

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. Крепом 20 VI 1972)

Наличие относительно активных АТФазных систем, в частности Na^+ , K^+ -АТФазы (3.6.1.4-АТФ-фосфогидролаза) 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 помещали 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 наслаивали 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 (рН 8,0), холинхлорид 70, n -нитрофенилфосфат 5, белок ~20 μg , в присутствии 0,3 mM строфантина К или без него. Реакцию останавливали (инкубация 30 мин., 20°) добавлением 0,2 мл 10% CSCl_3COOH , через 5 мин. прибавляли 1 мл 0,6 M глицинового буфера (рН 9,8) и затем после центрифуги-

рования измеряли оптическую плотность при 400 мμ, 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 осмотическую выдерживали за счет добавления холинхлорида или сахарозы.

Перед опытом фракции наружных сегментов (или свежие, или после оттаивания хранящихся при -10° фракций) суспендировали в 0,25 М сахарозе 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 мМ 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 мМ 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. 2а). Значение K_m для K^{+} составило в этих экспериментах $2,0 \pm 0,2$ ммол/л, для Na^{+} — в пределах 1–3 ммол/л,

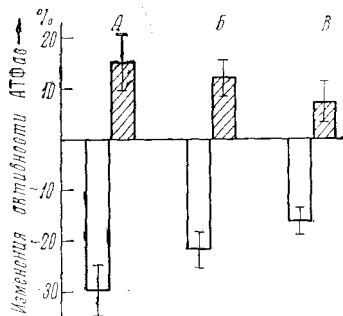


Рис. 1. Влияние освещения на АТФазную активность наружных сегментов (изменение в «световых» пробах по сравнению с «темновыми»). Концентрация Na^{+} (в ммол/л): 15 (А), 30 (В), 60 (В). Содержание АТФ во всех пробах 0,4 ммол/л. Светлые столбики — Na^{+} , K^{+} -АТФаза, заштрихованные — Mg^{2+} -АТФаза

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

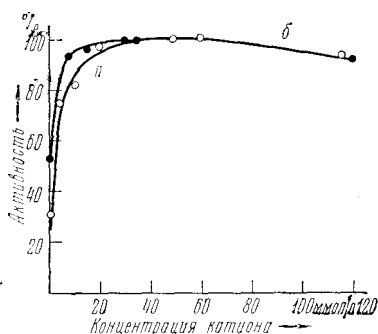


Рис. 2. Зависимость Na^+ , K^+ -АТФазной активности от содержания K^+ (а) и Na^+ (б) в среде. «Световые» наружные сегменты, АТФ 2 ммол/л, Na^+ 58 ммол/л, K^+ 5 ммол/л, температура 37°

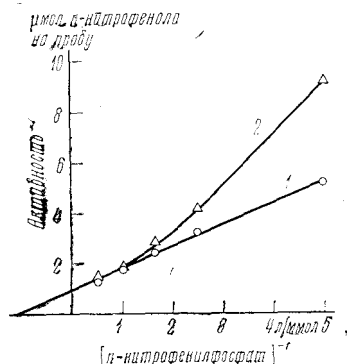


Рис. 3. Зависимость K^+ -*n*-нитрофенилфосфатазной активности от содержания субстрата в «темновых» и «световых» фракциях наружных сегментов. 1 — «темновые», 2 — «световые»

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 ммол/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 убаином, 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 1

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

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

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

вых» пробах по сравнению с «темновыми». Так, при 0,2 М концентрации субстрата торможение в среднем составляло 41%; при 0,4 мМ 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.

Т а б л и ц а 2

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

Концентрация субстрата, ммол/л	K^+ - <i>n</i> -нитрофенилфосфатазная активность, ммол. нитрофенола на 1 мг белка в час		Изменение в «световых» по сравнению с «темновыми», %
	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±3,4 (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, выражающимся, 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. Canady, 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. Шуклюков, В. Г. Леонтьев, ДАН, **156**, 979 (1964). ⁹ S. L. Bonting, A. D. Bangham, 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. V. 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. Шуклюков, Бюлл. эксп. биол. и мед., **62**, 122 (1966). ¹⁶ А. Л. Берман, Автореф. кандидатской диссертации, Л., 1972. ¹⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrought 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).