

И. Л. ДУМЛЕР, Р. Н. ЭТИНГОФ

## АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА И СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОЙ 3',5'-АМФ В ИЗОЛИРОВАННЫХ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТАХ СЕТЧАТКИ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 20 V 1974)

В настоящее время проблема участия 3',5'-АМФ в процессе развития фоторецепторного акта привлекает внимание многих исследователей и является предметом оживленных дискуссий (<sup>1-4</sup>). В связи с этим активно изучают возможные пути регуляции содержания циклического нуклеотида в первичных акцепторах световых квантов — наружных сегментах палочек сетчатки (н.с.п.) на различных этапах их функционирования (<sup>1, 2, 5-7</sup>). Во всех посвященных этому вопросу работах (<sup>1, 2, 7</sup>) отмечают уменьшение накопления 3',5'-АМФ в изолированных фракциях н.с.п. при освещении в случае инкубации их в средах, обеспечивающих образование циклического нуклеотида. Однако мнения о причине наблюдаемого уменьшения и, соответственно, изменений активности и характера регуляции ферментов образования и распада 3',5'-АМФ (аденилатциклаза и фосфодиэстераза — 3',5'-АМФ-фосфогидролаза, КФ 3.1.4.1) крайне противоречивы. Так, нами выделен из сетчатки и изолированных н.с.п. водорастворимый белковый ингибитор фосфодиэстеразы (<sup>8</sup>). В то же время в работе (<sup>2</sup>) есть вывод о наличии в н.с.п. неидентифицированного пока мембранного активатора этого фермента.

Неоднозначны и данные в отношении изменений активности аденилатциклазы. По первоначальным данным (<sup>1</sup>), аденилатциклазная активность «темновых» препаратов н.с.п. оказалась весьма значительной и почти полностью исчезала после освещения фракций. Факт уменьшения аденилатциклазной активности после освещения н.с.п. был в дальнейшем подтвержден (<sup>7</sup>), однако уровень ферментативной активности н.с.п., по данным последних авторов, был незначителен и составлял в чистых препаратах н.с.п. 0,8% от первоначально приведенной величины (<sup>1</sup>). В то же самое время первые авторы, обнаружившие аденилатциклазу в н.с.п. (<sup>1</sup>), в своей последующей работе (<sup>2</sup>) отрицают подавление аденилатциклазной активности н.с.п. после их освещения. Факт уменьшения содержания 3',5'-АМФ в «световых» препаратах н.с.п., рассматриваемый ими ранее как следствие инактивирования аденилатциклазной активности, они трактуют теперь как результат фотоиндуцированного увеличения активности фосфодиэстеразы (<sup>2</sup>). Первоначальную ошибку авторы объясняют тем, что применяемые ими ранее для выявления «светового» эффекта на фосфодиэстеразу инкубационные среды были неадекватны по своему составу. В частности, используемые ими при определениях аденилатциклазы ингибиторы фосфодиэстеразы оказались недостаточно эффективными, что приводило к неполной блокаде последней и ошибочной трактовке полученных данных (<sup>2</sup>).

Учитывая противоречивость имеющихся данных по аденилатциклазе н.с.п. (<sup>1, 2, 7</sup>) и необходимость гарантированного выключения фосфодиэстеразы при определениях аденилатциклазной активности, представлялось целесообразным, используя выделенный нами природный ингибитор фосфодиэстеразы (<sup>8</sup>), попытаться разобраться в имеющихся противоречиях и экспериментально изучить вопрос о наличии изменений в активности аденилатциклазы после освещения фракций н.с.п. Другой задачей настоящей

работы было определение и сравнение реального содержания 3',5'-АМФ в «темновых» и «световых» изолированных фракциях н.с.п. При этом заранее очевидно, что значительная доля свободной 3',5'-АМФ, содержащейся, возможно, в нативных н.с.п., может быть потеряна в процессе выделения фракций. Однако, учитывая возможность связывания 3',5'-АМФ зритель-

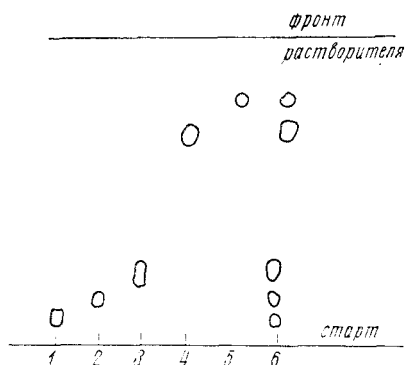


Рис. 1

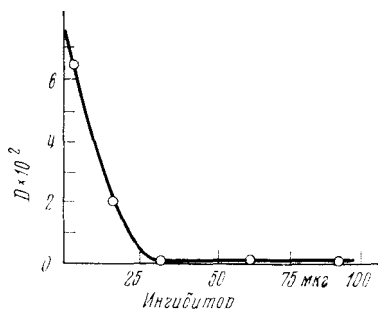


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма нуклеотидов на пластинке с силикагелем в системе изопропанол : вода : аммиак (7 : 2 : 1). 1 — АТФ, 2 — АДФ, 3 — АМФ, 4 — 3',5'-АМФ, 5 — аденозин, 6 — АТФ+АДФ+АМФ+3',5'-АМФ+аденозин

Рис. 2. Зависимость активности фосфодиэстеразы от количества ингибитора в пробе

ным пигментом<sup>(9)</sup> и имеющиеся данные о наличии связанной 3',5'-АМФ в других мембранных фрагментах (например, синапсоммах)<sup>(10)</sup>, можно было рассчитывать оценить реальный уровень связанной (или заключенной внутри дисков) 3',5'-АМФ в изолированных фракциях н.с.п. при их различном функциональном состоянии. Каких-либо литературных данных в этом отношении нам обнаружить не удалось.

Вся работа проведена на изолированных фракциях н.с.п. сетчатки быка<sup>(11)</sup>. Выделение белкового ингибитора фосфодиэстеразы (до стадии получения надосадочной жидкости рН 5,9), определение активности последней, фосфата и белка проводили так же, как в предыдущих работах<sup>(6, 8)</sup>. Активность аденилатциклазы определяли методом<sup>(12)</sup>, основным на измерении скорости превращения 8-<sup>14</sup>С-АТФ в <sup>14</sup>С-3',5'-АМФ. С этой целью использовали препарат 8-<sup>14</sup>С-АМФ со специфической активностью 53 мС/ммоль фирмы «Amersham». Метод несколько модифицировали, введя в среду инкубации АТФ-регенерирующую систему (креатинфосфат-креатинфосфокиназа) и проводя разделение нуклеотидов путем восходящей тонкослойной хроматографии на силикагеле. Для такого разделения использовали пластинки с силикагелем (15×15 см) фирмы «Силуфол», содержащие флуоресцентный индикатор, и систему растворителей изопропанол : вода : аммиак (7 : 2 : 1). При этом достигали быстрого по сравнению с другими способами (40 мин.) эффективного разделения нуклеотидов, содержащихся в смеси (рис. 1). В ряде опытов в среду инкубации вводили белковый ингибитор фосфодиэстеразы (25 мкг). Определение аденилатциклазной активности н.с.п. проводили, как правило, при двух-трех разведениях суспензии н.с.п., содержащих от 0,03 до 0,06 мг белка в пробе.

Определение содержания 3',5'-АМФ во фракциях н.с.п. осуществляли ферментативным методом<sup>(13, 14)</sup>, используя высокоочищенные препараты ферментов фирм «Sigma» и «Boehringer». Проверка метода на гомогенатах мозга крыс показала хорошее соответствие полученных величин имеющимся данным ( $1,1 \cdot 10^{-9}$  мол. на 1 г ткани мозга крыс — наши данные;  $0,8-1,2 \cdot 10^{-9}$  мол. на 1 г ткани мозга мышей и  $2,2 \cdot 10^{-9}$  мол. на 1 г ткани мозга крыс — литературные данные<sup>(13, 14)</sup>). Освещение фракций н.с.п.

проводили так же, как в работе (6). В ряде опытов фракции н.с.п. освещали при 0° с целью получения промежуточного продукта распада зрительного пигмента.

В первой серии опытов было определено количество ингибитора, необходимое для полного подавления фосфодиэстеразной активности. Из данных рис. 2 видно, что для этого было достаточно 25 мкг ингибитора при наличии в пробе 0,6 мг белка фракции н.с.п. Поскольку в опытах по определению аденилатциклазной активности содержание белка н.с.п. не превышало 0,06 мг, 25 мкг белка-ингибитора гарантировало полное выключение фосфодиэстеразы.

Опыты по определению активности аденилатциклазы н.с.п. приведены в табл. 1. Из этих данных очевидно, что во всех без исключения экспериментах наблюдали уменьшение ферментативной активности в «световых» фракциях н.с.п. по сравнению с «темновыми». Степень этого уменьшения варьировала и в среднем составила  $56 \pm 11\%$ . Далее было показано, что введение ингибитора в среду инкубации практически не изменяло уровня активности аденилатциклазы в «темновых» пробах и не снимало «светового» эффекта. Таким образом, в случае полностью блокированной фосфодиэстеразы количество образующейся 3',5'-АМФ было меньше в «световых» пробах по сравнению с «темновыми». На основании этих данных мы не можем пока согласиться

Таблица 1  
Аденилатциклазная активность «темновых» и «световых» изолированных фракций наружных сегментов (нмол. 3',5'-АМФ на 1 мг белка за 10 мин.)

№ опыта	«Темновые» фракции	«Световые» фракции	Торможение в «световых» пробах, %
1	9,5	0	100
2	7,9	0	100
3	7,3	4,8	34
4	8,5	4,2	51
5	12,5	6,9	45
6	13,8	8,7	37
7	6,5	3,8	42
Среднее	$9,4 \pm 1$	$4,1 \pm 1,2$	$56 \pm 11$
8 *	11,4	4,8	58
9 *	12,3	8,9	28
10 *	7,3	2,9	60

\* В «темновых» и «световых» пробы добавлен ингибитор.

с заключением авторов работы (2) о фотоиндуцированном увеличении в изолированных фракциях н.с.п. фосфодиэстеразной активности и трактуем наши результаты как уменьшение активности аденилатциклазы при освещении, что соответствует и выводам работы (7).

Таблица 2  
Содержание 3',5'-АМФ в изолированных «темновых» и «световых» фракциях наружных сегментов (нмол. 3',5'-АМФ на 1 мг белка)

№ опыта	«Темновые» фракции	«Световые» фракции (20°)	«Световые» фракции (0°)	Изменения по отношению к «темновым» пробам, %	
				«световые» фракции (20°)	«световые» фракции (0°)
1	20,0	10,8	—	—46	—
2	21,0	24,0	21,0	+12	0
3	16,5	11,1	16,5	—35	0
4	14,2	10,8	14,2	—24	0
5	16,7	11,6	16,7	—31	0
Среднее	$17,7 \pm 1,3$	$13,7 \pm 2,6$	17,1	$-25 \pm 6$	—

выше, чем в работе (7), где использовали специально очищенные фракции н.с.п. Не обсуждая пока вопроса о локализации аденилатциклазы в фоторецепторной клетке (фоторецепторные мембраны или область внутреннего сегмента), следует отметить, что независимо от ее расположения имеет

уровень аденилатциклазной активности изолированных фракций н.с.п. в наших экспериментах составил  $9,4 \pm 1$  нмол. 3',5'-АМФ на 1 мг белка за 10 мин. для «темновых» фракций и  $4,1 \pm 1,2$  нмол. 3',5'-АМФ на 1 мг белка за 10 мин. для «световых» и был ниже величины, приводимой в работе (4), и

составил  $9,4 \pm 1$  нмол. 3',5'-АМФ на 1 мг белка за 10 мин. для «световых» и был ниже величины, приводимой в работе (4), и

место регуляция ферментативной активности в процессе функциональной нагрузки. В связи с этим предположение о наличии диффундирующего из фоторецепторных мембран в область внутреннего сегмента фактора (<sup>7</sup>), изменяющего активность аденилатциклазы, представляется весьма интересным для дальнейшего изучения.

В табл. 2 приведены полученные нами данные по содержанию 3',5'-АМФ в «темновых» препаратах н.с.п. и фракциях последних, освещенных при 0° (распад родопсина до метародопсина II) и при 20° (полный распад зрительного пигмента). Из этих результатов следует, что количество связанной 3',5'-АМФ имело тенденцию к уменьшению в полностью обесцвеченных препаратах н.с.п. и не изменялось при частичном расщеплении родопсина.

Количество связанной 3',5'-АМФ в изолированных фракциях н.с.п. оказалось не так уж мало (17,7±2,3 пмоля на 1 мг белка в «темновых» препаратах); соответствующие величины для фрагментов синаптических мембран составляют 3,5 пмоля на 1 мг белка, для микросомальной фракции 65 пмол. на 1 мг белка (<sup>10</sup>).

Полученные нами данные по содержанию 3',5'-АМФ в «темновых» и «световых» изолированных фракциях н.с.п. свидетельствуют не только о возможности сохранения, по-видимому частичного, в них нуклеотида в процессе выделения фракций, но и об оставшейся тенденции к регуляции его содержания (табл. 2). По-видимому, механизмы этой регуляции достаточно стабильны.

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

Поступило  
10 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. W. Bitensky, W. H. Miller et al., In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, v. 1, N. Y., 1972, p. 317. <sup>2</sup> M. W. Bitensky, N. Miki et al., *Life Sciences*, v. 13, 11, 1451 (1973). <sup>3</sup> W. H. Miller, *Exp. Eye Res.*, v. 16, 5, 357 (1973). <sup>4</sup> V. J. Wulf, *Vision Res.*, v. 13, 2309 (1973). <sup>5</sup> R. G. Pannbacker, D. E. Fleischman, D. W. Reed, *Science*, v. 175, 4023, 757 (1972). <sup>6</sup> И. Л. Думлер, Р. Н. Эгингоф, *Биохимия*, т. 38, 2, 408 (1973). <sup>7</sup> Th Hendriks, J. J. H. H. M. De Pont et al., *Biochim. et biophys. acta*, v. 330, 2, 156 (1973). <sup>8</sup> И. Л. Думлер, Р. Н. Эгингоф, *ДАН*, т. 213, 5, 1197 (1973). <sup>9</sup> И. Л. Думлер, *Цитология*, т. 16, 464 (1974). <sup>10</sup> M. Weller, R. Rodnight, D. Carrera, *Biochem. J.*, v. 129, № 1, 113 (1972). <sup>11</sup> С. А. Шуколюков, И. Л. Думлер, *Биохимия*, т. 37, 2, 339 (1972). <sup>12</sup> O. M. Rosen, S. M. Rosen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 31, 1, 82 (1968). <sup>13</sup> N. D. Goldberg, J. Larner et al., *Anal. Biochem.*, v. 28, 1, 523 (1969). <sup>14</sup> B. M. Breckenridge, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 52, 1580 (1964).