

**Prof. dr hab. Krzysztof Palczewski**

**Streszczenie wykładu**

**MECHANIZMY MOLEKULARNE  
ODPOWIEDZIALNE ZA WIDZENIE**

**Wprowadzenie**

W niniejszym wykładzie przedstawię kilka zagadnień badawczych oraz nowe, nasuwające się pytania, na które próbujemy odpowiedzieć stosując techniki eksperymentalne rozwinięte w ostatnich latach. Zacznę od omówienia postępów w rozumieniu struktury i mechanizmów aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCRs – ang. *G-protein coupled receptors*), głównie na przykładzie rodopsyny (Rho). Następnie omówię mechanizm aktywacji białka G sprzężonego z Rho, transducyny  $G_t$ .

Transdukcja sygnału, inicjowana przez wiele różnych GPCRs, prowadzi często do takiej samej odpowiedzi komórkowej, na przykład wzrostu cytoplazmatycznego stężenia cGMP lub jonów wapnia. Zdobyta wiedza na temat transdukcji sygnału przez różne receptory prowadząca do określonej odpowiedzi umożliwia szerokie zastosowania terapeutyczne. Przykładem może być ochrona siatkówki przed uszkodzeniem wywołanym światłem, w mysim modelu choroby Stargardta, przy zastosowaniu różnych aktywatorów i inhibitorów GPCRs, już zaakceptowanych jako leki stosowane w innych celach. Wszystkie te środki, poprzez działanie na receptory sprzężone z różnymi białkami G, zapobiegają podwyższonemu stężeniu i w konsekwencji uwalnianiu jonów wapnia do cytoplazmy, co wystarcza, aby zapobiec śmierci fotorceptorów, gdy są ekspozowane na nadmierne światło.

Naszą wiedzę na temat podstawowych procesów biochemicznych zachodzących w siatkówce wykorzystujemy również w rozwijaniu metod diagnostycznych i monitorowaniu skuteczności terapii we wczesnych etapach rozwoju zwyrodnienia plamki żółtej (AMD – ang. *age-related macular degeneration*) – choroby, która jest najczęstszą przyczyną ślepoty u starszych ludzi w krajach rozwiniętych. Jako przykład przedstawię zastosowanie mikroskopii dwufotonowej do monitorowania zawartości retinolu, estrów retinylu i produktów kondensacji retinalu do wykrywania zmian we wczesnych etapach AMD.

Na koniec przedstawię wyniki ostatnich eksperymentów, w których używając podczerwonego promieniowania laserowego uzyskaliśmy absorpcję dwufotonową w czopkach siatkówki i percepcję kolorów odpowiadającą podwojonej częstotliwości fali promieniowania z lasera u 30 ochotników.

**Rodzina receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCRs) na przykładzie rodopsyny**

Rodzina GPCRs to największa klasa receptorów transbłonowych, do której należą czujniki molekularne kluczowe w wielu ważnych procesach fizjologicznych. Ze względu na szerokie zastosowania terapeutyczne kontrolowanie funkcji tych receptorów stało się jednym z wiodących

celów farmakologii. Do zrozumienia działania receptorów niezbędne jest poznanie ich struktury czwartorzędowej. Rozpracowanie struktury rodopsyny – pierwszej struktury ssaczego GPCR – utorowało drogę do poznania struktur innych GPCRs: receptorów  $\beta_1$ - i  $\beta_2$ -adrenergicznych, receptora chemokinowego CXCR4, receptora dopaminy i receptora  $A_{2A}$ -adenozyny (1–5). Badania te pozwoliły w znacznym stopniu wyjaśnić związek pomiędzy strukturą i funkcją tych receptorów (6–8).

*Struktury GPCRs.* Homologie sekwencji aminokwasów wśród GPCRs są raczej niskie i ograniczone tylko do niektórych motywów funkcjonalnych (9). Mimo to wszystkie GPCRs charakteryzują się wspólną cechą: siedmioma transbłonowymi helisami  $\alpha$ . Chociaż poznano już wiele nowych struktur GPCR, Rho nadal nadaje się najlepiej do badań biochemicznych, biofizycznych i strukturalnych, ponieważ jest jedynym GPCR, który jest dostępny w stanie natywnym w ilościach potrzebnych do analiz.

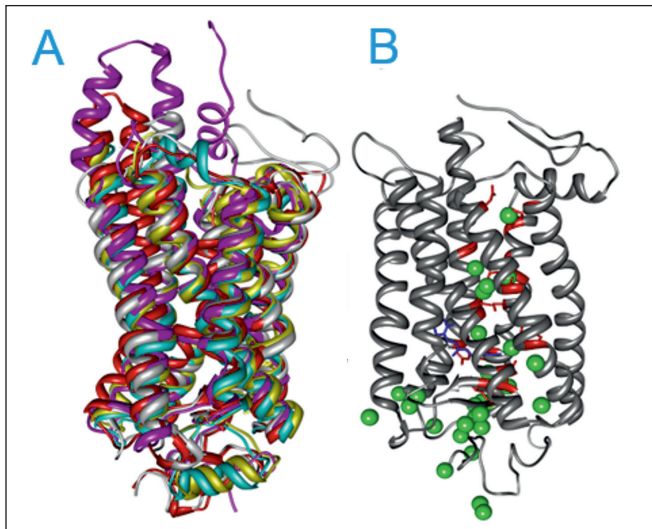
Pierwszą strukturę krystaliczną GPCR – Rho – w stanie nieaktywnym zbadano za pomocą biologii strukturalnej (1). Udoskonalenie warunków krystalizacji umożliwiło ulepszenie rozdzielczości i stworzenie modelu z dokładnością do 2,2 Å. Do dnia dzisiejszego ta struktura Rho pozostaje strukturą opisaną z najlepszą rozdzielczością w porównaniu ze strukturami innych GPCRs (3).

*Zmiany konformacyjne rodopsyny po fotoaktywacji.* Po absorpcji fotonu przez Rho w stanie nieaktywnym, Rho przechodzi przez szereg stanów przejściowych: batorodopsynę, lumirodopsynę, i metarodopsynę I, zanim dojdzie do biochemicznie aktywnego stanu metarodopsyny II (Meta II). Stany przejściowe mają charakterystyczne maksyma absorpcji i mogą być wyizolowane poprzez zamrożenie w odpowiedniej temperaturze, stabilizowanie niskocząsteczkowymi substancjami chemicznymi lub peptydami analogowymi do białka  $G_t$ . Struktury wszystkich stanów przejściowych fotoaktywowanej Rho zostały rozpracowane za pomocą metod krytalograficznych, rentgenografii, spektroskopii w podczerwieni oraz mikroskopii elektronowej i sił atomowych (10,11). Z ich pomocą poznano również strukturę fotoaktywowanej  $Rho^*$ , która wykazuje takie same widmo absorpcji optycznej i zdolność aktywacji  $G_t$  jak biochemicznie aktywny stan przejściowy Meta II.

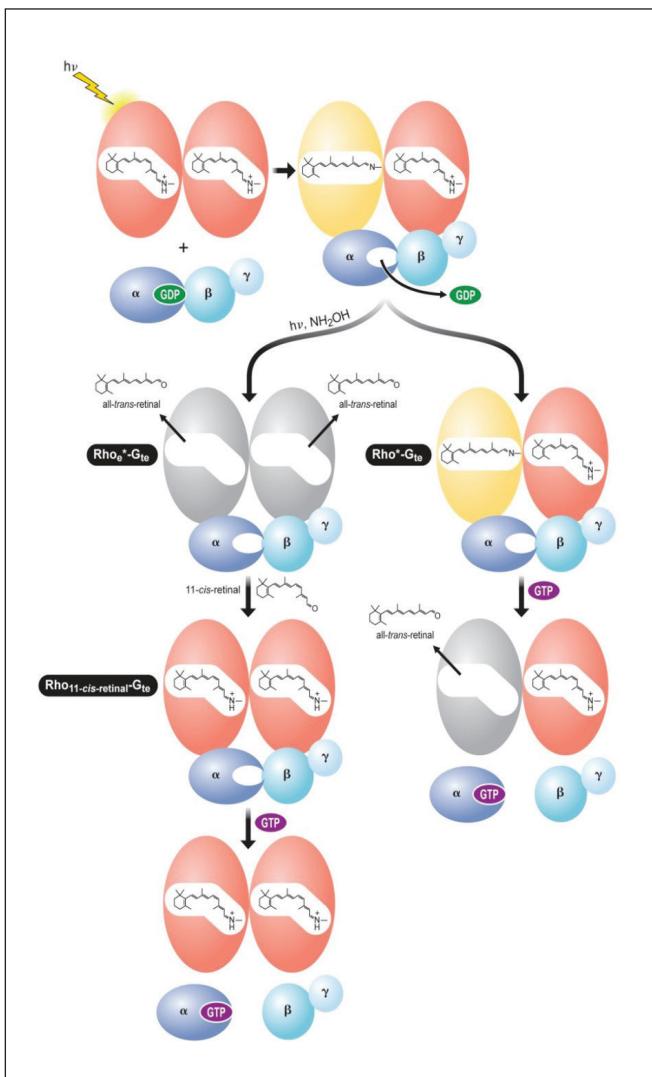
Co ciekawe, struktury stanów przejściowych Rho sugerują, że przy fotoaktywacji nie zachodzi na dużą skalę ruch całych helis. Wykazano natomiast, że fotoaktywacja następuje poprzez szereg małych, lokalnych zmian propagowanych w stronę pętli cytoplazmatycznych, zwłaszcza na końcu helis V i VI. Zmiany struktury w trakcie fotoaktywacji rodopsyny są podobne jak przy aktywacji innych GPCRs wywołanej wiązaniem agonisty, co zostało niedawno podsumowane przez Spranga (12).

*Porównanie struktury fotoaktywowanej rodopsyny z opsyną.* Wykazano, że struktura opsyny ujawnia wyraźne podobieństwa do  $Rho^*$  (13). Tak jak w  $Rho^*$ , helisy V i VI po stronie cytoplazmatycznej opsyny są rozchylone, tworząc w ten sposób wnękę umożliwiającą wiązanie  $G_t$ . W ostatnich badaniach uzyskano dodatkowe struktury  $Rho^*$ , otrzymane poprzez traktowanie kryształów opsyny całkowicie-*trans*-retinalem, które pokrywają się sinusoidalnie ze strukturą opsyny i są spektralnie nie do odróżnienia od struktury naszego  $Rho^*$  lub Meta II w roztworze (O. Ernst, *rozmowa prywatna*). Niewielkie różnice strukturalne są prawdopodobnie spowodowane oddziaływaniem kryształu z podłożem lub wpływem preparatów potrzebnych do krystalizacji na dynamikę i strukturę szkieletu Rho i opsyny.

*Struktury fotoaktywowanych mutantów Rho.* Poznano również struktury aktywowanych mutantów Rho (Oprian, *rozmowa prywatna*), charakteryzujące się zmianami ruchu helisy V i VI w porównaniu z Rho, które są zgodne z proponowanymi modelami fotoaktywacji.



Rys. 1. Podobieństwo ogólnej struktury i dystrybucji cząsteczek wody zachowanych w strukturach krystalicznych GPCRs. A) Superpozycja struktur różnych GPCRs wykazująca znaczne podobieństwa między ludzką Rho (różowy), receptorami adrenergicznymi  $\beta_1$  i  $\beta_2$ , (jasno-niebieski), receptorami adrenergicznymi (żółty) i Rho krowy (biały). B) Struktura Rho z cząsteczkami wody (zielone kulki), które są zachowane też w innych strukturach krystalicznych GPCRs.



Rys. 2. Schemat powstawania i rozpadu kompleksów utworzonych między Rho\* a G<sub>t</sub>. Po absorpcji fotonu, zmiany strukturalne w Rho umożliwiają wiązanie G<sub>t</sub> do dimeru Rho\*-Rho. Wiązanie to stymuluje uwolnienie GDP z miejsca wiążącego w G<sub>t</sub>. Następnie, jak przedstawiono na drodze aktywacji białka G/transducyny po prawej stronie, kompleks Rho\*•G<sub>te</sub> umożliwia wiązanie GTP do G<sub>t</sub>, co powoduje dysocjacje od dimeru Rho\*-Rho podjednostki  $\alpha$  i G<sub>t</sub> ze związanym GTP i podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$ . Na drodze aktywacji białka G/transducyny przedstawionej po lewej stronie, chromofor w kompleksie Rho\*•G<sub>te</sub> jest dostępny dla NH<sub>2</sub>OH, co prowadzi do jego hydrolizy i dysocjacji z miejsca wiążącego. Prowadzi to do powstania kompleksu z pustymi miejscami wiążącymi chromofor i nukleotydy (Rho<sub>e</sub>•G<sub>te</sub>). Poprzez dodanie 11-cis-retinalu można wygenerować stan ciemny Rho w kompleksie Rho<sub>e</sub>•G<sub>te</sub> – co prowadzi do powstania kompleksu Rho•G<sub>te</sub>. Kompleks ten można rozdzielić poprzez dodanie GTP. Czerwone owale symbolizują Rho w ciemności, żółte – fotoaktywowana Rho\* do stanu Meta II, szare – opsyny (Rho<sub>e</sub>), niebieskie – trzy podjednostki transducyny/białka G (G<sub>ta $\beta$  $\gamma$</sub> ).

Uzyskanie struktur innych GPCR w stanie aktywnym okazało się dużo bardziej skomplikowane niż w przypadku aktywnej rodopsyny lub opsyny ze względu na znaczną niestabilność GPCRs związanych z agonistami pod nieobecność białka G (14–17). Taki brak stabilności na skali czasowej 50  $\mu$ s wykazano w symulacji przeprowadzonej metodami dynamiki molekularnej. Dopiero po zastosowaniu przeciwciała wiążącego aktywny receptor  $\beta_2$ - zidentyfikowano fragment tego przeciwciała i wykazano, że po związaniu go powinowactwo receptora do jego agonisty (izoprenaliny) wzrasta prawie stukrotnie. Dzięki temu udało się uzyskać strukturę kryształiczną całego kompleksu, która ujawnia duże podobieństwo do opsyny. Wyjątkiem jest obecność pętli polipeptydowej „nanociała” we wnętrzu aktywnego receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego, która w przypadku opsyny jest miejscem wiązania karboksylowego końca  $G_t$ .

Pomimo znacznych osiągnięć, do lepszego zrozumienia oddziaływania GPCRs z białkami G potrzebne są dalsze badania strukturalne. W szczególności następujące punkty są godne uwagi:

1. Pomimo niskiego podobieństwa sekwencji pierwszorzędowej, ogólne pofałdowanie strukturalne jest zadziwiająco podobne dla różnych GPCRs (rys. 1). Dla wszystkich struktur Rho przesunięcia przestrzenne pomiędzy odpowiednimi fragmentami łańcuchów z regionów transbłonowych, mierzone jako pierwiastek z sumy średniej kwadratów odchyień (RMSDs – ang. *root mean squared deviations*), mieszczą się w zakresie 1,8 Å. Porównanie receptorów adrenergicznych z Rho wskazuje, że odchylenia te wynoszą 3,3–3,5 Å w przypadku receptorów adrenergicznych  $\beta_2$  i nieco więcej – 4,3–4,7 Å – w przypadku receptorów adrenergicznych  $\beta_1$  (10,18). Wynika z tego, że do wiązania i aktywacji białka G wymagane jest zachowanie tylko kilku podstawowych funkcji (19).

2. Zmiany strukturalne 2–8 Å obserwowane po aktywacji GPCRs sugerują, że takie subtelne zmiany mogą prowadzić bezpośrednio do różnych receptorów lub pośrednio wpływają na zakres protonowania/deprotonowania pozostałości klucza, np. D (E) RY motyw na powierzchni cytoplazmy odpowiedzialny za skuteczność G białka sprzęgającego oraz dalszych zmian konformacyjnych. W przypadku fotoaktywowanych stanów przejściowych Rho jedynie Meta II jest zdolna do aktywacji  $G_t$  i chemicznie różni się od innych fotoindukowanych stanów przejściowych tylko przez deprotonację zasady Schiffa i absorpcję protonu z rozpuszczalnika (20). GPCRs mogą wiązać różnych agonistów, co prowadzi do różnych poziomów aktywności. Niewielkie zmiany strukturalne wywołane przez związanego agonistę powodują różnice w skuteczności takich ligandów w aktywacji białka G (14).

3. Elastyczność struktury GPCRs pozwala na dynamiczne zmiany konformacyjne wywołane tylko przez część energii pochodzącej z wiązania ligandu.

4. Wydaje się, że cząsteczki wody odgrywają krytyczną rolę w procesie aktywacji poprzez mechanizm protonacji/deprotonacji (21–23). „Zachowane” cząsteczki wody, które obserwuje się w wielu strukturach GPCR (rys. 1B), oraz łańcuchy boczne aminokwasów tworzą sieci transmisji sygnału, rozciągające się od strony wiązania ligandu do powierzchni cytoplazmy.

5. Zgodnie z ogólnie przyjętym konsensusem jednostką funkcjonalną GPCR są oligomery (11,24–26).

Wszystkie powyższe punkty są warte dalszych badań.

### Aktywacja $G_t$ przez Rho\* jako początek szlaku transdukcji sygnału

W momencie aktywacji Rho przez światło 11-*cis*-retinal izomeryzuje do formy całkowicie-*trans*-retinalu, co powoduje przejście Rho do wcześniej wspomnianego, biochemicznie aktywnego, stanu Meta II. Przez wiele lat Meta II była uważana tylko za produkt przejściowy

fotoaktywacji Rho, który wiąże  $G_t$  i postulowano, że to wiązanie powoduje duże zmiany strukturalne i rozpad nukleotydów (27). Istnieją dwa rodzaje Meta II: IIa i IIb. Meta IIa powstaje poprzez deprotonowanie Schiffa, natomiast Meta IIb w wyniku absorpcji wolnego protonu z roztworu wodnego (28) (21–23). Porównanie struktury fotowzbudzonej  $Rho^*$  z jej stanem podstawowym Rho dostarczyło dowodów, by stwierdzić, że tym, co różni te stany receptorów, jest miejsce dokowania heterotrimerycznego  $G_t$  (29). Ponadto powinowactwo  $G_t$  do ciemnego stanu Rho, zmierzone za pomocą powierzchniowego rezonansu plazmonowego, jest w zakresie nanomolarnym (29,30). Wyniki tych badań sugerują, że stan ciemny Rho może tworzyć „wstępne” kompleksy z  $G_t$ , co jest najprawdopodobniej potrzebne, aby zapewnić szybką odpowiedź na bodziec, jakim jest światło, i zwiększyć wydajność transdukcji sygnału (31). Tak może być również w przypadku wielu innych białek G, które pośredniczą w transdukcji sygnału i prowadzą do odpowiedzi komórkowej w ciągu dziesiątek lub setek milisekund. Ta hipoteza „fizycznego rusztowania” sugeruje bezpośrednie lub pośrednie oddziaływania elementów konkretnego białka (32) i wydaje się bardziej odpowiednia niż uprzednie sugestie oddziaływania w wyniku przypadkowego zderzenia Rho i  $G_t$  swobodnie dyfundujących w błonie dysku (33). W oparciu o powyższe wyniki można też sugerować, że tylko subtelne zmiany są niezbędne do „relaksacji” struktury (34) i pozwalają na dokowanie właściwego białka G, które umożliwia dalsze zmiany w strukturze GPCR i ostatecznie powoduje wymianę GDP na GTP w białku G. Takie zmiany mogą obejmować pozostałości klucza w GPCRs w postaci cząsteczek wody ulegających wewnętrznemu protonowaniu/deprotonowaniu (35,36).

*Kompleksy  $Rho^*-G_t$*  W jaki sposób fotoaktywowana  $Rho^*$  w błonie dysku powoduje aktywację białka G znajdującego się 40 Å lub dalej i wywołuje odpowiedź komórkową? Jak zmiany struktury i dynamiki Rho mogą doprowadzić do wiązania  $G_t$ ? Aby odpowiedzieć na te pytania, potrzebna jest znajomość struktur, które są zaangażowane w proces przechwytywania. Chociaż poznano, z różnymi rozdzielczościami, wiele struktur aktywnych stanów poszczególnych składników kompleksu  $Rho^* \cdot G_t$ , niewiele wiadomo o mechanizmie, przez który  $Rho^*$  wiąże się z jego własnym białkiem G i katalizuje wymianę nukleotydów.

Dwa zdarzenia są krytyczne dla powstawania stabilnego kompleksu pomiędzy rodopsyną i transducyną (białkiem  $G_t$ ), a mianowicie: aktywacja rodopsyny przez światło i uwolnienie GDP z miejsca wiążącego nukleotydy w  $G_t$ . Utrzymanie białka  $G_t$  w formie niezwiązanej z nukleotydem jest krytyczne dla stabilności tego kompleksu. Chociaż w komórce kompleks ten jest bardzo krótkotrwały i ulega rozdysocjowaniu natychmiast po związaniu GTP przez białko  $G_t$ , po wyizolowaniu z pręcików siatkówki pozostaje stabilny przez kilka tygodni, a białko  $G_t$  nie traci zdolności wiązania GTP. Rodopsyna w tym kompleksie posiada właściwości swojej fotoaktywowanej formy, w której związana kowalencyjnie z częścią białkową (opsyną) grupa prostetyczna 11-*cis*-retinal uległa pod wpływem światła izomeryzacji i przejściu w formę all-*trans*-retinalu. Pomimo że aktywacja światłem powoduje hydrolizę i uwolnienie retinalu z kieszeni hydrofobowej wiążącej retinal, proces ten jest zablokowany w wyizolowanym, stabilnym kompleksie pomiędzy rodopsyną i  $G_t$ . Jednakże dodanie GTP do tego kompleksu stymuluje jego dysocjację oraz uwolnienie retinalu i akumulację opsyny (rys. 2, prawa droga aktywacji G).

## Farmakologia systemów

Odkrycie potencjalnego nowego leku to dopiero początek długiej i trudnej drogi prowadzącej do jego zastosowania w leczeniu. Proponujemy nowatorskie podejście do tego problemu w oparciu o farmakologię systemów. Identyfikuje ona efekty biochemiczne i komórkowe różnych ścieżek transdukcji sygnałów biochemicznych i wykorzystuje tę wiedzę do znalezienia wspólnych efektów końcowych inicjowanych sygnałami przesyłanymi przez różne receptory. Jak wcześniej wspomniano, białka G w połączeniu z GPCRs, takimi jak receptory muskarynowe, adrenergiczne, adenyliczne i około 800 innych w ludzkim genomie, odgrywają istotną rolę we wszystkich podstawowych procesach komórkowych, dlatego też GPCRs są najczęstszym celem przy poszukiwaniu nowych leków na różne choroby. Pierwszym krokiem w farmakologii systemów jest identyfikacja biochemicznych efektów komórkowych w tkankach dotkniętych chorobą i oznaczenie ekspresji genów związanych z różnymi szlakami GPCRs w nich. Pozwala to na zapobieżenie zmianom chorobowym poprzez uaktywnienie szlaków GPCRs, które przeciwdziałają się tym zmianom.

Takie podejście zastosowaliśmy w przypadku mysiego modelu choroby Stargardta, w którym usunęliśmy geny kodujące część enzymów odpowiedzialnych za usuwanie *całkowicie-trans*-retinalu po hydrolizie z pigmentów wzrokowych (Chen, Y., G. Palczewska, D. Mustafi, M. Golczak, Z. Dong, O. Sawada, T. Maeda, A. Maeda, and K. Palczewski. Systems Pharmacology Identifies Drug Targets for Stargardt Disease-Associated Retinal Degeneration. *J Clin Invest* 123: 5119–34). Siatkówka tych myszy dość szybko ulega degeneracji podobnej jak u ludzi dotkniętych chorobą Stargardta, jeśli są one hodowane w cyklicznym oświetleniu. Podatność siatkówki na fotouszkodzenie staje się widoczna po trzydziestominutowej ekspozycji myszy na światło z lampki biurowej, które powoduje niemal całkowite zniszczenie fotoreceptorów. Wykazaliśmy, że przyczyną podatności fotoreceptorów na śmierć wywołaną światłem jest akumulacja cytotoksycznych stężeń *całkowicie-trans*-retinalu, która powoduje aktywację oksydazy NADPH, wzrost generacji reaktywnych form tlenu oraz aktywację GPCR sprzężonego z  $G_q$ . To ostatnie z kolei aktywuje fosfolipazę C (PLC), która poprzez rozpad dwufosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) może aktywować kinazę białkową C (PKC). Kinaza białkowa C (PKC) aktywuje wówczas cyklazy adenyliczne (AC) 1, 2, 3, 5 i 7 i działa hamująco na AC6. Cyklazy syntetyzują cAMP, które w różnych komórkach wpływa na różne procesy. Między innymi, cAMP może się wiązać do kanałów jonowych bramkowanych tymi nukleotydami i powodować ich otwarcie, tym samym umożliwiając napływ jonów wapnia do cytoplazmy. Zwiększenie stężenia wapnia w cytoplazmie może być również spowodowane działaniem PLC, które generuje trójfosforan inozytolu (IP3). Związanie IP3 do jego receptora w siateczce śródplazmatycznej, który jest kanałem wapniowym, powoduje otwarcie tego kanału i uwolnienie jonów wapnia do cytoplazmy. Wzrost cytoplazmatycznego stężenia  $Ca^{2+}$  jest sygnałem do apoptozy.

W celu dobrania odpowiedniej terapii farmakologicznej przeanalizowaliśmy transkrypcje genów w siatkówce myszy i, aby te badania miały zastosowanie u człowieka, również w siatkówce ludzkiej. Pozwoliło to zidentyfikować w siatkówce cały szereg GPCRs – 11 receptorów serotoniny (THR) i 6 receptorów adrenergicznych (AR), które są sprzężone z białkami G stymulującymi ( $G_s$ ) lub hamującymi ( $G_i$ ) cyklazy adenyliczne (AC). Wykryliśmy również „targety” szlaków inicjowanych przez te GPCRs – 10 różnych cyklaz adenylicznych i białka odpowiedzialne za ich inaktywację (7 kinaz GPCRs i 4 arrestyny). Większość tych białek miało podobną ekspresję w siatkówce ludzkiej i mysiej. Dzięki temu mogliśmy wybrać z dostępnych leków te, które działając na istniejące w siatkówce GPCRs, oferują działanie przeciwstawne do inicjowanego

przez skumulowany *całkowicie-trans*-retinal. Należy przy tym pamiętać, że dotarcie leków do fotoreceptorów może być utrudnione przez barierę krew-siatkówka. Wybraliśmy kilka leków, które są antagonistami  $\alpha 1$ -AR lub różnych HTRs i kilka agonistów  $\alpha 2$ -AR. Antagoniści  $\alpha 1$ -AR mogą przesuwać równowagę aktywacji  $\alpha 1$ -AR w stronę nieaktywną, a zatem hamować sygnał przesyłany przez  $G_q$  i zmniejszać aktywację PLC. Antagoniści HTRs hamują sygnał przesyłany przez  $G_s$  aktywujący cyklazę adenylową. Agoniści  $\alpha 2$ -AR przesuują równowagę aktywacji  $\alpha 2$ -AR w stronę aktywną, a zatem stymulują  $G_p$ , które hamuje aktywację cyklazy adenylowej. Zatem leki te mają potencjał zmniejszenia aktywności AC. Nasze wyniki pokazały, że wykazują one znaczące działanie chroniące siatkówkę przed fotouszkodzeniem. Również bezpośredni inhibitor cyklazy adenylowej wykazał podobne działanie ochronne. Dodatkowo przeprowadziliśmy analizę skuteczności leków w zależności od dawki, analizę następstw oraz analizę skutków ubocznych, co pozwoliło wybrać te najlepsze do dalszych badań i ostatecznie dopuścić je do prób klinicznych zahamowania postępu rozwoju choroby Stargardta.

Podobne podejście farmakologii systemowej może być skuteczne przy leczeniu związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej (AMD) i innych chorób o złożonej etiologii, w których prawdopodobnie występuje brak równowagi pomiędzy kilkoma ścieżkami sygnalizacji. Zatem odpowiednie zahamowanie lub aktywacja tych dróg może pomóc w zachowaniu zdrowej siatkówki. Istnieje pilna potrzeba medyczna zrozumienia etiologii i patofizjologii AMD oraz rozwoju leczenia tego schorzenia, prowadzącego do ślepoty. Uszkodzenia tkanek powodowane AMD są łatwe do wykrycia poprzez techniki obrazowania pozwalające zmierzyć parametry, dzięki którym można śledzić rozwój tej choroby. Jednak w większości przypadków diagnoza pojawia się w momencie, kiedy choroba już trwa i spowodowała widoczne uszkodzenie siatkówki. Proponowane badania mogą pomóc zidentyfikować nowy zestaw diagnostyczny cząsteczek obecnych w krwi/moczu, które pozwolą przewidzieć początek i postęp AMD zanim nastąpią zmiany strukturalne. Taka prosta, nieinwazyjna, analityczna metoda pozwoli na wczesne wykrycie choroby, a co za tym idzie, ułatwi szybki rozwój i testowanie szerszego zakresu możliwości leczenia, mającego na celu zapobieganie nieodwracalnym zmianom w oku i utrzymanie wzroku.

Staje się oczywiste, że minęły czasy klasycznego podejścia farmakologii, w którym jeden receptor lub enzym był „targetem” do stworzenia odpowiedniego agonisty/antagonisty. Zamiast tego należy rozważać wiele receptorów i ścieżek sygnalizacji, co jest niezbędne do skutecznego leczenia i unikania „niespodziewanych” efektów ubocznych. Zatem farmakologia systemów otwiera nowy rozdział w tej dziedzinie nauki, pozwalający wzmocnić racjonalne strategie terapeutyczne. Z pewnością farmakologia systemów stanie się przełomem w medycynie.

### **Badanie mechanizmów odpowiedzialnych za opóźnioną adaptację do ciemności w zależnej od wieku degeneracji plamki (AMD)**

Pręciki charakteryzują się niezmiernie wysoką czułością i stosunkiem sygnału do szumu. Absorpcja pojedynczego fotonu wystarcza do wygenerowania mierzałnej odpowiedzi w postaci zahamowania napływu kationów i hiperpolaryzacji błony plazmatycznej pręcika. Taka wysoka czułość jest możliwa tylko w pręcikach zaadaptowanych do ciemności. Jak wspomniano wcześniej, nie tylko Meta II, ale również opsyna może aktywować  $G_t$ . Chociaż stała szybkości aktywacji  $G_t$  przez opsynę jest od 4000 do 2 000 000 razy mniejsza niż przez Meta II, obecność opsyny zwiększa „ciemny” szum, niezwiązany z absorpcją fotonów. Wobec tego, dopóki istnieją w pręciku opsyny, będą one podwyższać szum, a zatem podwyższać próg czułości (38). Zatem do odzyskania maksymalnej czułości niezbędna jest regeneracja wszystkich pigmentów wzro-

kowych. Normalnie regeneracja rodopsyny zajmuje 15–20 minut po ekspozycji na błysk światła, doprowadzający do blaknięcia nawet wszystkich jej cząsteczek. W przypadku niewielkiego początkowego blaknięcia, do około 10%, kinetyka odzysku czułości widzenia odpowiada kinetyce regeneracji rodopsyny. Obie mogą być z łatwością mierzone za pomocą spektrometrii światła odbitego z siatkówki, elektroretinografii lub bardziej subiektywnej metody postrzegania bodźców świetlnych o narastającej intensywności.

W początkowych stadiach AMD adaptacja do ciemności pręcików jest opóźniona w porównaniu do osób zdrowych w tym samym wieku (39). Zatem jej pomiar jest metodą pozwalającą na wykrywanie tej choroby na wczesnym etapie i monitorowanie jej postępu (np. praca z G. Jackson). Co więcej, pomiar adaptacji do ciemności może mieć zasadnicze znaczenie dla określenia skuteczności interwencji terapeutycznych. W naszych badaniach próbujemy znaleźć odpowiedź na pytanie, co jest powodem opóźnionej adaptacji do ciemności u osób z AMD? Rozważamy kilka potencjalnych przyczyn. Po pierwsze opóźnienie regeneracji pigmentów wzrokowych może być spowodowane zahamowaną syntezą ich chromoforu pigmentów (11-*cis*-retinalu). Jeśli tak, to nasuwa się następne pytanie – czy to zahamowanie wynika z braku substratu – estrów retinyłu, które są gromadzone w RPE? W zdrowych oczach ludzkich zapasy estrów retinyłu wystarczają na dwu i półkrotną regenerację rodopsyny po jej całkowitym wyblaknięciu. Przy AMD jest znacznie podwyższony stres oksydacyjny siatkówki. Retinoidy są dość labilne i mogą ulegać utlenianiu, co może prowadzić do ich szybszej degradacji oksydacyjnej i mniejszych zapasów w postaci estrów retinyłu zgromadzonych w RPE.

W przypadku, kiedy nie ma wystarczających zapasów estrów retinyłu w RPE, to synteza tych estrów następuje z *całkowicie-trans*-retinolu, dostarczonego do RPE z zewnętrznych segmentów pręcików (ROS – ang. *rod outer segments*) (40). Jeśli transport *całkowicie-trans*-retinolu z ROS do RPE jest utrudniony, np. z powodu zmian strukturalnych ROS, które z wiekiem stają się poskręcane i często hipertroficzne, może to być przyczyną zahamowania produkcji estrów i w konsekwencji – syntezy 11-*cis*-retinalu. Co więcej, enzymatyczna produkcja *całkowicie-trans*-retinolu w ROS może być zahamowana na przykład ze względu na podatność na fotoinaktywację enzymów odpowiedzialnych za transbłonowy transport i redukcję *całkowicie-trans*-retinalu zhydrolizowanego z opsyny do *całkowicie-trans*-retinolu.

Kolejną przyczyną opóźnionej adaptacji do ciemności może być zahamowana mobilizacja estrów retinyłu. Mechanizm odpowiedzialny za ich mobilizację nadal nie jest całkiem jasny. Estrы *całkowicie-trans*-retinyłu są izomeryzowane i hydrolizowane przez enzym RPE65 o wysokiej zawartości w RPE. W wyniku działania RPE65 powstaje 11-*cis*-retinol, który jest wiązany przez komórkowe białko wiążące formy 11-*cis* retinolu i retinalu. Następnie 11-*cis*-retinol jest enzymatycznie utleniany do 11-*cis* retinalu i transportowany do ROS, gdzie po związaniu z opsyną, regeneruje stan ciemny rodopsyny. Te etapy syntezy i transportu 11-*cis* retinalu też mogą ulec zaburzeniu w AMD.

Celem zidentyfikowania mechanizmu odpowiedzialnego za opóźnioną adaptację do ciemności u ludzi z AMD przeprowadzamy analizę ilościową różnych form retinoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją absorpcyjną. Te badania biochemiczne uzupełniamy badaniami obrazującymi strukturę i funkcjonowanie siatkówki: tomografią z wykorzystaniem światła częściowo spójnego OCT (OCT – ang. *optical coherence tomography*), skaningową oftalmoskopią laserową (SLO – ang. *scanning laser ophthalmoscope*), mikroskopią wielofotonową, elektroretinografią (ERG) i histologią. Pomiarы takie przeprowadzamy na ludzkich oczach pochodzących od osób zmarłych w różnym wieku, zdrowych oraz dotkniętych AMD.



Dodatkowo prowadzimy również badania na myszach modyfikowanych genetycznie, które służą jako modele AMD i innych chorób z zaburzeniami cyklu retinoidowego. Przykładem takiej choroby jest choroba Stargardta, która jest dziedzicznym schorzeniem, powodującym zwyrodnienie plamki żółtej siatkówki w młodym wieku, co prowadzi do progresywnej utraty wzroku u dzieci i młodych ludzi – i ostatecznie do ślepoty. Myszom tym podajemy modulatory cyklu retinoidowego (np. retinylaminę, ACU-4429, QLT091001), co pozwala na lepszy wgląd w źródło problemu i co więcej, pozwala na ocenę skuteczności terapeutycznej tych potencjalnych leków.

W następnej części referatu przedstawię nieinwazyjną metodę, dzięki której możemy monitorować cykl retinoidowy w czasie rzeczywistym u żywych zwierząt.

### **Obrazowanie dna oka i testowanie widzenia za pomocą dwufotonowego wzbudzenia endogennych fluoroforów i pigmentów wzrokowych**

Siatkówka nadaje się idealnie do obrazowania za pomocą mikroskopii z zastosowaniem dwufotonowego wzbudzenia endogennych fluoroforów (TPM – ang. *two-photon microscopy*) laserem emitującym wiązkę z bliskiej podczerwieni (IR), ponieważ układ optyczny oka, składający się z rogówki, płynu, soczewki i ciała szklanego, jest przezroczysty dla IR aż do 1400 nm i pozwala na precyzyjne skupienie wiązki lasera na wybranym punkcie siatkówki (41,42). Ponadto twardówka oka myszy jest również przezroczysta dla IR, więc w przypadku braku melaniny w naczyniówce również pozwala na obrazowanie siatkówki. Ze względu na dłuższą długość fali IR w porównaniu ze światłem widzialnym obrazowanie z użyciem IR jest znacznie mniej wrażliwe na zwiększoną gęstość optyczną soczewki, i czasem również rogówki, jaka występuje z wiekiem.

Co więcej, aby poprawić rozdzielczość i zminimalizować moc wiązki lasera, stosujemy układ optyczny korygujący artefakty związane z aberracjami optycznymi przedniej części oka, co pozwala na uzyskanie prawidłowego czoła fali (AO – ang. *adaptive optics*). Dzięki temu za pomocą TPM możemy monitorować *in vivo* w czasie rzeczywistym szereg procesów biochemicznych w RPE, fotoreceptorach i innych komórkach siatkówki. Należy podkreślić, że to nieinwazyjne obrazowanie o wysokiej rozdzielczości jest wspaniałym narzędziem diagnostycznym dla przed- i pooperacyjnej oceny tkanki i monitorowania skuteczności terapii (43). Promieniowanie IR wnika w tkanki głębiej niż promieniowanie widzialne i pozwala na zogniskowanie wiązki lasera w wybranym punkcie, gdzie zachodzi niemal jednoczesna absorpcja dwóch fotonów powodująca elektronowe wzbudzenie fluoroforów, które powracają do stanu podstawowego w sposób promienisty (44,45). Ze względu na konieczność absorpcji dwóch fotonów natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do kwadratu chwilowego natężenia światła. Ta zależność sprawia, że rozdzielczość TPM nie jest ograniczona limitem dyfrakcyjnym, charakteryzuje się wysokim stosunkiem sygnału do szumu, co prowadzi do wysokiego kontrastu w obrazowaniu za pomocą TPM (46). Metoda ta pozwala osiągnąć większą rozdzielczość i czułość niż inne sposoby obrazowania *in vivo* (47,48).

Jednym z najważniejszych procesów niezbędnych do widzenia jest synteza chromoforu – 11-*cis*-retinalu potrzebnego do regeneracji pigmentów wzrokowych. Jak wspomniano wcześniej, fotoaktywacja Rho, jak również pigmentów wzrokowych czopków, prowadzi do fotoizomeryzacji 11-*cis*-retinalu do formy *całkowicie-trans*. *Całkowicie-trans*-retinal ulega hydrolizie z miejscą wiążącego opsyny i jest enzymatycznie zredukowany do *całkowicie-trans*-retinolu. Następnie *całkowicie-trans*-retinol jest transportowany z zewnętrznych segmentów fotoreceptorów do

RPE, gdzie jest estryfikowany z resztami kwasów tłuszczowych, takimi jak palmitynian lub stearynian. W zależności od potrzeb estry retinyłu mogą się akumulować w wyspecjalizowanych strukturach zwanych retinosomami lub służyć jak substrat enzymu RPE65. RPE65 izomeryzuje formę *całkowicie-trans* do formy *11-cis* i hydrolizuje wiązanie estrowe. W wyniku tych sprzężonych procesów powstaje *11-cis-retinol*, który jest enzymatycznie utleniany do *11-cis-retinalu*. W ten sposób chromofor pigmentów wzrokowych jest odnawiany i po przetransportowaniu z RPE do zewnętrznych segmentów fotoreceptorów może się wiązać z opsyną, regenerując stan ciemny Rho. Ze względu na cykliczność zużycia i regeneracji proces ten jest znany jako cykl retinoidowy. W odróżnieniu do niefluoryzujących retinali zarówno retinole, jak i estry retinyłu charakteryzują się sporymi wydajnościami kwantowymi fluorescencji, a kinetyka zmian zawartości tych fluoroforów w obszarze zewnętrznych segmentów fotoreceptorów i RPE odzwierciedla sprawność kluczowych etapów cyklu retinoidowego (40). Kinetykę tych zmian możemy monitorować mikroskopią dwufotonową *in vivo* w czasie adaptacji do ciemności lub w trakcie ciągłej ekspozycji na światło.

Co więcej, zmiany w zawartości retinoidów i ich kinetykę w odpowiedzi na światło możemy monitorować przy różnorodnych manipulacjach genetycznych i podejściach terapeutycznych. Testujemy też leki będące pochodnymi witaminy A, które również są podatne na wzbudzenie dwufotonowe. TPM może wykrywać także produkty kondensacji retinali, które mają właściwości fluorescencyjne, gromadzą się z wiekiem w RPE i mogą mieć znaczenie w rozwoju AMD (49–52).

### Lista cytowanych prac

1. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
2. Okada, T., Le Trong, I., Fox, B. A., Behnke, C. A., Stenkamp, R. E., and Palczewski, K. (2000) X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J. Struct. Biol.* 130, 73–80.
3. Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A. N., Elstner, M., Entel, P., and Buss, V. (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J. Mol. Biol.* 342, 571–583.
4. Li, J., Edwards, P. C., Burghammer, M., Villa, C., and Schertler, G. F. (2004) Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J. Mol. Biol.* 343, 1409–1438.
5. Stenkamp, R. E. (2008) Alternative models for two crystal structures of bovine rhodopsin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* D64, 902–904.
6. Hubbell, W. L., Altenbach, C., Hubbell, C. M., and Khorana, H. G. (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv. Protein Chem.* 63, 243–290.
7. Lu, Z. L., Saldanha, J. W., and Hulme, E. C. (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 140–146.
8. Park, P. S., Filipek, S., Wells, J. W., and Palczewski, K. (2004) Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry* 43, 15643–15656.
9. Becker, O. M., Shacham, S., Marantz, Y., and Noiman, S. (2003) Modeling the 3D structure of GPCRs: advances and application to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 353–361.

10. Lodowski, D. T., Angel, T. E., and Palczewski, K. (2009) Comparative analysis of GPCR crystal structures. *Photochem. Photobiol.* 85, 425–430.
11. Park, P. S., Lodowski, D. T., and Palczewski, K. (2008) Activation of G-protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 107–141.
12. Sprang, S. R. (2011) Cell signalling: Binding the receptor at both ends. *Nature* 469, 172–173.
13. Topiol, S., and Sabio, M. (2009) X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem. Pharmacol.* 78, 11–20.
14. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., and Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363.
15. Rosenbaum, D. M., Zhang, C., Lyons, J. A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D. H., Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Devree, B. T., Sunahara, R. K., Chae, P. S., Gellman, S. H., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Caffrey, M., Gmeiner, P., and Kobilka, B. K. (2011) Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469, 236–240.
16. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469, 175–180.
17. Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J. G., Nehme, R., Edwards, P. C., Leslie, A. G., Schertler, G. F., and Tate, C. G. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* 469, 241–244.
18. Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P., and Stevens, R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211–1217.
19. Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S., and Palczewski, K. (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 42, 2759–2767.
20. Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J. A., and Palczewski, K. (2006) Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16123–16128.
21. Garczarek, F., and Gerwert, K. (2006) Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy. *Nature* 439, 109–112.
22. Wikstrom, M., Verkhovskiy, M. I., and Hummer, G. (2003) Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 61–65.
23. Osyczka, A., Moser, C. C., and Dutton, P. L. (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* 30, 176–182.
24. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5, 30–34.
25. Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 409–435.
26. Milligan, G., Canals, M., Padiani, J. D., Ellis, J., and Lopez-Gimenez, J. F. (2006) The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 145–161.
27. Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., and Palczewski, K. (2003) G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 851–879.

28. Arnis, S., and Hofmann, K. P. (1993) Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7849–7853.
29. Salamon, Z., Wang, Y., Soulages, J. L., Brown, M. F., and Tollin, G. (1996) Surface plasmon resonance spectroscopy studies of membrane proteins: transducin binding and activation by rhodopsin monitored in thin membrane films. *Biophys. J.* 71, 283–294.
30. Alves, I. D., Salgado, G. F., Salamon, Z., Brown, M. F., Tollin, G., and Hruby, V. J. (2005) Phosphatidylethanolamine enhances rhodopsin photoactivation and transducin binding in a solid supported lipid bilayer as determined using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Biophys. J.* 88, 198–210.
31. Fotiadis, D., Jastrzebska, B., Philippsen, A., Muller, D. J., Palczewski, K., and Engel, A. (2006) Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 252–259.
32. Hille, B. (1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9, 187–195.
33. Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.
34. Struts, A. V., Salgado, G. F., Martinez-Mayorga, K., and Brown, M. F. (2011) Retinal dynamics underlie its switch from inverse agonist to agonist during rhodopsin activation. *Nat Struct Mol Biol.*
35. Angel, T. E., Chance, M. R., and Palczewski, K. (2009) Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8555–8560.
36. Orban, T., Gupta, S., Palczewski, K., and Chance, M. R. (2010) Visualizing water molecules in transmembrane proteins using radiolytic labeling methods. *Biochemistry* 49, 827–834.
37. Jastrzebska, B., Golczak, M., Fotiadis, D., Engel, A., and Palczewski, K. (2009) Isolation and functional characterization of a stable complex between photoactivated rhodopsin and the G protein, transducin. *FASEB J.* 23, 371–381.
38. Jin, S., Cornwall, M. C., and Oprian, D. D. (2003) Opsin activation as a cause of congenital night blindness. *Nat. Neurosci.* 6, 731–735.
39. Owsley, C., McGwin, G., Jr., Jackson, G. R., Kallies, K., and Clark, M. (2007) Cone- and rod-mediated dark adaptation impairment in age-related maculopathy. *Ophthalmology* 114, 1728–1735.
40. Kiser, P. D., Golczak, M., and Palczewski, K. (2014) Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chem. Rev.* 114, 194–232.
41. van den Berg, T. J., and Spekrijse, H. (1997) Near infrared light absorption in the human eye media. *Vision Res.* 37, 249–253.
42. Boettner, E. A., and Wolter, J. R. (1962) Transmission of the ocular media. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1, 776–183.
43. Wolf, W. (2011) The unique potential for noninvasive imaging in modernizing drug development and in transforming therapeutics: PET/MRI/MRS. *Pharm. Res.* 28, 490–493.
44. Masters, B. R., and So, P. T. (2004) Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 63, 3–11.
45. Goppert-Mayer, M. (2009) Elementary processes with two quantum transitions. *Annalen Der Physik* 18, 466–479.
46. Zipfel, W. R., Williams, R. M., and Webb, W. W. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369–1377.

47. So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R., and Berland, K. M. (2000) Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 399–429.
48. Helmchen, F., and Denk, W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2, 932–940.
49. Palczewska, G., Maeda, T., Imanishi, Y., Sun, W., Chen, Y., Williams, D. R., Piston, D. W., Maeda, A., and Palczewski, K. (2010) Noninvasive multiphoton fluorescence microscopy resolves retinol and retinal condensation products in mouse eyes. *Nat. Med.* 16, 1444–1449.
50. Palczewska, G., Dong, Z., Golczak, M., Hunter, J. J., Williams, D. R., Alexander, N. S., and Palczewski, K. (2014) Noninvasive two-photon microscopy imaging of mouse retina and retinal pigment epithelium through the pupil of the eye. *Nat. Med.* 20, 785–789.
51. Imanishi, Y., Batten, M. L., Piston, D. W., Baehr, W., and Palczewski, K. (2004) Noninvasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye. *J. Cell Biol.* 164, 373–383.
52. Imanishi, Y., Gerke, V., and Palczewski, K. (2004) Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies. *J. Cell Biol.* 166, 447–453.