

Г. Р. КАЛАМКАРОВ, В. Е. ПРУСАКОВ, М. А. ОСТРОВСКИЙ,  
Р. А. СТУКАН, член-корреспондент АН СССР В. И. ГОЛЬДАНСКИЙ

### ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОНДУЦИРОВАННЫХ ПРОЦЕССОВ В РОДОПСИНЕ И ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ МЕТОДОМ ГАММА-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Конформационная перестройка зрительного пигмента и фоторецепторной мембраны является, по-видимому, одним из первых этапов в механизме фоторецепции. Для изучения такого рода перестроек в настоящее время широко используются самые различные физико-химические методы (1-3). В настоящей работе для исследования фотондуцированных изменений в молекуле родопсина и фоторецепторной мембране на различных стадиях фотоллиза впервые применен метод гамма-резонансной спектроскопии.

Суспензию наружных сегментов фоторецепторов лягушки и быка выделяли по методике, описанной в работе (4). Родопсин экстрагировали 2% раствором дигитонина. Для обесцвечивания образцов использовалась лампа накалывания с интерференционными фильтрами ЕЛ7М4/2.

В работе использовался стандартный г.р. спектрометр электрофлуориметрического типа. Источником служил  $Co^{57}$  в платине. Измерные сдвиги дамы относительно нитропрусида натрия. За превращениями в родопсине и фоторецепторной мембране следили по изменению г.р. спектра мёсбауэровской метки. В качестве метки быка использована соль-аскорбат железа, обогащенная изотопом  $^{57}Fe$ . Метку добавляли в экстракт или суспензию наружных сегментов фоторецепторов и инкубировали их 20—30 мин. Все полученные г.р. спектры как темнового, так и обесцвеченного образца снимали при температуре  $-196^{\circ}$ . Предварительные электрофизиологические эксперименты показали, что выбранный метка не оказывает выраженного действия на функциональное состояние фоторецепторной мембраны.

В первой серии опытов исследовались фотондуцированные изменения в стабилизированном родопсине. Г.р. спектр его необесцвеченного дигитонинового экстракта представляет собой дублет  $Fe^{3+}$  (измерный сдвиг 0,7 мм/сек), аналогичный спектру исходного комплекса аскорбата железа (рис. 1а). В темноте вид спектра длительное время не меняется. В образце же, предварительно обесцвеченном видимым светом, наблюдается появление двухвалентного железа (рис. 1б). Частичный переход  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$  указывает на появление при обесцвечивании экстрактов родопсина восстанавливающих центров в молекуле зрительного пигмента. В контрольном опыте освещенные раствора аскорбата железа не приводило к изменению г.р. спектра образца.

В последующей серии опытов исследовались фотондуцированные изменения в фоторецепторной мембране. Для изучения конформационных переходов в этой мембране на различных стадиях фотоллиза родопсина снимались г.р. спектры образцов, которые после предварительного обесцвечивания в жидком азоте выдерживались при температуре, стабилизирующей исследуемый продукт в форме, отвечающей той или иной стадии фотоллиза (прелюмородопсин, люмородопсин, метародопсин I). На рис. 2а показан спектр необесцвеченной суспензии наружных сегментов. Обращает на себя внимание появление в спектре «крыльев», отвечающих неразрешенной сверхтонкой структуре (с.т.с.), которой не было в случае экстрактов родоп-

сина. Подобная неразрешенная, иногда слабо разрешенная с.т.с. исчезает уже после обесцвечивания при температуре  $-196^\circ$ . Это указывает на изменения динамических свойств фоторецепторной мембраны уже на ранних стадиях фотолиза (прелюмиродопсин). Обесцвечивание проводилось светом с  $\lambda_{\max}$  450 нм.

Нагревание суспензии наружных сегментов фоторецепторов до более высоких температур ( $-70^\circ$  и  $-20^\circ$ ) не вызывает существенных изменений в мёсбауэровских спектрах образцов. Иными словами г.р. спектры

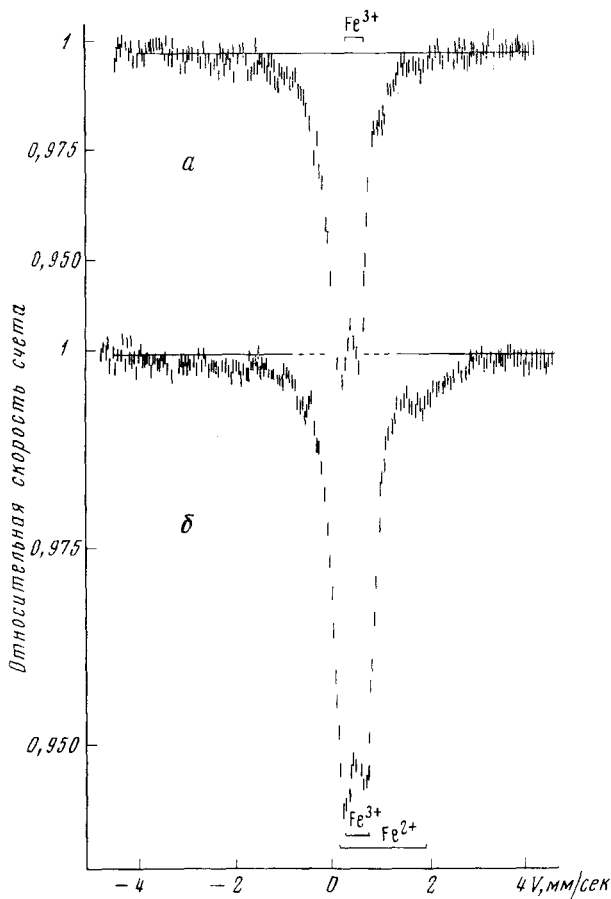


Рис. 1. Г.р. спектры дигитониновых экстрактов родопсина. *a* — необесцвеченный дигитониновый экстракт родопсина; *b* — экстракт, обесцвеченный видимым светом при  $20^\circ$

люмиродопсина и метародопсина I аналогичны спектрам прелюмиродопсина. Только при нагревании образца до комнатной температуры, т. е. в том случае, когда фотолиз идет до конца, в спектре появляется компонента  $\text{Fe}^{2+}$ , что соответствует результатам, полученным нами на солиобилизированном родопсине (рис. 2*в*—*д*).

Известно, что освещение промежуточных продуктов фотолиза родопсина в полосе их поглощения может приводить к фоторегенерации, т. е. к восстановлению исходных спектров оптического поглощения. Мы попытались аналогичным образом получить фотовосстановление г.р. спектров в суспензии наружных сегментов фоторецепторов. На рис. 3*в* показан г.р. спектр продукта, фоторегенерированного из прелюмиродопсина светом с  $\lambda_{\max}$  575 нм. Из сравнения спектров исходного и фоторегенерированного

образцов (рис. 3а, в) следует, что «крылья» неразрешенной с.т.с. восстанавливаются примерно на 50%.

Наблюдавшееся нами как в солюбилизованном родопсине, так и в суспензии наружных сегментов фоторецепторов восстановление железа может быть обусловлено появлением на последних стадиях фотолиза родопсина протонсвязывающего центра в молекуле (<sup>7</sup>). Возможно также, что в фоторецепторной мембране присутствует недыхательная цепь переноса электрона на кислород (<sup>8, 9</sup>). Не исключено, что тогда, при добавлении к экстракту родопсина или суспензии наружных сегментов фоторецепторов раствора аскорбата железа, акцептором электрона становятся связанные ионы железа.

Появление неразрешенной или слабо разрешенной сверхтонкой струк-

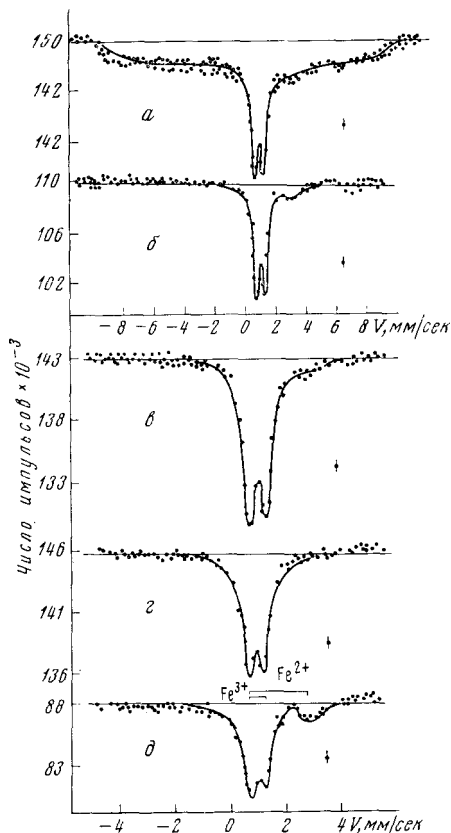


Рис. 2

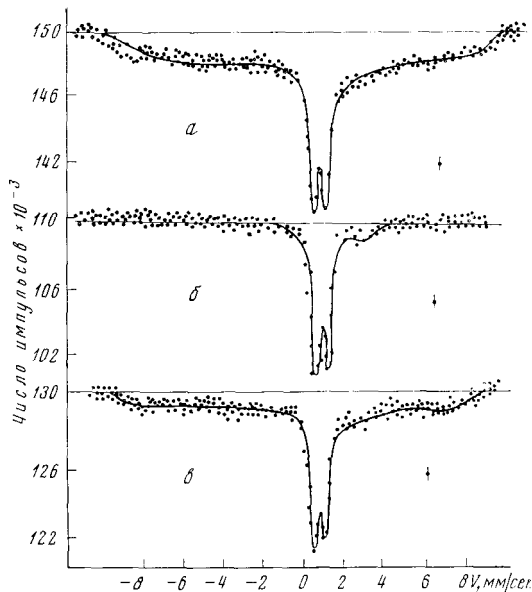


Рис. 3

Рис. 2. Г.р. спектры суспензии наружных сегментов фоторецепторов на различных стадиях фотолиза. *а* — необесцвеченная суспензия наружных сегментов фоторецепторов; *б* — суспензия, обесцвеченная при  $-196^{\circ}$  светом с  $\lambda_{\max}$  450 нм (прелюмиродопсин); *в* — суспензия, обесцвеченная при  $-196^{\circ}$  и нагретая до температуры  $-70^{\circ}$  (люмиродопсин); *г* — тот же образец, нагретый до температуры  $-20^{\circ}$  (метародопсин I); *д* — тот же образец после нагревания до температуры  $20^{\circ}$

Рис. 3. Восстановление г.р. спектров при фоторегенерации. *а* — необесцвеченная суспензия наружных сегментов фоторецепторов; *б* — суспензия, обесцвеченная при  $-196^{\circ}$  светом с  $\lambda_{\max}$  450 нм; *в* — продукт, регенерированный из прелюмиродопсина светом с  $\lambda_{\max}$  575 нм при  $-196^{\circ}$

туры спектров в суспензии наружных сегментов фоторецепторов можно объяснить тем, что ионы железа равномерно адсорбируются на мембране. При этом, вследствие малой концентрации ионов железа, расстояния между ними столь велики, что это может привести к исчезновению спин-спиновой релаксации и появлению с.т.с. Однако при наличии слабой спин-решеточной релаксации с.т.с. размывается и становится слабо разрешенной. В случае дигитониновых экстрактов ионы железа в растворе объединяются в кластеры, что приводит к усилению спин-спиновой релаксации и исчезновению с.т.с.

Для объяснения исчезновения с.т.с. при переходе родопсина в прелюмиродопсин можно предположить следующее. 1. Перераспределение атомов железа, связанных с белковыми группами, которое приводит к возникновению спин-спинового взаимодействия между понами из-за уменьшения расстояния между ними. Такое объяснение, однако, маловероятно, так как, согласно принятым представлениям, при переходе родопсина — прелюмиродопсина в зрительном пигменте не происходит существенного перераспределения белковых групп. Кроме того, вероятность образования кластеров при температуре жидкого азота крайне мала. 2. Появление в мембране парамагнитных центров, которое могло бы, в принципе, привести к подавлению сверхтонкого взаимодействия из-за кросс-релаксации. Однако это объяснение также маловероятно, так как обнаружить такие парамагнитные центры при переходе родопсина  $\rightleftharpoons$  прелюмиродопсина как в экстрактах, так и в суспензии наружных сегментов фоторецепторов пока не удается (<sup>10</sup>). 3. Изменение конформационного состояния всей мембраны при переходе родопсина  $\rightarrow$  прелюмиродопсина, которое может привести к изменению фонового спектра решетки в месте присоединения атома железа и к подавлению с.т.с. из-за спин-решеточной релаксации. При этом неизменяющийся центральный пик в спектре обусловлен, как показывают наши опыты, свободными понами железа. Это объяснение представляется нам наиболее приемлемым. Указание на возможность изменений с.т.с. из-за спин-решеточной релаксации можно найти в работах (<sup>11</sup>, <sup>12</sup>).

Показанное нами частичное восстановление исходных мессбауэровских спектров при освещении образца в максимуме поглощения прелюмиродопсина указывает на восстановление конформационного состояния фоторецепторной мембраны при фоторегенерации. Вместе с тем возможность фоторегенерации указывает на то, что эффект исчезновения с.т.с. является прямым и непосредственным следствием фотолиза родопсина.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что уже на ранних стадиях фотолиза зрительного пигмента (родопсина — прелюмиродопсина) в фоторецепторной мембране происходят изменения, которые нельзя объяснить только фотоизомеризацией хромофора. По всей вероятности, они затрагивают не только молекулу зрительного пигмента, но и динамическую структуру фоторецепторной мембраны в целом. Следует подчеркнуть, что если такая трактовка справедлива, то из наших опытов можно сделать вывод о возможности подобных конформационных переходов в биологических мембранах даже при достаточно низких температурах (в жидком азоте).

Примененный в этой работе впервые для исследования фотолуцированных изменений в фоторецепторной мембране метод г.р. спектроскопии, как можно видеть, позволяет получить существенную информацию о функциональных (электронных и динамических) свойствах мембран.

Авторы приносят благодарность Н. Б. Федорович за ценные советы и Н. Б. Томлиной за помощь в работе.

Настоящая работа выполнена в рамках проекта «Родопсин».

Институт химической физики  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
2 VIII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Л. Я. Гендель, Н. Б. Федорович и др., ДАН, т. 205, № 6 (1973). <sup>2</sup> Н. Б. Федорович, Биофизика, т. 13, № 2 (1968). <sup>3</sup> H. Shichi, Photochem. and Photobiol., v. 13, № 6 (1974). <sup>4</sup> C. Wu, Z. Stryer, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, № 5 (1972). <sup>5</sup> T. K. Blazie, Biophys. J., v. 12, 191 (1972). <sup>6</sup> Н. Б. Федорович, М. А. Островский, Биофизика, т. 13, № 3 (1968). <sup>7</sup> R. G. Matthews, R. Hubbard, P. K. Brown, J. Gen. Physiol., v. 47, № 215 (1964). <sup>8</sup> S. Fujishita, Japan. J. Physiol., v. 16, № 1 (1966). <sup>9</sup> S. Fujishita, Japan. J. Physiol., v. 16, № 5 (1966). <sup>10</sup> V. A. Alekseev et al., Studia Biophysica, v. 43, № 3 (1974). <sup>11</sup> В. П. Гольданский, П. П. Суздальев и др., ДАН, т. 185, № 3 (1969). <sup>12</sup> Н. П. Суздальев, А. М. Афанасьев и др., ЖЭТФ, т. 55, № 5 (1968).