

Л. Я. ГЕНДЕЛЬ, И. Б. ФЕДОРОВИЧ, М. А. ОСТРОВСКИЙ
А. Б. ШАПИРО, К. Е. КРУТЛЯКОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 1 XII 1971)

Конформационные изменения в фоторецепторной мембране, содержащей зрительный пигмент, до сих пор не показаны, хотя ряд косвенных данных свидетельствует в пользу этого. Так, например, освещение видимым светом суспензии наружных сегментов фоторецепторов приводит к повышению экстрактабельности липидов (¹, ²) и белков (³), небольшому изменению циркулярного дихроизма солюбилизованного родопсина в его белковой области (⁴).

В настоящей работе предпринята попытка обнаружить прямым методом спиновых зондов фотоиндуцированные конформационные изменения в мембранах наружного сегмента палочек сетчатки лягушки. Метод спиновых зондов, который находит в исследованиях биологических мембран все более широкое применение, позволяет изучать слабые взаимодействия в матрице без существенного нарушения ее молекулярной структуры и нормальных функций (⁵⁻⁹).

В качестве молекулярных зондов были использованы гидрофобные иминоксильные монаорадикал (I) и бирадикал (II) (¹⁰, ¹⁶) (рис. 1).

Поведение зондов в мембране оценивали по времени корреляции (τ), имеющему смысл среднего времени поворота радикала на угол $\pi/2$, по формуле (1) (¹¹)

$$\tau = -8,4 \Delta H_{\max (+1)} \cdot \left(1 - \sqrt{\frac{I(+1)}{I(-1)}}\right) \cdot 10^{-10} \text{ сек.}, \quad (1)$$

где $\Delta H_{\max (+1)}$ — ширина (в эрстедах) между точками максимального наклона компоненты спектра, соответствующей меньшему значению магнитного поля ($m_N = +1$), $I(\pm 1)$ — интенсивность крайних компонент, лежащих в высоких полях ($m_N = -1$) и низких ($m_N = +1$).

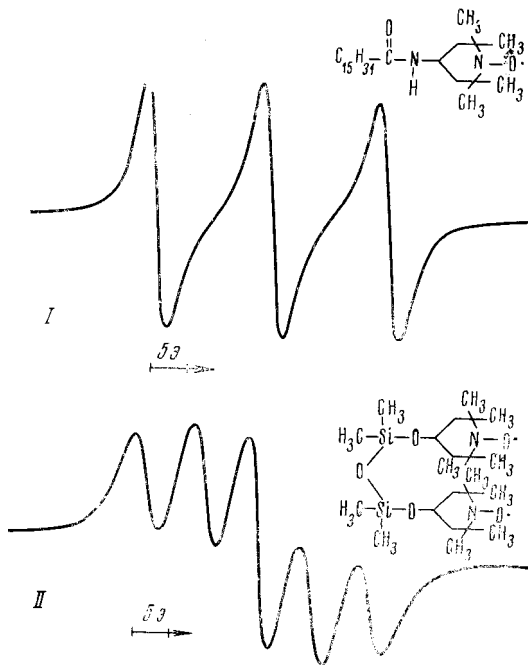


Рис. 1. Структурные формулы и спектры э.п.р. зондов I и II в этаноле ($10^{-3} M$)

Особенности спектра э.п.р. бирадикала определяются обменными взаимодействиями, модулируемыми внутримолекулярными движениями парамагнитных центров. В качестве дополнительного эффективного параметра поведения зонда — бирадикала использовали величину ν , рассчитанную по формуле ⁽¹²⁾

$$\nu = \frac{9,85 \cdot 10^7}{(\sqrt{2I(\pm 2)/I(\pm 1)} - 1) \cdot \Delta H_{\max(\pm 2)}} \text{ сек}^{-1}, \quad (2)$$

где $I(\pm 2)$, $I(\pm 1)$ — интенсивность линий резонансного поглощения с $M = m_1 + m_2 = \pm 2$ и ± 1 ; $\Delta H_{\max(\pm 2)}$ — ширина (в эрстедах) между точками максимального наклона линии $M(\pm 2)$.

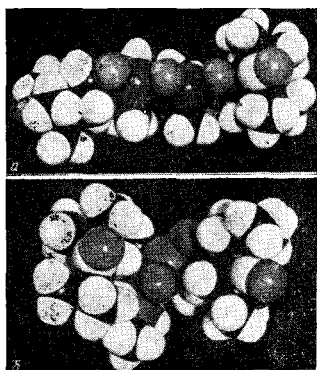


Рис. 2. Молекулярные модели зонда II в двух крайних конформациях: а — радикальные фрагменты максимально удалены, б — максимально сближены

Согласно ⁽¹²⁾, величина ν отражает интенсивность внутримолекулярных движений бирадикала. Установлено, что ν увеличивается при возрастании температуры и уменьшении вязкости системы ⁽¹²⁾. Это позволяет рассматривать параметр ν в качестве характеристики поведения бирадикального зонда, зависящей от микровязкости его локального окружения. Можно сказать, что уменьшение величины ν , также как и увеличение времени корреляции, свидетельствует об увеличении микровязкости ближайшего окружения зонда. В тех случаях, когда интенсивность внутримолекулярных движений бирадикала высока и парамагнитные центры сталкиваются часто, спектр э.п.р. бирадикала представляет собой квинтет, обусловленный обменным взаимодействием монарадикальных фрагментов; в другом предельном случае спектр э.п.р. состоит из трех линий и практически не отличается от спектра э.п.р. монарадикала.

На рис. 2 изображены молекулярные модели зонда II, иллюстрирующие некоторые возможные конформации, которые реализуются при его внутримолекулярных движениях. Молекулярные модели позволили оценить максимальное ($\sim 17,5$ Å) и минимальное ($\sim 5,4$ Å) расстояния между радикальными фрагментами (рис. 2).

Объектом исследования служила суспензия наружных сегментов палочек сетчатки лягушки, полученная при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы ⁽¹³⁾. Чистоту фракции контролировали под микроскопом. Образцы для э.п.р.-спектроскопии содержали 0,04 мл суспензии наружных сегментов (0,7—1,0 мг белка), 0,005 мл спиртового раствора зонда (10^{-3} M). Образцы освещали видимым светом, либо непосредственно в резонаторе э.п.р.-спектрометра, либо вне прибора лампой накаливания. Спектры э.п.р. регистрировали на радиоспектрометрах ЭПР-2 ИХФ АН СССР и «Е-4» фирмы «Вариан» при $t = 20 \pm 1^\circ$.

На рис. 1 приведен спектр э.п.р. спиртового раствора зонда I, представляющий симметричный триплет равноотстоящих компонент одинаковой интенсивности. Солюбилизация зонда I фоторецепторной мембраны приводит к появлению анизотропного спектра э.п.р., отражающего некоторую заторможенность вращательных движений радикала в матрице — мембране ($\tau \sim 5,2 \cdot 10^{-10}$ сек.). Спектр э.п.р. зонда I существенно не изменяется в течение 1,5—2 часа инкубации образцов в темноте при $t = 4^\circ$; при этом не происходит также каких-либо спектральных изменений зрительного пигмента.

Освещение образцов вызывает значительные изменения спектров э.п.р. (существенное возрастание анизотропии), что указывает на увеличение

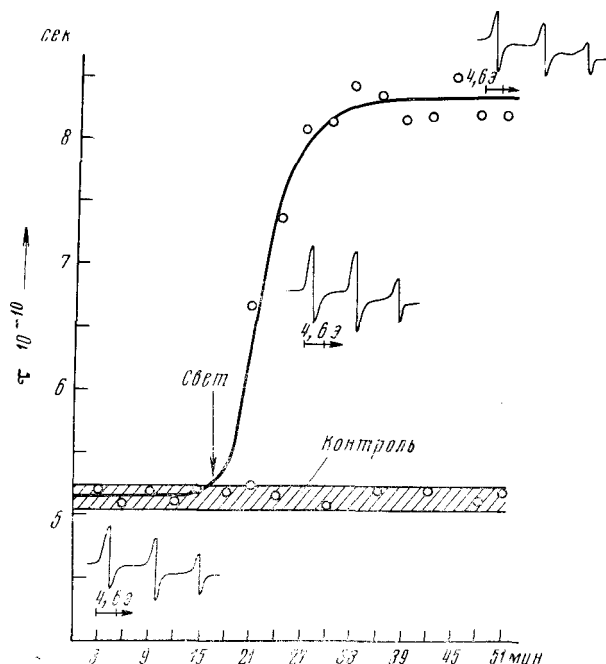


Рис. 3. Фотоиндуцированные изменения времени корреляции (τ) зонда I, солюбилизованного фоторецепторной мембраной. В кривую вмонтированы спектры э.п.р. зонда I зарегистрированные до и в различные моменты после начала освещения образца видимым светом

времени корреляции вращательной диффузии зонда (рис. 3). Кривая изменения времени корреляции от длительности освещения носит S-образный характер. Это позволяет заключить, что фотолиз зрительного пигмента сопряжен с переходом фоторецепторной мембраны из одного дискретного конформационного состояния в другое. Вследствие конформационного перехода увеличивается микровязкость гидрофобных областей мембраны, где локализован зонд, что, в свою очередь, приводит к увеличению параметра τ .

Подобные результаты были получены также при использовании в качестве гидрофобного спин-зонда бирадикала (II). Анализ времен корреляции и в этом случае показал, что под действием видимого света фоторецепторная мембрана претерпевает конформационный переход между двумя дискретными состояниями. Применение гидрофобных бирадикалов позволяет весьма наглядно фиксировать существование конформационных переходов матрицы — мембраны. Как видно из рис. 4, спектр э.п.р. зонда II, солюбилизованного фоторецепторной мембраной в темноте, представляет собой хорошо разрешенный квинтет, свидетельствующий о достаточно высокой интенсивности внутримолекулярных движений бирадикала. В ходе освещения образца видимым светом величина ν уменьшается (рис. 4); через 25—30 мин. после начала освещения в спектре э.п.р. бирадикала полностью пропадают дополнительные линии ($M (\pm 1)$) между компонентами триплетного спектра, свойственного монаорадикалам. Такие изменения в спектрах э.п.р. зонда II могут быть истолкованы как результат конформационного изменения мембраны, обусловленного фотохимическими превращениями зрительного пигмента.

Следует отметить, что квинтетный спектр э.п.р. бирадикала — зонда II наблюдается только в случае свежеприготовленной фоторецепторной мембраны. Хранение суспензии фоторецепторов в темноте в течение 48 час. ($t = 4^\circ$) приводит, как известно, к утрате ими некоторых функциональ-

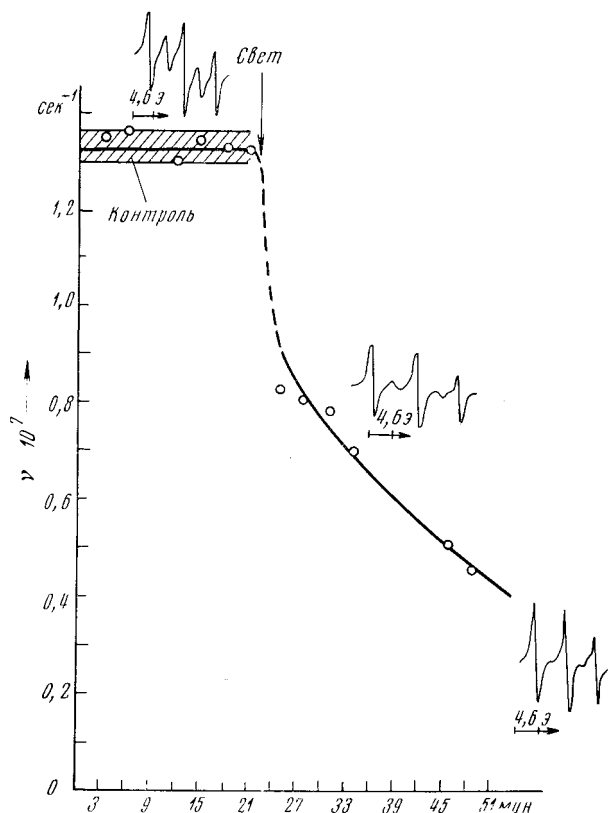


Рис. 4. Фотоиндуцированные изменения параметра для зонда II, солюбилизированной фоторецепторной мембраной. В кривую вмонтированы спектры э.п.р. зонда II, зарегистрированные до и в различные моменты после начала освещения образца видимым светом

бране наружного сегмента является следствием фотолиза молекулы зрительного пигмента — ее основной хромофосфолинопротеиновой единицы. В настоящее время предпринимаются попытки выяснить, не носит ли этот процесс кооперативный характер. Фотоиндуцированные конформационные изменения фоторецепторной мембраны являются, по-видимому, важным звеном в механизме фоторецепции — трансформации энергии кванта света в зрительный сигнал.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
29 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Ishimoto, G. Wald, *Federat. Proc.*, **5**, 50 (1946). ² R. G. Adams, J. Lipid Res., **8**, 245 (1967). ³ Р. Н. Эттингер, С. А. Шуклюков, *Цитология*, **11**, 1542 (1969). ⁴ R. Hubbard, D. Bownds, T. Yoshizawa, *Gold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **30**, 301 (1965). ⁵ A. D. Keith, A. S. Waggoner, O. M. Griffith, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 819 (1968). ⁶ Л. Я. Гендель, М. Г. Гольдфельд и др., *Биофизика*, **8**, 1114 (1968). ⁷ M. Calvin, H. H. Wang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 1 (1969). ⁸ Н. М. McConnell, B. G. McFarland, *Quart. Rev. Biophys.*, **3**, 91 (1970). ⁹ В. К. Кольтовер, Л. М. Райхман и др., *ДАН*, **197**, 219 (1971). ¹⁰ E. G. Rozantsev, L. A. Krinitzkaia, *Tetrahedron*, **21**, 497 (1965). ¹¹ Б. И. Сухоруков, А. М. Вассерман и др., *ДАН*, **177**, 454 (1967). ¹² А. Л. Бучаченко, Докторская диссертация, М., 1968. ¹³ И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биофизика*, **13**, 449 (1968). ¹⁴ J. J. H. M. De Pont, F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **140**, 275 (1970).

ных свойств (¹⁴). В таких «старых» препаратах исходно регистрируется триплетный спектр э.п.р. зонда II. Это позволяет предположить, что «старение» сопровождается нефункциональными деструктивными изменениями в мембранах наружного сегмента.

В отдельных случаях после обесцвечивания видимым светом суспензии наружных сегментов наблюдали медленную гибель радикалов, которые восстанавливались до гидроксилами на вероятно, в результате взаимодействия с промежуточными продуктами фотолиза родопсина или с ферментными системами наружного сегмента. Это явление представляет самостоятельный интерес и требует дальнейшего исследования.

Обнаруженный фотоиндуцированный конформационный переход в фоторецепторной мем-