

В. И. ГУСЕЛЬНИКОВ, А. М. КОРОЛЕВ, О. Ю. ФРОЛОВ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОДОРАНТОВ И ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ВОЛОСКОВ ЛЯГУШКИ IN VITRO

(Представлено академиком П. К. Анохиным 30 I 1974)

Общепризнано, что в пределах обонятельных волосков — ресничнопо-добных выростов обонятельных рецепторов — локализованы рецептивные участки, имеющие предположительно белковую природу и взаимодействующие с пахучими молекулами с образованием слабых связей (¹); последний процесс, согласно теоретическим воззрениям, является «триггером» конформационных переходов в мембране волоска, изменений мембранной проницаемости и транспорта ионов (²). Исходя из изложенного, существенный интерес представляет прямое исследование взаимодействия одорантов и концентрированного препарата обонятельных волосков, тем более, что применение для этой цели препарата «рецептивных» белков, полученного однократным центрифугированием гомогената обонятельной выстилки кролика и представляющего собой раствор белков неизвестной природы, не принесло ощутимого результата (³).

Обонятельные волоски выделяли из обонятельных выстилок озерных лягушек (*R. ridibunda* Pall.) описанным ранее способом (⁴). Полученную фракцию характеризовали содержанием белка, определенным по Лоури (⁵), количеством нейтральных сахаров на единицу белка, определенных по методу Виндлера в модификации Маршалла и др. (⁶) (нейтральные сахара $69,0 \pm 1,2^* \text{ мкг на } 1 \text{ мг белка}$), и общей картиной спектра препарата (рис. 1 з). Предметом обсуждения являлись дифференциальные спектры вида препарат волосков+раствор одоранта против препарата волосков. Контрольные дифференциальные спектры регистрировали для растворов слизи из обонятельной выстилки озерной лягушки, полученных разработанным ранее способом (⁷). Целесообразность применения данного контроля определялась гетерогенностью белкового состава слизи (⁷) и наличием в ее составе гликопротеидов различного молекулярного веса (нейтральные сахара — $38,0 \pm 2,8 \text{ мкг на } 1 \text{ мг белка}$). Дифференциальные спектры регистрировали на спектрофотометре Unicam SP-700 в кюветах с внутренней длиной 2 мм в области 200—220 нм и на спектрофотометре Shimadzu MPS-50L в области 220—400 нм в микрокюветах с внутренней длиной 1 см при использовании диапазона оптических плотностей 0—0,1. В качестве запаховых веществ применяли нитробензол (НБ), *n*-нитробензальдегид (НБА) и *n*-диметиламинобензальдегид (ДМАБА), имеющие цветочный запах для человека. Обработка полученных спектров заключалась в вычитании спектра введенного одоранта и релеевского рассеяния; последнее рассчитывали обычным способом (⁸). Применение в качестве одоранта ДМАБА позволило рассчитать по интенсивности длинноволнового максимума 355 нм количество связанного волосками одоранта и ряд сопряженных величин.

Предполагая, что процесс сорбции этого вещества подчиняется изотерме Лэнгмюра, и используя данные по связыванию трех концентраций ДМАБА (2; 6 и $10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) двумя концентрациями препарата (по белку

* Здесь и далее — вероятное квадратичное отклонение, полученное в трех сериях опытов на шестистах лягушках.

0,1 и 0,2 г/л) обычным способом рассчитывали константу диссоциации комплекса ДМАБА — рецептивный участок ($0,7 \pm 0,2$ мкмол/л), максимальную удельную способность белка волосков связывать ДМАБА (12 ± 3 мкмол/г), энергию образования комплекса ДМАБА — рецептивный участок ($35,1 \pm 0,6$ кДж/мол) и число центров связывания ДМАБА на один волосок ($4 \pm 1 \cdot 10^5$).

Как ранее было показано нами для препаратов обонятельных волосков травяной лягушки (7), взаимодействие одорантов и препаратов приводит к появлению сложной картины в дифференциальных спектрах (рис. 1). Наиболее значительные изменения поглощения наблюдались в коротковол-

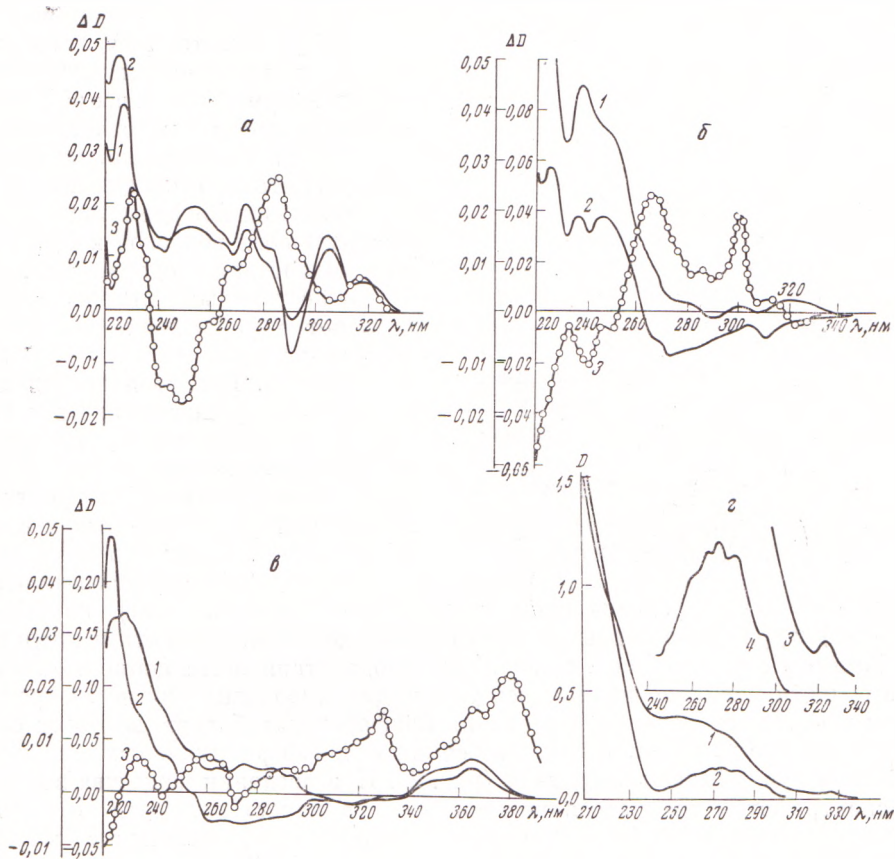


Рис. 1. Дифференциальные спектры, зарегистрированные при действии НВ (а), НБА (б) и ДМАБА (в) на препараты обонятельных волосков через 0,5 (1) и 3 мин. (2) после введения одоранта в кювету спектрофотометра и на препараты слизи через 15 мин. после начала взаимодействия (3). Концентрация белка в препаратах волосков 0,1 г/л; в препаратах слизи 0,2 г/л. Концентрация одорантов в опыте с волосками и слизью $3 \cdot 10^{-7}$ и $3 \cdot 10^{-6}$ мол/л. Правые шкалы изменений оптической плотности соответствуют 3. 2 — нормированные спектры препарата волосков (1, 3) и слизи (2, 4). Кривым 3 и 4 отвечают концентрации белка в 10 и 5 раз большие по сравнению с кривыми 1 и 3

новой области (200—240 нм) и отражали увеличение оптической плотности при 222, 227—228 и 233—236 нм. Первый из этих пиков хорошо соответствует по положению $n \rightarrow \pi^*$ -переходу пептидной связи в белках; этот переход особенно четко выявляется в спектрах агрегированных белков и белковых пленок (8), следовательно, появление этого пика в дифференциальном спектре свидетельствует об изменении агрегатного состояния белков волосков в процессе взаимодействия. Менее ясна природа более длинноволнового пика. Однако, исходя из наличия значительного числа мембранных белков, входящих в состав обонятельных волосков и, несомненно,

существенной альтерации спектральных характеристик хромофоров этих белков (положение в мембране), можно предположить, что эта полоса поглощения также соответствует $n \rightarrow \pi^*$ -переходу. Полоса поглощения в области 233—236 нм часто наблюдается в дифференциальных спектрах белков, подвергнутых денатурирующим воздействиям, и связана с изменением в поглощении пептидной связи и остатков тирозина и триптофана при изменении конформации белка (¹⁰). Наконец, применение нелинейной экстраполяции к поглощению (из (¹¹) с исправлением ошибки в расчетной формуле) в дифференциальных спектрах волосков в области 200—220 нм

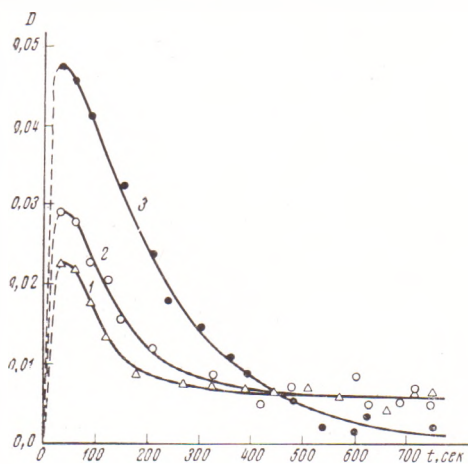


Рис. 2. Временное течение рассеяния в дифференциальных спектрах препаратов волосков при реакции с НБ (1), НБА (2) и ДМАБА (3) при 220 нм

дает значение максимума коротковолновой полосы поглощения равное 192 ± 2 нм, что отвечает главному пику поглощения пептидной связи. Таким образом, все эффекты, наблюдаемые в коротковолновой области дифференциальных спектров, убедительно свидетельствуют об изменении конформации белков обонятельных волосков в процессе взаимодействия с одорантами.

Существенный интерес представляет и наблюдение временного течения изменений в этой области спектра. Так, введение любого из использованных веществ в кювету с препаратом приводило к четко выраженному скачкообразному гиперхромному эффекту в дифференциальных спектрах в области 190—240 нм; это позволяет сделать вывод о реализации конформационных переходов вида α -спираль \rightarrow клубок и (или) клубок $\rightarrow \beta$ -структура (¹²) в первые секунды взаимодействия одоранта и препарата. Примерно через 35 сек. с начала взаимодействия поглощение в указанной области медленно изменялось уже индивидуальным образом. Отражением временного течения изменений конформации белков волосков служат и кривые изменения светорассеяния в дифференциальных спектрах волосков при действии одорантов (рис. 2). При введении вещества в кювету спектрофотометра рассеяние прогрессивно нарастало, достигая максимального значения через ~ 30 сек., и, следовательно, совпадало с быстрыми изменениями в поглощении пептидной связи. Дальнейший спад рассеяния был различен при использовании НБ, НБА и ДМАБА. В случаях использования первых двух веществ рассеяние стремилось к некоторому постоянному значению, что отражает длительно прогрессирующие изменения в коротковолновом поглощении при действии этих веществ на препарат. В случае ДМАБА рассеяние приближалось к нулю, что соответствует наблюдаемому в спектрах, отвечающих этому веществу, постепенному приближению к нулевой линии в коротковолновой области. Отметим, что для всех использованных веществ экспонента в уравнении Релея лежала в области значений 1,4—1,6 при концентрации белка в препаратах от 0,07 до 0,15 г/л. По данным Кортюма и Олкрюга (¹³) это значение экспоненты отвечает размеру рассеивающих частиц слегка меньшему длины волны рассеиваемого света. Однако единственным размером в препарате, способным дать такое значение экспоненты, является диаметр обонятельных волосков (150—200 нм). Следовательно, рассеяние осуществляется на диаметрах обонятельных волосков, а его изменения вызваны, прежде всего, изменением конформации мембранных белков обонятельных волосков в процессе взаимодействия с одорантом.

Наблюдаемые в более длинноволновой области полосы поглощения при 248—252, 264—266, 274—276, 280—286, 292—294 и 305 нм, несомненно, отвечают изменениям в поглощении тирозина и цистеина (248—252 нм) и циклических аминокислотных остатков при конформационных переходах в белках мембран волосков (¹⁴⁻¹⁶).

Весьма существенный интерес представляет комплекс длинноволновых полос поглощения в спектре, отвечающем действию ДМАБА (330—380 нм). Появление этих полос связано с батохромным сдвигом максимума поглощения ДМАБА на 5—7 нм. С другой стороны, рассчитанная энергия образования комплекса ДМАБА — рецептивный участок превышает значение энергии образования обычных слабых связей, хотя и не достигает значений, отвечающих образованию сильной связи (например, с азотом аминокислотной группы при образовании шиффова основания ДМАБА). Исходя из этих наблюдений, уместно предположить, что это вещество образует к.п.з. с аминокислотными группами белка волосков; этот к.п.з. имеет в значительной степени ион-радикальный характер (¹⁷) и, следовательно, характеризуется высоким значением энергии образования.

Наконец, взаимодействие слизи с использованными веществами существенно отличалось от такого с препаратами волосков. Так, близкий эффект изменения поглощения (по абсолютной величине) был получен для препаратов слизи только при использовании концентрации белка в 2 раза больше и концентрации одорантов в 10 раз выше, чем для препарата обонятельных волосков. Изменения в спектрах слизи развивались гораздо медленнее, часто характеризуясь прямо противоположным (по отношению к препарату волосков) изменением поглощения в определенных областях спектра и т. п. Это свидетельствует о высокой чувствительности конформации мембранных белков волосков к присутствию запахового вещества и о существенном различии центров связывания одорантов белками слизи и волосков. Вместе с тем интенсивность наблюдаемых изменений в поглощении волосков в коротковолновой области при действии одорантов свидетельствует и о том, что в процесс изменения конформации включаются практически все белки мембран волосков. Этот эффект отражает кооперативный, генерализованный характер наблюдаемых конформационных переходов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 X 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Королев, В сб.: Бионика. Современные проблемы. Эколого-физиологический аспект, т. 1, М., 1973. ² G. U. Henning, In: Gustation and Olfaction, London—N. Y., 1971, p. 239. ³ K. O. Ash, J. D. Skogen, J. Neurochem., v. 17, 10, 1143 (1970). ⁴ А. М. Королев, О. Ю. Фролов, Физиол. ж. СССР, т. 59, 1, 176 (1973). ⁵ O. H. Lowry, N. S. Rossebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 1, 265 (1951). ⁶ R. D. Marshall, C. Francoise et al., Biochem. J., v. 83, 2, 335 (1962). ⁷ А. М. Королев, О. Ю. Фролов, В сб.: Бионика — 1973, т. 2, М. 1973, 132, 138. ⁸ A. F. Winder, W. L. G. Gent, Biopolymers, v. 10, 7, 1243 (1971). ⁹ G. Holzwarth, P. Doty, J. Am. Chem. Soc., v. 87, 1, 218 (1965). ¹⁰ E. P. Azary, C. C. Bigelow, Canad. J. Biochem., v. 48, 9, 962 (1970). ¹¹ G. Hocman, Int. J. Biochem., v. 3, 17, 588 (1972). ¹² W. B. Gratzer, In: Poly- α -amino Acids, N.Y., 1967, p. 177. ¹³ G. Kortum, D. Oelkrug, Zs. Naturforsch., B19A, 1, 28 (1964). ¹⁴ N. Shimaki, K. Ikeda, J. Biochem., v. 68, 6, 795 (1970). ¹⁵ L. J. Andrews, L. S. Förster, Biochemistry, v. 11, 10, 1875 (1972). ¹⁶ Y. Ohba, M. Hayashi, Europ. J. Biochem., v. 29, 3, 461 (1972). ¹⁷ H. Kon, A. Szenci-Györgyi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 4, 1030 (1973).