



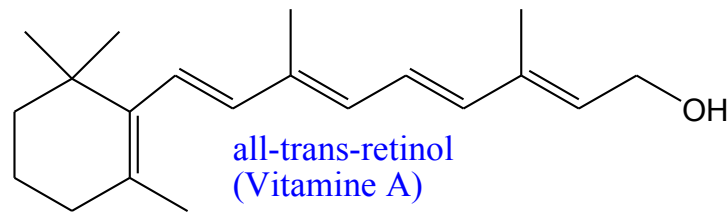
F5351 Základy molekulární biofyziky
Masarykova Univerzita
Podzimní semestr 2023

Vitamín A, biofyzika vidění

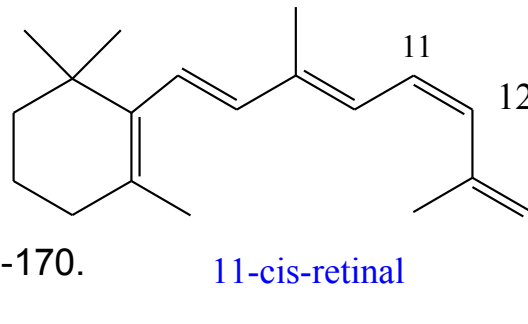
1.12.2023

Prof. Jiří Kozelka, Biofyzikální Laboratoř, Ústav fyziky kondenzovaných látek, PŘF MU, Kotlářská 2, kozelka.jiri@gmail.com

Vitamin A



Vitamín A je výchozí látkou pro syntézu 11-cis-retinalu, chromoforu, který používají téměř všechny organizmy k zachycování zrakových vjemů.



¹ Nakanishi, K. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 161-170.

11-cis-retinal je chromoforem, který používají jak tyčinky, tak čípky lidského oka k zachycení světelných vjemů. Při absorpci fotonu dojde k izomerizaci na trans-izomer. Tato reakce je sama o sobě energeticky výhodná ($\Delta G^0 = -4$ kcal/mol), avšak retinal je zakotven v proteinu zvaném opsin, který konformaci all-trans znevýhodňuje. Výhodná konformační změna retinalu je tedy spojena s energeticky nevýhodnou změnou konformace proteinu (výsledná ΔG^0 je přibližně +35 kcal/mol, proto je zapotřebí energie fotonu).¹ Relaxace této napjaté struktury nastartuje řadu signálních procesů, které vedou k elektrickému signálu v mozku.

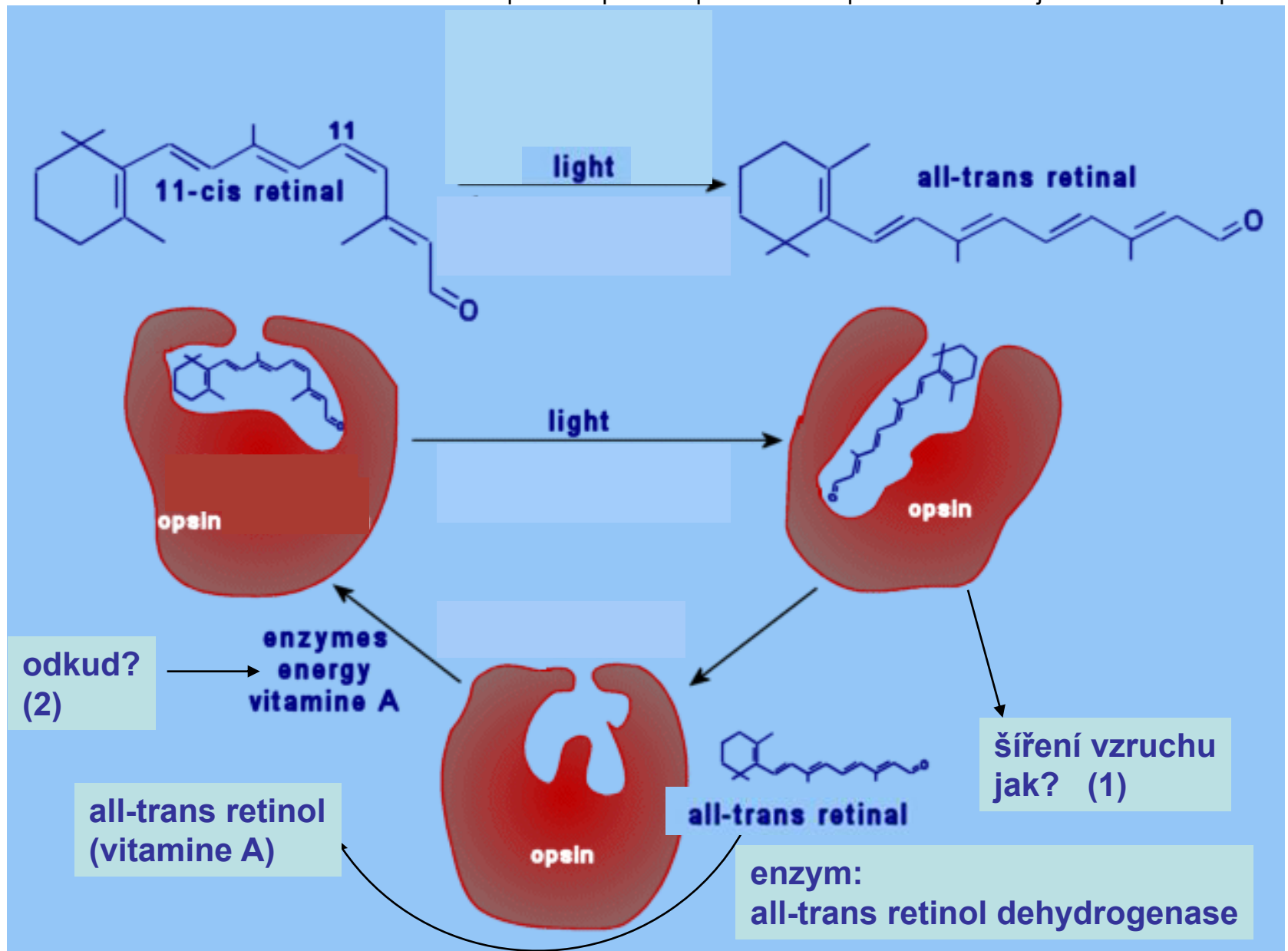
V dnešní přednášce se pokusíme objasnit tři problémy:

1. Jak probíhají první fáze přenosu světelného vzruchu?

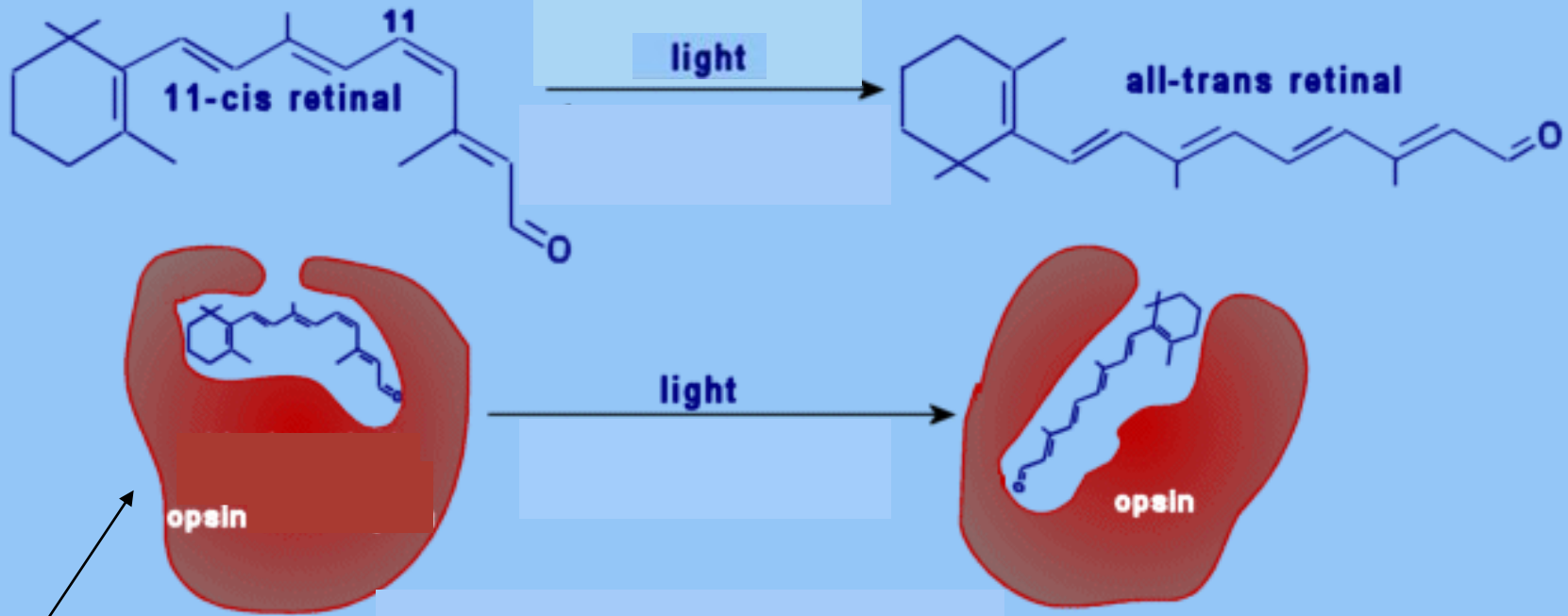
2. Odkud pochází energie k syntéze energeticky nevýhodné konformace 11-cis-retinalu?

Oxidací vitaminu A vzniká retinol ve své konformaci all-trans.

3. Jak je možné, že tentýž chromofor, 11-cis-retinal, který sám absorbuje v oblasti UV, slouží jako čidlo pro viditelné světlo, a to různých barev?



V tyčinkách i čípcích je 11-cis-retinal zakotven v proteinu zvaném opsin. Konformační změna vyvolaná absorpcí fotonu umožní připojení opsinu na G-protein transducin. To je první fáze signální kaskády.



Opsin + 11-cis-retinal = „oční pigment“ („visual pigment“)

Lidská sítnice obsahuje 4 různé oční pigmenty:

Rhodopsin v tyčinkách, $\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$ (krytalová struktura známa)

Jodopsin v čípcích

Červený, $\lambda_{\max} = 557 \text{ nm}$

Zelený, $\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$

Modrý, $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$

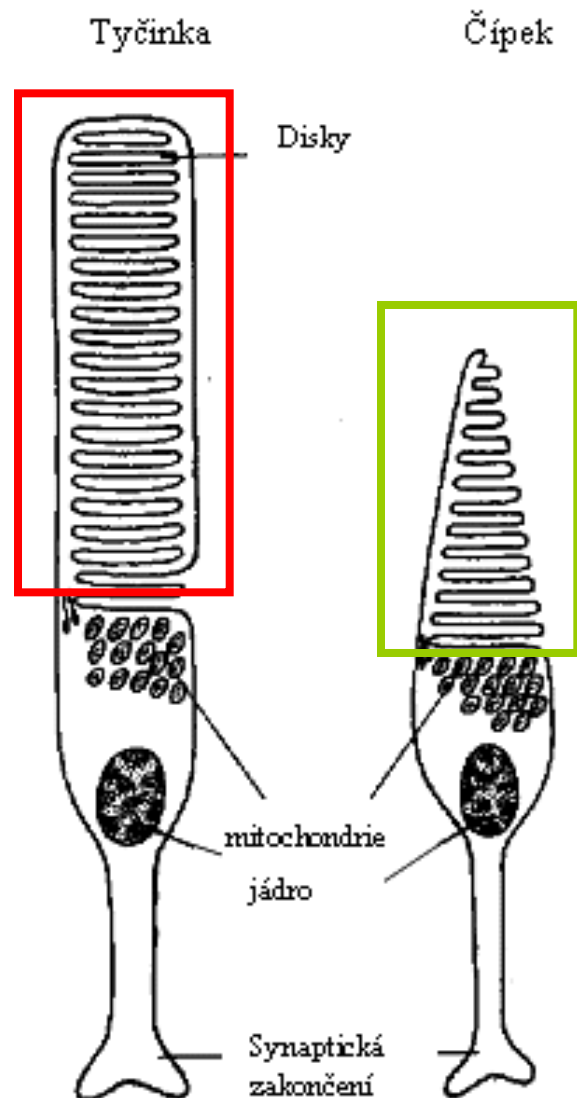
(struktura jodopsinů je podobná struktuře rhodopsinu, ale zatím přesně neurčena)

Většina studií mechanismu byla zatím věnována rhodopsinu.

**Jakým způsobem reguluje opsin vlnovou délku absorpce retinalu?
(3)**

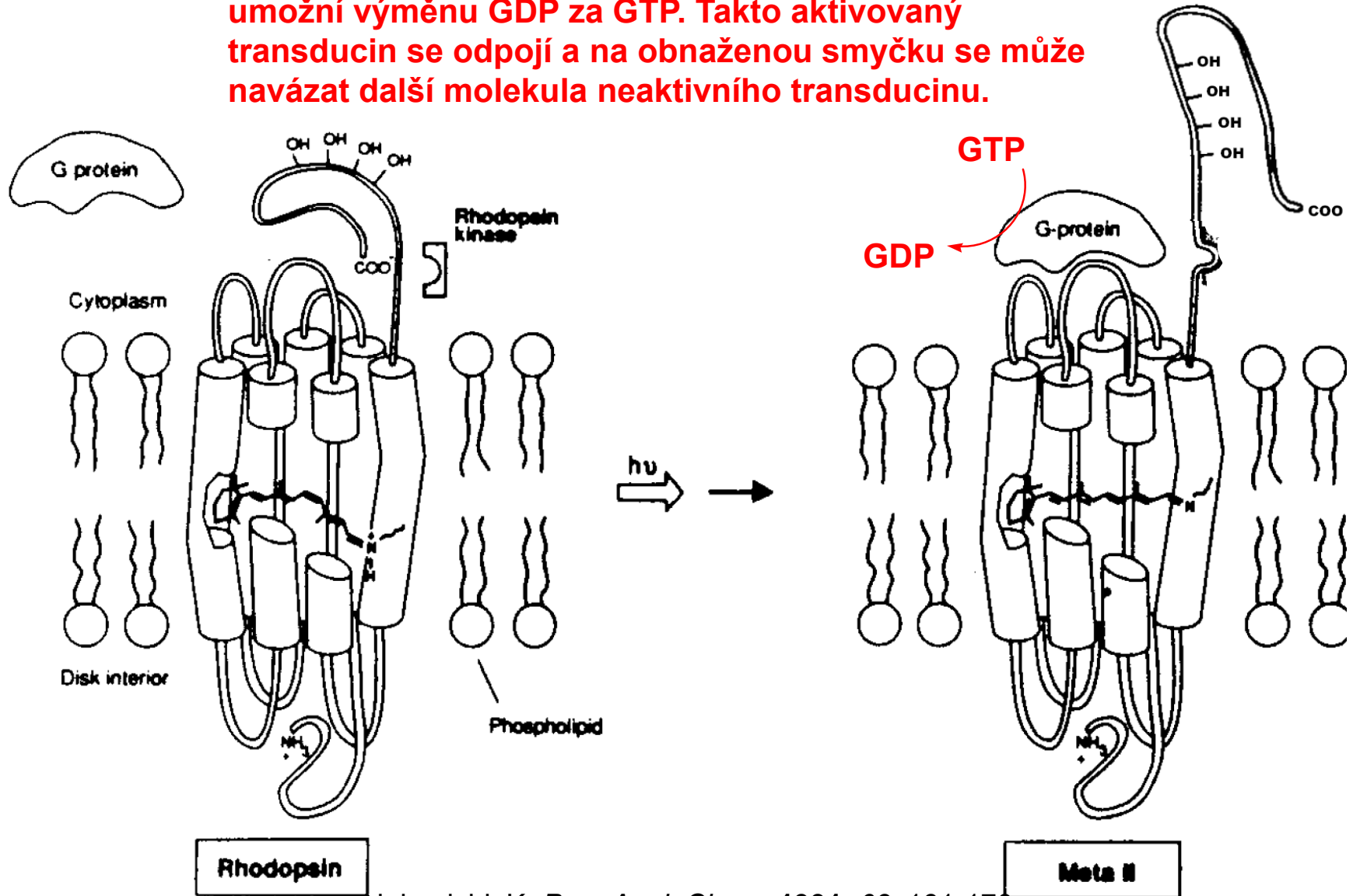
Rodopsin a jodopsiny jsou membránové proteiny

Rodopsin a jodopsiny jsou membránové proteiny. V tyčinkách je rodopsin zakotven v membráně **disků**, v čípcích jsou jodopsiny zakotveny v **průchozí plazmové membráně**



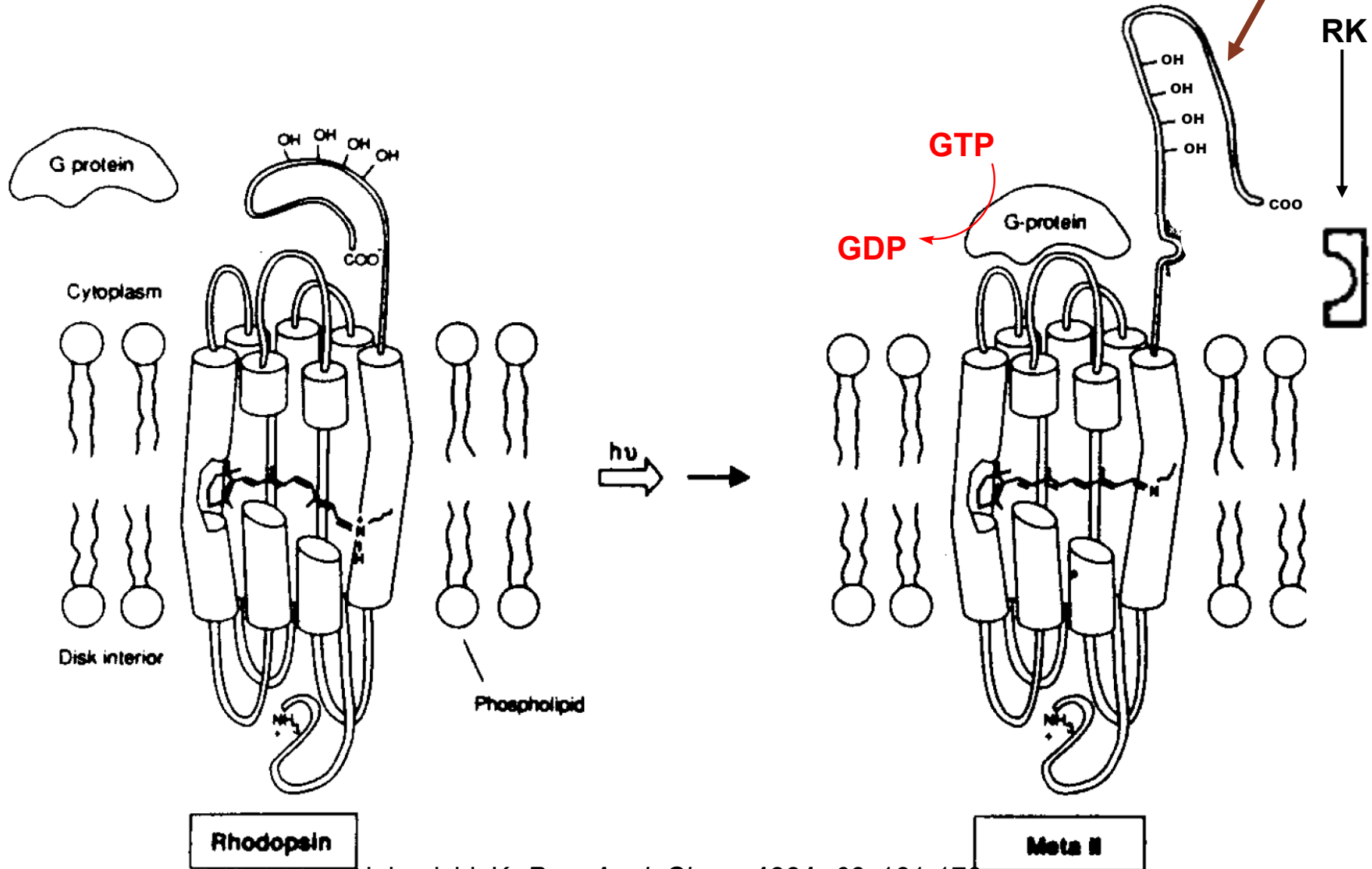
Konformační změna rodopsinu umožní vazbu s transducinem a jeho aktivaci.

Jako všechny G-proteiny obsahuje transducin vazebné místo pro GDP nebo GTP. V neaktivní formě je vázán na GDP. Vazba na aktivovanou formu rodopsinu („Meta II“) umožní výměnu GDP za GTP. Takto aktivovaný transducin se odpojí a na obnaženou smyčku se může navázat další molekula neaktivního transducinu.



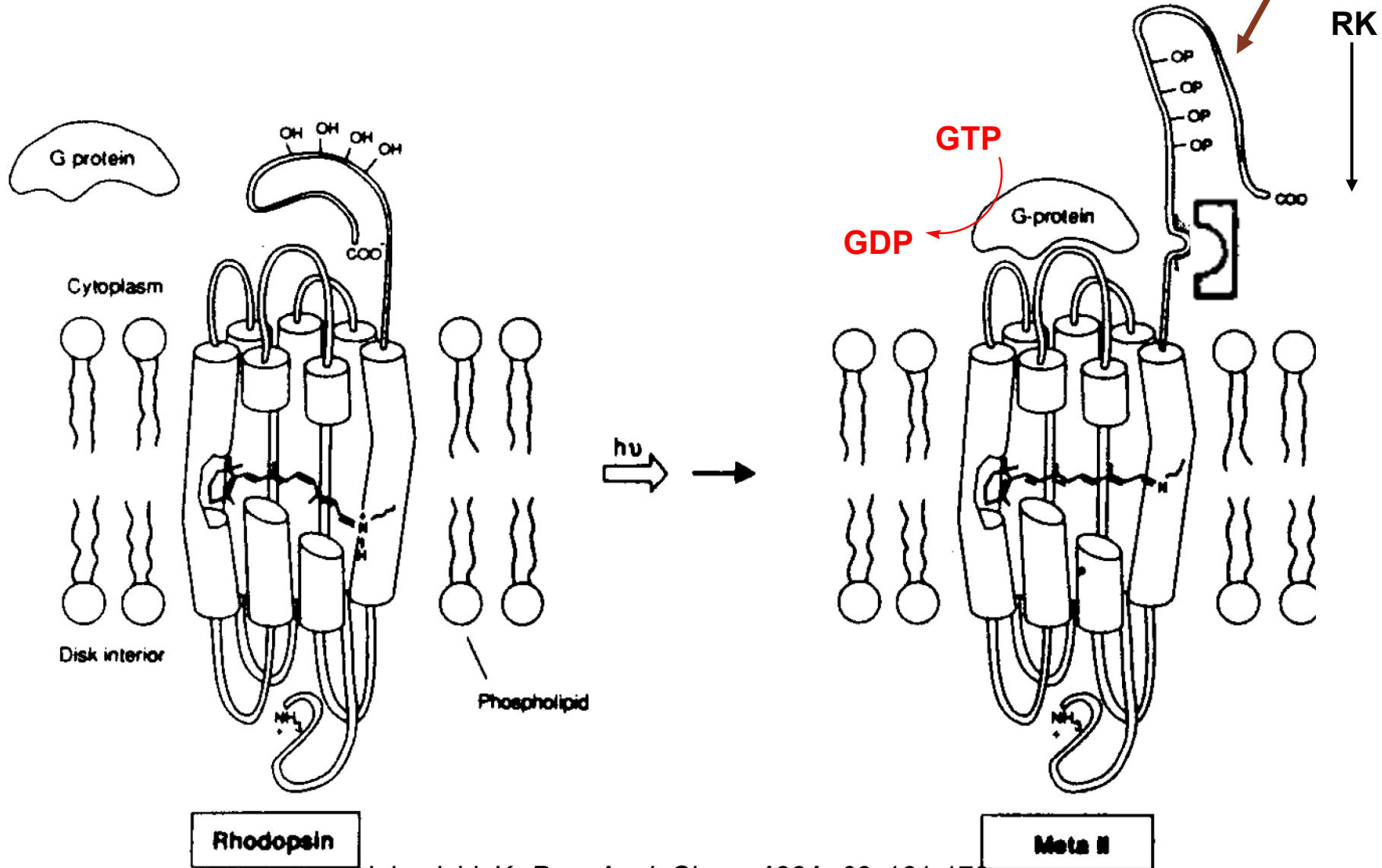
Konformační změna rodopsinu umožní vazbu s transducinem a jeho aktivaci.

Konformační změna rodopsinu vytvoří na carboxylovém terminálu vazebné místo pro rodopsin-kinázu (RK), která tam fosforyluje aminokyseliny serin a threonin.



Konformační změna rodopsinu umožní vazbu s transducinem a jeho aktivaci.

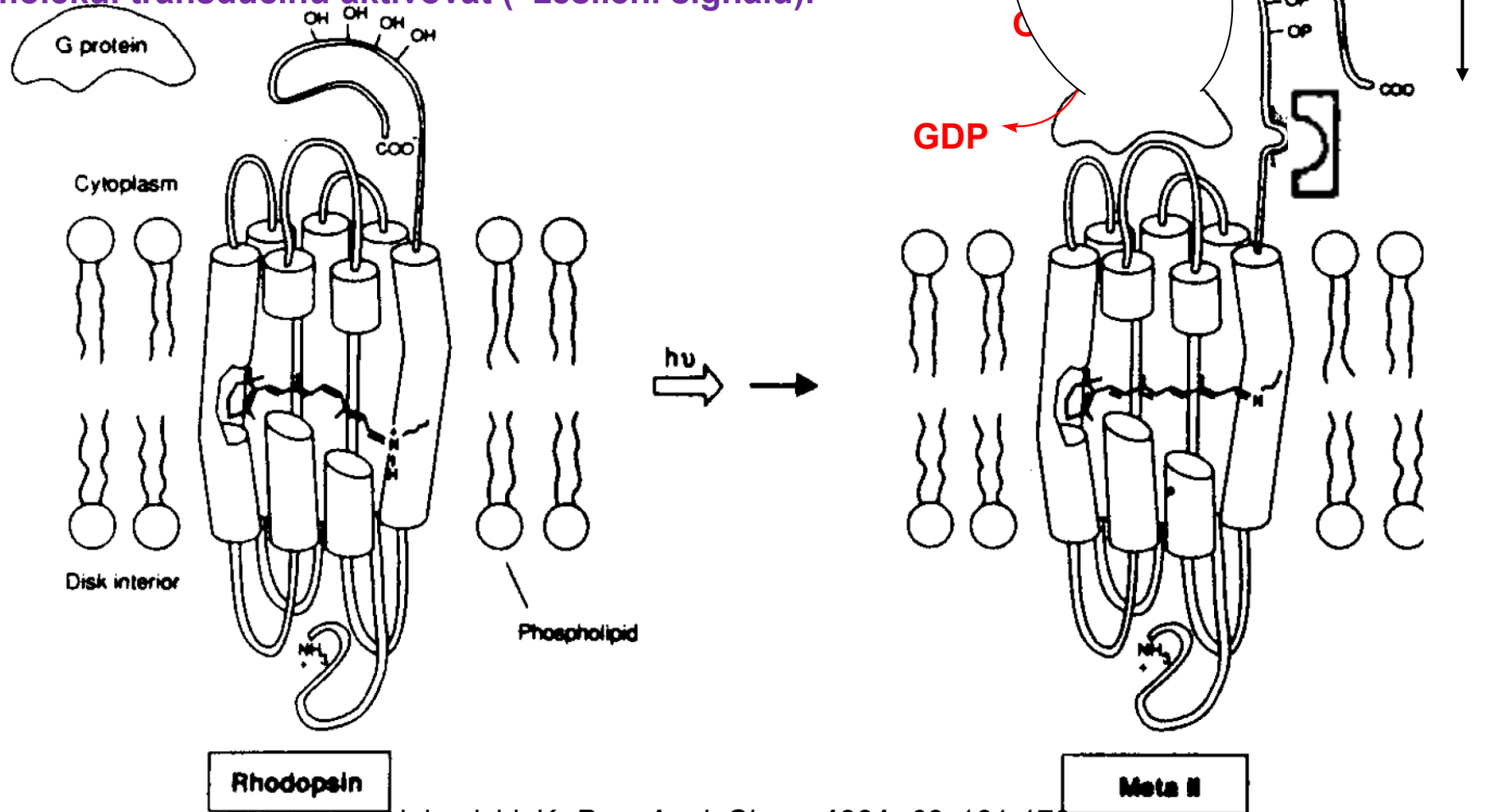
Konformační změna rodopsinu vytvoří na carboxylovém terminálu vazebné místo pro rodopsin-kinázu (RK), která tam fosforyluje aminokyseliny serin a threonin.

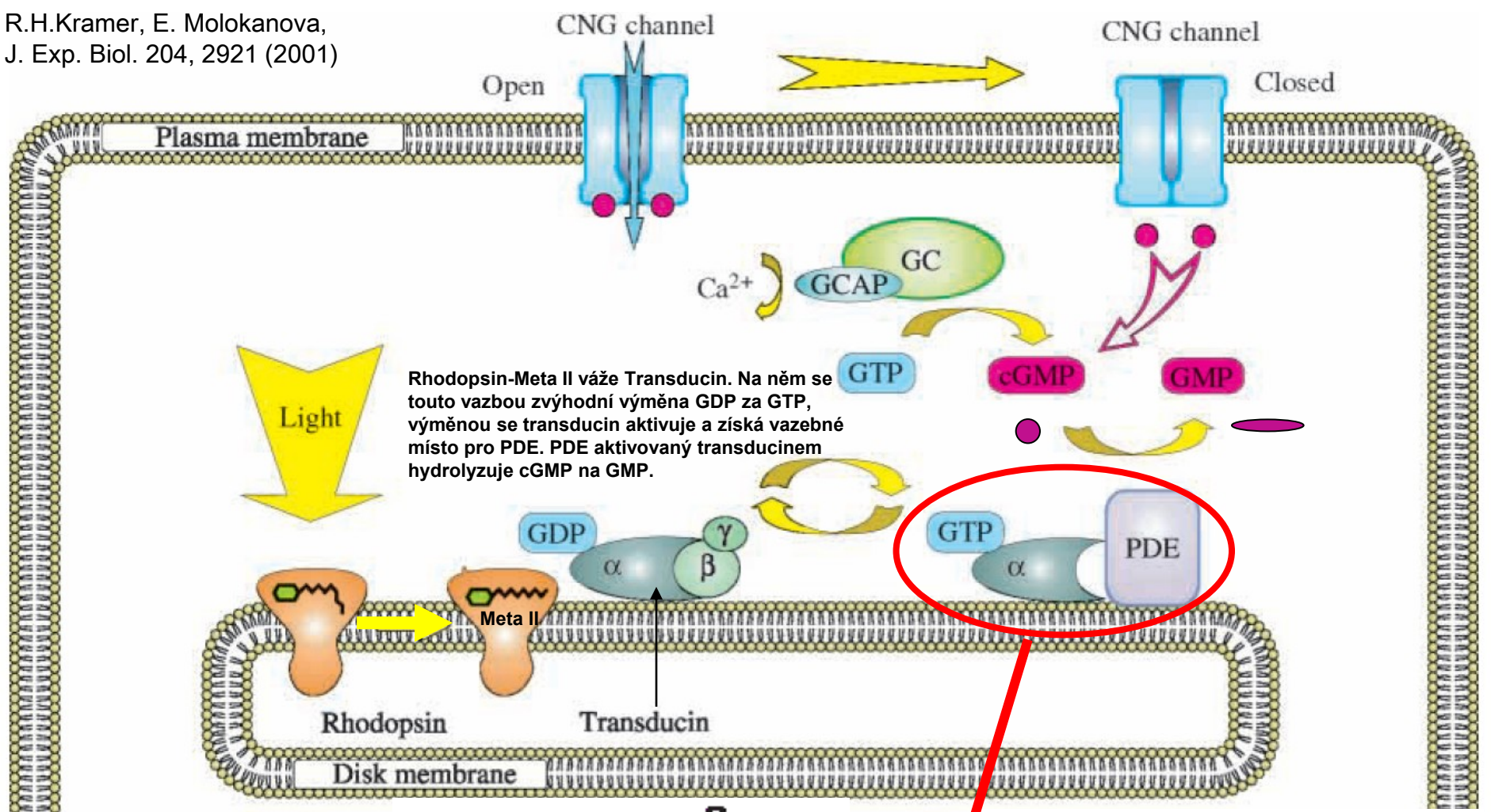


Konformační změna rodopsinu umožní vazbu s transducinem a jeho aktivaci.

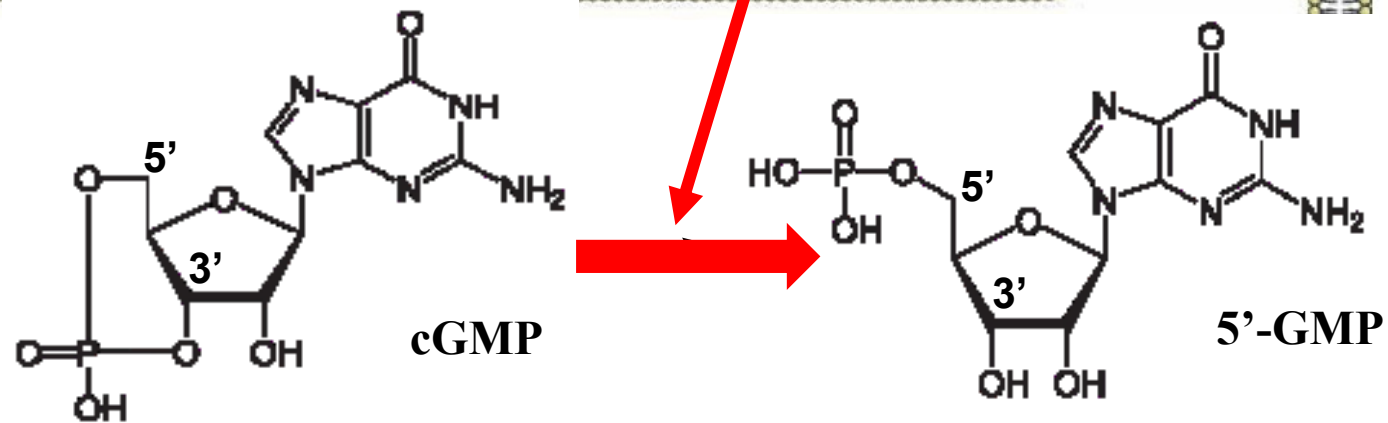
Konformační změna rodopsinu vytvoří na carboxylovém terminálu vazebné místo pro rodopsin-kinázu (RK), která tam fosforyluje aminokyseliny serin a threonin.

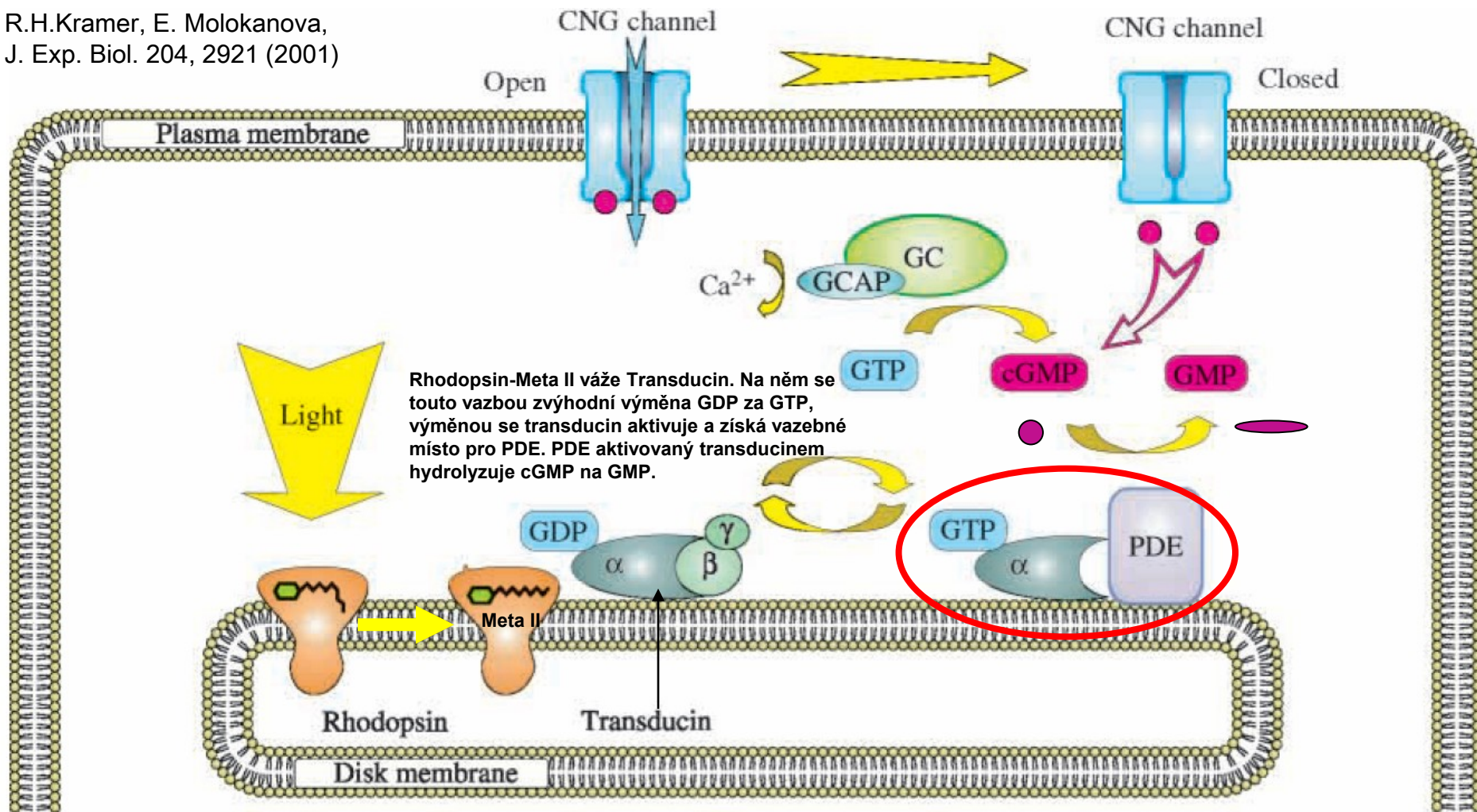
Fosforylovaná forma Meta II má vysokou afinitu pro protein arrestin, tento inhibitor zablokuje přístup dalším molekulám transducinu. Mezitím se ale stačilo ~100 molekul transducinu aktivovat (= zesílení signálu).





Rhodopsin-Meta II váže Transducin. Na něm se touto vazbou zvýhodní výměna GDP za GTP, výměnou se transducin aktivuje a získá vazebné místo pro PDE. PDE aktivovaný transducinem hydrolyzuje cGMP na GMP.

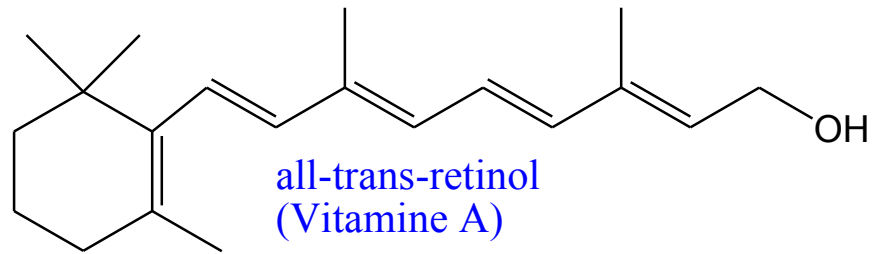




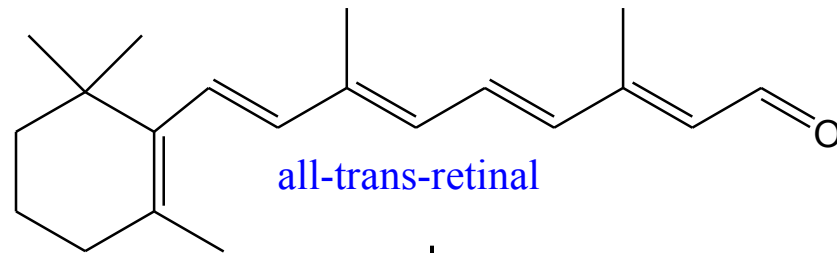
Při nedostatku cGMP (●) se uzavře „Cyclic nucleotide-gated channel“ (CNG channel) a stane neprůchodným pro kationty (Na⁺/K⁺/Ca²⁺), membrána se hyperpolarizuje. **To je signál, který se dále vede do mozku.**

Ochuzení ionty Ca²⁺ má další efekt: Ca²⁺ přestane bránit GCAP (Guanylate Cyclase-Activating Protein) v aktivaci enzymu Guanylate Cyclase (GC), ten tak znovu začne produkovat cGMP, což světelný vzruch ukončí.

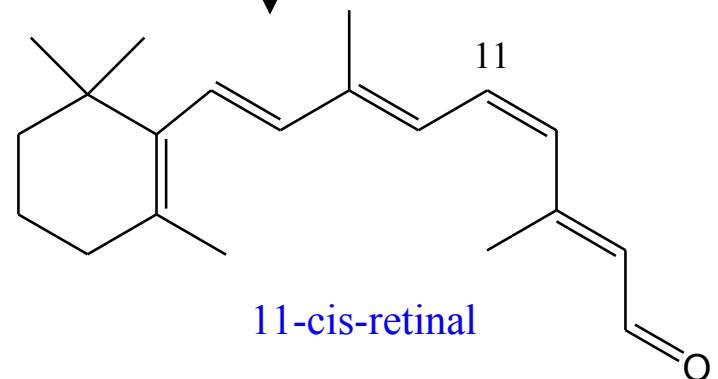
Jak je tvořen cis-11-retinal z vitamínu A?



Oxidace



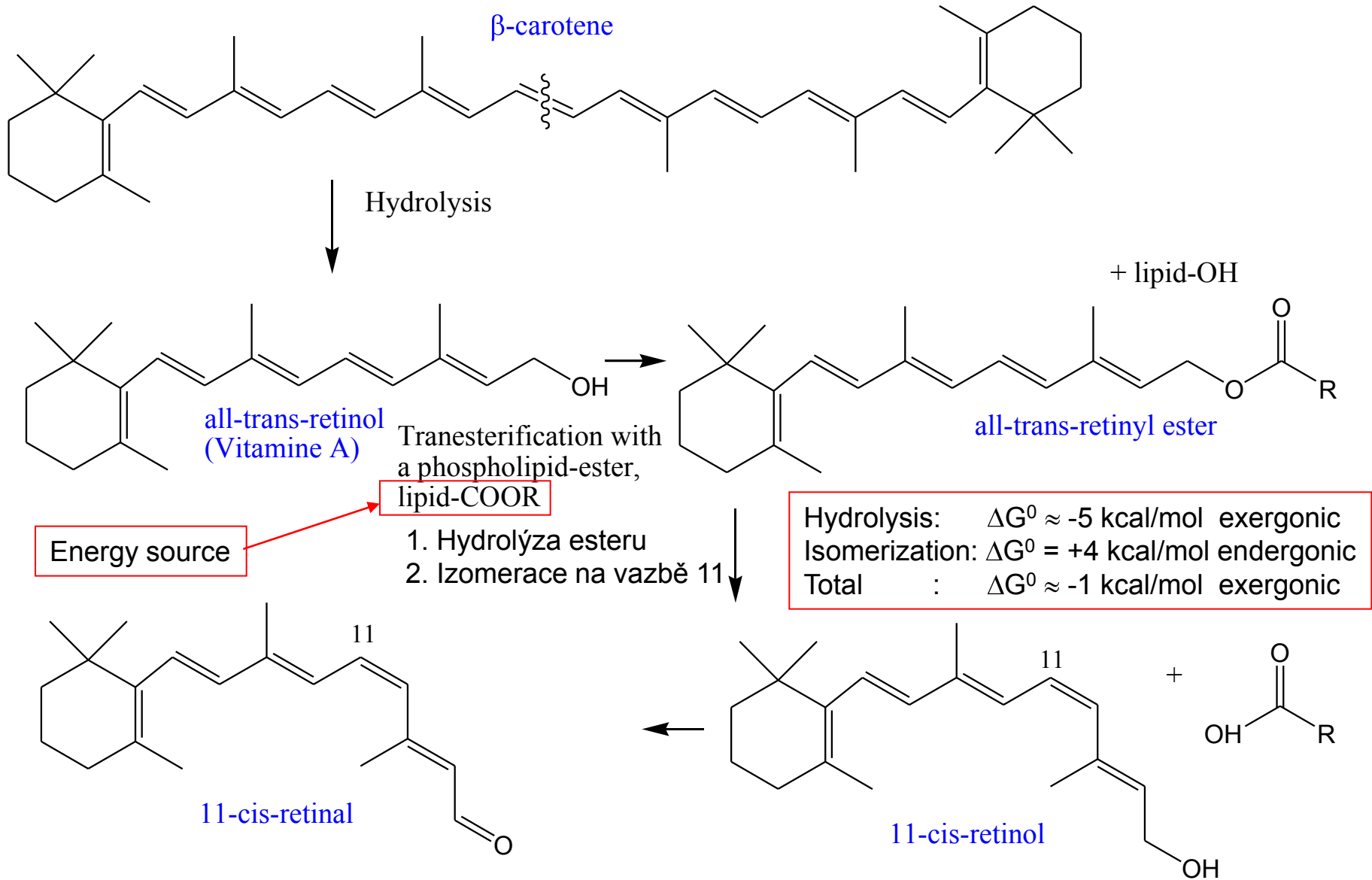
$\Delta G^0 = +4$ kcal/mol



Oxidací vitamínu A vzniká all-trans-retinal.

Izomerizace all-trans-retinalu na cis-11-retinal je ale energeticky nevýhodná ($\Delta G^0 = +4$ kcal/mol). Jak buňka syntetizuje energeticky nevýhodnou konfiguraci?

Biosynthesis of 11-cis-retinal, the chromophore of visual pigments



See: R. R. Rando, The Chemistry of Vitamin A and Vision, Angew.Chem.Int.Ed. 29, 461-480 (1990)

The energy for the unfavorable isomerization of all-trans-retinol to 11-cis-retinal comes from phospholipid esters of the retinal membrane

Jak je možné, že 11-cis-retinal, který absorbuje v oblasti UV, slouží jako čidlo pro viditelné světlo, a to různých barev?

11-cis-retinal: $\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$

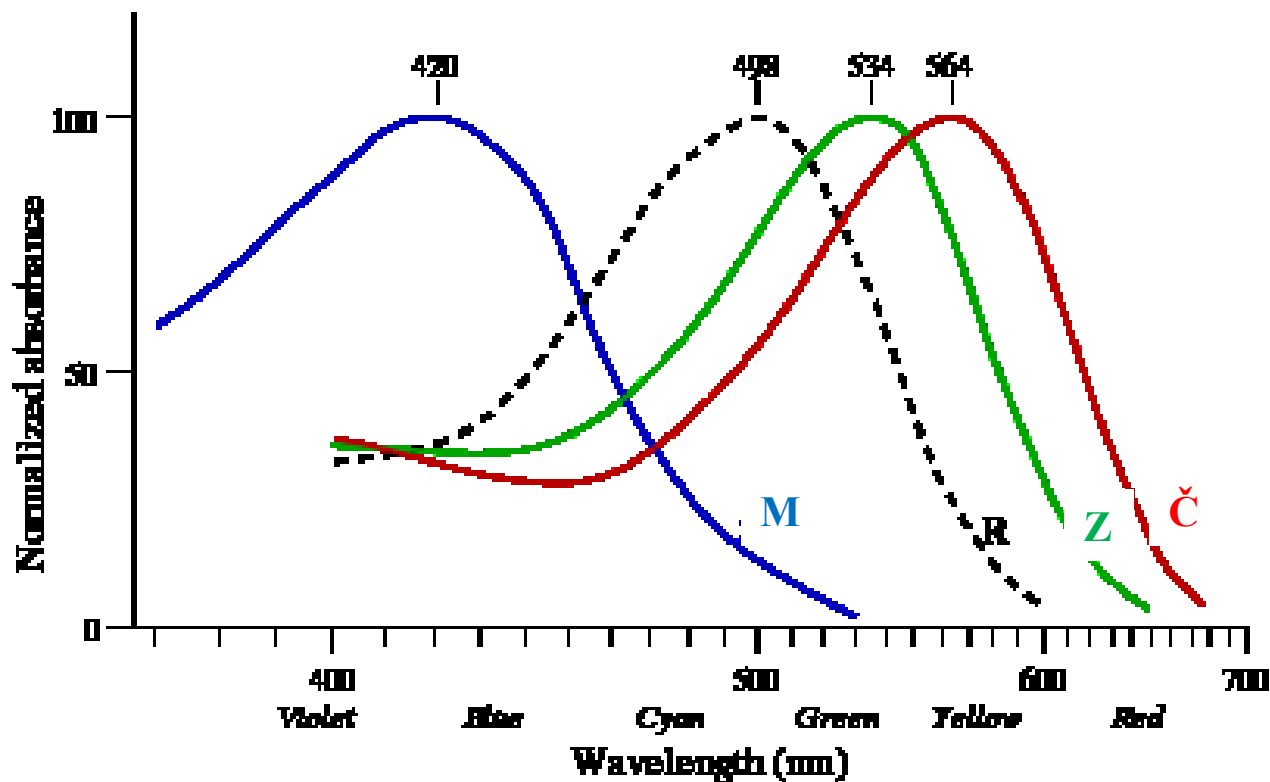
Rodopsin v tyčinkách: $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$

Jodopsin v čípcích

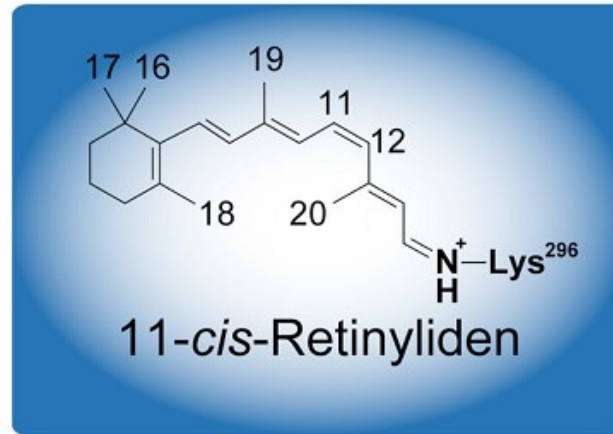
Červený: $\lambda_{\max} = 564 \text{ nm}$

Zelený: $\lambda_{\max} = 534 \text{ nm}$

Modrý: $\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$



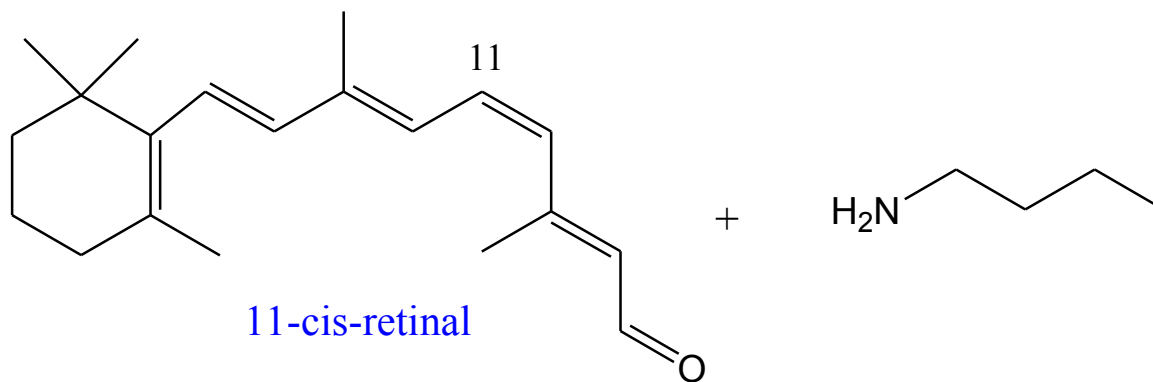
1. část odpovědi: 11-*cis*-retinal je k opsinu vázán přes amino-skupinu lysinu 296 tvorbou tzv. Schiffovy báze:



pK_a protonované Schiffovy báze silně závisí na okolí v molekule.
V rodopsinu a jodopsinech je Schiffova báze protonovaná.

Vytvořením Schiffovy báze se podstatně změní absorpční spektrum 11-*cis*-retinalu.

Jednoduchý model pro rodopsin/jodopsiny: Schiffova báze z reakce 11-cis-retinalu s n-butylaminem:



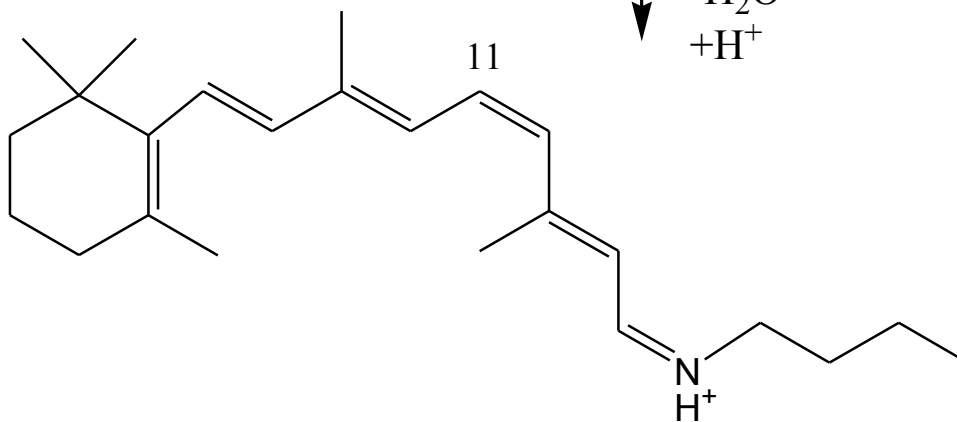
11-cis-retinal

$\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$

condensation

-H₂O

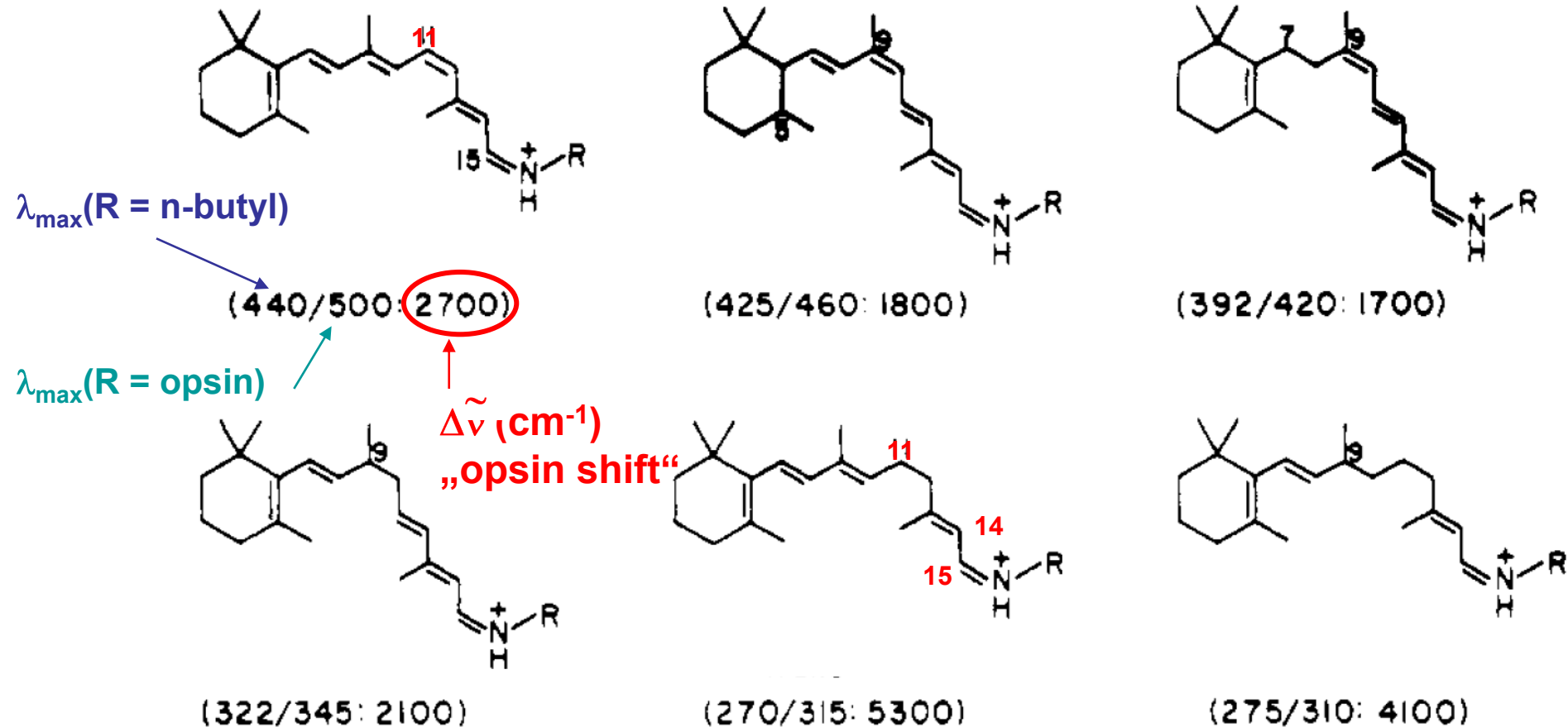
+H⁺



$\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$

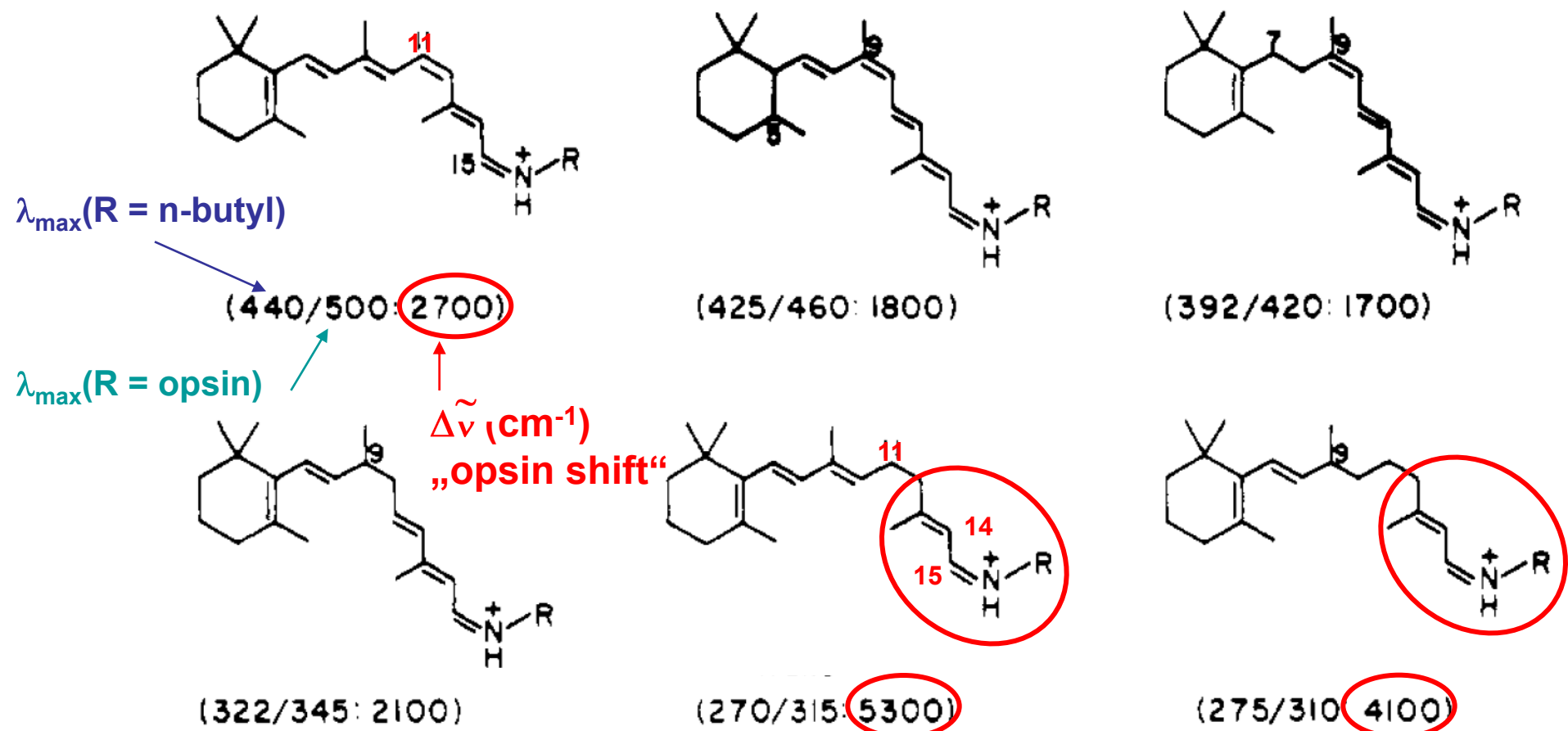
2. část odpovědi: elektronové přechody v protonované Schiffově bázi budou záviset na elektrostatických interakcích s okolím. Výpočty skupiny B. Honiga ukázaly, že bathochromní posun absorpce Schiffovy báze v rodopsinu může pocházet z interakce s negativně nabitou skupinou v okolí chromoforu.

Pokusy s deriváty 11-cis-retinalu a 9-cis-retinalu, kde konjugovaný systém dvojných vazeb byl na různých místech přerušen, umožnily předpovědět, kde se negativní náboj musí nacházet.



Největší „opsin shifts“ jsou pozorovány pro deriváty, kde chromofor je omezen na fragment mezi C₁₃ a N⁺. Negativní náboj v opsinu, který způsobuje „opsin shift“, se tedy musí nacházet v blízkosti tohoto fragmentu.

B. Honig a K. Nakanishi pomocí výpočtů vyvinuli tzv. „External point-charge model“, kde se nachází náboj -1 e ~3 Å od atomu C₁₂.

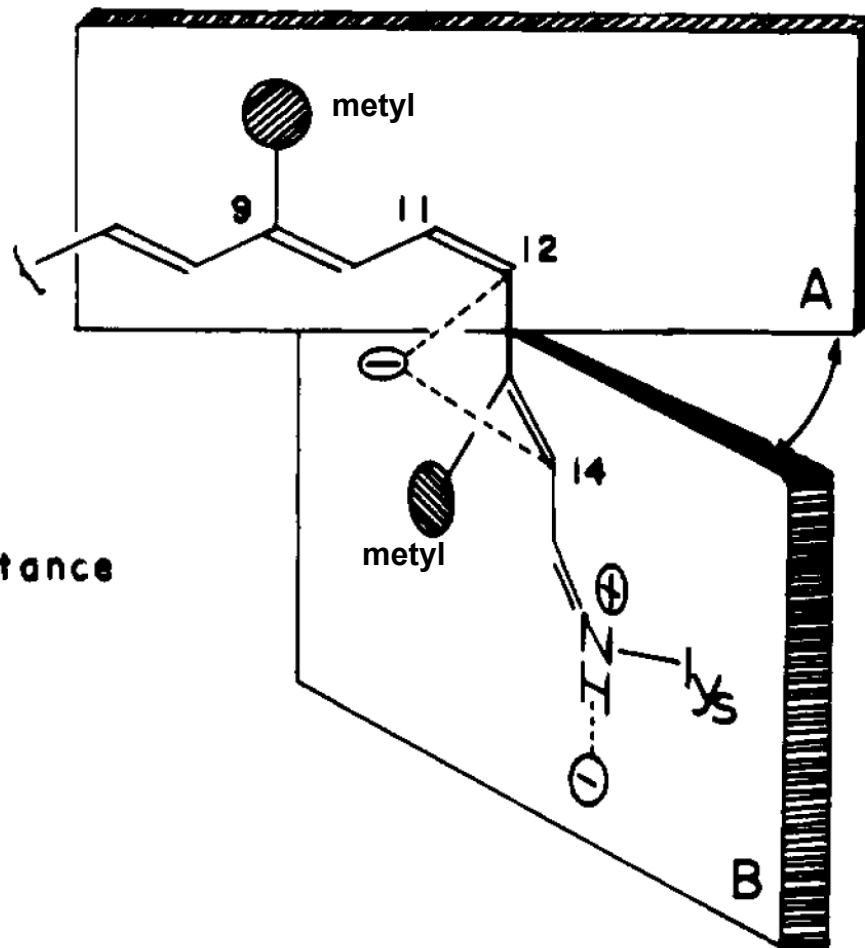


Největší „opsin shifts“ jsou pozorovány pro deriváty, kde chromofor je omezen na fragment $C_{14}-N^+$. Negativní náboj v opsinu, který způsobuje „opsin shift“, se tedy musí nacházet v blízkosti tohoto fragmentu.

B. Honig a K. Nakanishi pomocí výpočtů vyvinuli tzv. „External point-charge model“, kde se nachází náboj $-1 e \sim 3 \text{ \AA}$ od atomu C_{12} .

Podle modelu optimalizovaného pro hovězí rodopsin 11-cis-retinal nemůže být planární (jak by vyžadovala optimalizace π -systému), ale musí ležet zhruba ve dvou rovinách vzájemně pootočených kolem vazby $C_{12}-C_{13}$.

----- : $\sim 3 \text{ \AA}$ distance



Krystalová struktura hovězího rodopsinu byla zjištěna o 20 let později...

Molekula 11-cis-retinalu leží zhruba ve dvou rovinách, jak předpovězeno výpočty Honiga a Nakanishiho. Obě roviny jsou ale vůči sobě pootočený rotací kolem vazby C₁₁-C₁₂, a ne kolem vazby C₁₂-C₁₃, jak předpovězeno.

Glutamate E113

6 Å

C₁₂

C₁₁

11-cis-retinal bound to K296

3.87

3.22

NZ atom of lysine K296

Umístění negativně nabitě skupiny (E113) zhruba odpovídá strukturnímu modelu předpovězenému Honigem & Nakanishim, i když vzdálenost od C12 je delší, než předpovězeno.

Cvičení

Jak uvedeno na začátku prezentace, konformační změna rodopsinu po absorpci fotonu a izomerizaci retinalu je spojená s ΔG_0 přibližně +35 kcal/mol. Stačí energie fotonu na nabuzení této energeticky nevýhodné konformace? Vypočtete energii fotonu pro vlnovou délku 500 nm v jednotkách kcal/mol.