

УДК 577.158+612.843

БИОХИМИЯ

А. А. ЖУЧИХИНА, Р. Н. ЭТИНГОФ

## ВЛИЯНИЕ 3',5'-ЦИКЛИЧЕСКОЙ АМФ НА НАД-КИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ СЕТЧАТКИ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 28 V 1973)

В связи с особенностями функционирования фоторецепторных клеток сетчатки вопрос о наличии и регуляции в них активности НАД-киназы (АТФ: НАД-2 фосфотрансфераза К. Ф. 2.7.1.23) — единственной системы в животных тканях, обеспечивающей образование НАДФ<sup>(1-3)</sup>, представляет принципиальный интерес. НАДФ-Н<sub>2</sub> постоянно необходим в фоторецепторном акте для восстановления ретиналя, непрерывно образующегося в наружных сегментах (н.с.) сетчатки в процессе фотораспада зрительного пигмента. Показано, что в отличие от других алкогольдегидрогеназ (алькоголь: НАД-оксидоредуктаза К. Ф. 1.1.1.1.)  $K_m$  для НАДФ-Н<sub>2</sub> ретинолдегидрогеназы н.с. отличается на два порядка от соответствующей величины для НАД-Н<sub>2</sub> <sup>(4, 5)</sup>. Возникает вопрос, где же образуется необходимый для ретинолдегидрогеназы н.с. НАДФ-Н<sub>2</sub>: непосредственно в н.с., окружающем их пигментном эпителии, в иной части фоторецептора или других клетках сетчатки. Исследование этого вопроса и составляло одну из задач настоящей работы.

Восстановление ретиналя, возникающего при освещении сетчатки, происходит, по-видимому, главным образом в фазу световой адаптации <sup>(6)</sup>. Поэтому актуальным представлялся в данном случае и вопрос о регуляции НАД-киназной активности при различном функциональном состоянии сетчатки. Было предположено, что одним из регулирующих НАД-киназу, в случае наличия ее в н.с., факторов, помимо известных <sup>(7, 8, 9)</sup>, может быть циклическая форма 3',5'-АМФ. Основанием для этого предположения послужили данные о значении циклического нуклеотида в переносе лабильного фосфата АТФ на некоторые белки <sup>(10)</sup>, а также о наличии и изменении активности в н.с. при освещении фермента, обеспечивающего образование 3',5'-АМФ-аденилциклазы <sup>(11)</sup>. Исследование вопроса о регуляции активности НАД-киназы составляло вторую задачу этой работы.

Большинство экспериментов было проведено на изолированных н.с. сетчатки быка <sup>(12)</sup>, в ряде опытов использовали ткани сетчатки и пигментного эпителия в целом. Для определения ферментативной активности получали экстракты тканей (гомогенат ткани в 0,02 М КНСО<sub>3</sub>, инкубация в течение 1 часа при 0—3°, центрифугирование 40 мин. при 16 000 g); в случае н.с. фермент экстрагировали из предварительно приготовленных ацетоновых препаратов <sup>(13)</sup>. Реакционная смесь была такой же, как в работе <sup>(14)</sup>. Содержание НАДФ определяли по методу Слейтера и сотрудников <sup>(15)</sup>, содержание белка — по методу Лаури и сотрудников <sup>(16)</sup>. НАД-киназную активность определяли параллельно в «световых» и «темновых» образцах исследуемых объектов. Освещение сетчатки, пигментного эпителия и фракции н.с. проводили в течение 15 мин. лампой накаливания 200 вт через водный фильтр на расстоянии 20 см.

Результаты суммированы в табл. 1, где приведены средние данные опытов по НАД-киназной активности изученных объектов исследования. Очевидно, что в экстрактах сетчатки и пигментного эпителия фермента-

тивная активность была относительно незначительной, примерно такой же, как в экстрактах мозга <sup>(17)</sup>, и на порядок ниже, чем в экстрактах печени <sup>(18)</sup>. Активность фермента в экстрактах, полученных из ацетоновых препаратов н.с., была больше, чем в соответствующих препаратах митохондрий мозга <sup>(17)</sup>.

Таким образом, из этих данных можно заключить, что НАДФ, необходимый для ретинолдегидрогеназы, образуются непосредственно в н.с. Подтверждением этого заключения является и тот факт, что НАД-киназная активность в экстрактах из «световых» н.с. была заметно больше, чем из «темновых», т. е. в этих структурах имело место изменение ферментативной активности в зависимости от функциональной нагрузки. В то же время в экстрактах сетчатки и пигментного эпителия изменений в активности НАД-киназы при освещении не наблюдали.

Таблица 1

НАД-киназная активность экстрактов сетчатки, пигментного эпителия и н.с. при темновой адаптации и освещении

Объект исследования	Темновые образцы	Световые образцы	Изменения, %
	нмол. НАДФ на 1 мг белка в час		
Сетчатка	2,3±0,1 (6) *	2,5±0,1 (6)	+9
Пигментный эпителий	1,8±0,1 (3)	1,8±0,1 (3)	0
Н.с.	5,4±0,6 (14)	7,9±0,9 (14)	+46
Н.с., лишенные липидов	1,5	2,3	+53

\* В этом и табл. 2 в скобках дано число опытов.

Таблица 2

Влияние 3',5'-АМФ на НАД-киназную активность н.с.

Объект исследования	Добавленный нуклеотид	Контроль	+ Нуклеотид	Изменения, %
		нмол. НАДФ на 1 мг белка в час		
Н.с. «темновые»	3',5'-АМФ	5,1±0,7 (7)	8,1±1,2 (7)	+59
Н.с. «световые»	То же	7,6±1,3 (7)	7,9±1,2 (7)	+3
Н.с. «темновые»	5-АМФ	5,6 (2)	5,6 (2)	0
Н.с. «световые»	То же	7,2 (2)	6,5 (2)	-10

Известно, что в результате освещения в мембранах н.с. изменяются белок-липидные взаимодействия <sup>(18)</sup>, что могло приводить к увеличению экстрагируемости белков, и в частности ферментного белка, из «световых» мембран. Однако общее количество белка в экстрактах, полученных из «световых» и «темновых» фракций, было всегда примерно одинаковым. Разница в ферментативной активности между «темновыми» и «световыми» экстрактами сохранялась (при снижении уровня НАД-киназы) и в том случае, если фракции н.с. предварительно подвергали обработке для удаления липидов (ацетон — гексан 1:1) (табл. 1). Эти данные давали основание полагать, что увеличение НАД-киназной активности в «световых» экстрактах не связано с различным извлечением ферментного белка, а обусловлено различными свойствами самого фермента.

Действительно оказалось, что чувствительность НАД-киназы н.с. к НАД-Н<sub>2</sub>, тормозящему, как известно, ферментативную активность (<sup>19</sup>), была различной в «темновых» и «световых» экстрактах. В первых — в присутствии НАД-Н<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-4}$  M) ферментативная активность мало изменялась, во вторых, при тех же самых условиях, имело место существенное торможение (рис. 1). Таким образом, если рассматривать НАД-Н<sub>2</sub>

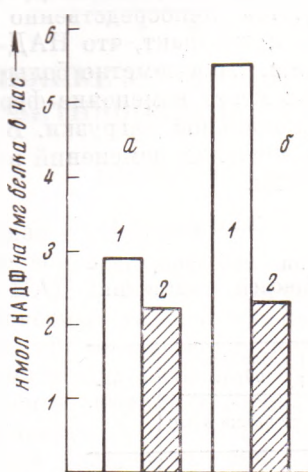


Рис. 1

Рис. 1. Влияние НАД-Н<sub>2</sub> на НАД-киназную активность экстрактов из «темновых» (а) и «световых» (б) н.с. 1 — контроль, 2 — добавлен НАД-Н<sub>2</sub>. Средние данные 3 опытов

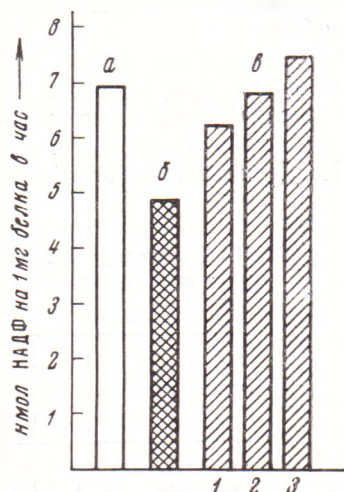


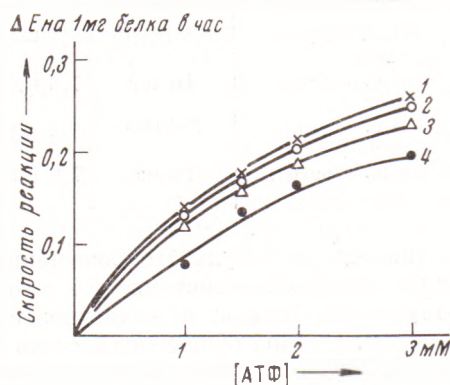
Рис. 2

Рис. 2. Влияние различных концентраций 3',5'-АМФ на НАД-киназную активность н.с. а — «световые» образцы, б — «темновые» образцы, в — с 3',5'-АМФ. 1 —  $5 \cdot 10^{-5}$  M, 2 —  $1 \cdot 10^{-4}$  M, 3 —  $5 \cdot 10^{-4}$  M

как конкурентный ингибитор (<sup>8, 19</sup>), то сродство его к ферменту в «световых» пробах иное, чем в «темновых».

В следующей серии опытов было изучено влияние 3',5'-АМФ ( $5 \cdot 10^{-5}$  M), а также для сравнения 5-АМФ на НАД-киназную активность экстрактов, полученных из «темновых» и «световых» фракций н.с. Из дан-

Рис. 3. Влияние 3',5'-АМФ на НАД-киназную активность н.с. при разных концентрациях АТФ. 1 — «световые» образцы, 2 — «световые» образцы+3',5'-АМФ, 3 — «темновые» образцы+3',5'-АМФ, 4 — «темновые» образцы



ных, суммированных в табл. 2, следует, что 3',5'-АМФ (в отличие от 5'-АМФ) значительно активировала НАД-киназную активность «темновых» и не влияла на активность фермента в «световых» экстрактах. Степень активации ферментативной активности, наблюдаемой в «темновых» экстрактах под действием 3',5'-АМФ, зависела от концентрации добавленного нуклеотида (рис. 2). Таким образом, ферментативная ак-



тивность в «темновых» экстрактах при наличии 3',5'-АМФ достигала (или даже превосходила) соответствующую величину в «световых» пробах.

Следовательно, в принципе ферментативную активность в «темновых» и «световых» пробах можно было выравнивать или добавлением в инкубационную смесь НАД-Н<sub>2</sub> (снижалась ферментативная активность в «световых» и мало изменялась в «темновых» (рис. 1)), или добавлением 3',5'-АМФ, в этом случае имела место обратная ситуация — увеличивалась активность в «темновых» и не изменялась в «световых» (табл. 2).

Для анализа возможных механизмов влияния 3',5'-АМФ на НАД-киназу была проведена серия опытов по изучению влияния нуклеотида при разных концентрациях АТФ ( $0,5 \cdot 10^{-3}$ — $4,10^{-3}$  М). Из данных одного из типичных экспериментов, приведенных на рис. 3, следует, что эффект нуклеотида проявлялся при всех концентрациях АТФ, но был более выражен при меньшем содержании последнего. Вопрос об изменении  $K_m$  для АТФ в присутствии циклического нуклеотида пока не ясен, и для его окончательного решения необходимо, по-видимому, использовать очищенные препараты фермента.

Независимо, однако, от механизмов влияния 3',5'-АМФ на НАД-киназу н.с., полученные материалы позволяют предполагать (по аналогии с имеющимися данными в отношении других ферментных систем) наличие в НАД-киназе регуляторной части фермента, чувствительной или резистентной к циклическому нуклеотиду в зависимости от состояния ткани.

Основными положениями, вытекающими из настоящей работы, являются следующие: 1) в н.с. сетчатки быка имеется НАД-киназная система, свойства которой изменяются в зависимости от функционального состояния фоторецептора; 2) 3',5'-АМФ регулирует в н.с. образование НАДФ и соответственно соотношение последнего с НАД, т. е. основных кофакторов обменных процессов.

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

Поступило  
12 V 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. B. Clark, A. L. Greenbaum et al., *Nature*, **201**, 1131 (1964). <sup>2</sup> С. Е. Севериц, В. И. Телепнева, Л. А. Цейтлин, *Биохимия*, **35**, 329 (1970). <sup>3</sup> В. Л. Немчинская, В. М. Божков, В. П. Кушнер, *Цитология*, **13**, 799 (1971). <sup>4</sup> R. D. Zachman, J. A. Olson, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2309 (1961). <sup>5</sup> Р. Н. Эттингер, А. Собота, И. А. Остапенко, *Биохимия*, **37**, 1172 (1972). <sup>6</sup> J. E. Dowling, *Nature*, **188**, 114 (1960). <sup>7</sup> A. L. Greenbaum, J. B. Clark, P. McLean, *Biochem. J.*, **93**, 17C (1964). <sup>8</sup> T. P. Wang, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, **206**, 311 (1954). <sup>9</sup> В. Л. Немчинская, А. Д. Браун, *Цитология*, **14**, 1544 (1972). <sup>10</sup> C. D. Ashby, D. A. Walsh, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6637 (1972). <sup>11</sup> M. W. Bitensky, R. E. Gorman, W. H. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 561 (1971). <sup>12</sup> С. А. Шуколюков, И. Л. Думлер, *Биохимия*, **37**, 339 (1972). <sup>13</sup> N. O. Kaplan, F. Lirman, *J. Biol. Chem.*, **174**, 37 (1948). <sup>14</sup> И. Ф. Беляева, И. Д. Певанер, В. И. Телепнева, *Журн. эвол. физиол. и биохим.*, **8**, 375 (1972). <sup>15</sup> T. E. Slater, B. Sawyer, U. Strauli, *Arch. Intern. Phys. Biochem.*, **72**, 427 (1964). <sup>16</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosenbraugh et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). <sup>17</sup> M. Fernandes, *J. Neurochem.*, **17**, 503 (1970). <sup>18</sup> R. P. Poincelot, E. W. Abrahamson, *Biochemistry*, **9**, 1820 (1970). <sup>19</sup> H. Oka, J. B. Field, *J. Biol. Chem.*, **234**, 815 (1968).