

П. А. ОСТАПЕНКО, В. В. ФУРАЕВ

ОБРАЗОВАНИЕ ИЗОРОДОПСИНА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА IN VITRO

(Представлено академиком Е. М. Крепом 26 XI 1972)

В процессе фоторецепции в сетчатке наряду с распадом зрительных пигментов под действием света постоянно осуществляется их регенерация (ресинтез). Благодаря этому содержанию родопсина в наружных сегментах палочек сетчатки (н.с.) поддерживается на определенном уровне и тем самым обеспечивается непрерывность восприятия света. Основным этапом регенерации родопсина является образование 11-цис ретиналя, так как соединение последнего с белковой частью зрительного пигмента (опсином) происходит спонтанно (¹). Литературные данные в отношении природы изомеразной реакции и процесса регенерации в целом немногочисленны и противоречивы (²⁻⁶). До настоящего времени не выяснены вопросы о структурной локализации отдельных этапов процесса ресинтеза, а также возможность использования эндогенного ретиналя при регенерации родопсина в изолированных н.с. (^{7, 8}).

В настоящей работе изучали условия образования зрительного пигмента во фракциях н.с. сетчатки быка и роль ее различных компонентов в этом процессе.

Фракцию н.с. получали следующим образом (⁹): фильтрат сетчаток, полученный после встряхивания последних в 1,02 *M* сахарозе, доводили до удельной плотности 1,135 г/см³, центрифугировали (6000 *g*, 15 мин.) и из полученной надосадочной жидкости после разведения ее в 3 раза 0,9% раствором NaCl осаждали (6000 *g*, 15 мин.) фракцию н.с. I. Для дальнейшей очистки фракцию н.с. I суспендировали в изотоническом растворе сахарозы ($d = 1,135$ г/см³), центрифугировали (6000 *g*, 15 мин.) и из супернатанта после разведения в 3 раза 0,9% раствором NaCl осаждали очищенную фракцию н.с. II. Опыты по регенерации проводили следующим образом. Гомогенат сетчатки или суспензию н.с., приготовленные на 0,1 *M* фосфатном буфере (рН 7,2), обесцвечивали в течение 30 мин. через фильтры ОС-14 и водный фильтр в присутствии ретиналя (полностью транс или 11-цис формы *) или без него. Растворы альдегида готовили с помощью твин-20 и использовали в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ *M*, причем отношение концентраций ретиналя и родопсина составляло приблизительно 10:1.

В некоторых опытах на фракции н.с. в инкубационную смесь (0,5 мл суспензии, концентрация родопсина $\sim 10^{-5}$ *M*) добавляли 0,5 мл надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогената сетчаток (12 сетчаток в 20 мл 0,1 *M* фосфатного буфера рН 7,2) при 120000 *g* 45 мин. Инкубацию проводили при 37°, 3 часа в атмосфере азота.

Содержание родопсина определяли после экстракции его из н.с. 1% раствором тритона х-100 спектрофотометрически в присутствии 0,1 *M*

* Выражаем глубокую признательность сотрудникам Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова проф. Р. П. Евстигнеевой, Е. Н. Звонковой и В. Л. Христофорову за предоставление 11-цис- и транс-ретиналя, помощь в работе и обсуждение.

гидроксиламина. Для оценки степени регенерации использовали расчет по формуле $(P - O) / (T - O)$, где P — количество пигмента после регенерации, O — оставшееся после обесцвечивания, T — исходное количество в «темновых» препаратах ⁽¹⁰⁾.

Для идентификации изомера ретиналя альдегид, экстрагированный как из необесцвеченных, «темновых» н.с., так и из фракции н.с. после регене-

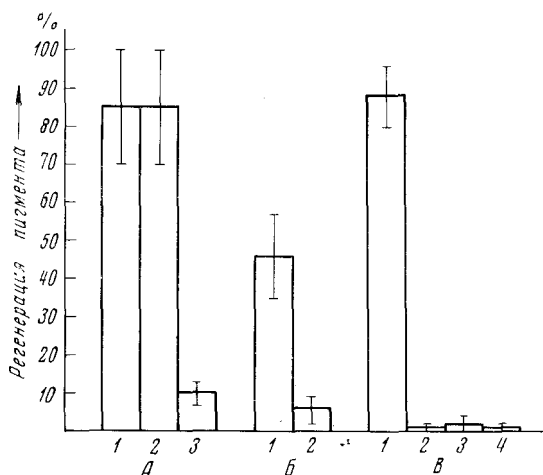


Рис. 1. Степень регенерации пигмента с $\lambda_{\max} = 487$ мμ. А: 1 — гомогенат + транс-ретиналь до обесцвечивания, 2 — гомогенат + транс-ретиналь после обесцвечивания, 3 — гомогенат. Б: 1 — фракция н.с. I + транс-ретиналь, 2 — фракция н.с. I. В: 1 — фракция н.с. II + транс-ретиналь + надосадочная жидкость, 2 — фракция н.с. II, 3 — фракция н.с. II + надосадочная жидкость, 4 — фракция н.с. II + транс-ретиналь

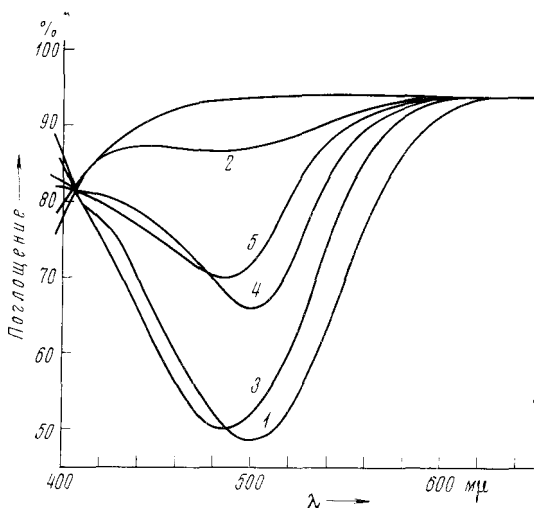


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения: родопсина ($\lambda_{\max} = 500$ мμ) (1), родопсина, оставшегося после обесцвечивания н.с. (2), пигмента, ресинтезированного в гомогенате сетчатки ($\lambda_{\max} = 487$ мμ) (3), пигмента после регенерации с ретиналем, экстрагированным из «темновых» н.с. (4) и экстрагированным после ресинтеза в гомогенате (5)

рации, проверяли по способности соединяться с опсином предварительно обесцвеченных н.с. Экстракцию ретиналя проводили 100° этиловым спиртом (10 мин, 20°) после предварительной обработки н.с. формальдегидом. Скорость распада зрительных пигментов определяли в 1% тритоновых экстрактах в присутствии 0,1 M гидроксиламина при обесцвечивании через интерференционный фильтр ($\lambda = 495$ мμ; $\Delta\lambda_{1/2} = 16$ мμ; $T_{\lambda_{\max}} = 30\%$).

В первой серии опытов изучали регенерацию родопсина в гомогенате сетчатки; в этом случае наблюдали почти полное восстановление количества зрительного пигмента (рис. 1А).

Однако в отличие от данных других авторов ^(3-7, 11) в наших условиях максимум поглощения регенерировавшего пигмента был не 500, а 487 мμ (рис. 2). Регенерация в гомогенате происходила только в присутствии экзогенного транс-ретиналя, причем степень регенерации не зависела от време-

ни внесения (до или после обесцвечивания гомогената) ретиналя в среду инкубации. В отсутствие добавленного ретиналя ресинтез был весьма незначителен (в среднем 10%) (рис. 1А). Для изучения условий образования пигмента, имеющего максимум поглощения 487 мμ вместо типичного для родопсина 500 мμ, исследовали регенерацию на различных стадиях очистки гомогената сетчатки. Оказалось, что фракция н.с. I обладала более низкой по сравнению с гомогенатом способностью к регенерации (около 50%). В очищенной же фракции н.с. II практически не наблюдали восстановления зрительного пигмента даже при добавлении транс-ретиналя (этот результат использовали в дальнейших опытах по идентификации изомеров ретиналя). Из этих данных следовало, что в процессе очистки н.с. терялись какие-то факторы, необходимые для ресинтеза. И, действительно, оказалось, что если к изолированной фракции н.с. помимо транс-ретиналя прибавить надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования гомогената сетчатки, наблюдается полное восстановление исходного количества зрительного пигмента. При этом во всех случаях λ_{\max} поглощения регенерировавшего пигмента был 487 мμ. Таким образом, полученные результаты о необходимости для регенерации в изолированных н.с. экзогенно транс-ретиналя и факторов, содержащихся в супернатанте гомогената, позволяют предположить, что условия образования пигмента 487 мμ аналогичны условиям образования родопсина (⁴, ⁵, ¹⁰).

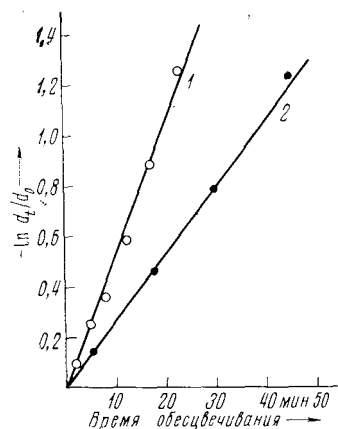


Рис. 3. Кинетика обесцвечивания родопсина и ресинтезированного пигмента. 1 — родопсин, 2 — ресинтезированный пигмент. d_0 — оптическая плотность исходного пигмента, d_i — оптическая плотность через время обесцвечивания t

В последующих экспериментах пытались идентифицировать образующийся в результате регенерации пигмент с $\lambda_{\max} = 487$ мμ. Сдвиг максимума поглощения в ресинтезированном продукте мог быть обусловлен или фотоизомеризацией, или изменениями белковой части родопсина, или изменениями хромофора. Фотоизомеризация в наших условиях была исключена, поскольку освещение проводили светом с длиной волны более 580 мμ; ретиналь в ряде опытов вносили в инкубационную смесь после обесцвечивания. С целью проверить нативность белковой части родопсина в ряде опытов на гомогенате сетчатки вместо транс-ретиналя в инкубационную среду добавляли 11-цис изомер. Образовавшийся в этом случае обычный родопсин с $\lambda_{\max} = 500$ мμ свидетельствовал о неизменности опсина в регенерированном пигменте (рис. 2), что опровергает второе предположение.

Из литературных данных известно, что максимум поглощения 487 мμ свойствен изородопсину, т. е. пигменту, содержащему вместо 11-цис ретиналя 9-цис изомер (¹²). Квантовая эффективность распада изородопсина значительно меньше, чем у родопсина (¹³⁻¹⁵). Из данных опытов, в которых изучали скорость обесцвечивания ресинтезированного пигмента, следует, что квантовая эффективность распада продукта с $\lambda_{\max} = 487$ мμ в 2 раза меньше, чем у родопсина (рис. 3). На основании этих опытов можно было предположить, что образовавшийся в процессе регенерации продукт был изородопсином. В дальнейшем для идентификации хромофорной группы в регенерированном пигменте из н.с., содержащих продукт 487, экстрагировали ретиналь и инкубировали его с предварительно обесцвеченным н.с. Образующийся в результате продукт имел $\lambda_{\max} = 487$ мμ. Ретиналь, экстрагированный из «темновых» н.с., приводил к образованию пигмента с $\lambda_{\max} = 500$ мμ; в присутствии транс-ретиналя никакого пигмента не обна-

руживали. Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что в процессе регенерации образовывался изородопсин, содержащий в качестве хромофора 9-цис ретиналь. Следовательно, *in vitro* возможна изомеризация транс-ретиналя не только в 11-цис, но и 9-цис изомер, что не соответствует представлениям о строгой специфичности изомеризационной реакции (2).

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Ленинград

Поступило
12 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Wald, P. K. Brown, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **36**, 84 (1950). ² R. Hubbard, *J. Gen. Physiol.*, **39**, 935 (1956). ³ S. Futterman, M. H. Rollins, E. Vancano, *Federat. Proc.*, **29**, 471 (1970). ⁴ S. Futterman, M. H. Rollins, *Federat. Proc.*, **30**, 3, Part II, abst. 843 (1971). ⁵ J. P. Rotmans, F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, *ibid.*, 844 (1971). ⁶ E. O. Plante, B. Rabinovich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 725 (1972). ⁷ H. Shichi, *J. Biol. Chem.*, **246**, 6178 (1971). ⁸ Ch. Baumann, in: *Handbook of Sensory Physiology*, 7/1, 1972. ⁹ А. Л. Берман, Натрий и калий в паружных сегментах фоторецепторов сетчатки, автореф. кандидатской диссертации, Л., 1972. ¹⁰ F. D. Collins, J. N. Green, R. A. Morton, *Biochem. J.*, **56**, 493 (1954). ¹¹ F. D. Collins, J. N. Green, R. A. Morton, *Biochem. J.*, **53**, 152 (1953). ¹² R. Hubbard, D. Bownds, T. Yoshizawa, *Cold Spring Harbor Sympos. on Quant. Biol.*, **30**, 301 (1965). ¹³ R. Hubbard, G. Wald, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 269 (1952). ¹⁴ R. Hubbard, A. Kropf, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 130 (1958). ¹⁵ L. Strackee, *Biophys. J.*, **11**, 728 (1971).