

УДК 577. 158 + 612. 843

БИОХИМИЯ

Р. Н. ЭТИНГОФ, Л. Г. КОЩЕВА, А. СОБОТА, И. А. ОСТАПЕНКО
**О РАЗДЕЛЕНИИ АТФаз И РОДОПСИНА НАРУЖНЫХ СЛОЕВ
СЕТЧАТКИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 25 I 1971)

В первичных акцепторах световых квантов — наружных члениках палочек и колбочек сетчатки разными методами исследования показано наличие Mg^{2+} -зависимой и Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -стимулируемой АТФаз (3. 6. 1. 4 — АТФ-фосфогидролаза) (¹⁻⁶). Для изучения роли этих ферментных систем на первичных этапах рецепторного акта необходимо в первую очередь выяснить взаимоотношение АТФаз с зрительным пигментом — родопсином.

Некоторые авторы предполагают, что сам родопсин обладает свойствами фермента, в частности является АТФазой Mg^{2+} -типа (^{5,7}). По мнению же других исследователей, такое представление маловероятно (^{2,3,6}).

Таблица 1

Экстрагируемость родопсина из фракции наружных слоев сетчатки при разных концентрациях тритона X-100, %

Концентрация, детергента, %	Надосадочная жидкость	Осадок	Концентрация, детергента, %	Надосадочная жидкость	Осадок
0,05	0	100	0,2	65	—
0,1	19	80	0,2	85	13
0,1	12	88	0,25	97	3
0,1	20	81	0,25	87	16
0,1	6	95	0,5	98	2
0,15	55	45	0,6	97	0

Что касается возможности препаративного разделения Mg^{2+} -стимулируемой АТФазы и Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -зависимого фермента, то имеющиеся в этом отношении сведения единичны (^{8,9}), и вопрос о характере взаимоотношений этих ферментных систем не ясен (^{8,10,11}).

Задачей настоящей работы явилось изучение связи родопсина с АТФазными системами и попытка разделения Mg^{2+} -зависимого и Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -стимулируемого ферментов.

Работа была проведена на тритоновых экстрактах изолированных наружных сегментов (¹²) сетчатки глаз быков. Для экстракции родопсина и АТФаз из фракции сегментов использовали растворы с разными концентрациями тритона X-100 от 0,05 до 0,6%, приготовленные на 0,02 M трис-буфере, pH 7,4. Время экстракции 1 — 2 часа при $t = 2-4^\circ$. В опытах, в которых ферментативную активность пытались отделить от родопсина путем использования разных концентраций детергента, экстракты наружных сегментов центрифугировали (100 000 g, 30 мин., центрифуга Spinco L, ротор 50).

В опытах по гель-хроматографии экстракцию проводили при постоянном встряхивании, используя 0,25% забуференные растворы детергента, приготовленные или на 0,15 M NaCl или на 0,1 M сахарозе; эти же

смеси, но с концентрацией детергента 0,05%, применяли для уравнивания колонки и элюции. В некоторых опытах суспензию сегментов перед экстракцией подвергали обработке ультразвуком (22 кгц, 5 раз по 10 сек.).

Колонку (1,5 × 80 см) заполняли сефарозой 4В. Перед нанесением пробы на колонку полученные экстракты центрифугировали (20 000 g, 15 мин.) и концентрировали в 5 раз при помощи сефадекса Г-25 по методу (13) с некоторыми модификациями; на колонку наносили 2,5 мл конечного экстракта наружных сегментов. Фракции собирали по 3 мл, скорость элюции 20 мл/час. Все операции проводили при красном свете (длина волны ≥ 620 мμ) и при t 2–4°.

Mg²⁺-стимулируемую и Mg²⁺, Na⁺, K⁺-зависимую АТФазные активности определяли по несколько видоизмененному методу (2,6), фосфор — по методу (14) или (15); белок по методу (16). Родопсин измеряли по дифференциальному спектру в присутствии 0,1 M раствора гидроксиламина с помощью спектрофотометра СФ-10.

В первой серии опытов исследовали экстрагируемость родопсина из наружных сегментов разными концентрациями тритона X-100 (0,05–0,6%). Молярное соотношение детергента к родопсину составляло в этих опытах $\sim 3 \cdot 10^2$. Определение родопсина проводили в нецентрифугированном экстракте, надосадочной жидкости и осадке, полученных после центрифугирования. Из данных табл. 1 следует, что при использовании 0,05% растворов детергента родопсин в условиях наших опытов не экстрагировался; 0,1% тритон извлекал 6–20% зрительного пигмента; 0,15% тритон — около 50% пигмента; 0,2% тритон извлекал 60–80% сегмента. При увеличении концентраций тритона свыше 0,2% родопсин извлекали почти полностью.

В следующей серии экспериментов сравнивали экстрагируемость Mg²⁺-АТФазы из наружных сегментов при использовании детергента в концентрациях (от 0,05 до 0,25%), при которых родопсин извлекался в различной степени. Активность Mg²⁺-зависимой АТФазы в надосадочной жидкости и осадке сопоставляли с активностью ферментной системы в нецентрифугированном экстракте, принимая последнюю за 100%. Из данных этих опытов, представленных на рис. 1, следует, что не было никакой корреляции между экстрагируемостью родопсина и Mg²⁺-АТФазы: 0,05% растворы детергента, не извлекая даже следов родопсина, переводили в раствор около 50% активности фермента; 0,1% тритон, экстрагируя 6–20% родопсина, извлекал при этом 70–80% Mg²⁺-АТФазной активности, и только 0,2–0,25% растворы детергента экстрагировали почти полностью и фермент и родопсин.

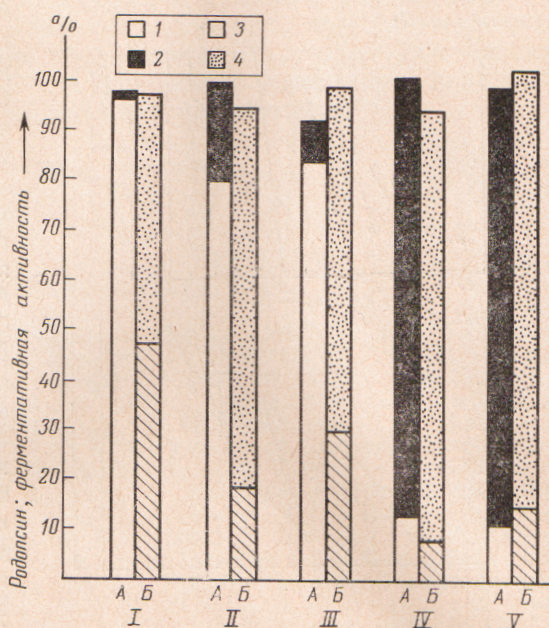


Рис. 1. Сравнительная экстрагируемость активности родопсина (А) и Mg²⁺-АТФазы (В) из фракции наружных слоев сетчатки. I — в осадке для А, 2 — в надосадочной жидкости для А, 3 — в осадке для В, 4 — в надосадочной жидкости для В. Концентрации тритона X-100: 0,05% (I), 0,1% (II, III), 0,2% (IV), 0,25% (V)

Активность Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -зависимой АТФазы была в условиях этих опытов значительно подавлена из-за влияния детергента, и поэтому результаты по распределению активности этой ферментной системы в изучаемых пробах не приводятся.

Таким образом, на основании этих экспериментов можно заключить, что значительная доля (до 80%) активности Mg^{2+} -зависимой АТФазы

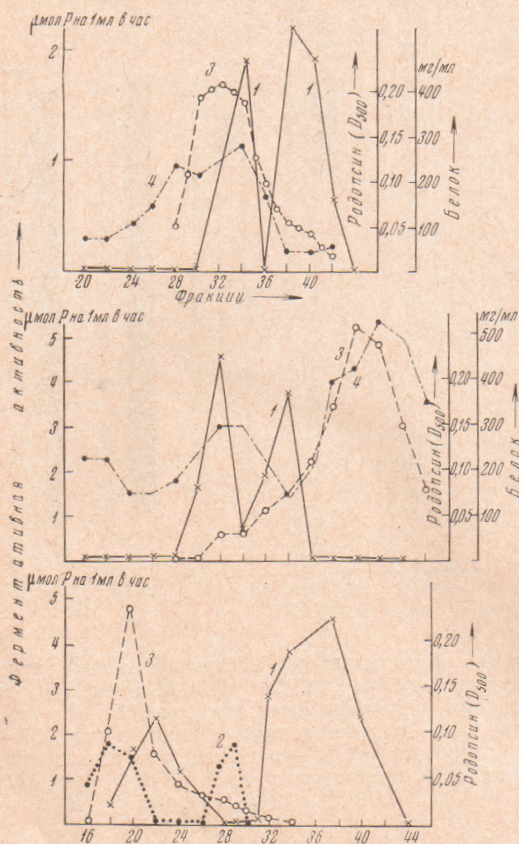


Рис. 2. Гель-хроматография тритоновых экстрактов наружных сегментов. А — экстракция 0,25% тритоном на 0,1 М сахарозе, элюция 0,05% тритоном на 0,1 М сахарозе; Б — экстракция 0,25% тритоном на 0,15 М NaCl, элюция 0,05% тритоном на 0,15 М NaCl; В — предварительная обработка ультразвуком суспензии наружных сегментов в 0,05% тритоне на 0,1 М сахарозе, элюция таким же раствором. 1 — активность Mg^{2+} -АТФазы, 2 — активность Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазы, 3 — родопсин, 4 — белок

обнаружения незначительной активности этой системы в элюатах ферментативная активность была также представлена двумя пиками (рис. 2В), не соответствующими ни родопсину, ни Mg^{2+} -зависимому ферменту.

Из данных рис. 2А и 2Б следует также, что основной пик суммарного белка почти совпадал с распределением родопсина; этот факт свидетельствует, по-видимому, что родопсин являлся одним из основных белков, экстрагируемых детергентом из наружных сегментов.

При сравнении рис. 2А и 2Б обращает на себя внимание то, что в одном случае (рис. 2Б) пик зрительного пигмента обнаруживали во фракциях, последующих тем, которые обладали ферментативной активностью;

была отделена от зрительного пигмента. Дальнейшее разделение АТФазных активностей и родопсина было достигнуто в опытах с применением гель-хроматографии.

Из материалов этих экспериментов (рис. 2), в которых одновременно во всех фракциях определяли активности АТФаз, родопсин и суммарный белок, следует, что родопсин и Mg^{2+} -зависимая АТФаза, представленная всегда в наших опытах двумя пиками, элюировались по-разному и пики их максимального выхода не совпадали. Так, на рис. 2А видно, что пик выхода родопсина приходился на фракцию 32; ближайший же к родопсину пик Mg^{2+} -АТФазы — на фракцию 34; на рис. 2В — соответствующие пики наблюдали в фракциях 20 и 22. Еще более четкое распределение родопсина и Mg^{2+} -зависимой АТФазы имело место в опыте, данные которого отражены на рис. 2Б. Пик выхода родопсина обнаруживали в данном случае в фракции 40; ближайший к зрительному пигменту пик выхода фермента в фракции 34.

Что касается Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазы, то в ряде опытов последнюю во фракциях вообще не находили, так как ее инактивация происходила, по-видимому, и за счет влияния детергентов и благодаря пропусканию через колонку (*). В случае, однако,

в других (рис. 2А) имела место обратная картина. Это различие было связано с использованием для экстракции и элюции разных смесей: при наличии в них NaCl выход родопсина следовал за фракциями, обладающими активностью Mg^{2+} -АТФазы (рис. 2Б); без NaCl родопсин обнаруживали во фракциях, предшествующих ферменту. На основании этих данных можно предполагать, что ионная сила имеет существенное значение для размера образующихся мицелл белка, и в частности родопсина.

Полученные факты дают основание заключить, что Mg^{2+} -зависимая АТФаза не является родопсином. Вопрос о природе двух пиков последней и взаимосвязи ее с Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} -стимулируемым ферментом в наружных сегментах является предметом дальнейших исследований.

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

Поступило
9 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. Sekoguti, J. Cell. and Comp. Physiol., 56, 129 (1960). ² S. L. Bonting, L. L. Caravaggio, M. R. Canady, Exp. Eye Res., 3, 47 (1964). ³ R. N. Frank, T. U. Goldsmith, Arch. Biochem. and Biophys., 110, 517 (1965). ⁴ D. G. Scarpelli, E. L. Craig, J. Cell Biol., 17, 279 (1963). ⁵ М. А. Островский, И. Б. Федорович, Биофизика, 13, 793 (1968). ⁶ Р. Н. Этингер, С. А. Шуклюков Цитология, 11, 1542 (1969). ⁷ И. Б. Федорович, Автореф. диссертации, Пушино, 1969. ⁸ F. Medzihradsky, M. H. Kline, L. E. Hokin, Arch. Biochem. and Biophys., 121, 311 (1967). ⁹ S. Uesugi, A. Kahlenberg et al., Arch. Biochem. and Biophys., 130, 156 (1969). ¹⁰ A. E. Shamoo, D. E. Gentile, W. A. Brodsky, Biochim. et biophys. acta, 203, 495 (1970). ¹¹ J. Somogyi, M. Budai et al., Acta biochim. biophys. Acad. sci. Hung., 4, 249 (1969). ¹² С. А. Шуклюков, Бюлл. эксп. биол. и мед., 62, 122 (1966). ¹³ Г. Дегерман, Гель-хроматография, М., 1970, стр. 94. ¹⁴ P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner, Anal. Chem., 28, 1756 (1956). ¹⁵ H. Eibl, W. E. Ma Lands, Anal. Biochem., 30, 51 (1969). ¹⁶ O. H. Lowry, N. I. Rosenbraugh et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).