

УДК 577.158+612.843

БИОХИМИЯ

А. СОБОТА, И. Б. ОСТРЕЦОВА, М. П. РЫЧКОВА,
Р. Н. ЭТИНГОФ

**ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ Na^+ , K^+ -АТФазной И
n-НИТРОФЕНИЛФОСФАТАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ НАРУЖНЫХ
СЕГМЕНТОВ СЕТЧАТКИ ПРИ ОСВЕЩЕНИИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 20 VI 1972)

Наличие относительно активных АТФазных систем, в частности Na^+ - K^+ -АТФазы (3.6.1.4-АТФ-фосфогидролазы) в наружных сегментах палочек сетчатки показано сравнительно давно (¹⁻⁴). Предполагают, что Na^+ , K^+ -АТФаза служит для поддержания градиента концентраций Na^+ и K^+ в системе диск — междисковое пространство (⁵). Наличие разности концентраций Na^+ и K^+ внутри структуры первичных акцепторов световых квантов экспериментально доказано (^{6, 7}). Имеется ряд биохимических работ об изменениях выхода Na^+ и K^+ из изолированных наружных сегментов под действием света (^{6, 8-11}) и физиологических данных, свидетельствующих о ведущей роли ионных перемещений в первичном механизме рецепторного акта (¹²⁻¹⁴). На основании этих материалов следовало ожидать изменений Na^+ - K^+ -АТФазной активности под влиянием функциональной нагрузки. Однако до сих пор попытки разных исследователей (а также наши) обнаружить какие-либо изменения активности этой системы в мембранах наружных сегментов под действием света были безуспешны (^{2, 3}).

В настоящем сообщении приводятся данные о фотоиндуцированном уменьшении Na^+ - K^+ -АТФазной, а также K^+ -*n*-нитрофенилфосфатазной активностей в изолированных наружных сегментах; однако для выявления этих изменений необходимы были специальные условия экспериментов.

Работа выполнена на изолированных наружных сегментах палочек сетчатки быка. Фракцию наружных сегментов получали путем модификации ранее применяемых методов (^{15, 16}). Сетчатки после промывания в 0,25 M сахарозе помешали в 1 M раствор сахарозы (1:1; конечная концентрация сахарозы ~0,6 мол/л) и после встряхивания (5 мин.) и фильтрования через слой капроновой ткани надосадочную жидкость насылаивали на 1,06 M раствор сахарозы ($d = 1,139$). После центрифугирования (горизонтальный ротор, 20 мин., 8000 g) слой наружных сегментов, находящихся на границе двух растворов сахарозы, отсасывали и дважды промывали 0,25 M раствором сахарозы. Все операции проводили при красном свете.

Чистоту получаемых фракций оценивали по соотношению родопсина и белка (¹⁶), определяемого методом Лаури и др. (¹⁷).

АТФазную активность определяли так же, как и в предыдущей работе (¹⁸), но при 20°; *n*-нитрофенилфосфатазную — в среде (конечный объем 0,3 мл), содержащей (в ммол/л): KCl 25, Mg^{2+} 5, трис-HCl 60 (pH 8,0), холинхлорид 70, *n*-нитрофенилфосфат 5, белок ~20 мг, в присутствии 0,3 mM строфантиника К или без него. Реакцию останавливали (инкубация 30 мин., 20°) добавлением 0,2 мл 10% CCl_3COOH , через 5 мин. прибавляли 1 мл 0,6 M глицинового буфера (pH 9,8) и затем после центрифуги-

рования измеряли оптическую плотность при 400 м μ , рассчитывая концентрацию продукта реакции по молярному коэффициенту его экстинкции (¹⁹). Ферментативную активность определяли как разность в пробах без строфантина и при его наличии.

При варьировании концентраций катионов в среде инкубации осмотичность выдерживали за счет добавления холинхлорида или сахараозы.

Перед опытом фракции наружных сегментов (или свежие, или после оттаивания хранящихся при -10° фракций) суспензировали в 0,25 M сахараозе и делили на две части, одну из которых освещали (15 мин, лампа накаливания 100 вт, водный фильтр), другую выдерживали при той же температуре в темноте.

Ранее в работах, в которых изучали влияние освещения на АТФазную активность наружных сегментов сетчатки, была использована стандартная среда с относительно высоким содержанием АТФ (2-3 ммол/л) и Na^+ (60 ммол/л). В этом случае не было выявлено изменений ферментативной активности под действием света (^{2, 3}).

Изменив условия опытов, в частности уменьшив концентрацию АТФ (0,2-0,8 ммол/л), мы наблюдали уменьшение Na^+ - K^+ -АТФазной активности в «световых» пробах по сравнению с «темновыми». Эффект торможения был, однако, в данном случае небольшим и составлял в среднем при наличии 0,4 mM АТФ в среде 71% (рис. 1). Более выраженное торможение ферментативной активности имело место, когда одновременно с АТФ уменьшали содержание Na^+ в инкубационной среде. Из средних результатов этих опытов, представленных на рис. 1, следует, что при концентрации АТФ 0,4 ммол/л и Na^+ 15 ммол/л торможение ферментативной активности составляло 30%; при наличии 30 mM Na^+ 22%.

Уменьшение Na^+ - K^+ -АТФазной активности сопровождалось, как правило, увеличением Mg^{2+} -зависимой АТФазы, однако степень этого увеличения была небольшой и значительно колебалась в отдельных экспериментах (рис. 1).

Таким образом, для выявления действия света на АТФазную активность наружных сегментов необходимы были условия реакции, не соответствующие тем, которые принято считать по содержанию катионов и субстрата в среде оптимальными для определения активности этой системы. Обычно для всех изученных объектов исследования оптимальное соотношение катионов в среде инкубации существенно сдвинуто в пользу Na^+ и K_m для Na^+ значительно больше, чем для K^+ (²⁰). При изучении влияния изменений концентраций катионов на Na^+ - K^+ -АТФазную активность наружных сегментов были выявлены несколько необычные свойства ферментной системы в этих структурах. На рис. 2 и в табл. 1 представлены результаты опытов по изменению ферментативной активности при варьировании содержания одного катиона (другой постоянен) и изменениях концентраций обоих (общая сумма 65 ммол/л) (табл. 1) в среде инкубации. Из приведенных данных очевидно, что активность Na^+ - K^+ -АТФазы наружных сегментов в отличие от многих других объектов исследования очень мало изменялась при резких колебаниях содержания катионов в инкубационной среде. Мало было выражено в данном случае и ингибирующее влияние на ферментативную активность высоких концентраций иона K^+ (табл. 1, рис. 2a). Значение K_m для K^+ составило в этих экспериментах $2,0 \pm 0,2$ ммол/л, для Na^+ — в пределах 1-3 ммол/л,

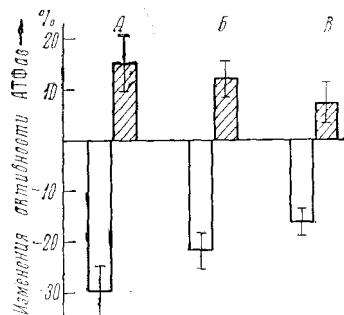


Рис. 1. Влияние освещения на АТФазную активность наружных сегментов (изменение в «световых» пробах по сравнению с темновыми). Концентрация Na^+ (в ммол/л): 15 (A), 30 (B), 60 (B). Содержание АТФ во всех пробах 0,4 ммол/л. Светлые столбики — Na^+ - K^+ -АТФаза, запятыханные — Mg^{2+} -АТФаза

что свидетельствует, по-видимому, об относительно высоком сродстве Na^+ к Na^+ , K^+ -АТФазе наружных сегментов. Следует также отметить, что в большинстве этих опытов реальную Na^+ , K^+ -АТФазную активность обнаруживали и без добавления иона Na в инкубационную смесь. Этот факт указывает на возможность использования внутренних ресурсов, имевшихся в изолированных наружных сегментах катиона, для осуществления

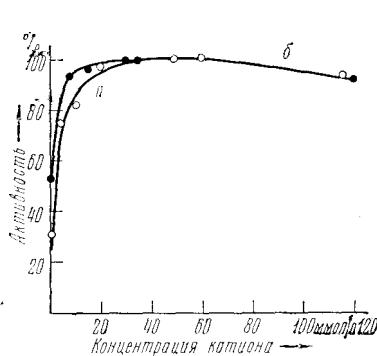


Рис. 2. Зависимость Na^+ , K^+ -АТФазной активности от содержания K^+ (а) и Na^+ (б) в среде. «Световые» наружные сегменты, АТФ 2 ммоль/л, Na^+ 58 мкмоль/л, K^+ 5 мкмоль/л, температура 37°

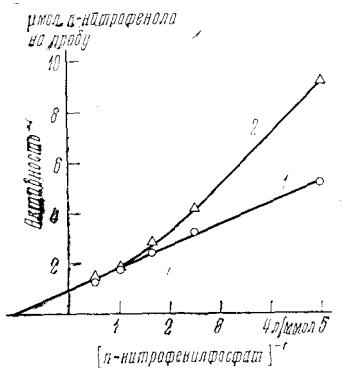


Рис. 3. Зависимость K^+ -n-нитрофенилфосфатазной активности от содержания субстрата в «темновых» и «световых» фракциях наружных сегментов. 1 — «темновые», 2 — «световые»

реакции. Наличие прочно и лабильно связанного Na^+ в последних показано (21). Возможность выявления Na^+ , K^+ -АТФазной активности без добавления Na^+ в среду можно также трактовать как следствие высокого сродства катиона к данной ферментной системе. Эта особенность последней может быть одной из причин, препятствующих выявлению функциональных сдвигов ее активности при стандартном содержании (60 мкмоль/л) Na^+ в инкубационной среде. Если «световые» изменения Na^+ , K^+ -АТФазы выражаются в изменениях условий взаимодействия фермента с катионом, то при избытке последнего и возможности «насыщения» всех акцепторных точек они не обнаруживаются. Естественно, что это предположение — предварительное и для окончательного решения вопроса о механизме торможения Na^+ , K^+ -АТФазы при освещении необходимы дополнительные эксперименты.

Для исследования последнего звена действия Na^+ , K^+ -АТФазы часто используют n-нитрофенилфосфат, считая, что n-нитрофенилфосфатазная активность, стимулируемая K^+ и ингибируемая убацином, отражает стадию распада фосфорилированного производного, образующегося по ходу реакций, осуществляемых Na^+ , K^+ -АТФазой (22). Поэтому в следующей серии опытов изучали влияние освещения на K^+ -n-нитрофенилфосфатазную активность наружных сегментов. Оказалось, что, как и в случае с Na^+ , K^+ -АТФазой, при уменьшении концентрации субстрата в среде инкубации имело место уменьшение ферментативной активности в «свето-

Таблица 4
 Na^+ , K^+ -АТФазная активность наружных сегментов сетчатки в средах с различным содержанием катионов

Концентрация катионов, мкмоль/л	Na^+ , K^+ -АТФазная активность в процентах к активности в стандартной среде *	
	K	Na^+
5		60
10		55
15		50
25		40
32		33
50		15
		100 (15)
		107 ± 3 (10)
		99 ± 5 (5)
		98 ± 4 (5)
		97 ± 2 (10)
		84 ± 5 (8)

* Здесь и в табл. 2 в скобках указано число опытов.

вых» пробах по сравнению с «темновыми». Так, при $0,2 M$ концентрации субстрата торможение в среднем составляло 41%; при $0,4 mM$ 20% (табл. 2). При увеличении концентрации n -нитрофенилфосфата в среде инкубации эффекта торможения не наблюдали. Анализ кривых рис. 3 свидетельствует о возможных конформационных изменениях фермента (в частности, его «К-центра») под действием света.

Таблица 2

Влияние освещения на K^+-n -нитрофенилфосфатазную активность наружных сегментов

Концен- трация субстрата, ммоль/л	K^+-n -нитрофенилфосфатазная активность, мкмоль. нитрофенола на 1 мг белка в час		Изменение в «световых» по сравне- нию с «тем- новыми», %
	в «темновых» фракциях	в «световых» фракциях	
0,2	58,2 ± 3,0 (5)	34,2 ± 2,0 (5)	-41
0,4	94,3 ± 5,4 (5)	75,9 ± 3,9 (5)	-20
0,6	124,8 ± 3,1 (5)	112,0 ± 5,7 (4)	-12
1,0	165,0 ± 2,5 (5)	166,3 ± 3,0 (5)	0

Совокупность полученных данных дает основание полагать, что освещение наружных сегментов приводит к изменениям их Na^+ -, K^+ -АТФазной активности, выражаящимся, по-видимому, в изменениях условий ее взаимодействия с катионами и субстратом. Эти изменения проявляются лишь в зоне определенных концентраций реагирующих компонентов.

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

Поступило
15 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Y. Sekoguti, J. Cell. Comp. Physiol., **56**, 129 (1960).
- ² S. L. Bonting, L. L. Caravaggio, M. K. S腺ady, Exp. Eye Res., **3**, 47 (1964).
- ³ R. N. Frank, T. U. Goldsmith, Arch. Biochem. and Biophys., **110**, 517 (1965).
- ⁴ И. Б. Федорович, М. А. Островский, Биофизика, **13**, 449 (1968).
- ⁵ S. L. Bonting, Current Topics in Bioenergetics, N. Y.—London, **3**, 1969, p. 351.
- ⁶ Р. Н. Этингоф, А. Л. Берман и др., Укр. биохим. журн., **43**, 60 (1971).
- ⁷ V. I. Govardovskii, Nature, New Biology, **234**, 53 (1971).
- ⁸ Р. Н. Этингоф, С. А. Шуколюков, В. Г. Леонтьев, ДАН, **156**, 979 (1964).
- ⁹ S. L. Bonting, A. D. Bingham, Exp. Eye Res., **6**, 400 (1967).
- ¹⁰ Y. A. Bowmaker, Vision Res., **10**, 601 (1970).
- ¹¹ В. Ф. Антонов, А. Л. Афанасьев и др., Биофизика, **16**, 78 (1971).
- ¹² G. B. Arden, H. Ernst, Nature, **223**, 528 (1969).
- ¹³ T. Tomita, Quart. Rev. Biophys., **3**, 179 (1970).
- ¹⁴ K. Zuckerman, Nature, New Biology, **234**, 29 (1971).
- ¹⁵ С. А. Шуколюков, Бюлл. эксп. биол. и мед., **62**, 122 (1966).
- ¹⁶ А. Л. Берман, Авто-реф. кандидатской диссертации, Л., 1972.
- ¹⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- ¹⁸ Р. Н. Этингоф, Л. Г. Концева и др., ДАН, **201**, 242 (1971).
- ¹⁹ O. L. Bessey, R. N. Love, J. Biol. Chem., **196**, 175 (1952).
- ²⁰ S. L. Bonting, Membrane, Metabolism and Ion Transport, London, 1970, p. 287.
- ²¹ В. Г. Леонтьев, А. Л. Берман, Р. Н. Этингоф, ДАН, **197**, 490 (1971).
- ²² R. Whittam, K. R. Wheeler, Ann. Rev. Physiol., **32**, 21 (1970).