

Р. Н. ЭТИНГОФ, А. А. ЖУЧИХИНА

**О ВОЗМОЖНОМ МЕХАНИЗМЕ ВЛИЯНИЯ РОДОПСИНА
НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ
(ИНАКТИВАЦИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ)**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 12 VI 1969)

Вопрос о связи родопсина — первичного акцептора световых квантов — с ферментными системами наружных сегментов представляет существенный интерес для проблемы фоторецепции. В настоящей работе показано, что одним из механизмов влияния родопсина на ферментативную активность может быть обусловленная хромопротеидом инактивация фермента.

Работа была проведена на изолированных наружных сегментах сетчатки быка (1). Из сегментов в различных вариантах опытов получали 4 типа экстрактов: А — солевой (2); Б — тритоновый; В — тритоновый, такой же как и Б, но не обладающий ферментативной активностью лактатдегидрогеназы (1.1.1.27 — лактат-НАД-оксидоредуктаза (ЛДГ)) и Г — дигитониновый, так же как и В, не содержащий фермента. Для подавления ферментативной активности в экстрактах В и Г осадок сегментов перед обработкой детергентами гомогенизировали в 4% растворе алюмокалиевых квасцов и оставляли сегменты в этом растворе на 1 час, после чего тщательно (3—5 раз) промывали осадок 9% раствором NaCl и затем уже добавляли раствор детергента. Все процедуры по получению сегментов и экстрактов, а также определения ферментативной активности в «темновых» пробах проводили при глубоко красном свете. В ряде экспериментов в качестве источника фермента использовали кристаллический препарат ЛДГ из мышц свиньи (фирма «Reanal» Венгрия). Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически или по восстановлению пирувата (2) или по окислению лактата (3). Освещение экстрактов осуществляли через водный фильтр, лампой накаливания, освещенность 1000 лк, время варьировало.

Ранее было установлено, что полученные из «темновых» сегментов солевые экстракты обладали меньшей ЛДГ-активностью, чем экстракты сегментов, предварительно подвергавшиеся действию света (2). Освещение же самих же себе уже готовых солевых экстрактов не приводило к изменениям в активности фермента. В настоящей работе освещению подвергали тритоновые экстракты сегментов (экстракты Б), содержащие, в отличие от солевых, все липопротеидные компоненты сегментов, и в том

Таблица 1
Влияние освещения на ЛДГ-активность тритоновых экстрактов наружных сегментов

№ опыта	Активность $\mu\text{мол. НАД за 1 мин.} \times 10$		Изменение активности, %
	«темновые» пробы	после освещения	
1	0,506	0,361	-29
2	0,410	0,361	-12
3	0,626	0,545	-13
4	0,183	0,144	-21
5	0,193	0,173	-10
6	0,520	0,385	-26
7	0,308	0,308	0
8	0,317	0,279	-15
9	0,419	0,318	-26
10	0,375	0,328	-13

-17±2,8

числе родопсин. Из табл. 1 следует, что в данном случае имело место некоторое уменьшение (в среднем на 17%) ферментативной активности в «световых» пробах по сравнению с «темновыми». Относительно небольшой эффект, наблюдаемый в этих опытах, мог быть объяснен тем обстоятельством, что используемые в данном случае экстракты В необходимо было для определения ферментативной активности значительно разводить, что соответственно приводило и к уменьшению содержания в них родопсина. Поэтому в следующей серии экспериментов попытались изменить соотношение фермент/родопсин в пользу последнего; для этого смешивали в различных пропорциях солевые экстракты сегментов (А) и «неферментные» их препараты, содержащие родопсин, — экстракты В и Г. Смесь инкубировали несколько минут, а затем в аликвоте определяли ферментативную активность в обычных условиях. Оказалось, что в такой модификации опытов, еще до освещения испытуемой смеси, имело место заметное уменьшение активности фермента. Этот эффект четко воспроизводился с разными образцами родопсина, независимо от характера его экстракции (дигитонин или тритон). Такой же эффект торможения наблюдали и на смеси кристаллического фермента с экстрактами В и Г. Добавление к ферменту заранее обесцвеченного родопсина или чистого раствора тритона X-100 не изменяло скорости реакции. Этот эффект свидетельствовал о том, что торможение ферментативной активности было обусловлено, по-видимому, именно «темновым» родопсином, не зависело от продуктов его распада и других компонентов, содержащихся в добавляемом экстракте. Типичные результаты этих опытов приведены в табл. 2 (серия I).

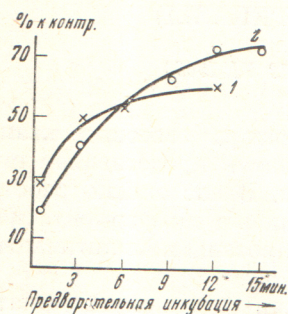


Рис. 1. Влияние времени предварительной инкубации фермента и родопсина на степень торможения ферментативной активности. Контроль — кристаллическая ЛДГ без добавок. Два опыта. В качестве источника родопсина использовали экстракт В в соотношении фермент — хромопротеид 3 : 1. Объяснение в тексте

Степень торможения ферментативной активности под действием родопсина определялась его количеством в смеси (табл. 2, серия I) и продолжительностью предварительной инкубации хромопротеида с ферментом (рис. 1).

Таким образом, помимо отмеченного ранее (табл. 1) «светового» торможения, наблюдаемого при освещении естественной смеси фермента с зрительным пигментом (экстракты Б), был показан еще «темновой» эффект родопсина, заключающийся также в торможении ферментативной активности. Этот эффект проявлялся при искусственном смешивании ферментных препаратов с хромопротеидом. При освещении таких искусственных смесей, содержащих родопсин и уже «заторможенный» им фермент, в первый момент имело место незначительное увеличение степени торможения в этих пробах по сравнению с «темновыми», однако в дальнейшем эта разница исчезла (табл. 2, серия II). Следует указать, что при такой постановке опытов сравнительная оценка «темнового» влияния родопсина и «светового» воздействия вообще затруднительна, так как в «световых» и «темновых» пробах соотношение фермент/родопсин неодинаково за счет непрерывной убыли «темнового» родопсина в процессе освещения. Вопрос о связи «светового» и «темнового» эффекта неясен и нуждается в дальнейшем изучении.

Встает вопрос о возможном механизме влияния родопсина на фермент. Что касается «светового» воздействия, то можно было предположить, что в данном случае имеет место тот же принцип действия, который показан при освещении смеси кристаллических препаратов ЛДГ с метиленовой синью, т. е. фотоинактивация фермента, обусловленная повреждением гистидинового участка каталитического центра (3, 4). Такого типа опыты

были нами поставлены на смесях солевых экстрактов сегментов (экстракты А) с краской, причем было выяснено, что в качестве протекторов «светового» воздействия, т. е. веществ, препятствующих инактивации фермента при освещении, могли быть использованы гистидин и тиаминпирофосфат⁽⁵⁾ (табл. 2, серия III). Наиболее интересно, что такого же типа предохраняющее действие оказывали эти вещества и при освещении смеси экстрактов А или кристаллического фермента с родопсином (табл. 2, се-

Таблица 2

Влияние родопсина на активность ЛДГ в различных условиях опытов

Серия опытов	Состав смеси (соотношение компонентов, добавки)*	Время предварит. инкубации фермента и родопсина, мин.	Освещение смеси	Активность фермента, $\mu\text{мол. НАД}$ за 1 мин $\times 10$	Изменение активности по сравн. с контролем, %
I	А (контроль)	—	—	0,188	
	То же + В (1:1)	2	—	0,072	-62
	» » » (2:1)	2	—	0,115	-39
	» » » (3:1)	2	—	0,144	-23
	ЛДГ _{кристал} (контроль)	—	—	0,145	
	То же + В (1:1)	2	—	0,086	-41
II	» » + обесцв. В (1:1)	2	—	0,140	-3
	» » + Г** (1:1)	2	—	0,072	-50
	ЛДГ _{кристал} (контроль)	—	—	0,288	
	То же + В (2:1)	0,5	—	0,205	-28
		0,5	+	0,175	-39
		6	—	0,115	-60
III		6	+	0,125	-57
	А + МС (120 $\mu\text{г}$) (контроль)	10	+	0,097	
	То же + Ги (1,4 мг)	10	+	0,135	+39
	» » + ТПФ (2,9 мг)	10	+	0,144	+48
IV	А + В (2:1) (контроль) ³	7	+	0,057	
	То же + Ги (1,4 мг)	7	+	0,097	+70
	» » + ТПФ (2,9 мг)	7	+	0,145	+154
	ЛДГ _{кристал} + В (1:1) (контроль)	5	+	0	
	То же + Ги (1,4 мг)	5	+	0,288	
	» » + ТПФ (2,9 мг)	5	+	0,288	

* Буквами А — Г обозначены экстракты; Ги — гистидин; ТПФ — тиаминпирофосфат; МС — метиленовая синь.

** E = 280/500—5; 400/500—0,21.

рия IV). Влияют ли эти соединения в данном случае на развитие «темнового» торможения или на «световой» эффект, пока установить не удалось.

Полученные данные дают основание предполагать, что «темновой» родопсин может действовать как один из белковых регуляторов ферментативной активности. Не исключена также возможность фотоинактивации фермента в присутствии родопсина. Справедливость этих предположений, так же как и механизм описанных эффектов, являются предметом дальнейших исследований.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
8 VI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ С. А. Щуколюков, Бюлл. эксп. биол. и мед., в. 9, 122 (1966). ² Р. Н. Эттингоф, С. А. Щуколюков, А. А. Жучихина, ДАН, 175, 234 (1967). ³ В. S. Millar, G. Schwert, J. Boil. Chem., 238, 3249 (1963). ⁴ D. Balinsky, Biochim. et biophys. acta, 122, 537 (1966). ⁵ Г. А. Кочетов, К. Р. Кобылянская, Вопр. мед. хим., 11, 80 (1965).