразы. Следует также отметить, что более короткая задержка колбочек обеспечивается в свою очередь на порядок более быстрым этапом активации фосфодиэстеразы трансдуцином. Только задание времени взаимодействия ТаГТФ и фосфодиэстеразы меньшим или равным 5 мс позволяло получить удовлетворительную аппроксимацию ответа колбочки. Современные представления об активации каскада фототрансдукции в палочках и колбочках не в состоянии объяснить этот феномен – более подробно это будет обсуждаться в разделе 4.1.

### **3.3 Сравнительный анализ длительности задержки в различных фоторецепторах**

Поскольку реакции отдельных молекул подвержены стохастическим флуктуациям, каждый из временных параметров модели  $t_1...t_6$  меняется случайным образом (в соответствии с экспоненциальным распределением) среди событий активации каскада фототрансдукции. Моделирование ответа на множество фотонов, – одновременной реализации большого числа цепочек реакций фототрансдукции, – показывает, что на самом деле при активации каскада задержка, как таковая, отсутствует (Rotov et al., 2017). Ввиду стохастической природы процессов всегда существует отличная от нуля вероятность того, что первый активный трансдуцин Та $\beta$ ГТФ или фосфодиэстераза PDE\* появятся мгновенно (с точки зрения доступного экспериментатору временного разрешения) после поглощения фотона. При ответе на яркий стимул, т.е. при устремлении числа одновременных активаций молекул зрительного пигмента, эта вероятность возрастает. Таким образом, наблюдаемая в эксперименте «кажущаяся» задержка фотоответа определяется только возможностью обнаружить минимальное отклонение тока фоторецептора от его уровня до стимуляции.

Наблюдаемая задержка экспериментального ответа также зависит от интенсивности стимула, так как при этом изменяется крутизна переднего

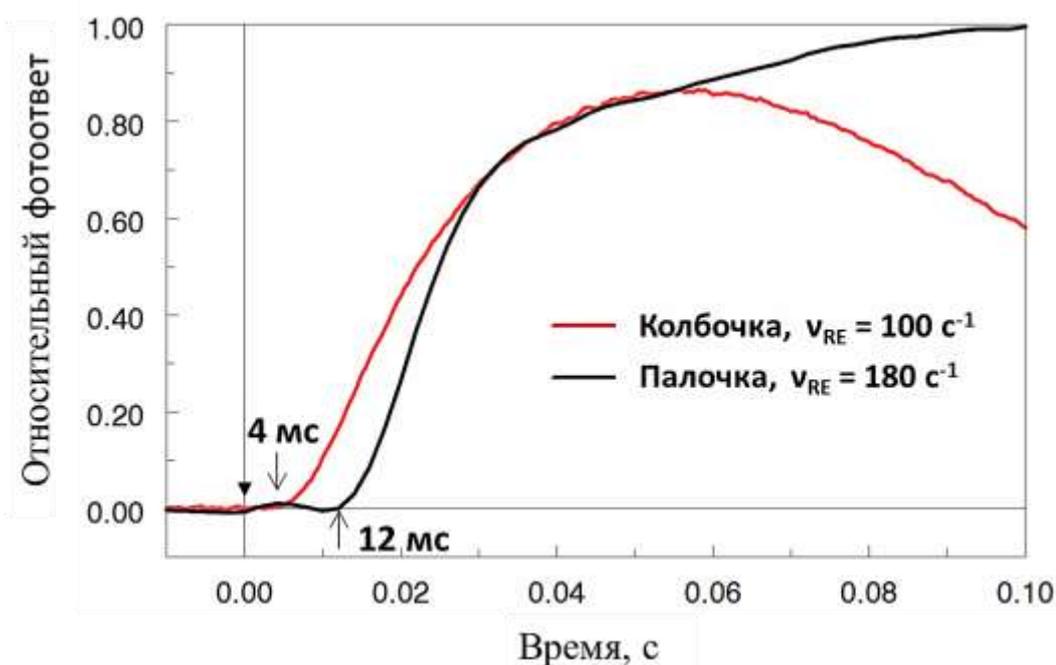
фронта фотоответа (Рис. 20А). Однако при достаточно высокой интенсивности крутизна фронта насыщается, а задержка достигает своего минимума (Cobbs, Pugh, 1987; Hestrin, Korenbrot, 1990), который можно считать характерным параметром для того или иного типа фоторецептора. Чтобы дать надежную оценку этой минимальной задержке, за начало фотоответа принималась первая точка экспериментальной записи после стимула, которая находится на уровне не ниже, чем 0.25 % от относительного фотоответа. Также накладывалось дополнительное условие, что эта точка находится за пределами интервала: среднее значение тока до стимула  $\pm$  удвоенное стандартное отклонение (см. Рис. 20Б). Помимо обеспечения фиксированной контрольной точки, такой способ оценки задержки также учитывает экспериментальный шум.



**Рис. 20.** Зависимость задержки от интенсивности стимула. (а) Ответы колбочек лягушки на стимулы разной интенсивности. Каждая линия представляет собой усреднение по 100 фотоответам. Числа вблизи линий показывают относительную интенсивность вспышки, интенсивность 1.0 соответствует  $252 \text{ R}^*/\text{мкм}^3$ . (б) Оценка длительности задержки фотоответа. Запись рецепторного потенциала колбочек лягушки, интенсивность стимула – относительное обесцвечивание на вспышку  $122 \text{ R}^*/\text{мкм}^3$ . Штриховые линии отмечают интервал: среднее значение тока до стимула  $\pm$  удвоенное

среднеквадратичное отклонение (SD). Треугольники обозначают момент вспышки (1 мс).

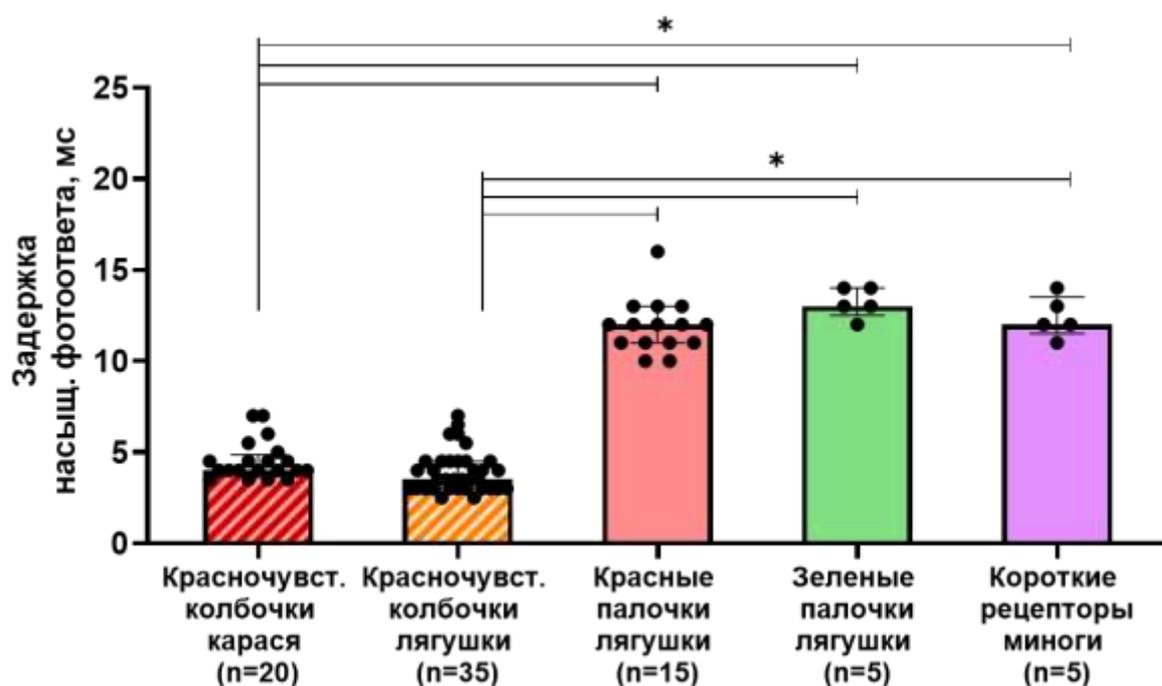
Анализ фотоответов красночувствительных колбочек лягушки и карася, а также типичных красных палочек лягушки показал, что минимальная задержка в колбочках существенно короче, чем в палочках (Рис. 21) и составляет 3-4 мс против 10-12 мс, соответственно. Этот результат противоречит утверждению о том, что процесс активации трансдуцина ответственен за возникновение задержки, однако хорошо согласуется с результатами моделирования начальной фазы фотоответа (раздел 3.2).



**Рис. 21.** Минимальная задержка фотоответов палочек и колбочек. Насыщенные ответы колбочки карася и палочки лягушки, зарегистрированные методом всасывающей микропипетки. Интенсивности стимулов: колбочка –  $252 \text{ R}^*/\text{мкм}^3$ , палочка –  $70 \text{ R}^*/\text{мкм}^3$  на вспышку. Указанные скорости активации фосфодиэстеразы ( $v_{RE}$ ) были получены с помощью математической модели фотоответа (по Astakhova et al., 2015). Момент вспышки отмечен треугольником (1 мс).

На Рис. 22 приведены результаты сравнительного анализа значений минимальной задержки ответа в палочках, колбочках, а также исследуемых

переходных фоторецепторах. Данные по красным и зеленым палочкам лягушки и рецепторам миноги получены методом всасывающей микропипетки, по колбочкам лягушки – методом регистрации рецепторного потенциала. Для колбочек карася данные, полученные обоими методами были объединены в общую выборку. Статистический анализ подтвердил, что длительность задержки в типичных красных палочках и колбочках достоверно различается ( $p < 0.001$  для колбочек как лягушки, так и карася, критерий Данна). Значения длительности задержки в колбочках лягушки и карася не имели статистически значимых различий ( $p > 0.999$ , критерий Данна). Задержка в зеленых палочках лягушки и коротких рецепторах миноги не отличалась от таковой в красных палочках ( $p > 0.999$ , критерий Данна) и варьировала в пределах от 10 до 15 мс. Таким образом, кинетика начальных стадий фотоответа, отвечающих за возникновение задержки в зеленых палочках амфибий и коротких рецепторах миноги соответствует палочковой.



**Рис. 22.** Сравнительный анализ значений минимальной задержки фотоответа в различных типах фоторецепторов. \* – достоверные различия по критерию Данна ( $p < 0.05$ ). Данные приведены как медиана  $\pm$  межквартильный интервал, n – число усредненных по многим фотоответам

экспериментальных записей, для которых вычислялась длительность задержки.

### 3.4 Сравнительный анализ чувствительности различных фоторецепторов

Ранее было показано, что зеленые палочки амфибий и короткие рецепторы миноги обладают примерно в 40-60 раз большей чувствительностью, чем типичные колбочки в сетчатке того же вида (Asteriti et al., 2015; Morshedian, Fain, 2015; Ma et al., 2001). С типичными палочками холоднокровных сравнивались только зеленые палочки жабы, однако полученные данные имели достаточно большой разброс, что позволило лишь дать оценку, что их чувствительность сопоставима с таковой у красных палочек (Matthews, 1983). В рамках данного исследования для оценки чувствительности были записаны наборы ответов фоторецепторов нескольких типов на короткие вспышки (зеленый светодиод, 525 нм) возрастающей яркости и построены зависимости амплитуды ответов от интенсивности стимула. Экспериментальные значения относительной амплитуды ответа аппроксимировали функцией Хилла (Рис. 23):

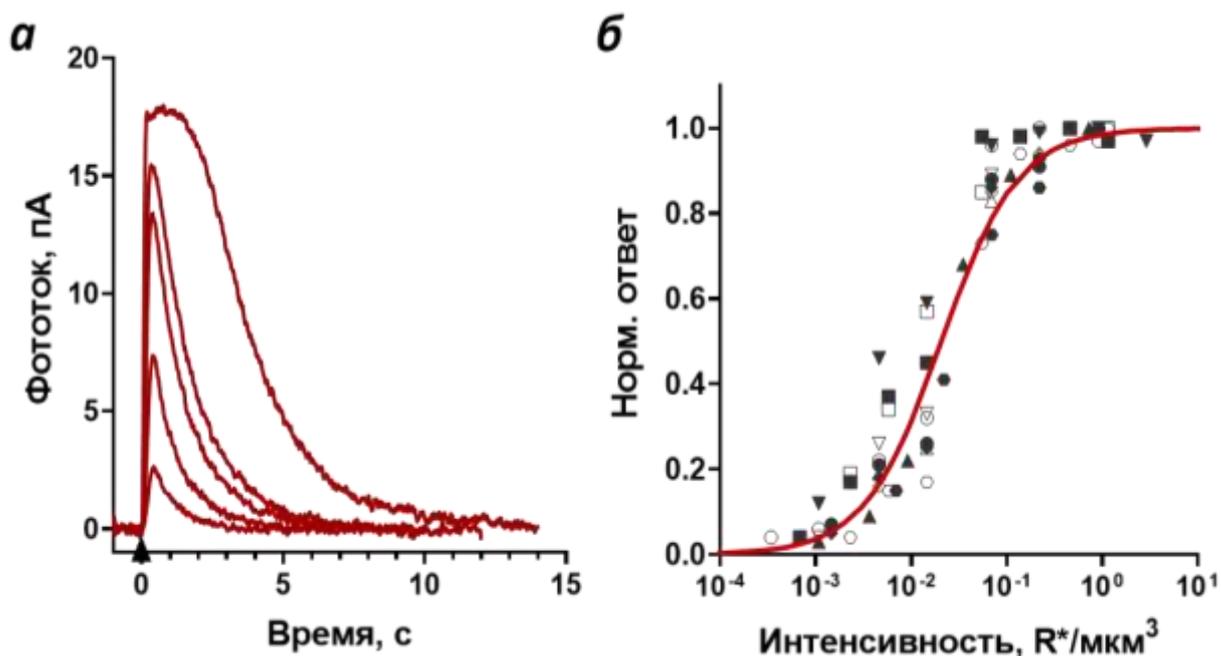
$$r = r_{\max} \cdot \frac{I^h}{I^h + I_{0.5}^h}$$

(21)

Здесь,  $r_{\max}$  – величина темнового тока/насыщенного ответа фоторецептора,  $I$  – интенсивность стимула,  $I_{0.5}$  – полунасыщающая интенсивность,  $h$  – коэффициент, регулирующий крутизну роста амплитуды вместе с интенсивностью стимула, для ответов на короткие (10 мс) вспышки света обычно близок к единице.  $I_{0.5}$  соответствует фотоответу с амплитудой в 50% от величины темнового тока, и сдвигу ее значений двумя типами палочек оценивали их различия в абсолютной чувствительности.

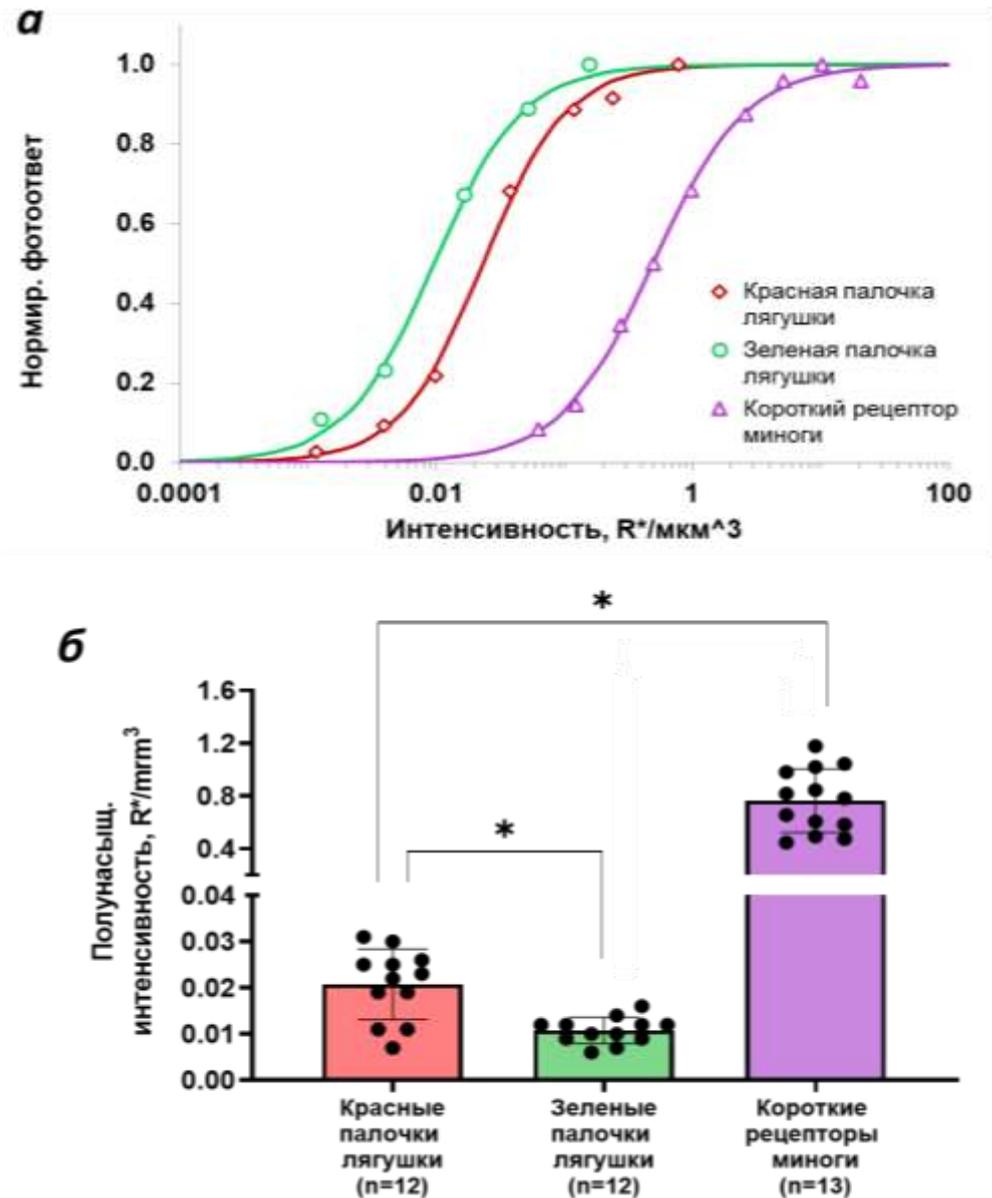
Расчет чувствительности показал, что зеленые палочки лягушки имеют в среднем в 2 раза большую абсолютную чувствительность, чем красные, а короткие рецепторы миноги напротив, более, чем на порядок менее

чувствительные, в сравнении с типичными палочками (Рис. 24). Статистический анализ подтвердил эти различия ( $p < 0.01$  для сравнения с красными палочками, критерий Даннетта). Следует отметить, что рецепторы миноги, однако, существенно превосходят по чувствительности типичные колбочки карася (Astakhova et al., 2015), а при пересчете чувствительности на целую клетку, ввиду малых размеров наружного сегмента, оказываются статистически неотличимы от красных палочек лягушки ( $p=0.166$ , критерий Даннетта, Рис. 25). Повышенная же чувствительность зеленых палочек при расчете на клетку оказывается еще более выраженной, поскольку объем их наружного сегмента примерно в два раза меньше, чем у красных палочек. Статистический анализ подтвердил эти различия ( $p < 0.001$  для отличий зеленых палочек от красных, критерий Даннетта).



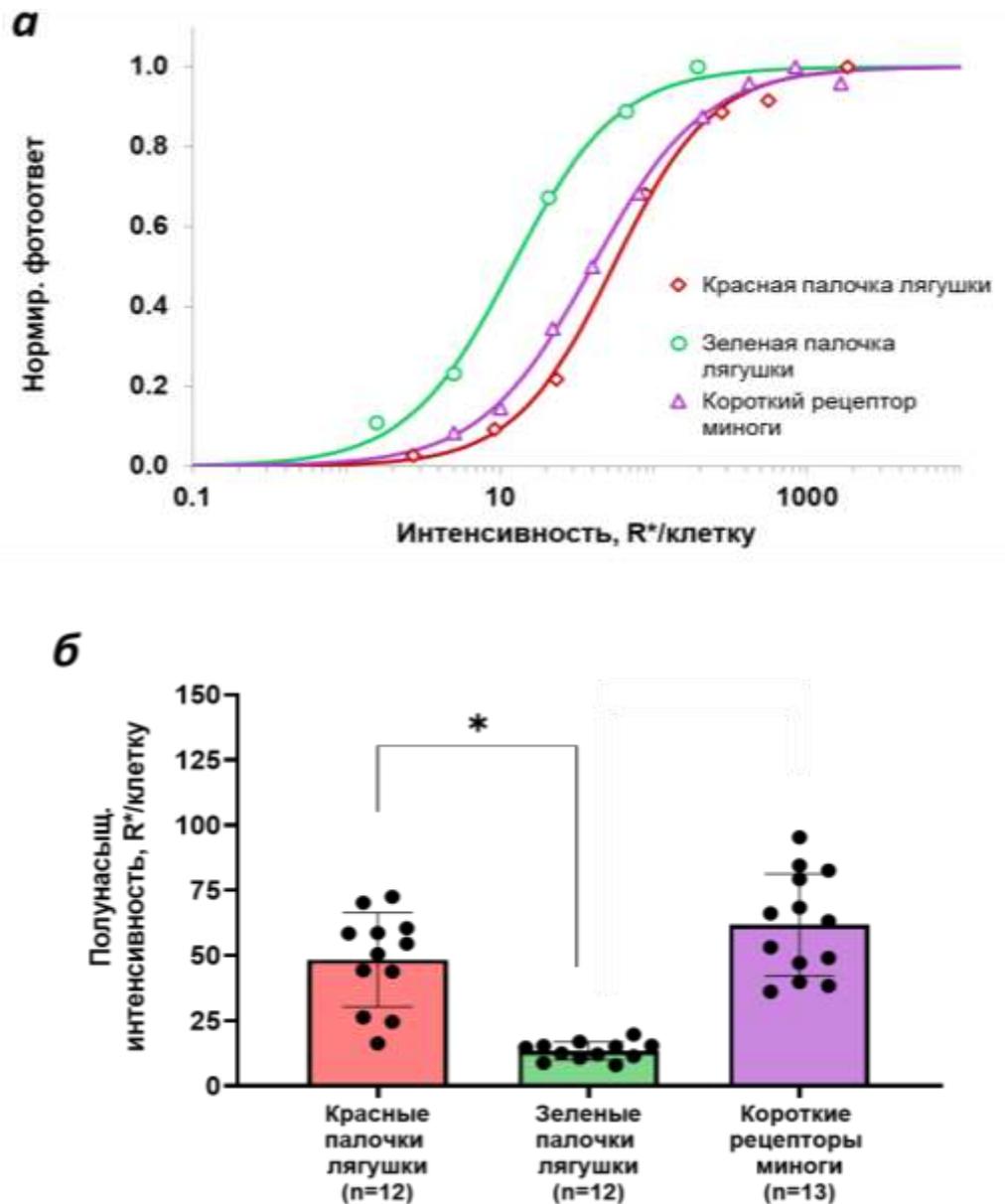
**Рис. 23.** Описание зависимости амплитуды фотоответа красных палочек лягушки от интенсивности светового стимула. (а) Пример набора ответов красной палочки на вспышки 525 нм различной интенсивности. Используемые интенсивности от самой низкой до самой высокой: 0.007, 0.022, 0.07, 0.22, 0.92  $R^*/\mu\text{м}^3$  на вспышку. Момент вспышки отмечен треугольником (10 мс). (б) Зависимость ответ-интенсивность, построенная на

основе данных с 12 красных палочек. Каждой клетке соответствует отдельный тип символа. Сплошная линия – аппроксимация всех экспериментальных точек функцией типа Хилла с параметрами  $h = 1.08$  и  $I_{0.5} = 0.018 R^*/\text{мкм}^3$  на вспышку.



**Рис. 24.** Оценка чувствительности различных фоторецепторов в пересчете на единицу объема клетки. (а) Зависимости ответ-интенсивность для трех типов рецепторов. Точки – данные по репрезентативным клеткам, сплошные линии – их аппроксимация с помощью функции Хилла. Значения  $I_{0.5}$  равны, соответственно ( $R^*/\text{мкм}^3$  на вспышку): красная палочка – 0.023, зеленая

палочка – 0.010, короткий рецептор миноги – 0.492. (б) Сравнительный анализ чувствительности различных фоторецепторов. \* – достоверные отличия от красных палочек по критерию Даннета ( $p < 0.01$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение,  $n$  – число клеток, для которых вычислялась зависимость ответ-интенсивность с помощью функции Хилла.



**Рис. 25.** Оценка чувствительности различных фоторецепторов в пересчете на целую клетку. (а) Зависимости ответ-интенсивность для трех типов рецепторов. Точки – данные по репрезентативным клеткам, сплошные линии – их аппроксимация с помощью функции Хилла. Значения  $I_{0.5}$  равны,

соответственно ( $R^*/\text{клетку на вспышку}$ ): красная палочка – 53.8, зеленая палочка – 12.4, короткий рецептор миноги – 39.9. (б) Сравнительный анализ чувствительности различных фоторецепторов. \* – достоверные отличия от красных палочек по критерию Даннета ( $p < 0.001$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение,  $n$  – число клеток, для которых вычислялась зависимость ответ-интенсивность с помощью функции Хилла.

### **3.5 Кинетика ответов различных фоторецепторов на этапах включения и выключения каскада фототрансдукции**

Для того, чтобы определить, какие этапы каскада фототрансдукции – процессы активации или инактивации, – определяют обнаруженную разницу в чувствительности, был проведен сравнительный анализ кинетики фотоответа различных фоторецепторов. Следует отметить, что использованная оценка кинетики включения путем расчета домножающего коэффициента для совмещения восходящего фронта с эталоном (Рис. 26А, Б, см. раздел 2.2.3) дает значение лишь некоего условного параметра, пригодного для сравнительного анализа различных фоторецепторов, но не описывающего конкретные физиологические и биохимические процессы, происходящие в клетке.

Ранее считалось, что достаточно надежную оценку величине коэффициента усиления в каскаде позволяет дать описание начальной фазы фотоответа квадратичной параболой (Pugh, Lamb, 1993, 2000), поскольку на этом этапе процессами инактивации можно пренебречь. Однако в дальнейшем было показано, что процессы включения и выключения каскада накладываются друг на друга во времени начиная с самых первых этапов развития фотоответа. В результате, расчет коэффициента усиления даже по начальному участку длительностью 100-200 мс ведет к его недооценке примерно в 4 раза у колбочек, и в 1.6 раза у палочек (Astakhova et al., 2015). Расчет шкалирующего коэффициента также не учитывает механизмы выключения, однако пригоден для сравнительного анализа фоторецепторов, относящихся к одной функциональной группе и, как следствие, не имеющих значительных (на порядок и более) различий в кинетике фотоответа. Другим фактором,

влияющим на крутизну восходящей фазы фотоответа является электрическая фильтрация ответа, регистрируемого микропипеткой, возникающая за счет собственной емкости и сопротивления клеточной мембраны. Однако, для палочкоподобных рецепторов с медленной кинетикой ответа этот эффект, вероятно, незначителен, поскольку электрическая постоянная времени мембраны, существенно короче анализируемого временного интервала (Cobbs, Pugh, 1987).

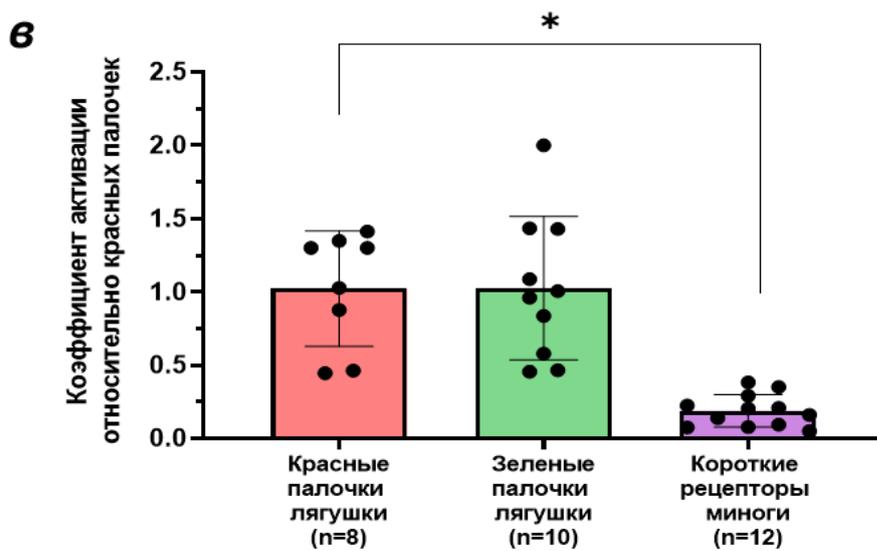
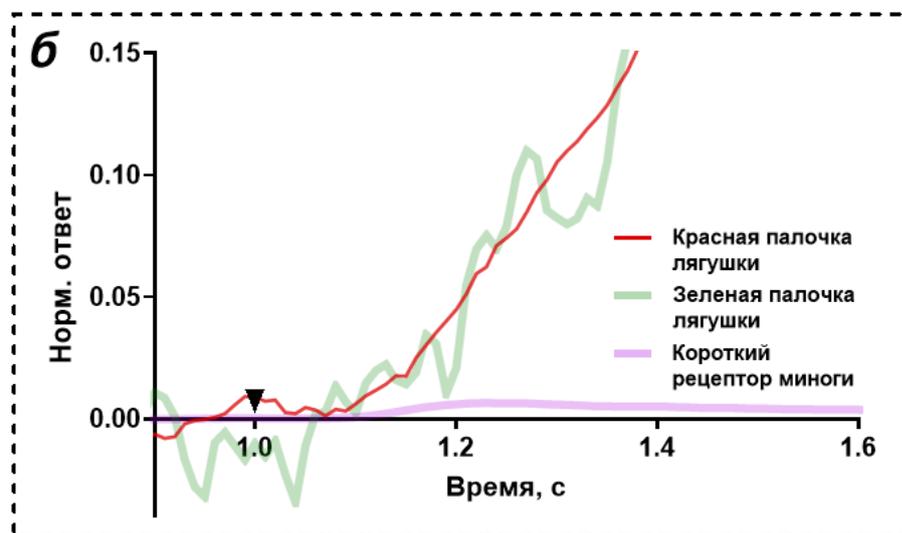
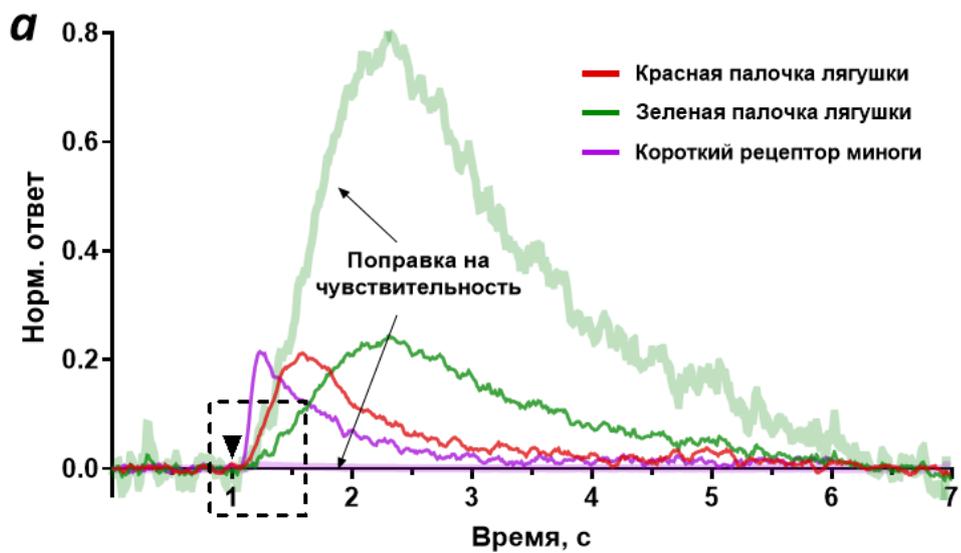


Рис. 26. Оценка усиления в каскаде фототрансдукции в различных типах

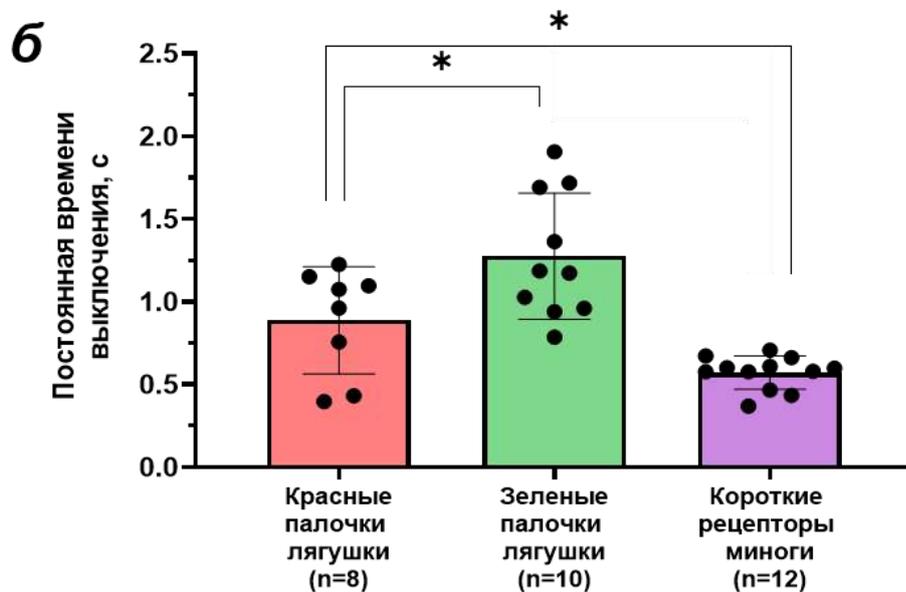
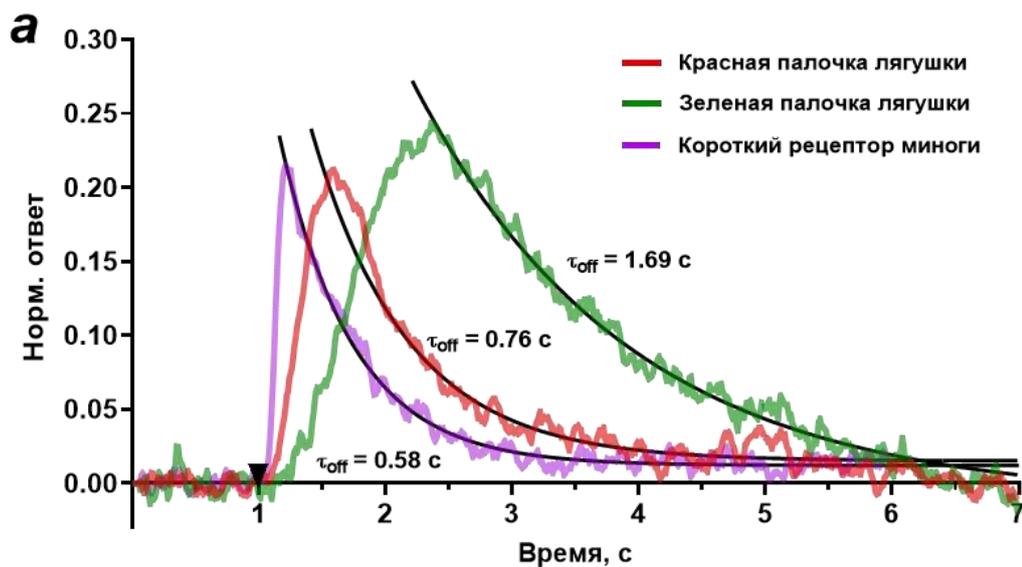
фоторецепторов. (а) Примеры нормированных ответов трех типов рецепторов, а также ответы зеленой палочки и короткого рецептора миноги, скорректированный на сдвиг в абсолютной чувствительности ними и красными палочками. (б) Участок фотоответов, используемый для сравнительной оценки усиления. Для этого скорректированные восходящие фронты подгонялись к эталону (красным палочкам) путем домножения на числовой коэффициент. Момент вспышки отмечен треугольником (10 мс). (в) Сравнение эффективности процессов активации фототрансдукции для трех типов рецепторов. \* – достоверные различия по критерию Тьюки ( $p < 0.001$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты.

Поскольку крутизна начальной части пропорциональна интенсивности вспышки в ненасыщающем диапазоне была проведена корректировка фотоответов, путем приведения их к одной и той же интенсивности стимула (в  $R^*/\text{мкм}^3$ ). В качестве контрольной записи (эталон) использовалось усредненный по нескольким клеткам фотоответ красных палочек лягушки. Далее ответ каждой отдельной клетки (для всех трех типов фоторецепторов) подгонялся к эталону. Полученные значения поправочных коэффициентов отражают соотношение скоростей активации в исследуемых рецепторах относительно красных палочек лягушки. Для наглядности, далее используются обратные величины по отношению к этим коэффициентам, чтобы у клеток с большей крутизной фронта числовая оценка оказалась больше единицы, и наоборот.

Оказалось, что при пересчете на одинаковую абсолютную чувствительность (поправка к сдвигу, рассчитанному в разделе 3.4), передние фронты ответов зеленых и красных палочек практически совпадают, в то время, как фронт скорректированного ответа короткого рецептора миноги оказывается значительно более пологим. Статистический анализ для сравнительного коэффициента усиления в каскаде показал, что эта величина статистически не различается между красными и зелеными палочками лягушки ( $p > 0.999$ ,

критерий Тьюки), в то время как у клеток миноги усиление оказывается примерно в 5 раз ниже ( $p < 0.001$ , критерий Тьюки, см. Рис. 26B). Следует отметить, что разница в чувствительности между рецепторами миноги и типичными палочками примерно равна отношению в объеме их наружных сегментов и, при пересчете на клетку, оказывается, что восходящая фаза фотоответа клеток миноги имеет более крутой наклон, чем у палочек лягушки. Таким образом, несмотря на то, что абсолютное усиление в каскаде фототрансдукции рецепторов миноги ниже, чем в специализированных палочках, ввиду малого объема наружного сегмента, он демонстрирует более высокую эффективность в ответ на единичные фотоизомеризации зрительного пигмента в клетке.

Выключение каскада также представляет собой многоступенчатый процесс, включающий отдельные механизмы снижения активности зрительного пигмента, трансдуцина и фосфодиэстеразы, регулируемые кальциевой обратной связью (см. раздел 1.3.2). Экспоненциальное описание нисходящего фронта фотоответа (Рис. 27А) позволяет оценить кинетику только лимитирующих стадий выключения, в то время как вклад других этапов останется вне рассмотрения. Учет комплексного характера выключения каскада, а также решение упомянутой выше проблемы искажения восходящего фронта из-за наложения выключающих механизмов возможен только с помощью подробной математической модели фотоответа. Однако построение такой модели требует знания ряда параметров клетки, величины которых можно получить только экспериментально. Подобные эксперименты часто сопряжены с помещением клетки в стрессовые условия (например, метод фиксации уровня кальция, см. Lyubarsky et al., 1996; Astakhova et al., 2015), и лишь наиболее устойчивые фоторецепторы способны переносить такой протокол. Поэтому в настоящее время подробные модели возможно составить лишь для ограниченного круга фоторецепторов (палочки мыши, лягушки и амбистомы, колбочки рыб), в который зеленые палочки и рецепторы миноги фоторецепторы не входят.

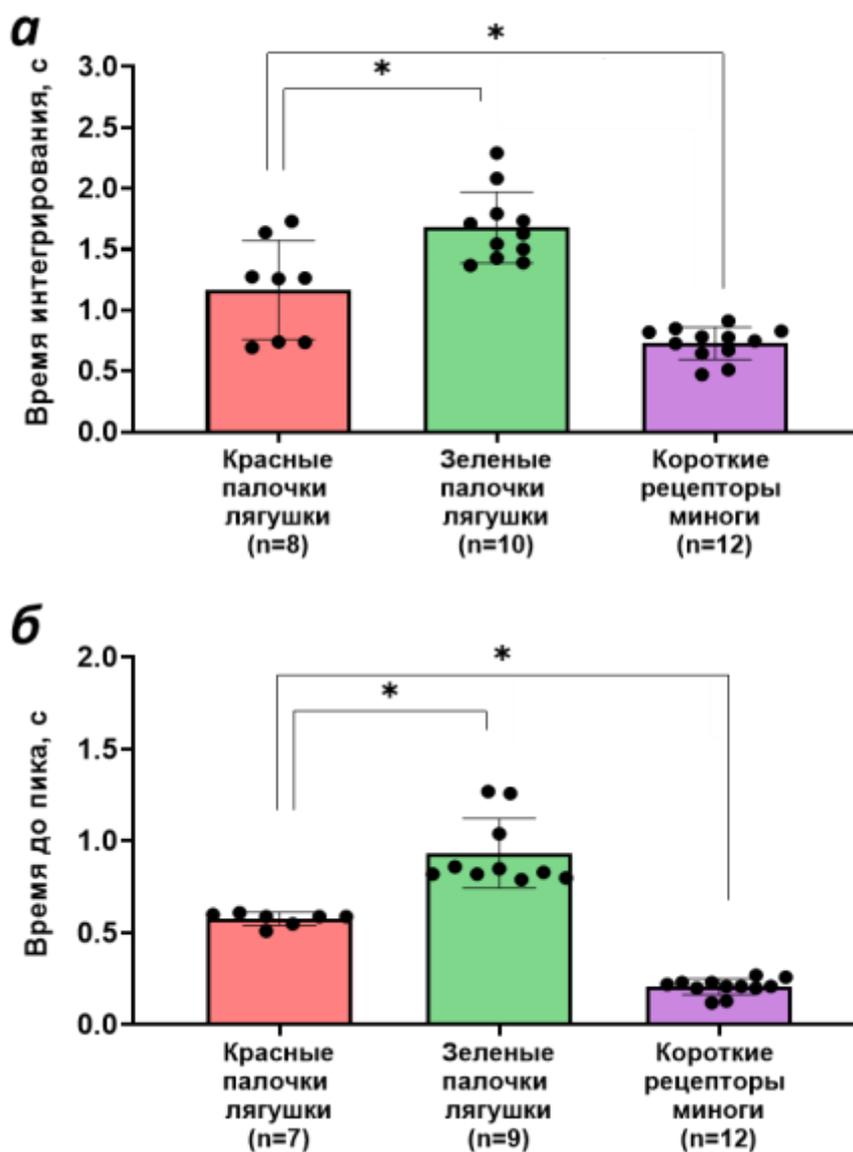


**Рис. 27.** Оценка скорости инактивации в каскаде фототрансдукции в различных типах фоторецепторов. (а) Аппроксимация нисходящих фронтов нормированных фотоответов одноэкспоненциальными функциями с различными постоянными времени. Момент вспышки отмечен треугольником (10 мс). (б) Сравнение значений постоянных времени нисходящей фазы выключения фотоответа для трех типов рецепторов. \* – достоверные различия по критерию Тьюки ( $p < 0.001$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение,  $n$  – число клеток, для которых производились расчеты.

Статистический анализ кинетики выключения фотоответов показал, что у зеленых палочек выключение в среднем происходит медленнее, чем у красных палочек (постоянные времени составили  $1.3 \pm 0.4$  и  $0.9 \pm 0.3$ , соответственно,  $p < 0.05$ , критерий Тьюки, Рис. 27). Выключение каскада в коротких фоторецепторах миноги, напротив, оказалось быстрее, чем у красных палочек (постоянная времени  $0.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ , критерий Тьюки). За счет разницы в кинетике выключения зеленые палочки обладают увеличенным временем интегрирования фотоответа, а рецепторы миноги, напротив – уменьшенным за счет ускорения процессов деактивации каскада.

Также был проведен анализ дополнительных временных параметров, характеризующих кинетику фотоответа: времени до пика фотоответа и его времени интегрирования (Рис. 27). Последнее определяется как интеграл по времени для малого ответа, нормированного по амплитуде на единицу. В соответствии с различиями в кинетике выключения, время интегрирования и время до пика у зеленых палочек лягушки оказалось больше, чем у красных. У коротких рецепторов миноги оба параметра в свою очередь, оказались ниже, чем у типичных палочек, что связано с более быстрым выключением в каскаде фототрансдукции.

Сопоставление спектральных и электрофизиологических данных позволяет сделать вывод о том, что зеленые палочки амфибий обладают более высокой чувствительностью, чем красные палочки соответствующего вида. При этом усиление в каскаде фототрансдукции у двух типов рецепторов не различается, а разница в чувствительности связана с более медленной кинетикой выключения зеленых палочек. Короткие рецепторы миноги имеют низкую абсолютную чувствительность по сравнению с типичными палочками холоднокровных, что связано с пониженным усилением в каскаде и его ускоренным выключением. У типичных колбочек рыб коэффициент усиления в среднем также ниже, чем у палочек (Astakhova et al., 2015), и известные для них значения (относительно красных палочек лягушки) близки к таковым для фоторецепторов миноги.

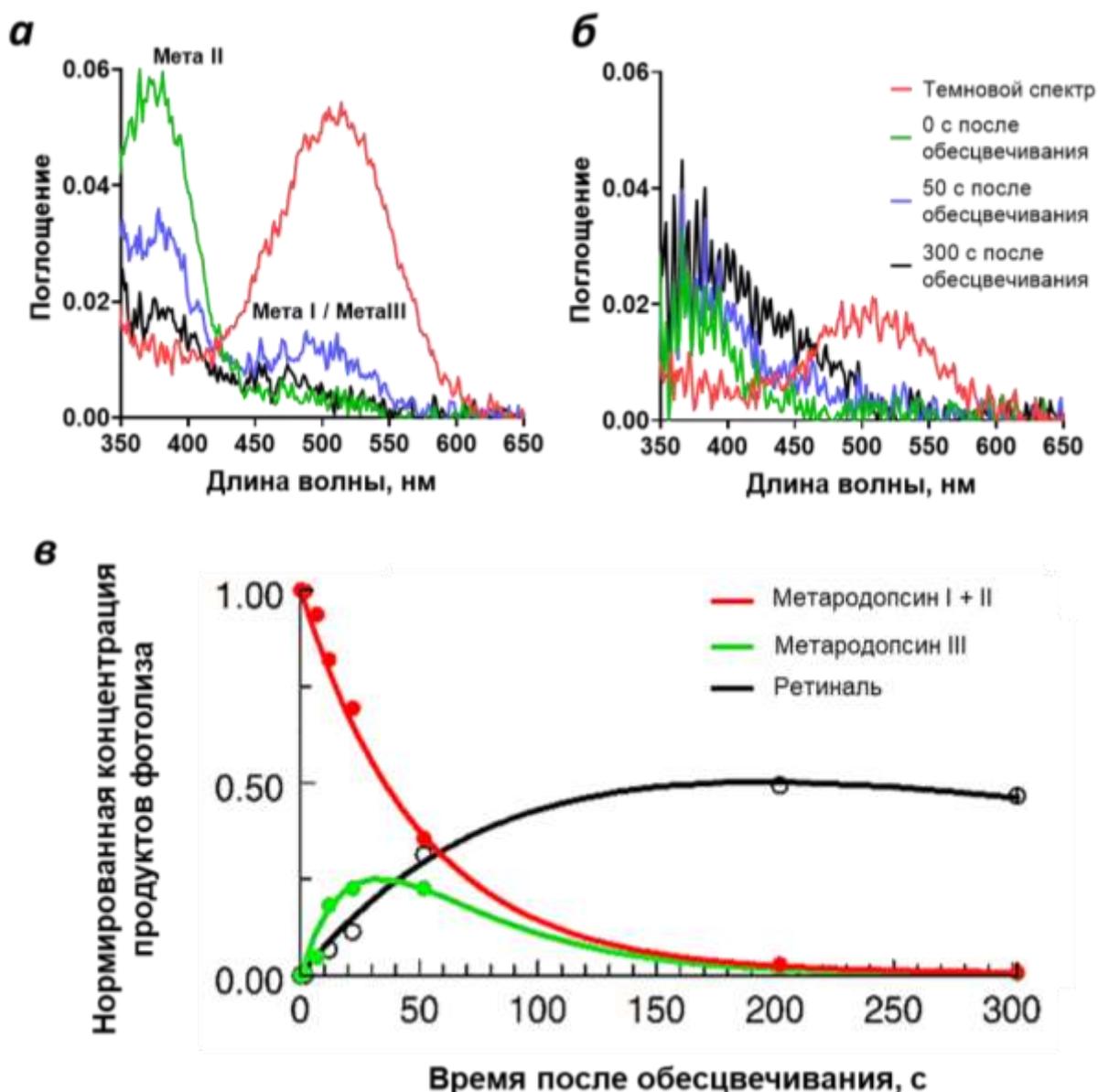


**Рис. 28.** Временные параметры, характеризующие кинетику полунасыщенных фотоответов различных фоторецепторов. (а) Сравнение значений времени интегрирования для 3 типов рецепторов. (б) Сравнение значений времени до пика ответа для 3 типов рецепторов. \* – достоверные различия по критерию Тьюки ( $p < 0.01$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение,  $n$  – число клеток, для которых производились расчеты.

### 3.6 Кинетика фотолиза зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками

Фотолиз зрительных пигментов многих типов фоторецепторов уже был ранее исследован с применением микроспектрофотометрии на интактных клетках (Kolesnikov et al., 2003, 2007; Golobokova, Govardovskii, 2006; Estevez et al., 2009). Итогом многолетних исследований стало установление того факта, что пигменты типичных палочек и колбочек четко разделяются на две группы, различающиеся скоростью распада метaproдуктов после обесцвечивания примерно на 2 порядка. Повышенная скорость распада пигмента в колбочках, предположительно помогает им избегать насыщения при высоких уровнях освещенности. В данной работе был проанализирован фотолиз короткого рецептора миноги и сопоставлен с уже известными данными о типично палочковых и колбочковых пигментах. Единственным исключением в этом разделении является пигмент трансмутированных рецепторов ночного геккона (*Gekko gekko*), фотолиз которого протекает с промежуточной скоростью между типично палочковыми и колбочковыми значениями (Kolesnikov et al., 2007). По всей видимости, замедление скорости фотолиза стало неизбежным следствием размена «открытой» конфигурации сайта связывания хромофора на высокую стабильность пигмента, необходимую для рецепторов ночного зрения.

Сразу после вспышки в спектре фотопродуктов коротких рецепторов миноги наблюдался основной пик на 380 нм и дополнительный на 475 нм, соответствующие образованию метародопсинов I и II (Мета I и II, Рис. 29А, Б). Затем смесь Мета I /Мета II распадается и частично превращается в Мета III (пик около 475 нм через 50 с после обесцвечивания), одновременно продолжая высвобождать полностью транс-ретиаль. Как было показано на палочках быка и лягушки, продукты позднего фотолиза представляют собой смесь транс-ретиаля, вероятно, растворенного в мембране, и его протонированных и непротонированных оснований Шиффа, образованных различными аминокруппами (Hoffman, 2000; Kolesnikov et al., 2003). Дальнейшее потенциальное восстановление ретиальсодержащих продуктов до ретинола не удалось надежно отследить из-за низкого отношения сигнал/шум для спектров относительно небольших фоторецепторов миноги.



**Рис. 29.** Образование и распад продуктов фотолиза в коротких рецепторах миноги. Спектры при T- и L-поляризации (панели (а) и (б), соответственно) были записаны в разное время после обесцвечивающей вспышки (525 нм, 1 с). Спектры усреднены по 10 различным клеткам для улучшения соотношения сигнал/шум. Записи в некоторые моменты времени опущены, чтобы не загромождать рисунок. (в) Зависимость концентрации продуктов фотолиза от времени. Концентрации нормированы по исходной концентрации темнового зрительного пигмента. МI, МII и МIII – метародопсины I, II и III; RAL – смесь транс-ретинол-содержащих продуктов.

Поскольку распад метaproдуктов фотолиза на опсин и ретиналь необратим (Kolesnikov et al., 2003), становится возможным составить кинетическую схему, определяющую кинетику этого процесса. Ход образования метародопсинов I, II ( $M$ ) и метародопсина III ( $MIII$ ) можно определить из решения системы дифференциальных уравнений:

$$\frac{d[M(t)]}{dt} = -(k_1 + k_3) \cdot [M(t)] + k_2 \cdot [MIII(t)]$$

(22)

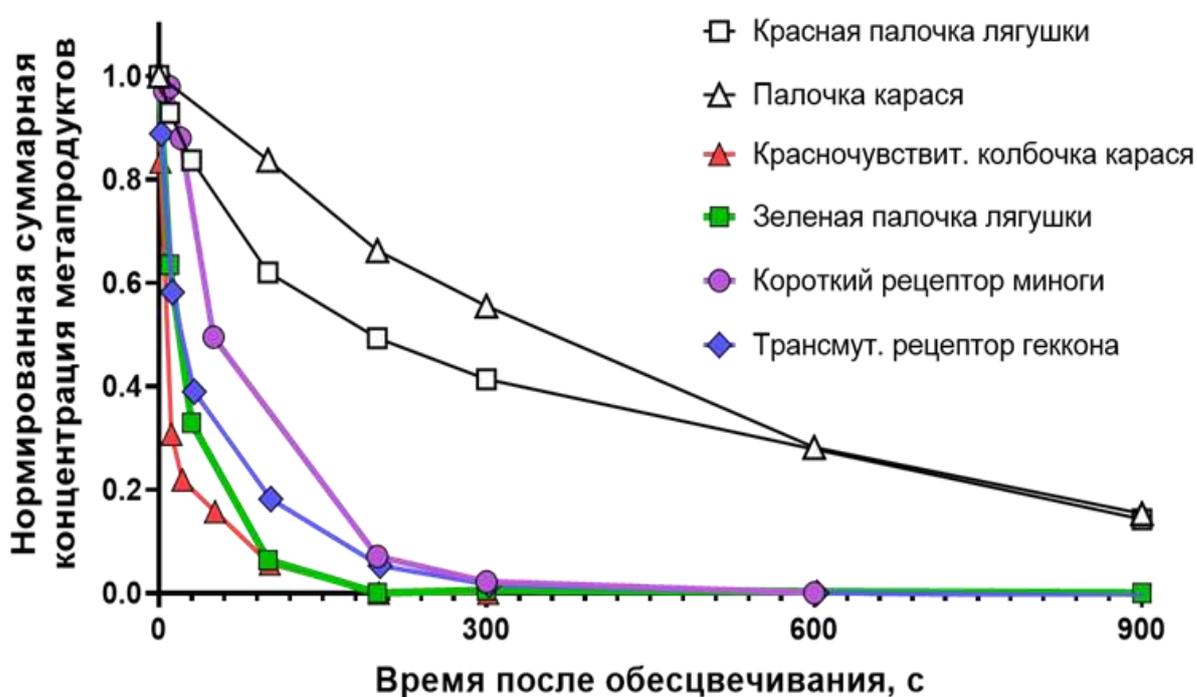
$$\frac{d[MIII(t)]}{dt} = k_1 \cdot [M(t)] - (k_2 + k_4) \cdot [MIII(t)]$$

(23)

Здесь,  $k$  – константы скорости реакций:  $k_1$  – образование  $MIII$  из  $M$ ,  $k_2$  – обратная реакция;  $k_3, k_4$  – распад на опсин и ретиналь  $M$  и  $MIII$ , соответственно. Решение этой системы с учетом начальных условий ( $M(0) = 1, MIII(0) = 0$ ) дает зависимость для временного хода концентрации метародопсинов I, II как суммы, а метародопсина III как разности двух экспонент с отрицательным показателем степени и различными постоянными времени. Скорость образования ретиналь-содержащих продуктов, очевидно, будет определяться суммой  $M$  и  $MIII$  с коэффициентами  $k_3, k_4$ . На Рис. 29В показаны наилучшие аппроксимации этими функциями экспериментальных значений концентрации различных продуктов фотолиза в коротких рецепторах миноги после обесцвечивающей засветки.

Сумма метaproдуктов (метародопсины I, II, III) в коротких рецепторах миноги разлагаются со временем полураспада 53 с, что примерно в 5 раз быстрее, чем в типичных палочках карая и травяной лягушки. С другой стороны, у колбочек карая и амбистомы оно составляет около 5 с (Рис. 30). Таким образом, пигмент коротких рецепторов миноги занимает промежуточное положение по скорости фотолиза между типичными пигментами палочек и колбочек. В этом отношении он оказывается аналогичен колбочковому опсину

геккона, экспрессирующемся в трансмутированном палочкоподобном рецепторе (Kolesnikov et al., 2007). Также следует отметить, что некоторыми авторами на основе молекулярного филогенетического анализа пигмент коротких рецепторов круглоротых выделяется в самостоятельную группу, отделившуюся от пигментов палочек и колбочек (Collin et al., 2003b; Lamb, 2013). Принимая это во внимание, промежуточную скорость фотолиза можно трактовать не как признак трансмутации, а как сохранившуюся в параллельной эволюционной линии архаичную черту предкового неспециализированного фоторецептора.



**Рис. 30.** Динамика распада суммы метапродуктов (Мета I + II + III) в коротких рецепторах миноги в сравнении с другими типами фоторецепторов. Приведены данные других авторов по фотолизу пигмента красночувствительных колбочек карася (Golobokova and Govardovskii, 2006), красных (Kolesnikov et al., 2003) и зеленых (Голобокова с соавт., 2003) палочек травяной лягушки, трансмутированных фоторецепторов геккона (Kolesnikov et al., 2007)

Ранее в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН было показано, что фотолиз зрительного пигмента зеленых палочек травяной лягушки (*Rana temporaria*) протекает с той же скоростью, что и у типично колбочковых пигментов (Golobokova and Govardovskii, 2006; Голобокова с соавт., 2003). Проведенные дополнительные эксперименты подтвердили, что в клетках озерной лягушки наблюдается аналогичная картина. Таким образом, согласно гипотезе о степени открытости сайта связывания хромофора, от пигмента зеленых палочек следует ожидать высокой частоты спонтанных тепловых изомеризаций, что не соответствует его наблюдаемой сверхвысокой чувствительности (см. раздел 3.4).

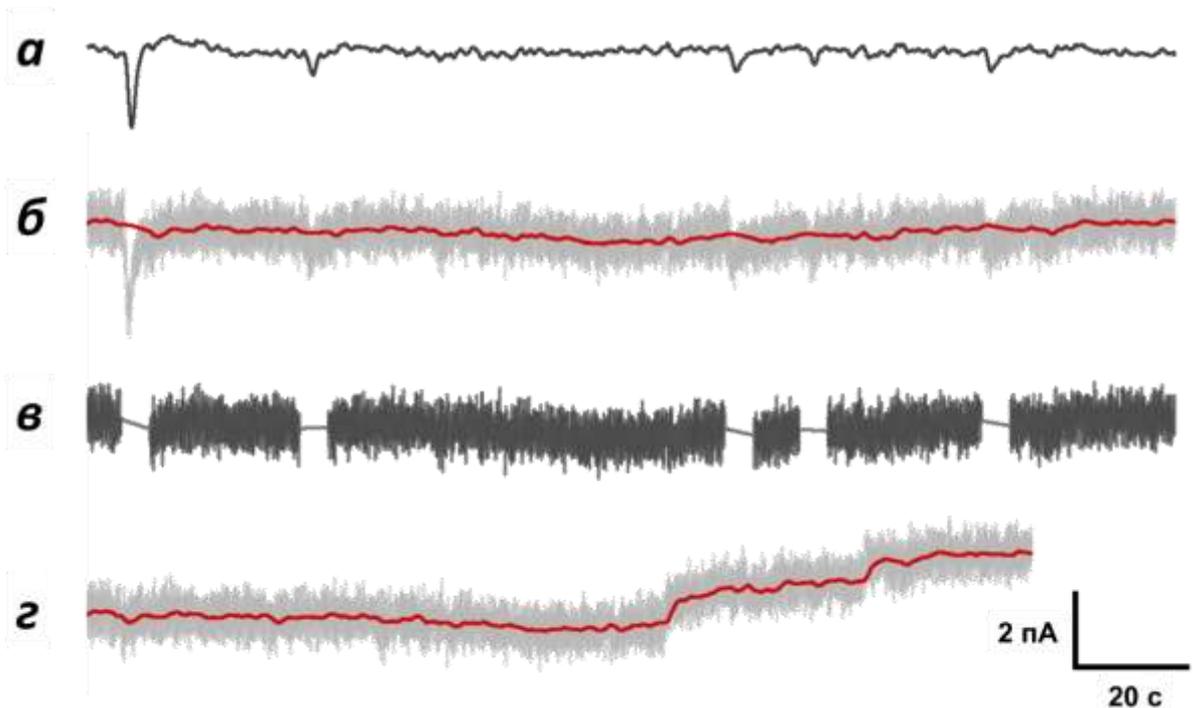
### **3.7 Стабильность зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками**

Другой характеристикой зрительного пигмента, принципиально важной для рецепторов ночного зрения, является его способность к спонтанным тепловым изомеризациям. Согласно современным представлениям, внутренние тепловые флуктуации в молекуле зрительного пигмента приводят к ее активации и генерации волн тока – дискретного темнового шума (Baylor et al., 1980; Barlow et al., 1993). Эти темновые события составляют неустранимый источник шума клетки, поскольку их невозможно отличить от реальных одноквантовых ответов (ОКО).

В экспериментах *in vitro* на пигментах, экспрессированных в клетках линии НЕК293 было показано, что синечувствительный колбочковый пигмент зеленых палочек бесхвостых амфибий должен быть более стабилен, чем аналогичный пигмент, экспрессирующийся в колбочках других позвоночных (Kojima et al., 2017). Несмотря на то, что соответствие данных экспериментов *in vitro* процессам в живых фоторецепторных клетках не до конца ясно, можно ожидать, что частота дискретных темновых событий у зеленых палочек при регистрации клеточного тока, должна быть сопоставима с таковой для частотой событий в красных палочках. Попытки провести такие измерения уже

предпринимались ранее, однако оценки в двух независимых исследованиях различаются в 400 раз (Matthews, 1984; Luo et al., 2011). В рамках данной работы также была проведена оценка стабильности пигмента зеленых палочек, чтобы разрешить возникшее противоречие.

Обработка экспериментальных записей темнового тока проводилась в соответствии с процедурой, описанной ранее (Astakhova et al., 2017, см. Рис. 31). Из исходной записи темнового тока (запись (б)) вырезаются дискретные события, аналогичные ОКО. Для упрощения распознавания таких событий запись фильтруется в полосе 0.02 – 0.5 Гц (запись (а)). Запись (а) нужна только для визуализации дискретных событий и в дальнейшем для анализа не используется.



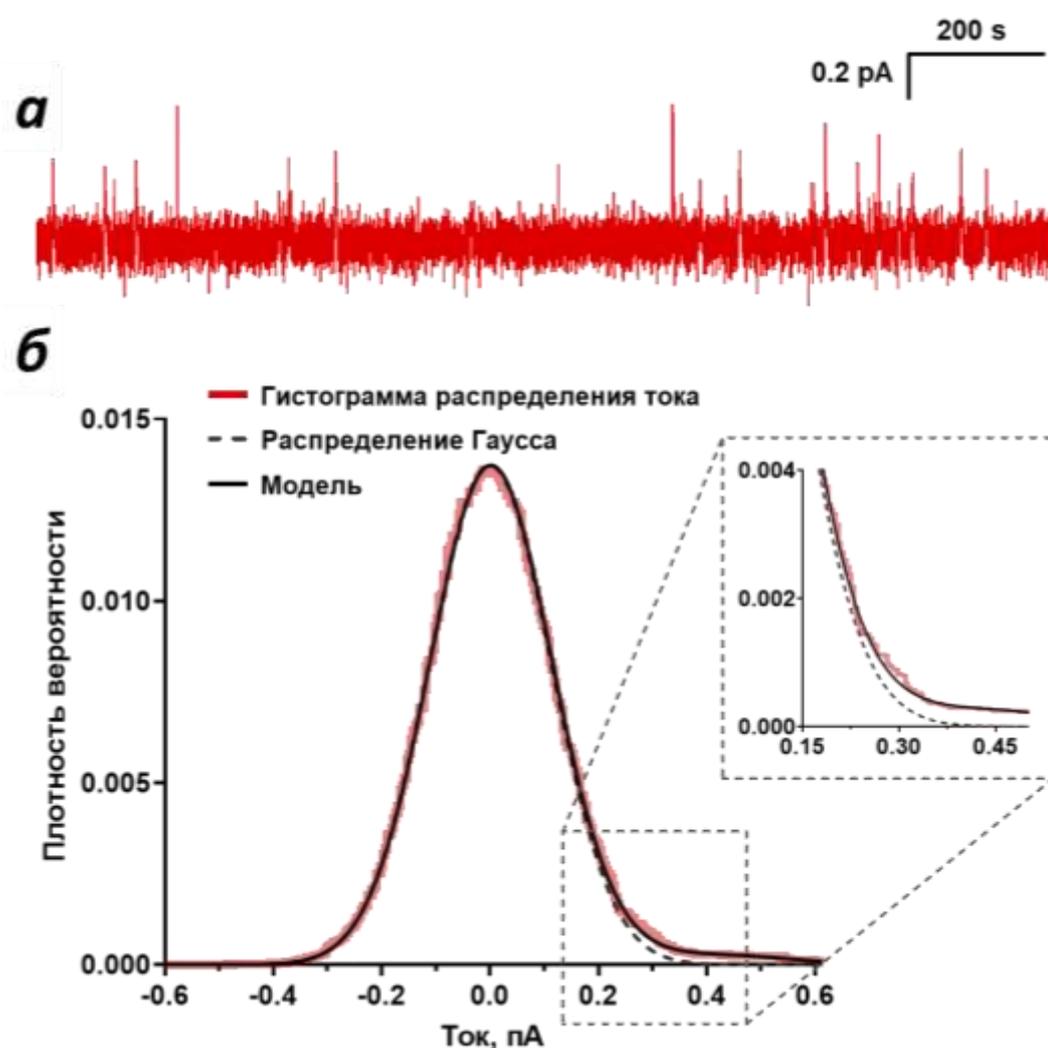
**Рис. 31.** Коррекция низкочастотного дрейфа записей темнового тока фоторецепторов. Запись (а) составляется из записи (б) путем фильтрации в полосе частот 0.02 – 0.5 Гц для лучшей визуализации дискретных событий. Запись (б) – исходная запись, содержащая как дискретные события, так и непрерывный шум. Красная линия на (б) сделана из записи (в) путем фильтрации в полосе частот 0 – 0.2 Гц и вычитается, чтобы исключить медленные колебания базовой линии. Запись (г) – составлена из записи (б)

путем вырезания идентифицированных дискретных событий и замены их линейными отрезками. Запись (г) и соответствующая ей красная линия составлены из записи (б) и ее фильтрации в полосе частот 0 – 0.2 Гц путем соединения встык краев после вырезания дискретных событий.

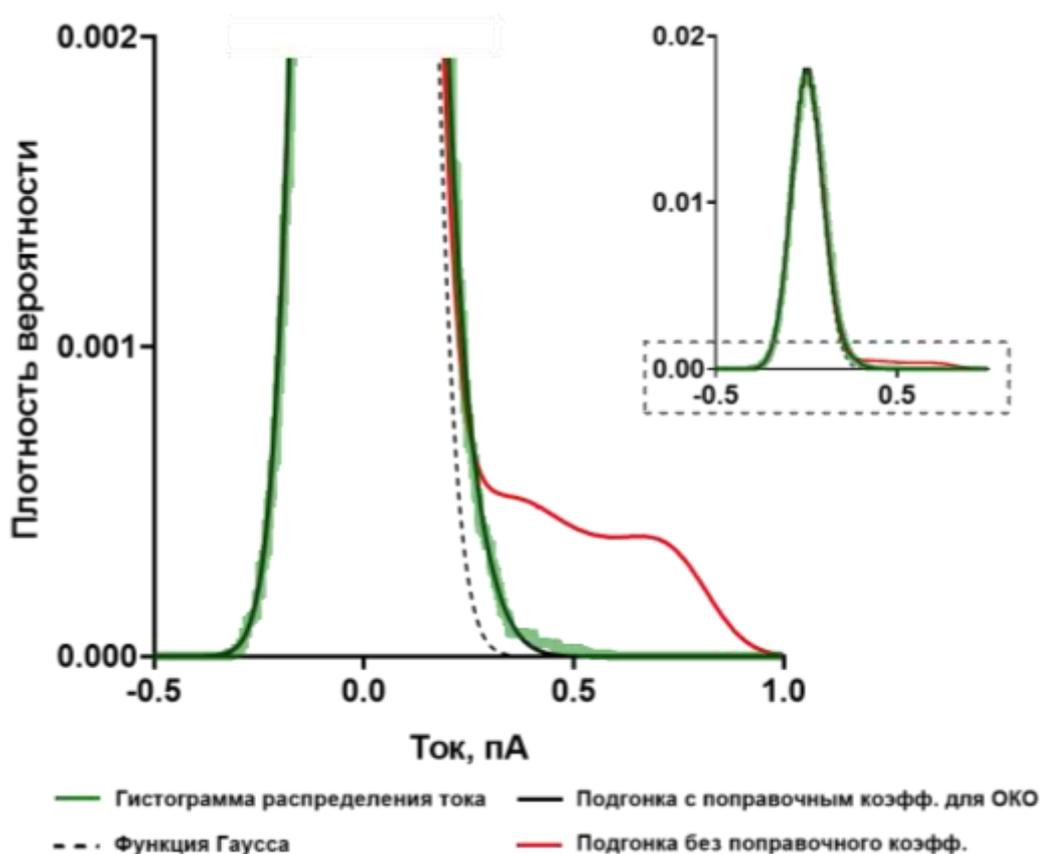
Запись (в) формируется из (б) при вырезании дискретных событий и их замены линейным отрезком, положение крайних точек которого определяется средним значением текущего шума справа и слева от области выреза. Запись (г) формируется аналогично (в), но темновые события после вырезания в ней не заменяются линейным отрезком, а соединяются встык. Далее, запись (в), равная по длине исходной записи (б), фильтруется фильтром Бесселя 2-го порядка в полосе 0 – 0.2 Гц. Результатом является низкочастотная базовая линия, которая вычитается из записи (б) (красная линия на Рис. 31В). Эта операция устраняет низкочастотный дрейф записи темнового тока без смещения нулевой позиции записи. Затем исходная запись (б) после вычитания низкочастотного дрейфа подвергалась низкочастотной фильтрации 3 Гц и использовалась для построения гистограммы шума темнового тока.

Запись (г), в которой места вырезания темных событий соединялись встык, также фильтровалась фильтром верхних частот с 0.2 Гц для выделения базовой линии. После фильтрации запись (г), отфильтрованная на частоте 3 Гц и скорректированная на низкочастотный дрейф, использовалась для построения гистограммы и определения стандартного отклонения ( $\sigma$ ) непрерывного темнового шума, не содержащего темновых событий, раздел 2.2.4). Стандартное отклонение определялось путем описания гистограммы кривой Гаусса. Далее, согласно формуле (14) производилась свертка функции Гаусса с ОКО, идущим с коэффициентом, характеризующим частоту дискретных событий. Пример подгонки экспериментальной записи темнового тока такой моделью приведен на Рис. 33.

В настоящее время общепринятой процедурой определения амплитуды ОКО является пуассоновский анализ набора ответов фоторецептора на слабые световые стимулы (Baylor et al., 1979a). Этот метод позволяет определить ОКО, который предположительно совпадает по форме с дискретными темновыми событиями и использовать в дальнейших расчетах. Пуассоновский анализ также применялся в рамках данного исследования, однако в ряде случаев полученные на его основе оценки амплитуды ОКО явно были некорректными, как видно из гистограммы плотности вероятности и вида реальных событий из записей темнового шума. В результате не было возможности удовлетворительно аппроксимировать гистограмму плотности вероятности стандартной функцией. Для решения этой проблемы в формулу (14) был добавлен масштабирующий коэффициент амплитуды темнового события (см. Рис. 34).



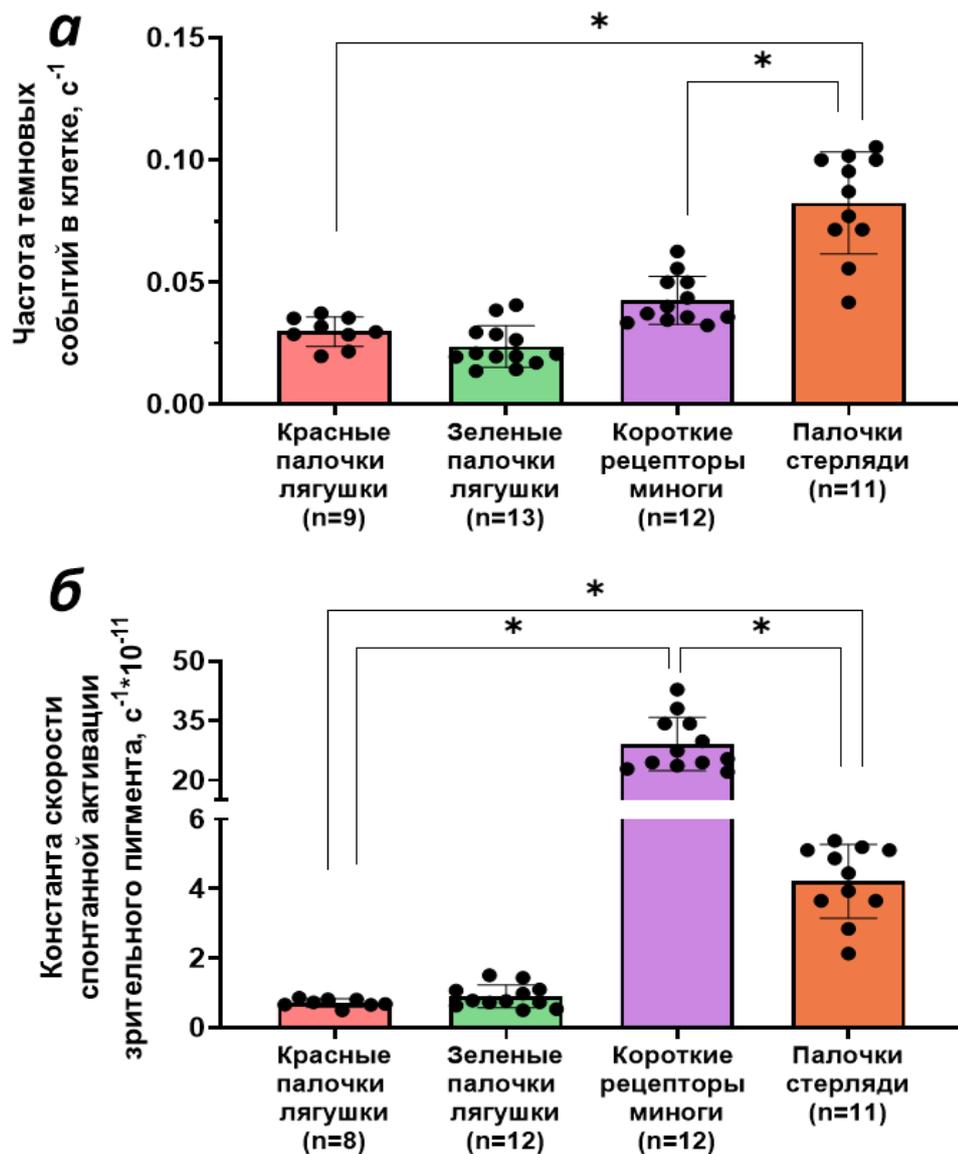
**Рис. 33.** Пример анализа частоты темновых событий фоторецептора. (а) Запись темнового тока красной палочки лягушки и (б) – соответствующая ей функция плотности вероятности. Красная линия представляет собой гистограмму плотности вероятности исходной записи темнового тока, а пунктирная линия – функцию Гаусса для записи с вырезанными темновыми событиями ( $\sigma = 0.112$ ). Сплошная линия – наилучшая аппроксимация гистограммы плотности вероятности функцией свертки гауссиана и одноквантового ответа.



**Рис. 34.** Пример завышенной оценки амплитуды темнового события зеленой палочки лягушки из анализа Пуассона. Зеленая линия – гистограмма плотности вероятности, пунктирная линия – функция Гаусса соответствующая той же записи после удаления темновых событий ( $\sigma = 0.088$ ). Сплошная черная линия – наилучшая аппроксимация гистограммы плотности вероятности функцией свертки гауссиана и одноквантового ответа, содержащей поправочный коэффициент для амплитуды ОКО, рассчитанного

методом Пуассона (частота темновых событий  $0.015 \text{ c}^{-1}$ ). Красная линия – подгонка гистограммы плотности вероятности функцией, но без корректирующего коэффициента (с той же частотой темновых событий). Для получения какой-либо приемлемой подгонки без такой коррекции следует установить частоту дискретных событий как чрезвычайно низкую (менее одного события на длительность записи), что противоречит наблюдаемой форме исходных записей темнового тока.

На Рис. 35 приведены оценки частоты дискретных темновых событий в различных фоторецепторах. Константа спонтанной активации пигмента определялась путем нормировки частоты темновых событий на количество молекул зрительного пигмента в клетке (оценивается по размерам клетки и плотности поглощения пигмента, см. раздел 3.1).



**Рис. 35.** Параметры дискретного темнового шума фоторецепторов. (а) Сравнение частоты дискретных темновых событий на клетку. \* – достоверные различия по критерию Тьюки ( $p < 0.001$ ) (б) Сравнение констант скорости тепловой изомеризации пигментов. \* – достоверные различия по критерию Даннетта ( $p < 0.001$ ). Данные приведены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты.

Наша оценка частоты дискретных темновых событий в зеленых палочках лягушки сильно расходится с результатом Луо с соавт., которые получили экстремально низкое значение частоты изомеризаций для клеток жабы-аги, соответствующее сверхстабильному пигменту, аналогов которому у других

видов не обнаружено (Luo et al., 2011). Однако, наш результат хорошо соответствует данным Мэттьюза на клетках той же жабы (Matthews, 1984), и очень близка к таковой для родопсина красных палочек (нет статистических различий по критерию Тьюки,  $p=0.693$ ). Такая высокая стабильность является необычной для типично колбочкового пигмента, и говорит о его дополнительной стабилизации в ходе эволюции.

Короткие рецепторы миноги также генерируют дискретные темновые события, причем их частота на одну клетку оказывается такой же, как у типичных палочек амфибий (нет статистических различий по критерию Тьюки,  $p=0.117$ ), и, таким образом, не является препятствием для детекции этими клетками одиночных квантов света. Однако, расчет константы скорости спонтанной активации показал, что для пигмента коротких рецепторов миноги она на 1.5 порядка выше чем для родопсинов палочек амфибий. Можно предположить, что такая низкая стабильность связана со сдвигом пика поглощения в длинноволновую область относительно родопсинов амфибий (515 против 502 нм), в соответствии с гипотезой Барлоу (Barlow, 1957). Для проверки этой гипотезы были дополнительно проанализированы параметры темнового шума в палочках в палочках стерляди, имеющих максимум поглощения на 545 нм. Константа скорости активации пигмента у этих клеток оказалась с одной стороны, значительно выше, чем у красных палочек лягушки, однако существенно ниже, чем у пигмента коротких рецепторов миноги (для обоих случаев  $p < 0.001$ , критерий Даннетта). Таким образом, стабильность пигмента рецепторов миноги оказывается не связанной с его длинноволновым сдвигом и является промежуточной между типично палочковыми и колбочковыми пигментами.

## **4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

### **4.1 Задержка фотоответа в колбочках: проблема скорости активации фосфодиэстеразы**

Попытки измерить длительность задержки фотоответа предпринимались неоднократно (Cobbs, Pugh 1987; Hestrin, Korenbrot, 1990), однако большинство работ прошлых лет обладают рядом характерных недостатков, которые приводили к неправильным оценкам. Наиболее распространенными проблемами являются недостаточно широкая полоса пропускания частот при регистрации фотоответов и/или слишком длительные световые стимулы. В первом случае процессы с характерной длительностью в несколько миллисекунд сглаживаются фильтрацией, во втором – общее число фотонов, попадающих на фоторецептор распределено в течение длительного временного промежутка, и в первые 1-2 миллисекунды число активированных молекул зрительного пигмента оказывается сравнительно небольшим. В результате, начало ответа сдвигается и длительность задержки переоценивается. Работа Каваками и Кавамуры (Kawakami, Kawamura, 2014) лишена этих недостатков, и в ней отчетливо показано, что задержка фотоответа в колбочках карпа короче, чем в палочках. Однако в ней не проводится численная оценка длительности реальной задержки фоторецепторного ответа ( $t_d$ ), а определяется значение параметра  $t_{eff}$  модели Пью и Лэмба (Pugh, Lamb, 1993, 2000) –  $t_{eff}$  [2, 26-27]. Эта модель предполагает упрощенное описание временного хода продукции PDE\* линейной зависимостью с определенной эффективной задержкой (см. раздел 1.3.3), поэтому связь величин  $t_{eff}$  и  $t_d$  неясна. В связи с этим одной из задач данной работы стала регистрация фотоответов палочек и колбочек с целью надежной оценки их задержки, что было успешно реализовано.

Полученный результат о существенно меньшей задержке фототрансдукции в колбочках по сравнению с палочками вступает в противоречие с современными представлениями о реакциях каскада. Поскольку лимитирующей стадией в активации трансдуцина является образование комплекса R\*-TaβγГДФ с постоянной времени  $t_l$  (см. раздел 1.3.3), скорость этой активации может быть выражена следующим образом:

$$v_{RG} = 1/t_{cycle} \approx 1/t_1 = c_e \cdot v_{enc}$$

(24)

Здесь  $v_{enc}$  – частота диффузионных столкновений между молекулами  $R^*$  и  $\text{Ta}\beta\gamma\text{ГДФ}$ , а  $c_e$  - эффективность их взаимодействия, то есть доля столкновений, которые приводят к образованию комплексов. Показано, что в палочках  $v_{enc}$  составляет  $\approx 6000 \text{ с}^{-1}$ , а  $v_{RG} \approx 200 \text{ с}^{-1}$ , поэтому  $c_e \approx 1/30$ , то есть эффективным является в среднем каждое тридцатое столкновение (Lamb, 1994; Pugh, Lamb, 2000). Величина  $v_{enc}$  пропорциональна поверхностной плотности упаковки молекул трансдуцина в мембране фоторецепторных дисков ( $2500 \text{ молекул/мкм}^2$ ). Плотность поверхностной упаковки фосфодиэстеразы составляет около  $200 \text{ субъединиц/мкм}^2$ , то есть в 12 раз меньше чем у трансдуцина (Pugh, Lamb, 2000). Таким образом, если бы эффективность взаимодействия  $c_e$  для  $T^*$  и PDE была такой же, как у  $R^*$  и  $\text{Ta}\beta\gamma\text{ГДФ}$ , скорость активации PDE молекулой  $T^*$  (обратно пропорциональная параметру  $t_6$ ) была бы в 12 раз ниже, чем скорость активации T.

Анализ параметров математической модели фотоответа показывает, что экспериментальная задержка в палочках (10-12 мс) может быть воспроизведена моделью при  $t_6 \approx 50 \text{ мс}$  (Табл. 3), что в десять раз больше, чем время взаимодействия  $R^*$  с  $\text{Ta}\beta\gamma\text{ГДФ}$  – примерно 5 мс (Leskov et al., 2000; Calvert et al., 2001; Sokolov et al., 2002). Таким образом, полученные результаты согласуются с предположением о том, что эффективность взаимодействия  $R^*$ - $\text{Ta}\beta\gamma\text{ГДФ}$  и  $T^*$ -PDE примерно одинакова, по крайней мере, в палочках.

В колбочках задержка трансдукции в три раза меньше, чем в палочках. Анализ модели показывает, что такая длительность задержки достижима только при значении  $t_6$  не более 5 мс, из чего следует, что в колбочках скорость взаимодействия PDE с  $T^*$  составляет около  $200 \text{ с}^{-1} \approx v_{RG}$  (Табл. 3). В этом случае возникает вопрос: как возможно, что в колбочках значение либо  $v_{enc}$ , либо  $c_e$  на стадии взаимодействия  $T^*$  с PDE на порядок выше, чем в палочках? Можно было бы предположить, что концентрация фосфодиэстеразы в

мембранных дисках колбочек в 10 раз выше, чем в палочках, о чем косвенно свидетельствует тот факт, что в колбочках темновая активность этого фермента в 10 раз выше (Astakhova et al., 2015). Однако биохимические данные о содержании фосфодиэстеразы в колбочках показывают, что его соотношение с трансдуцином либо такое же, как в палочках (1:12, Tachibanaki et al., 2001), либо, в случае колбочек млекопитающих, в два раза большее (1:6, Zhang et al., 2003) что в любом случае не объясняет феномен быстрого взаимодействия  $T^*$  с PDE. По-видимому, высокая скорость взаимодействия  $T^*$  с PDE в колбочках связана с более высокой эффективностью взаимодействия  $c_e$ . Пока неясно, какие особенности структуры колбочковых T и PDE и/или их упаковки в мембране могут обеспечить такую эффективность. В качестве гипотезы можно предположить на роль такого фактора, специфическую димерную структуру фосфодиэстеразы колбочек, где значительная часть неэффективной с точки зрения ферментативной активности поверхности скрыта между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами.

Результаты данной работы позволяют объяснить противоречие между традиционными представлениями о процессах активации каскада фототрансдукции и экспериментальными данными о длительности задержки в палочках и колбочках. Было показано, что этап активации трансдуцина не вносит существенного вклада в задержку, и в действительности она определяется этапом активации фосфодиэстеразы. Таким образом, были получены новые сведения о кинетике реакций, приводящих к активации сигнального каскада. Вместе с тем, в ходе анализа полученных данных была сформулирована новая проблема для текущей модели фототрансдукции, связанная с необъяснимой пока высокой скоростью взаимодействия  $T^*$  и PDE. Ее разрешение необходимо для выяснения молекулярных свойств участников фоторецепторного сигнального каскада и дальнейшего построения непротиворечивой модели структурной организации фоторецепторной мембраны.

## **4.2 Зеленые палочки бесхвостых амфибий: сверхспециализированные рецепторы ночного зрения**

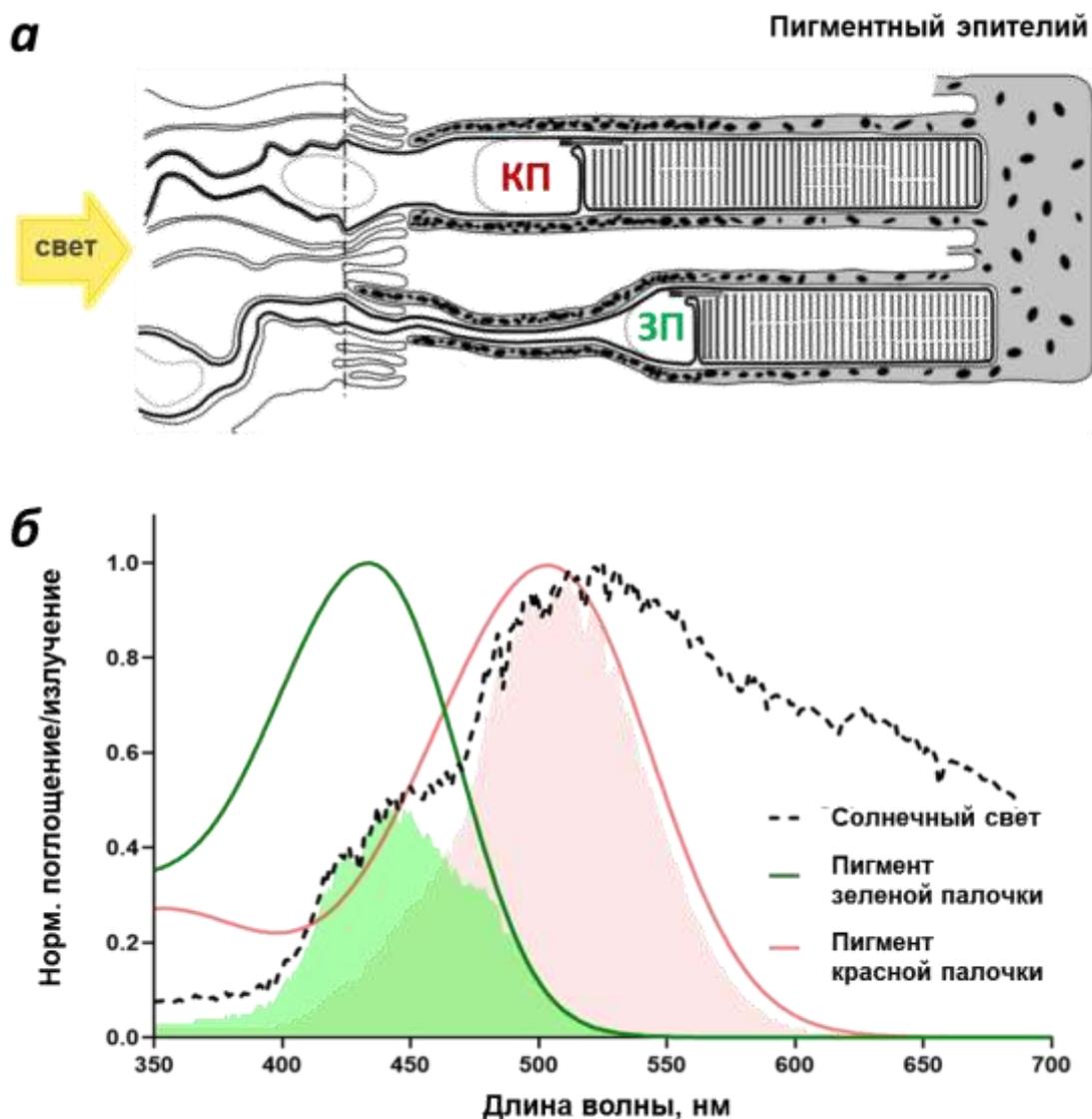
### **4.2.1 *Повышенная чувствительность зеленых палочек и ее функциональное значение***

Результаты проведенного исследования убедительно свидетельствуют о том, что зеленые палочки бесхвостых амфибий являются сверхспециализированными рецепторами ночного зрения, превосходящими по чувствительности типичные красные палочки. Кинетика процессов активации каскада фототрансдукции – определяющих крутизну восходящего фронта и длительность начальной задержки фотоответа, – не различается между двумя типами палочек, в то время как инактивация каскада в зеленых палочках происходит примерно в 2 раза медленнее, чем в красных. В результате увеличивается время интегрирования, что позволяет клетке более эффективно собирать статистику фотонов в условиях низкой освещенности. Следует отметить, что применяемое одноэкспоненциальное описание нисходящего фронта фотоответа позволяет оценить только суммарную кинетику различных стадий инактивации, а конкретный вклад каждой из них останется вне рассмотрения. Определение конкретных путей выключения, определяющих сверхчувствительность зеленых палочек, требует дополнительных экспериментов. Однако, некоторые из них, необходимые для определения ключевых биохимических параметров каскада фототрансдукции (применение ингибиторов фосфодиэстеразы и фиксация уровня кальция, см. Lyubarsky et al., 1996; Astakhova et al., 2015), требуют высокой устойчивости клетки и хорошего соотношения сигнал шум. Зеленые палочки озерной лягушки, по-видимому, не соответствуют этим критериям, и для дальнейшей разработки этого вопроса может потребоваться другой модельный организм.

Несмотря на более высокую чувствительность зеленых палочек относительно красных, наши результаты свидетельствуют о том, что эти рабочие диапазоны этих двух типов рецепторов широко перекрываются (до 3 порядков интенсивности для ответов на короткие вспышки света), в основном в

скотопической области. При оценке верхней границы чувствительности палочек следует учитывать световую адаптацию за счет ретиномоторного эффекта: перемещения гранулы меланина из тел клеток пигментного эпителия в их отростки, окружающие наружные сегменты палочек и снижающие количество света, достигающего их (Miller and Snyder, 1972). Когда гранулы пигмента окружают внутренний сегмент тонкой зеленой палочки, они образуют узкую структуру, подобную бутылочному горлышку в миоиде и ограничивают количество света, доступного для внешнего сегмента в еще большей степени, чем для красной палочки (Govardovskii, Reuter, 2014, см. Рис. 36А). Таким образом, совместный рабочий диапазон двух типов рецепторов расширяется еще сильнее. Это согласуется с результатами поведенческих экспериментов на травяных лягушках, сохраняющих способность различать цвета даже при крайне низком уровне освещения (Yovanovich et al., 2017) и дополнительно подтверждает наличие основы для ночного цветового зрения на уровне фоторецепторов.

Все предшествующее обсуждение чувствительности зеленых палочек подразумевало функционирование каскада в условиях, когда хотя бы один квант света уже успешно активировал молекулу зрительного пигмента, независимо от его спектральных свойств. Однако интерес также представляет вопрос об относительной чувствительности красных и зеленых палочек к естественному освещению, например, солнечному/лунному свету. Сопоставление спектров зрительных пигмента с солнечным излучением, измеренным в ясный день, позволило сравнить количество фотонов, достигающих двух типов палочек лягушки (Рис. 36Б). Расчет интегралов перекрытия показывает, что красные палочки эффективно поглощают в 2.3 раза больше солнечного света, чем зеленые. Таким образом, с экологической точки зрения двукратно более высокая абсолютная чувствительность зеленых палочек лягушек может быть также адаптацией к меньшей доле коротковолновых фотонов, пригодных для поглощения их зрительным пигментом, в солнечном излучении.



**Рис. 36.** Функционирование зеленых и красных палочек лягушки в естественных условиях. (а) Регуляция чувствительности красных (КП) и зеленых (ЗП) палочек за счет ретиномоторного эффекта. В светоадаптированном состоянии гранулы меланина распространяются по отросткам пигментного эпителия, экранируя наружные сегменты фоторецепторов (по Govardovskii, Reuter, 2014). (б) Расчет интегралов перекрытия (окрашенные области) спектра солнечного света и пигментов красных и зеленых палочек. Измерение солнечного спектра было выполнено В.И. Говардовским.

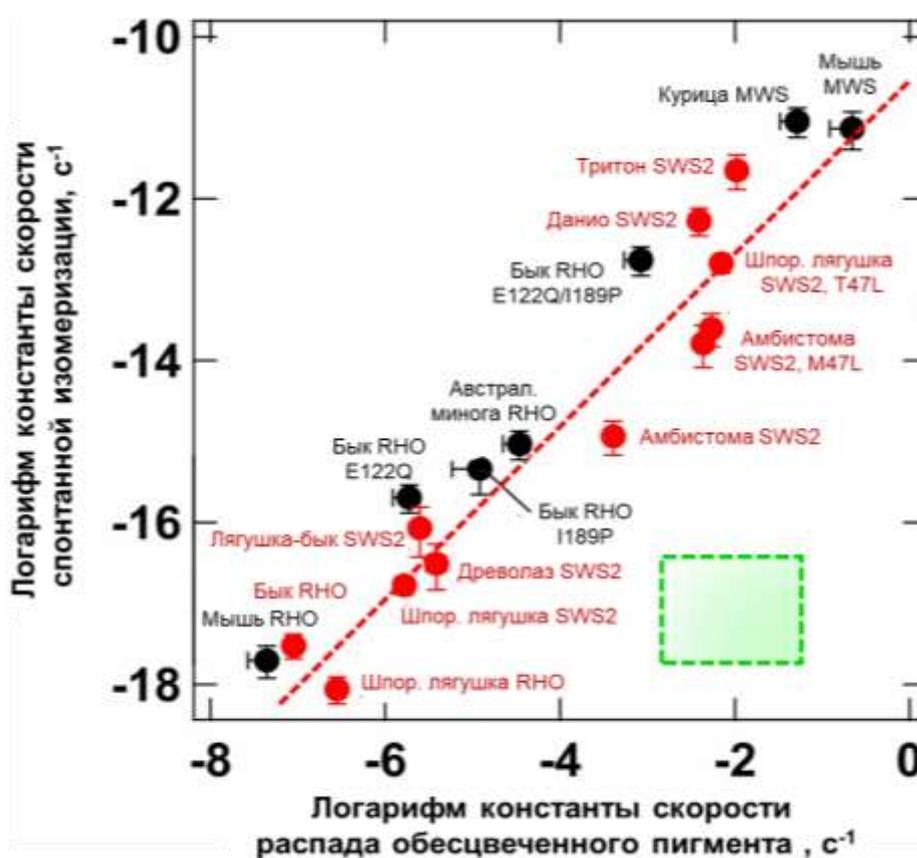
#### ***4.2.2 Необычные свойства зрительного пигмента зеленых палочек***

Биохимические свойства зрительного пигмента зеленых палочек лягушки крайне необычны и отражают одновременно его колбочковое происхождение (семейство SWS2), так и его функционирование в специализированных рецепторах ночного зрения. Так, в рамках данной работы было установлено, что скорость его спонтанной тепловой изомеризации совпадает с таковой для родопсина красных палочек, что соответствует функциональной роли клетки. Данная оценка существенно ближе к значению, ранее сообщенному Мэттьюзом для зеленых палочек жабы-аги, хотя и оказывается примерно в 4 раза меньше (Matthews, 1984). Данное расхождение можно объяснить двумя факторами: выбором значения концентрации пигмента в наружном сегменте фоторецептора из различных литературных источников (1.4 мМ в исследовании Мэттьюза, по Dartnall, 1972; 3.5 мМ в настоящей работе, по Hárosi, 1975) и разницей в процедуре расчета. Мэттьюз также использовал анализ гистограммы плотности вероятности темнового тока, однако определял дисперсию непрерывного шума по менее пологому плечу асимметричного распределения, а не по записи с вырезанными темновыми событиями (см. раздел 3.7). Такой подход может приводить к неточностям в определении стандартного отклонения  $\sigma$ , и, как следствие, примерно ошибке в оценке результирующей частоты спонтанных событий. Анализ Луо с соавт. (Luo et al., 2011) дал экстремально низкое значение скорости спонтанной изомеризации, соответствующее сверхстабильному пигменту, аналогов которому у других видов не обнаружено (примерно в 100 раз ниже, чем в настоящем исследовании). Однако, подсчет количества темновых событий производился вручную, без проведения анализа распределения тока. Поскольку амплитуда темновых событий переменна и не всегда соответствует средней амплитуде ОКО, в анализе с большой долей вероятности, учитывались только самые большие из них, более маленькие были пропущены, что и привело к недооценке склонности пигмента к спонтанным изомеризациям.

Измерения *in vitro* на пигментах, экспрессированных в культуре клеток НЕК293, подтверждают высокую стабильность пигмента зеленых палочек бесхвостых амфибий, сопоставимую с таковой для родопсина (Kojima et al., 2017). Однако, в этой же работе было показано, что высокостабильные пигменты зеленых палочек также имеют низкую скорость фотолиза, подобно родопсином (Рис. 37). Этот результат хорошо соответствует гипотезе о тесной связи скорости спонтанных изомеризаций и распада пигмента после обесцвечивания со степенью открытости сайта связывания хромофора (Yanagawa et al., 2015). С другой стороны, эти данные противоречат результатам измерений скорости фотолиза на изолированных интактных клетках, выполненных в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН (Голобокова с соавт., 2003) и подтвержденными в рамках данного исследования, что ставит под сомнение валидность данных, полученных на рекомбинантных пигментах. Помимо расчетов на основе спектров продуктов фотолиза в разные моменты времени после обесцвечивания, быстрый, типично колбочковый фотолиз пигмента зеленых палочек лягушек подтверждается в экспериментах с регенерацией зрительного пигмента в клетках, контактирующих с пигментным эпителием после обесцвечивания (Маурер, Говардовский, 2013). В зеленых палочках регенерация происходила значительно быстрее, чем в красных, что свидетельствует о более быстром освобождении сайта связывания хромофора в условиях доступа к 11-цис-ретинолу. Возможно, сам по себе пигмент зеленых палочек склонен к более медленному распаду, но в наружном сегменте присутствуют некие вспомогательные факторы, ускоряющие этот процесс – данный вопрос требует дальнейшего изучения.

В итоге, в зеленых палочках зрительный пигмент сочетает в себе быстрый распад после обесцвечивания с высокой стабильностью. Примечательно, что такая комбинация биохимических свойств характерна только для пигментов бесхвостых амфибий. У хвостатых амфибий, как амбистом (имеющих зеленые палочки), так и других представителей отряда (имеющим только синечувствительные колбочки) синечувствительный зрительный пигмент имел

низкую стабильность и высокую скорость фотолиза, подобно типично колбочковым. Предположительно, высокая скорость распада метaproдуктов у пигмента зеленых палочек бесхвостых сохранилась благодаря тому, что помимо зеленых палочек, он также экспрессируется в синечувствительных колбочках, что требует соответствия потребностям двух функционально разных типов рецепторов (Ma et al., 2001). Низкая скорость изомеризации позволяет зеленым палочкам детектировать одиночные фотоны, а высокая скорость фотолиза позволяет синечувствительным колбочкам быстро регенерировать пигмент при ярком освещении.



**Рис. 37** Корреляция между скоростями спонтанной термической изомеризации и скоростью распада различных зрительных пигментов, нативных и с внесенными мутациями (из работ Yanagawa et al., 2015; Kojima et al., 2017). Данные приведены как среднее  $\pm$  стандарт. ошибка среднего. Пунктирная линия – регрессия для зависимости стабильности пигмента от скорости его распада. RHO – палочковые родопсины, SWS2 – синечувствительные, MWS – зеленочувствительные колбочковые опсины.

Зеленым прямоугольником отмечена область, где ожидается расположение пигментов лягушек на основании измерений на интактных фоторецепторах.

Согласно данным Кодзимы с соавт., зрительные пигменты зеленых палочек бесхвостых амфибий приобрели высокую стабильность за счет одной аминокислотной замены – треонина в 47-м положении вместо метионина (у амбистом), лейцина или изолейцина (у других позвоночных, см. Kojima et al., 2017). Примечательно, что у палочковых родопсинов в этом положении также находится лейцин, а высокая стабильность обеспечивается за счет глутамата и изолейцина в положениях 122 и 189, соответственно (Imai et al., 1997, 2005, см. Рис. 37). Таким образом, синечувствительные колбочковые пигменты пришли к высокому уровню стабильности независимым путем, а отличие в аминокислоте на ключевой, 47-й позиции у амбистом делает их крайне интересным объектом для дальнейшего изучения функционального перехода зеленых палочек к роли рецепторов ночного зрения. К настоящему же моменту, трансмутированная природа зеленых палочек, как некогда типичных колбочек, ставших палочкоподобными остается под вопросом. Тем не менее, полученные результаты указывают на то, что если в эволюции фоторецепторов амфибий и имела место трансмутация, то на уровне современных бесхвостых она обеспечила появление рецептора, ничем не уступающего, и даже превосходящего в роли детектора одиночных фотонов «оригинальную» красную палочку.

### **4.3 Палочкоподобные рецепторы круглоротых: переходная форма между колбочками и палочками?**

#### ***4.3.1 Морфологическая и функциональная классификация коротких рецепторов миноги***

Природа фоторецепторов круглоротых в течение многих лет была объектом дискуссий. Предпринимались попытки замены морфологических критериев предполагаемой физиологической ролью, без обоснования связи между этими двумя характеристиками. Современные биохимические и молекулярные данные

не разрешили противоречий полностью, но дополнительно подтвердили сложность проблемы.

По морфологическим критериям короткие фоторецепторы миног определенно являются колбочками. Их наружные сегменты имеют форму усеченного конуса, а электронная микроскопия показывает, что мембранные диски как в длинных, так и в коротких рецепторах являются складками плазматической мембраны, а не отделены от нее (Öhman, 1971, 1976; Лычаков, 1976; Dickson, Graves, 1979). Сходная конусообразная топология наружных сегментов коротких и длинных фоторецепторов дополнительно подтверждается тем, что обновление белков фототрансдукции в них происходит характерным для колбочек путем равномерной диффузии по наружному сегменту, в то время как в палочках синтезированные *de novo* белки накапливаются в нижних мембранных дисках (Young, 1969; Dickson, Graves, 1979). Также, ранний рецепторный потенциал как в коротких, так и в длинных фоторецепторах миноги генерируется дисками, что свидетельствует об одинаковой природе электрической связи их внутренней среды с внеклеточным пространством (Govardovskii, 1975). Следует отметить, морфология рецепторов миноги представляет также интерес в контексте проблемы скорости активации фосфодиэстеразы в колбочках (раздел 4.1). Поскольку задержка в коротких рецепторах идентична типично палочковой, можно заключить, что колбочковая морфология наружного сегмента и связанные с ней особенности распределения белков в мембранных дисках не играют определяющей роли в повышении эффективности активации фосфодиэстеразы трансдуцином. По-видимому, ключевым фактором здесь являются собственные биохимические свойства белков.

Столь же уверенно можно заключить, что по своей физиологической роли короткие фоторецепторы миног северного полушария являются палочками. Их фотоответы замедлены относительно длинных, колбочкоподобных рецепторов, они способны надежно регистрировать одиночные фотоизомеризации в объеме наружного сегмента и насыщаются при умеренных уровнях освещенности, то

есть соответствуют определению рецептора ночного зрения (Govardovskii and Lychakov, 1984; Asteriti et al., 2015, Morshedian, Fain, 2015, Sakurai, 2017).

Несмотря на то, что короткие рецепторы миноги способны реагировать на одиночные фотоизомеризации, с учетом малого объема их наружного сегмента, их абсолютная чувствительность оказывается существенно ниже, чем у палочек холоднокровных позвоночных. Однако, абсолютная чувствительность палочек млекопитающих, также регистрирующих одиночные фотоизомеризации и имеющих малый объем, оказывается близкой к значениям для рецепторов миноги (Rapport et al., 1994; Xu et al., 1997), в то время как их принадлежность к типичным палочкам не вызывает сомнений. Таким образом, можно обнаружить закономерность, согласно которой в палочках большинства известных позвоночных биохимия каскада фототрансдукции подстроена таким образом, чтобы обеспечивать надежную реакцию на обесцвечивание единственной молекулы зрительного пигмента в рамках нижнего предела своего диапазона чувствительности (полунасыщающая интенсивность при этом устанавливается на уровне 30-60  $R^*/\text{клетку}$  на вспышку света, см. Табл. 4). Поскольку световой стимул является квантованным (то есть невозможен стимул ниже одного поглощенного фотона), увеличение чувствительности относительно этого порога представляется функционально бессмысленным, поскольку приведет к сужению рабочего диапазона клетки, а также росту амплитуды дискретного темнового шума.

Низкая чувствительность коротких рецепторов миноги к падающему свету приводит к сдвигу их рабочего диапазона в мезопическую область. В результате, область перекрытия рабочих диапазонов коротких и длинных рецепторов оказывается существенно выше, чем, например, для фоторецепторов амфибий. Это, по сути, объясняет парадокс, обнаруженный ранее Говардовским и Лычаковым и интерпретированный как специфическое свойство коротких рецепторов миноги к эффективному сопротивлению насыщению, подобно колбочкам (Govardovskii, Lychakov, 1984). Короткие рецепторы миноги существенно уступают по чувствительности крупным

палочкам амфибий, однако, с учетом морфологии, их каскад фототрансдукции успешно справляется с задачей надежного детектирования одиночных квантов света.

**Табл. 4.** Параметры чувствительности и кинетики фотоответа палочек различных позвоночных. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты. \* - данные по палочкам мыши из работ Raport et al., 1994; Pugh, Lamb, 2006; Wang et al., 2018 (все измерения выполнены при температуре 37 °C, усиление рассчитано согласно Pugh, Lamb, 1993, см. формулу (1)).

<b>Параметр чувствительности/ кинетики</b>	<b>Красные палочки лягушки</b>	<b>Короткие рецепторы миноги</b>	<b>Палочки мыши*</b>
Полунасыщ. интенсивность, R*/мкм <sup>3</sup>	0.021 $\pm$ 0.008 (n=12)	0.76 $\pm$ 0.24 (n=13)	0.57
Полунасыщ. интенсивность, R*/клетку	51.5 $\pm$ 18.7 (n=12)	61.8 $\pm$ 19.5 (n=13)	22.8
Относительная скорость активации (по палочкам лягушки)	1.02 $\pm$ 0.39 (n=8)	0.19 $\pm$ 0.11 (n=12)	3.2
Постоянная времени выключения, с	0.89 $\pm$ 0.32 (n=8)	0.57 $\pm$ 0.10 (n=12)	0.21
Время до пика, с	0.55 $\pm$ 0.08 (n=8)	0.21 $\pm$ 0.04 (n=12)	0.13
Время интегрирования, с	1.17 $\pm$ 0.41 (n=8)	0.73 $\pm$ 0.13 (n=12)	0.26

Усиление в каскаде рецепторов миноги также существенно ниже, чем у палочек и приближено к колбочковым значениям (Kawakami, Kawamura, 2014; Astakhova et al., 2015). Важно отметить, что у палочек млекопитающих, несмотря на сниженную абсолютную чувствительность, абсолютное усиление в

каскаде даже превосходит таковое у палочек амфибий (Pugh, Lamb, 2006). Показано, что столь высокое усиление обусловлено в том числе более высокой температурой тела (в экспериментах 37 и 22 °С, соответственно) и после учета этого фактора оказывается, что усиление в палочках амфибий и млекопитающих примерно одинаковое (Nymark et al., 2005; Pugh, Lamb, 2006). Низкая чувствительность палочек млекопитающих, по-видимому, связана с ускоренной кинетикой выключения (Табл. 4). У коротких рецепторов миноги кинетика выключения также оказывается ускоренной относительно палочек амфибий, однако гораздо ближе к ней по величине постоянной времени выключения, чем к палочкам млекопитающих и, очевидно, колбочкам. Таким образом, кинетика каскада фототрансдукции рецепторов миноги носит переходный характер: активация близка по эффективности к типично колбочковой, в то время как скорость выключения близка к палочковой. При этом данная комбинация успешно справляется с обеспечением физиологического функционала рецептора ночного зрения.

#### ***4.3.2 Эволюционное происхождение участников каскада фототрансдукции коротких рецепторов миноги***

Молекулярно-генетический анализ белков каскада фототрансдукции в коротких фоторецепторах миноги показал, что изоформ их белков каскада фототрансдукции не всегда можно надежно определить как палочковые или колбочковые. Так, и в коротких, и в длинных рецепторах морской миноги экспрессируется только один тип каталитической субъединицы фосфодиэстеразы, подобно тому, как это происходит в типичных колбочках. Был Нуклеотидная последовательность ее гена в равной степени удалена от генов палочковых (*Pdeba* и *Pdebb*) и колбочковых (*Pdebс*) субъединиц других позвоночных (Muradov et al. 2007; Lagman et al., 2016). Для ингибирующих  $\gamma$ -субъединиц фосфодиэстеразы было обнаружено два разных гена: в длинных рецепторах экспрессируется изоформа  $P\gamma 1$ , близкая к типично колбочковым, а в коротких –  $P\gamma 2$ , также смешанной колбочко-палочковой природы. С другой

стороны, ген  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина коротких рецепторов близок к таковому для палочковых изоформ в фоторецепторах челюстноротых, в то время как колбочковый трансдуцин равноудален как от палочкового, так и от колбочкового (Muradov et al., 2008). Генетический анализ выявил у миног два гена родопсина, *RhA* и *RhB*, сходные с *Rh1* и *Rh2* челюстноротых позвоночных, но не идентичные им (Collin et al., 2003b; Lamb, 2013; однако см. обсуждение Pisani et al., 2006; Collin, Trezise, 2006). Принципиальное отличие пигмента коротких рецепторов миноги от родопсинов типичных палочек подтверждается полученными в рамках данной работы данными о его фотолизе и стабильности.

Распад обесцвеченного пигмента рецепторов миноги происходит по той же схеме, что и у типичных родопсинов: через равновесную смесь метародопсинов I и II, к метародопсину III и далее к полностью транс-ретиналю и продуктам его взаимодействия с фоторецепторной мембраной. Однако скорость распада *сe* *v* *v* *s* метародопсинов миноги значительно выше, чем скорость распада метародопсинов в палочках карася, лягушки или крысы: время полураспада составляет 53 с против примерно 200–300 с (при соответствующих физиологических температурах, см. Kolesnikov et al., 2003; Golobokova, Govardovskii, 2006; Кореняк, Говардовский, 2012). По скорости распада пигмент коротких рецепторов оказывается между типично палочковыми и колбочковыми, и близким к пигменту трансмутированных палочкоподобных рецепторов ночного геккона (Kolesnikov et al. 2007, см. Рис. 30), который филогенетически относится к группе колбочковых пигментов LWS (Yokoyama, Blaw, 2001). Как было отмечено выше, высокая стабильность палочковых родопсинов обуславливается двумя характерными аминокислотными остатками: глутамата и изолейцина в положениях 122 и 189, соответственно (Imai et al., 1997, 2005). Оказалось, что пигмент рецепторов австралийской миноги в позиции 122 содержит глутамат, а в 189-ой изолейцин заменен на пролин, типичный для пигментов колбочек (Hisatomi et al., 1997).

Константа скорости сонтанной изомеризации для пигмента коротких рецепторов также занимает промежуточное значение между типично

палочковыми и колбочковыми (Luo et al., 2011). При этом пигмент палочек стерляди оказался значительно стабильнее пигмента миноги, несмотря на то, что его пик смещен на 30 нм в длинноволновую область (Фирсов, Говардовский, 1990). Из этого следует, что повышенная скорость изомеризаций пигмента миноги не укладывается в рамки гипотезы Барлоу (о зависимости стабильности пигмента от пика его поглощения, см. Barlow, 1957) и является следствием его промежуточной палочко-колбочковой природы. Анализ рекомбинантных зрительных пигментов палочек и колбочек, экспрессированных в клетках HEK293 также показал, что пигмент австралийской миноги занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми как по скорости спонтанных изомеризаций (Yanagawa et al., 2015, см. Рис. 37). Таким образом, полученные в ходе данной работы результаты, вкупе с данными молекулярно-биологического анализа подкрепляют предположение о том, что опсины коротких рецепторов миног могут формировать специфическую эволюционную линию, отдельную от родопсинов челюстноротых позвоночных.

Поскольку белки фототрансдукции круглоротых потенциально представляют собой отдельные линии от палочковых и колбочковых белков других позвоночных, проследить происхождение их рецепторов не представляется возможным. Равновероятны сценарии, когда короткий рецептор произошел от высокоспециализированной колбочки посредством трансмутации, и его соответствие архаичному предковому фоторецептору, с невыраженной дифференцировкой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования были определены этапы активации каскада фототрансдукции, определяющие длительность задержки перед началом электрического ответа рецептора. Применение подробной модели фотоответа и варьирование ее параметров показало, что традиционное представление о том, что ключевым этапом задержки является цикл активации трансдуцина зрительным пигментом, является ошибочным. Оказалось, что истоки задержки лежат в более поздних этапах каскада, связанных с активацией фосфодиэстеразы трансдуцином.

Минимальная длительность задержки оказывается существенно различной у типичных палочек и колбочек, что не находит объяснения в современных представлениях об активации каскада фототрансдукции. Согласно литературным данным, концентрация фосфодиэстеразы в колбочках не отличается от таковой в палочках (Zhang et al., 2003), поэтому можно предположить, что высокая скорость активации связана с повышенной эффективностью взаимодействия колбочковых изоформ трансдуцина и фосфодиэстеразы. У трансмутированных фоторецепторов – коротких рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки – задержка оказалась типично палочковой, что согласуется с их ролью рецепторов сумеречного зрения.

Для трансмутированных фоторецепторов были оценены и другие параметры, определяющие кинетику фотоответа: эффективность активации каскада и скорость его выключения. Сравнительный анализ этих величин с характерными для палочек и колбочек холоднокровных показал, что зеленые палочки бесхвостых амфибий являются сверхспециализированными рецепторами ночного зрения, превосходя в чувствительности даже типичные красные палочки. Это становится возможным за счет замедленного выключения каскада фототрансдукции и, как следствие, увеличенного времени интегрирования фотоответа. Короткие рецепторы миноги занимают

промежуточное положение по абсолютной чувствительности между типичными палочками и колбочками. Усиление в каскаде рецепторов миноги существенно ниже, чем у палочек и приближено к колбочковым значениям (Astakhova et al., 2015). Кинетика выключения фотоответа, напротив, близка к таковой для типичных палочек, что указывает на переходный характер данного типа фоторецепторов.

Также для характеристики особенностей биохимии зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, была оценена скорость их фотолиза и частота спонтанных изомеризаций. Колбочковый по происхождению пигмент зеленых палочек оказался сопоставим по стабильности с палочковым родопсином, что, вероятно, является следствием эволюционного перехода этих клеток к роли рецепторов ночного зрения. Необычным результатом оказалась высокая скорость распада метапродуктов в зеленых палочках: согласно современным представлениям, этот параметр тесно связан с темновой стабильностью пигмента, при этом у стабильных пигментов ретиналь более жестко зафиксирован в комплексе с опсином, что приводит к более медленному распаду метапродуктов (Yanagawa et al., 2015). Вместе с тем, физиологическая роль такой двойственности представляется очевидной: помимо зеленых палочек, этот пигмент также экспрессируется в синечувствительных колбочках – типичных рецепторах дневного зрения. Поскольку колбочкам необходима высокая скорость обмена хромофора для обесцвеченного зрительного пигмента, сохранение быстрого распада метапродуктов оказалось эволюционно выгодным.

Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги занимает промежуточное положение как по уровню темновой стабильности, так и скорости фотолиза, что укладывается в представление о его трансмутированной природе. Однако следует отметить, что некоторыми авторами на основе молекулярного филогенетического анализа пигмент коротких рецепторов круглоротых выделяется в отдельную от пигментов палочек группу (Collin et al., 2003). Принимая это во внимание, промежуточную скорость фотолиза

можно трактовать не как признак трансмутации, а в том числе как сохранившуюся в параллельной эволюционной линии архаичную черту предкового неспециализированного фоторецептора.

## **ВЫВОДЫ**

1. Задержка ответов фоторецепторов определяется кинетикой этапа связывания фосфодиэстеразы с активированным трансдуцином. Скорость этого процесса в колбочках оказывается в 10 раз выше, чем в типичных палочках и палочкоподобных трансмутированных рецепторах, что может быть связано с особенностями взаимодействия колбочковых изоформ белков фототрансдукции.

2. Зеленые палочки бесхвостых амфибий являются высокоспециализированными рецепторами ночного зрения. Кинетика процессов включения каскада фототрансдукции у них совпадает с таковой у типичных палочек, а выключение происходит в 2 раза медленнее, что делает их еще более эффективными счетчиками одиночных фотонов.

3. Зрительного пигмента зеленых палочек имеет высокую темновую стабильность, что позволяет им сохранять высокий порог чувствительности. Одновременно пигмент сохраняет типичную для колбочек высокую скорость фотолиза, что противоречит современным представлениям о взаимодействии опсина с ретиналем.

4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный по физиологическим характеристикам тип фоторецептора. Эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, а кинетика выключения – палочкам, что приводит к сдвигу диапазона чувствительности рецептора в мезопический диапазон.

5. Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги по частоте спонтанных изомеризаций и скорости фотолиза занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми. Таким образом дополнительно подтверждается переходный характер рецепторов миноги.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML, Govardovskii VI. Origins of the phototransduction delay as inferred from stochastic and deterministic simulation of the amplification cascade // *Molecular Vision*. – 2017. – V. 23 – P. 416.

2. Govardovskii VI, Astakhova LA, Rotov AY, Firsov ML. Rejection of the biophoton hypothesis on the origin of photoreceptor dark noise // *The Journal of General Physiology*. – 2019. – V. 151(7) – P. 887-897.

3. Govardovskii VI, Rotov AY, Astakhova LA, Nikolaeva DA, Firsov ML. Visual cells and visual pigments of the river lamprey revisited // *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. – 2020. – V. 206(1) – P. 71-84.

4. Astakhova LA, Novoselov AD, Ermolaeva ME, Firsov ML, Rotov AY. Phototransduction in anuran green rods: origins of extra-sensitivity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22(24) – P. 13400.

### Тезисы докладов

1. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Говардовский В.И. Фоторецепторы и зрительные пигменты сетчатки речной миноги *Lampetra fluviatilis* // XV Всероссийское Собрание с международным участием и восьмая Школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов. – 2016. – С. 204-205

2. Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML, Govardovskii VI. Origins of the phototransduction delay // *Visionarium XV*. – 2016. – P. 26-27

3. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Происхождение задержки в каскаде фототрансдукции // *Международная*

конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. – 2017. – Т. 1 – С. 387-392

4. Govardovskii VI, Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML. Paradoxes in phototransduction: sources of the transduction delay // *Visionarium XVI*. – 2017. – P. 17

5. Rotov AY, Astakhova LA, Govardovskii VI. Photoreceptors and visual pigments of river lamprey: reconsideration // *Visionarium XVI*. – 2017. – P. 29-30

6. Govardovskii VI, Astakhova LA, Rotov AY, Firsov ML. Biophotons and photoreceptor dark noise // *Visionarium XVII*. – 2018. – P. 9-10

7. Rotov AY, Astakhova LA, Nikolaeva DA, Firsov ML, Govardovskii VI. Photoreceptors of River Lamprey *L. fluviatilis*: the “Color Vision” Paradox // XVI Всероссийская конференция с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели». Сборник материалов. – 2020. – С. 792.

8. Ротов А.Ю., Новоселов А.Д., Ермолаева М.Э., Астахова Л.А., Фирсов М.Л. Сравнительный анализ чувствительности зеленых и красных палочек сетчатки лягушки // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. – 2021. – Т. 2 – С. 480-484

9. Ротов АЮ, Астахова ЛА, Новоселов АД, Ермолаева МЭ, Фирсов МЛ. Анализ функциональных различий зеленых и красных палочек бесхвостых амфибий // Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу: тезисы докладов научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелева – 2022. – С. 90-93

10. Rotov AY, Astakhova LA, Novoselov AD, Ermolaeva ME, Firsov ML. Comparative analysis of anuran green and red rods: response kinetics and sensitivity // *Visionarium XX*. – 2022. – P. 9-10

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Говардовский В.И. Фоторецепторы и зрительные пигменты сетчатки позвоночных: сравнительный и эволюционный аспект // Руководство по физиологии. Эволюционная физиология. – Л.: Наука. – 1983. – Ч. 2. – С. 229–261.
2. Говардовский В. И., Астахова Л. А., Фирсов М. Л. Специфика физиологических и биохимических механизмов возбуждения и адаптации колбочек сетчатки // Сенсорные системы. – 2015. – Т. 29. – №. 4. – С. 296-308.
3. Говардовский В.И., Зуева Л.В. Скоростной микроспектрофотометр для исследования фотолиза зрительных пигментов *in situ* // Сенсорные системы. – 2000. – Т. 14. – С. 288-296.
4. Голобокова Е. Ю., Колесников А. В., Говардовский В. И. Медленные стадии фотолиза зрительного пигмента зеленых палочек лягушки *Rana temporaria* // Сенсорные системы. – 2003. – Т. 17. – №. 2. – С. 134-143.
5. Каламбаров Г. Р., Островский М. А. Молекулярные механизмы зрительной рецепции. // М: Наука. – 2002.
6. Кондрашев С.Л., Гнубкин В.Ф. 1978. Участие зеленых палочек сетчатки бесхвостых амфибий в зрительном процессе // Механизмы зрения животных. М.: Наука. С. 76–84.
7. Кореняк Д. А., Говардовский В. И. Температурная зависимость медленных стадий фотолиза родопсина в интактных палочках сетчатки лягушки и крысы // Сенсорные системы. – 2012. – Т. 26. – №. 2. – С. 141-149.
8. Лычаков Д.В. Свето- и электронномикроскопическое исследование фоторецепторов миноги *Lampetra fluviatilis* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1976. – Т. 12. – №. 2-5. – С. 358.

9. Маурер Е. Ю., Говардовский В. И. Регенерация зрительных пигментов в изолированной сетчатке лягушки *Rana temporaria* // Сенсорные системы. – 2013. – Т. 27. – №. 2. – С. 99-107.
10. Овчинников Ю.А., Абдулаев Н.Г., Фейгина М.Ю. и др. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина // Биоорганическая химия. - 1982. - Т. 8, №10. - С. 1424-1427.
11. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Световая адаптация палочек сетчатки, адаптационная память и последовательные образы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 462–473.
12. Трифонов Ю.А., Чайлахян А.Л., Бызов А.Л. Исследование природы электрических ответов горизонтальных клеток сетчатки рыб // Нейрофизиология. - 1971. - Т. 3, №1. - С. 89-98.
13. Фирсов М. Л., Говардовский В. И. Кинетика перехода метародопсин I-метародопсин II при фотолизе палочковых и колбочковых зрительных пигментов холоднокровных и теплокровных животных // Сенсорные системы. – 1988. – Т. 2. – №. 1. – С. 10-16.
14. Фирсов М.Л., В.И. Говардовский. Темновой шум зрительных пигментов с разными максимумами поглощения. Сенсорные системы. 1990.4:25–33
15. Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Световая адаптация фоторецепторов: смысл и механизмы. Сенс. сист. 2001. 15(2): 101-113.
16. Abbas F., Vinberg F. Transduction and adaptation mechanisms in the cilium or microvilli of photoreceptors and olfactory receptors from insects to humans // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – V. 15. – P. 662453.
17. Arey, L.B. Changes in the rod-visual cells of the frog due to the action of light. *J. Comp. Neurol.* **1916**, 26, 429–441.
18. Arshavsky V.Yu., Antoch M.P., Philippov P.P. On the role of transducin GTPase in the quenching of a phosphodiesterase cascade of vision // *FEBS letters*. - 1987. - V. 224. - P. 19-22.

19. Arshavsky V. Y., Burns M. E. Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – №. 3. – P. 1620-1626.
20. Arshavsky, V.Y., Burns, M.E. Current understanding of signal amplification in phototransduction. *Cell. Logist.* **2014**, 4, e28680.
21. Astakhova, L. A.; Nikolaeva, D. A.; Fedotkina, T. V.; Govardovskii, V. I.; Firsov, M. L. cAMP controls rod photoreceptor sensitivity via multiple targets in the phototransduction cascade // *Journal of General Physiology*. – 2012. – V. 140. – №. 4. – P. 421-433.
22. Astakhova, L. A.; Nikolaeva, D. A.; Fedotkina, T. V.; Govardovskii, V. I.; Firsov, M. L. Elevated cAMP improves signal-to-noise ratio in amphibian rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **2017**, 149, 689-701.
23. Astakhova L., Firsov M., Govardovskii V. Activation and quenching of the phototransduction cascade in retinal cones as inferred from electrophysiology and mathematical modeling // *Molecular vision*. – 2015. – V. 21. – P. 244.
24. Astakhova L. A., Firsov M. L., Govardovskii V. I. Kinetics of turn-offs of frog rod phototransduction cascade // *The Journal of general physiology*. – 2008. – V. 132. – №. 5. – P. 587-604.
25. Asteriti S., Grillner S., Cangiano L. A Cambrian origin for vertebrate rods // *Elife*. – 2015. – V. 4. – P. e07166.
26. Bäckström, A.C.; Reuter T. Opponent colour interaction between two kinds of rod signals in the frog's retina. *Phys. Nor.* **1974**, 7, 187–189.
27. Barlow, H.B. 1957. Purkinje shift and retinal noise. *Nature*. 179:255–256.
28. Barlow R. B. et al. On the molecular origin of photoreceptor noise // *Nature*. – 1993. – V. 366. – №. 6450. – P. 64-66.
29. Baumann C. The formation of metarhodospin 380 in the retinal rods of the frog // *The Journal of physiology*. – 1976. – V. 259. – №. 2. – P. 357
30. Baylor D. A., Lamb T. D., Yau K. W. Responses of retinal rods to single photons // *The Journal of physiology*. – 1979a. – V. 288. – №. 1. – P. 613-634.

31. Baylor D. A., Lamb T. D., Yau K. W. The membrane current of single rod outer segments // *The Journal of physiology*. – 1979b. – V. 288. – №. 1. – P. 589-611.
32. Baylor D. A., Matthews G., Yau K. W. Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments // *The Journal of physiology*. – 1980. – V. 309. – №. 1. – P. 591-621.
33. Bennett N. Light-induced interactions between rhodopsin and the GTP-binding protein. Relation with phosphodiesterase activation // *European Journal of Biochemistry*. - 1982. - V. 123. - P. 133-139.
34. Berman D.M., Gilman A.G. Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate // *Journal of biological chemistry*. - 1998. - V. 273. - P. 1269-1272.
35. Bigay, J., Faurobert, E., Franco, M., Chabre, M. Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding // *Biochemistry*. – 1994. – V. 33. – №. 47. – P. 14081-14090.
36. Boll, F. Zur Anatomie und Physiologie der Retina *Arch. Anal. Physiol.* **1877**, 4-36
37. Bornancin F., Pfister C., Chabre M. The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin // *The FEBS Journal*. – 1989. – V. 184. – №. 3. – P. 687-698.
38. Bowmaker J.K. The ecology of visual pigments // *Novartis Foundation symposium*. – 1999. – V. 224. – P. 21–31;
39. Bownds D., Gordon-Walker A., Gaide-Huguenin A.C., Robinson W. Characterization and analysis of frog photoreceptor membranes // *The Journal of general physiology*. - 1971. – V. 58. – P. 225–237.
40. Bridges CDB The rhodopsin–porphyropsin visual system. In: Dartnall HJA (ed) *Handbook of sensory physiology VII*, 1972. Springer, Berlin, Germany, pp 417-480
41. Burns M.E., Mendez A., Chen J., Baylor D.A. Dynamics of cyclic GMP synthesis in retinal rods // *Neuron*. - 2002. - V. 36. - P. 81-91.
42. Calvert, P. D., Govardovskii, V. I., Krasnoperova, N., Anderson, R. E., Lem, J., & Makino, C. L. Membrane protein diffusion sets the speed of rod phototransduction // *Nature*. – 2001. – V. 411. – №. 6833. – P. 90-94.

43. Catty, P., Pfister, C., Bruckert, F., Deterre, P. The cGMP phosphodiesterase-transducin complex of retinal rods. Membrane binding and subunits interactions // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – №. 27. – P. 19489-19493.
44. Chen J., Makino C.L., Peachey N.S., Baylor D.A., Simon M.I. Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant // *Science*. - 1995. - V. 267. - P. 374-377.
45. Cobbs W. H., Pugh Jr E. N. Kinetics and components of the flash photocurrent of isolated retinal rods of the larval salamander, *Ambystoma tigrinum* // *The Journal of Physiology*. – 1987. – V. 394. – P. 529.
46. Collin SP, Hart NS, Shand J, Potter IC (2003a) Morphology and spectral absorption characteristics of retinal photoreceptors in the southern hemisphere lamprey (*Geotria australis*). *Vis Neurosci* 20(2):119-130
47. Collin SP, Knight MA, Davies WL, Potter IC, Hunt DM, Trezise AE (2003b) Ancient colour vision: multiple opsin genes in the ancestral vertebrates. *Curr Biol* 13(22):R864-5
48. Collin SP, Trezise AE Response to Pisani et al. *Curr Biology*. 2006. 16(9):R320
49. Crescitelli F The visual pigments of geckos and other vertebrates: an essay in comparative biology. In: Crescitelli F (ed) *Handbook of Sensory Physiology*. 1977. vol 7/5, Springer, Berlin, pp 391-450
50. Dartnall, H. J. A. The photosensitivities of visual pigments in the presence of hydroxylamine. *Vis. Res.* **1968**, 8, 339-358.
51. Dartnall, H. J. A. Photosensitivity. In: *Photochemistry of vision*. Springer, Berlin, Heidelberg. **1972**, 122-145.
52. Daemen F.J., De Grip W.J., Jansen P.A. Biochemical aspects of the visual process. XX. The molecular weight of rhodopsin // *Biochimica et biophysica acta*. - 1972. - V. 271. - P. 419–428.
53. DeGrip W.J., Rothschild K.J. Structure and mechanisms of vertebrate visual pigments // In *Handbook of Biological Physics*, eds. Stavenga D.G., DeGrip W.J., Pugh E.N. Jr. - Elsevier Science B.V. - 2000. - V. 3. - Chapter 1. - P. 1-54.

54. Denton, E. J.; Wyllie J. H. Study of the photosensitive pigments in the pink and green rods of the frog. *J. Physiol.* **1955**, 127, 81-89.
55. Denton E.J. The contribution of oriented photosensitive and other molecules to the absorption of whole retina // *Proceedings of the Royal Society B.* - 1959. - V. 150. - P. 78-94.
56. Dickson DH, Graves DA (1979) Fine structure of the lamprey photoreceptors and retinal pigment epithelium (*Petromyzon marinus* L.). *Exp Eye Res* 29(1):45-60
57. Dizhoor A.M., Hurley J.B. Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins // *Methods.* - 1999. - V. 19. - P. 521-531.
58. Dizhoor A.M., Olshevskaya E.V., Peshenko I.V. Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> cation binding cycle of guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs): role in regulation of photoreceptor guanylyl cyclase // *Molecular and cellular biochemistry.* - 2010. - V. 334. - P. 117-124.
59. Dizhoor A.M., Ray S., Kumar S., Niemi G., Spencer M., Brolley D., Walsh K.A., Philipov P.P., Hurley J.B., Stryer L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase // *Science.* - 1991. - V. 251. - P. 915-918.
60. Donner, K. Spectral and thermal properties of rhodopsins: closely related but not tightly coupled. *Russ. J. Physiol.* **2020**, 106, 421–435.
61. Donner, K.O.; Reuter, T. The spectral sensitivity and photopigment of the green rods in the frog's retina. *Vis. Res.* 1962, 2, 357-372.
62. Donner K., Firsov M. L., Govardovskii V. I. The frequency of isomerization- like 'dark' events in rhodopsin and porphyropsin rods of the bull- frog retina // *The Journal of physiology.* – 1990. – V. 428. – №. 1. – P. 673-692.
63. Donner, K.; Yovanovich, C. A. M. A frog's eye view: Foundational revelations and future promises *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, 106, 72-85.
64. Enright JM, Toomey MB, Sato SY, Temple SE, Allen JR, Fujiwara R, Kramlinger VM, Nagy LD, Johnson KM, Xiao Y, How MJ, Johnson SL, Roberts NW, Kefalov VJ, Guengerich FP, Corbo JC Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity

- of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2. *Curr Biol.* 2015. 25(23):3048-3057
65. Estevez ME, Kolesnikov AV, Ala-Laurila P, Crouch RK, Govardovskii VI, Cornwall MC The 9-methyl group of retinal is essential for rapid Meta II decay and phototransduction quenching in red cones. *J Gen Physiol.* 2009. 134(2):137-150
66. Fain G. L. Lamprey vision: photoreceptors and organization of the retina // *Seminars in cell & developmental biology.* – Academic Press, 2020. – T. 106. – C. 5-11.
67. 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.* - 1985. - V. 313. - P. 310-313.
68. Fu, Y.; Kefalov, V.; Luo, D.G.; Xue, T.; Yau, K.W. Quantal noise from human red cone pigment. *Nature Neurosci.* 2008, 11, 565–71.
69. Fung B.K., Hurley J.B., Stryer L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1981. – V. 78. – P. 152–156.
70. Gordon S.E., Downing-Park J., Zimmerman A.L. Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory factor // *The Journal of physiology.* - 1995. - V. 486. - P. 533-546.
71. Govardovskii VI On the sites of generation of the early and late receptor potentials in rods. *Vision Res.* 1975. 15:971-986
72. Govardovskii, V. I.; Fyhrquist, N.; Reuter, T.; Kuzmin, D. G.; Donner, K. In search of the visual pigment template. *Vis. neurosci.* 2000, 17, 509-528.
73. Govardovskii V. I., Lychakov D. V. Visual cells and visual pigments of the lamprey, *Lampetra fluviatilis* // *Journal of Comparative Physiology A.* – 1984. – V. 154. – №. 2. – P. 279-286.
74. Govardovskii, V. I.; Reuter, T. Why do green rods of frog and toad retinas look green? *J. Comp. Physiol. B.* **2014**, 200, 823-835.

75. Govardovskii, V.I., Röhlich, P., Szél, A., Khokhlova, T.V. Cones in the retina of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*: an immunocytochemical and electrophysiological study // *Vision research*. – 1992. – V. 32. – №. 1. – P. 19-27.
76. Govardovskii VI, Astakhova LA, Rotov AY, Firsov ML. Rejection of the biophoton hypothesis on the origin of photoreceptor dark noise // *The Journal of General Physiology*. – 2019. – V. 151(7) – P. 887-897.
77. Golobokova E. Y., Govardovskii V. I. Late stages of visual pigment photolysis in situ: cones vs. rods // *Vision research*. – 2006. – V. 46. – №. 14. – P. 2287-2297.
78. Gozem, S., I. Schapiro, N. Ferré, and M. Olivucci. 2012. The molecular mechanism of thermal noise in rod photoreceptors. *Science*. 337: 1225–1228
79. Gross O. P., Pugh E. N., Burns M. E. Spatiotemporal cGMP dynamics in living mouse rods // *Biophysical journal*. – 2012. – V. 102. – №. 8. – P. 1775-1784.
80. Hamer, R. D., Nicholas, S. C., Tranchina, D., Lamb, T. D., Jarvinen, J. L. P. Toward a unified model of vertebrate rod phototransduction // *Visual neuroscience*. – 2005. – V. 22. – №. 04. – P. 417-436.
81. Hárosi, F. I. Absorption spectra and linear dichroism of some amphibian photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 1975, 66, 357-382.
82. Hárosi FI, Kleinschmidt J Visual pigments in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Vis Neurosci*. 1993. 10(4):711-715.
83. Hestrin S., Korenbrot J. I. Activation kinetics of retinal cones and rods: response to intense flashes of light // *Journal of Neuroscience*. – 1990. – V. 10. – №. 6. – P. 1967-1973.
84. Hisatomi, O., Ishikawa, M., Tonosaki, A. & Tokunaga, F. Characterization of lamprey rhodopsin by isolation from lamprey retina and expression in mammalian cells. *Photochem Photobiol.* 1997 .66, 792–5.
85. Hisatomi, O.; Takahashi, Y.; Taniguchi, Y.; Tsukahara, Y.; Tokunaga, F. Primary structure of a visual pigment in bullfrog green rods. *FEBS Lett.* **1999**, 447, 44–48.
86. Hofmann KP Late photoproducts and signaling states of bovine rhodopsin. In: Stavenga DG, DeGrip WJ, Pugh EN Jr (eds) *Handbook of Biological Physics*, vol 3, chapter 3. 2000. Elsevier Science B.V., North Holland, pp 91-142.

87. Hubbard R., Wald G. Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system // *The Journal of general physiology*. - 1952. - V. 36. - P. 269-315.
88. Imai H., Imamoto Y., Yoshizawa T., Shichida Y. Difference in molecular properties between chicken green and rhodopsin as related to the functional difference between cone and rod photoreceptor cells // *Biochemistry*. - 1995. - V. 34. - P. 10525-10531.
89. Imai, H., Kojima, D., Oura, T., Tachibanaki, S., Terakita, A., Shichida, Y. Single amino acid residue as a functional determinant of rod and cone visual pigments // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94. – №. 6. – P. 2322-2326.
90. Imai H, Kuwayama S, Onishi A, Morizumi T, Chisaka O, Shichida Y Molecular properties of rod and cone visual pigments from purified chicken cone pigments to mouse rhodopsin in situ. *Photochem Photobiol*. 2005. Sci 4:667–674
91. Kawakami N., Kawamura S. Difference in the gain in the phototransduction cascade between rods and cones in carp // *Journal of Neuroscience*. – 2014. – V. 34. – №. 44. – P. 14682-14686.
92. Karpen, J. W., Zimmerman, A. L., Stryer, L., Baylor, D. A. Gating kinetics of the cyclic-GMP-activated channel of retinal rods: flash photolysis and voltage-jump studies // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – V. 85. – №. 4. – P. 1287-1291.
93. Knowles A, Dartnall HJA The photobiology of vision. In: Davson H (ed) *The Eye*. 1977. vol 2B. Academic Press, London-New York, pp 53-101
94. Knowles A., Pepe I.M. Can metarhodopsin I activate rod outer segment phosphodiesterase? // *Cell Biophysics*. - 1988. - V. 13. - P. 43-53.
95. Kojima D., Oura T., Hisatomi O., Tokunaga F., Fukada Y., Yoshizawa T., Shichida Y. Molecular properties of chimerical mutants of gecko blue and bovine rhodopsin // *Biochemistry*. - 1996. - V. 35. - P. 2625-2629.
96. Kojima, K; Matsutani, Y, Yamashita, T; Yanagawa, M; Imamoto, Y; Yamano, Y; Wada, A; Hisatomi, O; Nishikawa, K; Sakurai, K; Shichida, Y. Adaptation of

- cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017, 114, 5437-5442.
97. Kojima, K., Matsutani, Y., Yanagawa, M., Imamoto, Y., Yamano, Y., Wada, A., Shichida Y., Yamashita, T. Evolutionary adaptation of visual pigments in geckos for their photic environment // *Science Advances*. – 2021. – V. 7. – №. 40. – P. eabj1316.
98. Kolesnikov AV, Ala-Laurila P, Shukolyukov SA, Crouch RK, Wiggert B, Estevez ME, Govardovskii VI, Cornwall MC. Visual cycle and its metabolic support in gecko photoreceptors // *Vision research*. – 2007. – V. 47. – №. 3. – P. 363-374.
99. Kolesnikov A. V., Golobokova E. Y., Govardovskii V. I. The identity of metarhodopsin III // *Visual neuroscience*. – 2003. – V. 20. – №. 3. – P. 249-265.
100. Koshitani Y., Tachibanaki S., Kawamura S. Quantitative aspects of cGMP phosphodiesterase activation in carp rods and cones // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – №. 5. – P. 2651-2657.
101. Koutalos Y., Nakatani K., Yau K. W. Cyclic GMP diffusion coefficient in rod photoreceptor outer segments // *Biophysical journal*. – 1995. – V. 68. – №. 1. – P. 373-382.
102. Kühn H., Wilden U. Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin // *Journal of receptor research*. - 1987. - V. 7. - P. 283-298.
103. Lagman D., Franzen I.E., Eggert J., Larhammar D., Abalo X.M., Evolution and expression of the phosphodiesterase 6 genes unveils vertebrate novelty to control photosensitivity, *BMC. Evol. Biol.* 16 (2016) 124.
104. Lagnado L., McNaughton P.A. Electrogenic properties of the Na:Ca exchange // *The Journal of membrane biology*. - 1990. - V. 113. - P. 177-191.
105. Lamb T. D. Stochastic simulation of activation in the G-protein cascade of phototransduction // *Biophysical journal*. – 1994. – V. 67. – №. 4. – P. 1439-1454.
106. Lamb T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina // *Progress in retinal and eye research*. – 2013. – V. 36. – P. 52-119.

107. Lamb T. D. Evolution of the genes mediating phototransduction in rod and cone photoreceptors //Progress in retinal and eye research. – 2020. – V. 76. – P. 100823.
108. Lamb T. D., McNaughton P. A., Yau K. W. Spatial spread of activation and background desensitization in toad rod outer segments //The Journal of Physiology. – 1981. – V. 319. – №. 1. – P. 463-496.
109. Lamb T. D., Pugh Jr E. N. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors //The Journal of Physiology. – 1992. – V. 449. – P. 719
110. Lamb T.D., Pugh E.N. Jr. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration. The Proctor Lecture // Investigative ophthalmology & visual science. – 2006. – V. 47. – P. 5138–5152.
111. Lamb, T.D., M. Heck, and T.W. Kraft. 2018. Implications of dimeric activation of PDE6 for rod phototransduction. Open Biol. 8:180076.
112. Lasater E.M., Dowling J.E. Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1982. - V. 79. - P. 936-940.
113. Laties AM, Bok D, Liebman P Procion yellow: a marker dye for outer segment disc patency and for rod renewal. Exp. Eye Res. 1976. 23(2):139-148
114. Leskov I.B., Klenchin V.A., Handy J.W., Whitlock G.G., Govardovskii V.I., Bownds M.D., Lamb T.D., Pugh E.N. Jr., Arshavsky V.Y. The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements // Neuron. - 2000. - V. 27. -P. 525-537.
115. Liebman P.A. Microspectrophotometry of photoreceptors // Handbook of sensory physiology. photochemistry of vision, ed. Dartnall H.J.A. - Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag. -1972. - V. 7/1. - P. 481-528.
116. Liebman P.A., Parker K.R., Dratz E.A. The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment // Review. - Ann. Rev. Physiol. - 1987. - V. 49. - P. 765-791.

117. Loew ER, Govardovskii VI, Röhlich P, Szell A Microspectrophotometric and immunocytochemical identification of ultraviolet photoreceptors in geckos. *Visual Neurosci.* 1996. 13(2):247-256
118. Luo, D.G.; Yue, W.W.; Ala-Laurila, P.; Yau, K.W. Activation of visual pigments by light and heat. *Science.* 2011, 332, 1307-1312.
119. Lyubarsky, A.; Nikonov, S.; Pugh, E. N. Jr.. The kinetics of inactivation of the rod phototransduction cascade with constant Ca(2+) i. *J. Gen. Physiol.* **1996**, 107, 19-34.
120. Ma, J.; Znoiko, S.; Othersen, K. L.; Ryan, J. C.; Das J.; Isayama, T.; Kono, M.; Oprian, D.D.; Corson, W.D.; Cornwall M.C.; Cameron, D.A.; Harosi, F.I.; Makino C. L.; Crouch R.K. A visual pigment expressed in both rod and cone photoreceptors. *Neuron.* **2001**, 32, 451-461.
121. Makino C.L., Dodd R.L., Burns M.E., Roca A., Simon M.I., Baylor D.A. Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods // *The journal of general physiology.* - 2004. - V. 123. - P. 729–741.
122. Matthews G. Physiological characteristics of single green rod photoreceptors from toad retina // *The Journal of physiology.* – 1983. – V. 342. – №. 1. – P. 347-359.
123. Matthews G. Dark noise in the outer segment membrane current of green rod photoreceptors from toad retina // *The Journal of physiology.* – 1984. – V. 349. – №. 1. – P. 607-618.
124. Matthews R.G., Hubbard R., Brown P.K., Wald G. Tautomeric forms of metarhodopsin // *The Journal of general physiology.* - 1963. - V. 47. - P. 215-240.
125. Maximov VV, Orlov OY, Reuter T Chromatic properties of the retinal afferents in the thalamus and the tectum of the frog (*Rana temporaria*). *Vis Res.* 1985. 25:1037–1049
126. Miller W. H., Snyder A. W. Optical function of myoids // *Vision Research.* – 1972. – V. 12. – №. 11. – P. 1841-1848.
127. Mohun, S. M.; Davies, W. I. L. The evolution of amphibian photoreception. *Front. Ecol. Evol.* **2019**, 7, 321.

128. Molday R. S., Kaupp U. B. Ion channels of vertebrate photoreceptors //Handbook of Biological Physics. – 2000. – V. 3. – P. 143-181.
129. Morshedian A, Fain GL (2015) Single-photon sensitivity of lamprey rods with cone-like outer segments. *Curr Biol* 25(4):484-487.
130. Morshedian A, Fain GL (2017) Light adaptation and the evolution of vertebrate photoreceptors. *J Physiol* 595(14):4947-4960.
131. Morshedian A, Toomey MB, Pollock GE, Frederiksen R, Enright JM, McCormick SD, Cornwall MC, Fain GL, Corbo JC Cambrian origin of the CYP27C1-mediated vitamin A1-to-A2 switch, a key mechanism of vertebrate sensory plasticity. *R Soc Open Sci.* 2017. 4(7):70362
132. Muntz, W. R. A.; Reuter, T. Visual pigments and spectral sensitivity in *Rana temporaria* and other European tadpoles. *Vis. Res.* 1966, 6, 601-618.
133. Muradov H., Boyd K. K., Artemyev N. O. Rod phosphodiesterase-6 PDE6A and PDE6B subunits are enzymatically equivalent //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 51. – P. 39828-39834.
134. Muradov H., Boyd K.K., Kerov V., Artemyev N.O., PDE6 in lamprey *Petromyzon marinus*: implications for the evolution of the visual effector in vertebrates, *Biochemistry* 46. 2007. 9992–10000.
135. Muradov H, Kerov V, Boyd KK, Artemyev NO Unique transducins expressed in long and short photoreceptors of lamprey *Petromyzon marinus*. *Vision Res.* 2008. 48(21):2302-2308
136. Nakatani K., Yau K. W. Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment //The Journal of Physiology. – 1988. – V. 395. – P. 695.
137. Nathans J. The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments // *Neuron.* - 1999. - V. 24. - P. 299–312.
138. Nikolaeva D. A., Astakhova L. A., Firsov M. L. The effects of dopamine and dopamine receptor agonists on the phototransduction cascade of frog rods //Molecular vision. – 2019. – V. 25. – P. 400.

139. Nilsson, S.E.G. An electron microscopic classification of the retinal receptors of the leopard frog (*Rana pipiens*). *J. Ultrastruct. Res.* **1964**, 10, 390–416.
140. Nymark, S., Heikkinen, H., Haldin, C., Donner, K., Koskelainen, A. Light responses and light adaptation in rat retinal rods at different temperatures //The Journal of physiology. – 2005. – V. 567. – №. 3. – P. 923-938.
141. Ohguro, H., Fukada, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Yoshizawa, T., Akino, T. Carboxyl methylation and farnesylation of transducin gamma-subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II //The EMBO journal. – 1991. – V. 10. – №. 12. – P. 3669.
142. Öhman P (1971) The photoreceptor outer segments of the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*). An electron- fluorescence- and light microscopic study. *Acta Zoologica* 52:287-297
143. Öhman P (1976) Fine structure of photoreceptors and associated neurons in the retina of *Lampetra fluviatilis* (Cyclostomi). *Vision Res* 16(6):659-662
144. Palczewski K. G protein-coupled receptor rhodopsin. //Annu Rev Biochem. 2006;75:743-67.
145. Palczewski K., Buczyłko J., Imami N.R., McDowell J.H., Hargrave P.A. Role of the carboxyl-terminal region of arrestin in binding to phosphorylated rhodopsin // The Journal of biological chemistry. - 1991. - V. 266. - P. 15334-15339.
146. Pedler C, Tilly R The nature of the gecko visual cell. A light and electron microscopic study. *Vision Res.* 1964. 4(10):499-510
147. Pinto BJ, Nielsen SV, Gamble T Transcriptomic data support a nocturnal bottleneck in the ancestor of gecko lizards. *Mol Phylogenet Evolution.* 2019. 141:106639
148. Pisani D, Mohun SM, Harris SR, MacInerney JO, Wilkinson M Molecular evidence for dim-light vision in the last common ancestor of the vertebrates. *Curr Biology.* 2006. 16(9):R318-R319
149. Pugh Jr E. N., Lamb T. D. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1993. – V. 1141. – №. 2-3. – P. 111-149.

150. Pugh Jr E. N., Lamb T. D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation //Handbook of biological physics. – North-Holland, 2000. – V. 3. – P. 183-255.
151. Lamb T. D., Pugh E. N. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture //Investigative ophthalmology & visual science. – 2006. – V. 47. – №. 12. – P. 5138-5152.
152. Rao VR, Oprian DD. Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors.// Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1996;25:287-314.
153. Raport, C. J., Lem, J., Makino, C., Chen, C. K., Fitch, C. L., Hobson, A., Baylor, D., Simon, M. I., Hurley, J. B. Downregulation of cGMP phosphodiesterase induced by expression of GTPase-deficient cone transducin in mouse rod photoreceptors //Investigative ophthalmology & visual science. – 1994. – V. 35. – №. 7. – P. 2932-2947.
154. Reuter, T. E.; White, R. H.; Wald, G. Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. J. Gen. Physiol. 1971, 58, 351-371.
155. Rieke, F.; Baylor, D. A. Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. *Biophys. J.* **1998**, 75, 1836-1857.
156. Rieke, F., Baylor D.A. Origin and functional impact of dark noise in retinal cones. *Neuron.* **2000**, 26, 181–186.
157. Robinson W.E., Gordon-Walker A., Bownds D. Molecular weight of frog rhodopsin // Nature: New biology. - 1972. - V. 235. - P. 112–114.
158. Röhl B Gecko vision - visual cells, evolution, and ecological constraints. J Neurocytol. 2000. 29(7):471-484
159. Ross E.M., Wilkie T.M. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins // Annual review of biochemistry. - 2000. - V. 69. - P. 795-827.
160. Rotov A. Y. et al. Origins of the phototransduction delay as inferred from stochastic and deterministic simulation of the amplification cascade //Molecular Vision. – 2017. – T. 23. – C. 416.

161. Sakurai K Physiological characteristics of photoreceptors in the lamprey, *Lethenteron japonicum*. 2017. *Zoolog Sci* 34(4):326-330
162. Sakurai, K.; Onishi A.; Imai H.; Chisaka O.; Ueda Y.; Usukura J.; Nakatani K.; Shichida Y. Physiological Properties of Rod Photoreceptor Cells in Green-sensitive Cone Pigment Knock-in Mice. *J. Gen. Physiol.* **2007**, 130, 21–40.
163. Schott RK, Bhattacharyya N, Chang BSW Evolutionary signatures of photoreceptor transmutation in geckos reveal potential adaptation and convergence with snakes. *Evolution*. 2019. 73(9):1958-1971
164. Shi G.; Yau, K.-W.; Chen, J.; Kefalov, V.J. Signaling properties of a short-wave cone visual pigment and its role in phototransduction. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 10084–10093.
165. Sokolov, M., Lyubarsky, A. L., Strissel, K. J., Savchenko, A. B., Govardovskii, V. I., Pugh, E. N., Arshavsky, V. Y. Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation // *Neuron*. – 2002. – V. 34. – №. 1. – P. 95-106.
166. Tachibanaki S., Arinobu D., Shimauchi-Matsukawa Y., Tsushima S., Kawamura S. Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-activated visual pigment in cones // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9329–9334.
167. Tachibanaki S., Tsushima S., Kawamura S. Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 14044–14049.
168. Tachibanaki, S., Yonetsu, S. I., Fukaya, S., Koshitani, Y., Kawamura, S. Low activation and fast inactivation of transducin in carp cones // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – №. 49. – P. 41186-41194.
169. Tang L., Ebrey T.G., Subramaniam S. Sequences and structures of retinal proteins // *Israel Journal of Chemistry*. – 1995. – V. 35. – P. 193–209.
170. Tretjakoff DK (1916) Sense organs of the river lamprey. *Transactions of Novoross Univ, Phys Mat Fac* 8, Odessa.

171. Vinberg F., Chen J., Kefalov V. J. Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. *Prog. Retin. Eye Res.* 67: 87-101. 2018.
172. Wald G. The metamorphosis of visual systems in the sea lamprey. *J Gen Physiol.* 1957. 40 (6):901-914.
173. Wald G. The molecular basis of visual excitation // *Nature.* - 1968. - V. 219. - P. 800-807.
174. Walls G. L. The Reptilian Retina: I. A new concept of visual-cell evolution // *American journal of ophthalmology.* – 1934. – V. 17. – №. 10. – P. 892-915.
175. Walls G. L. *The Vertebrate Eye and Its Adaptive Radiation* // Bloomfield Hills, Mich.: Cranbrook Institute of Science. – 1942. – 785 PP.
176. Wang, T., Reingruber, J., Woodruff, M. L., Majumder, A., Camarena, A., Artemyev, N. O., Fain, G. L., Chen, J. The PDE6 mutation in the rd10 retinal degeneration mouse model causes protein mislocalization and instability and promotes cell death through increased ion influx // *Journal of Biological Chemistry.* – 2018. – V. 293. – №. 40. – P. 15332-15346.
177. Warrington, R.E., Davies, W.I., Hemmi, J.M., Hart, N.S., Potter, I.C., Collin, S.P., Hunt, D.M. Visual opsin expression and morphological characterization of retinal photoreceptors in the pouched lamprey (*Geotria australis*, Gray) // *Journal of Comparative Neurology.* – 2021. – T. 529. – №. 9. – C. 2265-2282.
178. Whitlock G. G.; Lamb T. D. Variability in the time course of single photon responses from toad rods: termination of rhodopsin's activity. *Neuron.* 1999, 23, 337-351.
179. Xu, J., Dodd, R. L., Makino, C. L., Simon, M. I., Baylor, D. A., Chen, J. Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin // *Nature.* – 1997. – V. 389. – №. 6650. – P. 505-509.
180. Yanagawa M. et al. Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore // *Scientific reports.* – 2015. – V. 5. – №. 1. – P. 11081.
181. Yau K.W., Nakatani K. Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment // *Nature.* - 1985. - V. 313. - P. 579-582.

182. Yokoyama S Molecular Evolution of Vertebrate Visual Pigments. *Prog in Retin Eye Res.* 2000. 19(4):385-419
183. Yokoyama S., Blow N. S. Molecular evolution of the cone visual pigments in the pure rod-retina of the nocturnal gecko, *Gekko gekko* // *Gene.* – 2001. – V. 276. – №. 1-2. – P. 117-125.
184. Yoshizawa T. Molecular basis for color vision // *Review.* – *Biophys. Chem.* – 1994. – V. 50. – P. 17–24.
185. Yoshizawa T., Shichida Y. Low-temperature circular dichroism of intermediates of rhodopsin // *Methods Enzymol.* – 1982. – V. 81. – 634–641.
186. Young RW A difference between rods and cones in the renewal of outer segment protein. *Invest Ophthalmol.* 1969. 8(2):222-231
187. Yovanovich, C.A.; Koskela, S.M.; Nevala, N.; Kondrashev, S.L.; Kelber, A.; Donner, K. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2017**, 372, 20160066
188. Yue, W. W. S., Frederiksen, R., Ren, X., Luo, D. G., Yamashita, T., Shichida, Y., Cornwall M. C., Yau, K. W. Spontaneous activation of visual pigments in relation to openness/closedness of chromophore-binding pocket. *Elife*, .2017. 6, e18492.
189. Zhang X., Wensel T. G., Kraft T. W. GTPase regulators and photoresponses in cones of the eastern chipmunk // *Journal of Neuroscience.* – 2003. – V. 23. – №. 4. – P. 1287-1297.
190. Zhang X., Wensel T. G., Yuan C. Tokay gecko photoreceptors achieve rod-like physiology with cone-like proteins // *Photochemistry and photobiology.* – 2006. – V. 82. – №. 6. – P. 1452-1460.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1: Математическая модель фотоответа

Для моделирования фотоответа использовалась модель, представляющая собой систему дифференциальных уравнений. Такая модель была разработана в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН, реализована в MathCad и описана в работе Астаховой с соавт., однако в ней активация PDE с помощью  $R^*$  считалась одноступенчатым процессом с некоторой постоянной задержкой и скоростью  $v_{RE}$  (Astakhova et al., 2015). Чтобы учесть многоступенчатый характер активации каскада, модель была дополнена уравнениями которые подробно описывают этапы каскада (уравнения (3)-(13) в основном тексте). Полная система дифференциальных уравнений включает три дополнительных, приведенных ниже:

$$\frac{dcG}{dt} = \alpha_{\min} + \frac{\alpha_{\max} - \alpha_{\min}}{1 + (Ca / K_{\text{cyc}})^{n_{\text{cyc}}}} - \left( \beta_{\text{dark}} + \frac{k_{\text{cat}}}{V_{\text{cyto}} N_{\text{Av}} \cdot 10^{-6}} PDE^* \right) \frac{cG}{cG + K_M}$$

(п1)

$$\frac{dCa}{dt} = \frac{1}{FB+1} \left( \frac{(1/2) \cdot f_{Ca} \cdot j_{cG} - j_{ex}}{\Phi \cdot V_{cyto}} - \frac{dCa_{Bslow}}{dt} \right)$$

(п2)

$$\frac{dCa_{Bslow}}{dt} = k_{+1} \cdot Ca \cdot (B_{max} - Ca_{Bslow}) - k_{-1} \cdot Ca_{Bslow}$$

(п3)

Здесь, уравнение (п1) описывает ход изменения концентрации cGMP - основного параметра, определяющего ток через катионные каналы фоторецептора. В нем первые два слагаемых отражают скорость нарастания концентрации cGMP за счет работы гуанилатциклазы, зависящей от концентрации внутриклеточного кальция (Ca), а последнее – скорость его убыли за счет работы фосфодиэстеразы. Здесь  $\alpha_{max/min}$  – максимальная и минимальная скорости синтеза cGMP, наблюдаемые при нулевом и максимально возможном значении концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в клетке, соответственно.  $K_{cyc}$  – константа, соответствующая такому значению концентрации ионов кальция, при которой скорость работы гуанилатциклазы составляет половину от максимальной (константа Михаэлиса).  $n_{cyc}$  – коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность связывания ионов  $Ca^{2+}$  с гуанилатциклазой. Для слагаемого, определяющего гидролиз cGMP:  $\beta_{dark}$  – минимальная скорость гидролиза cGMP, определяемая темновой активностью PDE,  $k_{cat}$  – каталитическая активности одной активированной субъединицы PDE,  $K_M$  – константа Михаэлиса для гидролиза cGMP фосфодиэстеразой. Множители  $V_{cyto}$  (объем наружного сегмента),  $N_{av}$  (число Авогадро) и  $10^{-6}$  нужны для перевода числа молекул PDE\* в их концентрацию в микромолях на литр. Два других уравнения описывают кальциевую обратную связь, регулирующую процесс инактивации каскада.

Искомую функцию – мембранный ток, текущий через наружный сегмент фоторецептора ( $j_M$ ) можно определить как сумму тока через CNGC ( $j_{cG}$ ) и обменного тока, обусловленного работой NCKX ( $j_{ex}$ ):

$$j_m = j_{cG} + j_{ex}$$

(п4)

Ток через cGMP-управляемые каналы определяется как:

$$j_{cG} = j_{cG \max} \frac{cG^{n_{cG}}}{cG^{n_{cG}} + K_{cG}^{n_{cG}}}$$

(п5)

где  $j_{cG \max}$  – максимальный ток через каналы, достигаемый при бесконечной концентрации cGMP,  $K_{cG}$  – константа Михаэлиса для связывания cGMP с каналами,  $n_{cG}$  – коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность связывания cGMP с каналами.

Ток через  $Na^+/Ca^{2+}$  обменник определяется внутриклеточной концентрацией ионов кальция, и описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$j_{ex}(t) = j_{exsat} \frac{Ca}{Ca + K_{ex}}$$

(п6)

где  $j_{exsat}$  – максимальный ток через обменник (при максимальной внутриклеточной концентрации кальция),  $K_{ex}$  – константа полунасыщения обменника ионами  $Ca^{2+}$ .

Как уже было указано, дифференциальные уравнения (п2)-(п3) характеризуют изменение концентрации свободных ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме наружного сегмента. В (п2) параметры  $\Phi$  (постоянная Фарадея) и  $V_{cyto}$  нужны для перевода числа заряженных частиц в их микромолярную концентрацию.  $f_{Ca}$  – вклад ионов  $Ca^{2+}$  в общий ток через CNGC. В цитоплазме наружного сегмента фоторецептора присутствует целый ряд соединений, способных связывать ионы кальция. Некоторые из них связывают его на короткие промежутки времени, организуя быстрый обмен ионов между связанным и свободным состояниями. Наличие таких веществ в цитоплазме учитывается с помощью множителя перед выражением в скобках в (п2), где FB – буферная сила «быстрого» Ca-буфера.

В цитоплазме имеются также буферные системы, которые связывают и освобождают кальций медленно. Для учета «медленного» Са-буфера введено дифференциальное уравнение (2.14). Здесь  $Ca_{Bslow}$  – концентрация ионов  $Ca^{2+}$ , связанных медленным Са-буфером,  $V_{max}$  – максимальная связывающая способность этого буфера,  $k_{\pm 1}$  – скорости связывания и освобождения ионов кальция.

Решение полной системы дифференциальных уравнений ((3)-(13) и (п1)-(п3)) и подстановка решений в выражения (2.15)-(2.17) позволяет, в конечном итоге, получить модельную кривую для тока, текущего через наружный сегмент фоторецептора ( $j_M$ ).

Для подгонки использовались экспериментальные фотоответы, нормированные на максимальную амплитуду насыщенного ответа, достижимую в данной клетке/препарате сетчатки. Модель успешно воспроизводила как записи тока одиночных клеток, так и рецепторный потенциал сетчатки. Начальные значения большинства параметров модели для палочек и колбочек были взяты из работы Астаховой с соавт. (Astakhova et al., 2015). Подгонка осуществлялась путем варьирования параметров модели вручную, а ее качество оценивалось путем вычисления коэффициента детерминации между экспериментальным и модельным ответами.