

В. Л. БОРОВЯГИН, Т. А. ИВАНИНА, Д. А. МОШКОВ, Е. П. СЕВЕРИНА

## ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ И КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ МЕМБРАН СЕТЧАТКИ ПОЗВОНОЧНЫХ

(Представлено академиком Г. М. Франком 18 VII 1974)

Ранее (<sup>1-3</sup>) на основании данных по ультраструктурной организации наружных сегментов палочек (н.с.п.) и фоторецепторных мембран (ф.м.) сетчатки позвоночных было показано, что в цитоплазме н.с.п. локализованы компоненты, поддерживающие постоянное расстояние между дисками. Тогда же (<sup>2, 3</sup>) была предложена модель, демонстрирующая асимметричное распределение родопсина по обе стороны мембраны с преимущественной его локализацией со стороны цитоплазмы н.с.п. Ниже изложены результаты экспериментов, выполненных для проверки модели (<sup>2, 3</sup>).

В работе использованы суспензии н.с.п. и изолированные сетчатки быка и лягушки с критериями чистоты препаратов  $P_{278}$  (бык) = 2,2 (<sup>4</sup>) и  $P_{278}$  (лягушка) = 2,4 (<sup>5</sup>). Ультраструктурную организацию н.с.п. и ф.м. изучали стандартными методами замораживания-замещения и скальвания. Стандартно контрастированные ультратонкие срезы и реплики с расщепленных ф.м. просматривали на электронном микроскопе JEM-7A. Вторичную структуру липидных и белковых компонентов ф.м. до и после последовательной обработки 1% глутаральдегидом (24 час.), спиртом и ацетоном, фиксации 1% OsO<sub>4</sub> (1—2 часа), инкубации суспензий при 80, 90° (<sup>2, 3</sup>) оценивали методом и.-к. спектроскопии (<sup>6</sup>). Гидролиз белковых компонентов осуществляли инкубированием суспензий с проназой до полного обесцвечивания пигмента при двух концентрациях фермента: 250 или 150 мкг на 1 мг белка препарата в течение 6 или 12 час. соответственно при 25°.

Картины ультратонких срезов ф.м., обработанных методом замораживания-замещения, а также реплик с поперечных сколов н.с.п. сетчатки лягушки подтвердили ранее полученные данные (<sup>1-3</sup>) о существовании в цитоплазме н.с.п. «жестких» структур, поддерживающих расположение дисков с постоянным периодом ~300 Å (рис. 1а). Показано (<sup>7</sup>), что такие компоненты должны составлять ~15% всех белковых компонентов н.с.п.

При изучении картин рельефа гидрофобных поверхностей (г.п.) расщепленных ф.м. сетчаток быка и лягушки обнаружено большее число глобулярных субчастиц (г.с.) диаметром 110—120 Å, локализованных на г.п. «междисковой» половины ф.м. (рис. 1б, вогнутая поверхность) и значительно меньшее г.с. на г.п. противоположной половины мембраны (рис. 1б, выпуклая поверхность). Методом скальвания показано, что включение родопсина в модельные липидные мембраны сопровождается появлением на их гидрофобных поверхностях аналогичных г.с. (<sup>8-10</sup>). В ф.м. позвоночных родопсин должен составлять около 80—85% всех белков этих мембран (<sup>7, 11</sup>). На основании таких данных, по-видимому, можно считать, что асимметричное распределение субчастиц соответствует участкам липидного бислоя ф.м., в которых локализованы гидрофобные пептиды опсина или входящие в состав родопсина молекулы гликопротеида (<sup>12</sup>). Следовательно, наши данные по распределению субчастиц в гидрофобной области ф.м. быка и лягушки прямо подтверждают предложенную ранее модель ф.м. (<sup>2, 3</sup>).

После последовательной обработки ф.м. 1% альдегидом, спиртом и ацетоном спектральные кривые, соответствующие структурному состоянию белка, почти не меняли своего положения и формы по сравнению со спек-

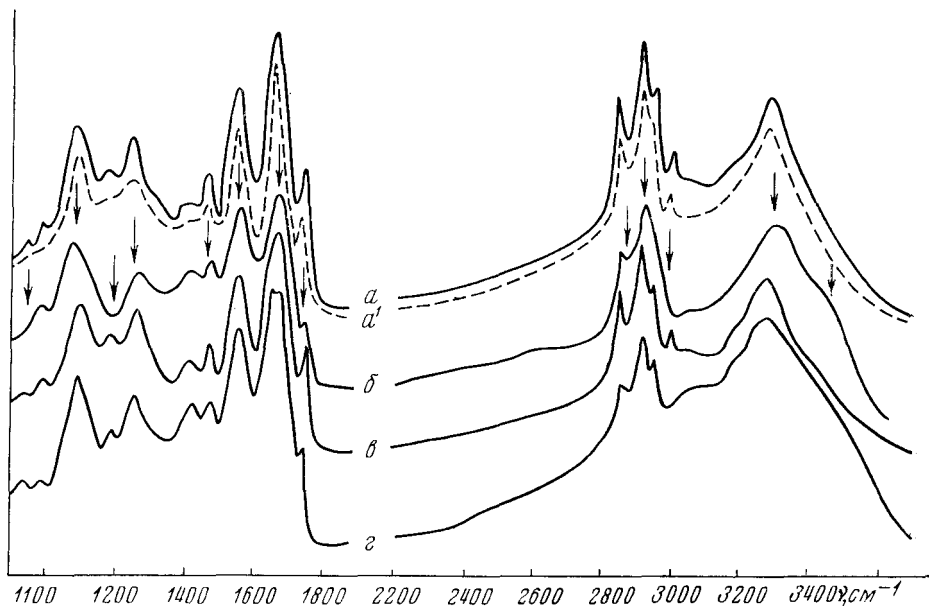


Рис. 2. И.-к. спектры суспензий фоторецепторных мембран сетчатки быка, 5 мМ трис-буфер, pH 7,4. *a* — контроль; *a'* — после обработки глутаральдегидом, спиртом и ацетоном; *b* — после фиксации четырехокисью осмия; *β* — после инкубации в 5 мМ трис-буфере, pH 7,4 при 90° в течение 10 мин.; *z* — то же, что и *β*, но после инкубации в присутствии 25% глицерина, диализованного против трис-буфера в течение 96 час.

трами контрольных препаратов (рис. 2, *a*, *a'*). Фиксация суспензий ф.м. 1%  $\text{OsO}_4$  сопровождалась существенными изменениями спектральных кривых (рис. 2, *b*). Эти изменения могут свидетельствовать о существенном влиянии  $\text{OsO}_4$  на структурное состояние липидов и белков ф.м. Спектральные характеристики ф.м., полученные после альдегидных и осмиевых фиксаций, хорошо согласуются с результатами изучения их ультраструктуры: поперечное сечение ф.м. при альдегидных фиксациях на 10–15 Å больше, чем сечение тех же мембран при фиксации  $\text{OsO}_4$  (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>). Уменьшение поперечного сечения ф.м. при фиксации осмием, по-видимому, обусловлено денатурацией пептидов, расположенных в гидрофильных зонах мембран, а также изменением структурного состояния их липидов.

Спектры липидов и белков ф.м. быка, зарегистрированные при 20° после нагревания препаратов до 90° (в течение 10–15 мин. до полного обесцвечивания родопсина), существенно не отличаются от спектров контрольных препаратов (рис. 2, *β*). Скальвание таких ф.м. (рис. 1, *β*) не выявило изменений в количестве и распределении субчастиц на г.п. расщепленных мембран по сравнению с контролем. Нагревание ф.м. до 90° в присутствии 25% глицерина (криопротектант) сопровождается значительным изменением структурного состояния пептидов ф.м.: на спектрах появляется четкий пик в области 1630  $\text{cm}^{-1}$ , свидетельствующий о появлении в пептидах β-структуры (рис. 2, *z*). Скальвание при этом не выявляет субчастиц: все поверхности расщепленных ф.м. гладкие (рис. 1, *z*). Поперечное сечение таких мембран при фиксации альдегидом идентично сечению мембран в контроле. Можно предполагать, что нагревание ф.м. до 90° сопровождается обратимым (при охлаждении до 20°) изменением структурного состояния белковых молекул. Введение же глицерина делает эти изменения необратимыми: при нагревании глицерин, видимо, вызывает дегидратацию пептидов, нарушая их взаимосвязь с липидами и лишая способности восстанавливать свое естественное структурное состояние. Гидрофобная часть пептидов в этом случае, по-видимому, как бы перемещается из жирнокислотной области в интерфазные зоны мембраны.

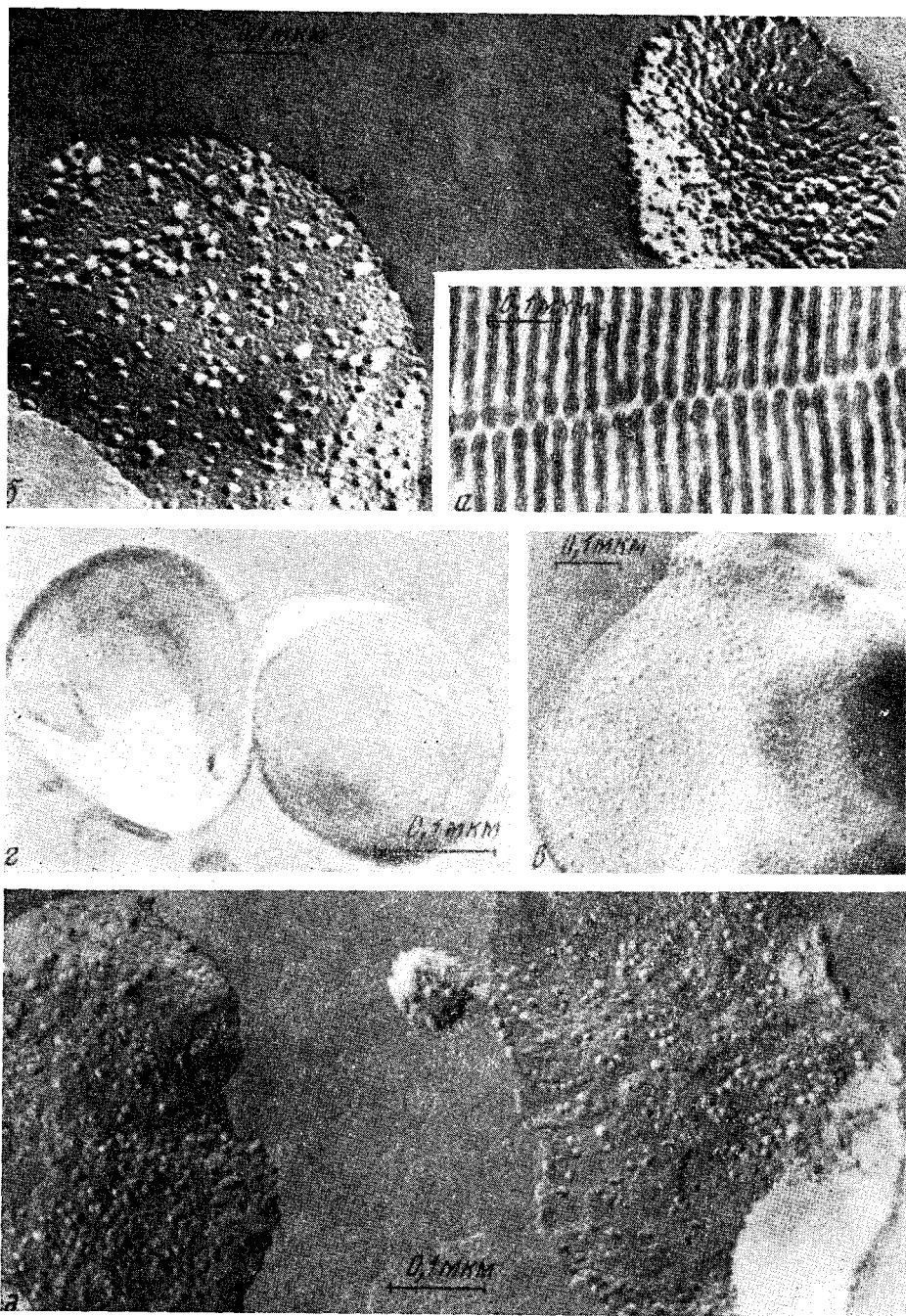


Рис. 1. Ультратонкий срез н.с.п. сетчатки лягушки (а); сетчатка приготовлена по методу замораживания — замещения. Реплика со скола замороженной от  $20^{\circ}$  ф. м. палочки сетчатки лягушки (б); видно асимметричное распределение г.с. на г.п. выпуклых и вогнутых «половинах» мембраны (см. текст); в — реплика со скола ф.м. палочки сетчатки быка после нагрева до  $90^{\circ}$  с последующим замораживанием от  $20^{\circ}$ ; г — то же, что и в, но нагрев до  $90^{\circ}$  осуществлялся в присутствии 25% глицерина. Замораживание от  $20^{\circ}$ ; д — реплика со скола ф.м. сетчатки лягушки после инкубации с проназой (150 мкг на 1 мг белка в течение 12 час.). Замораживание от  $20^{\circ}$

*К статье В. М. Гинзбург, Г. Г. Левина и А. Н. Метелкина, стр. 734*

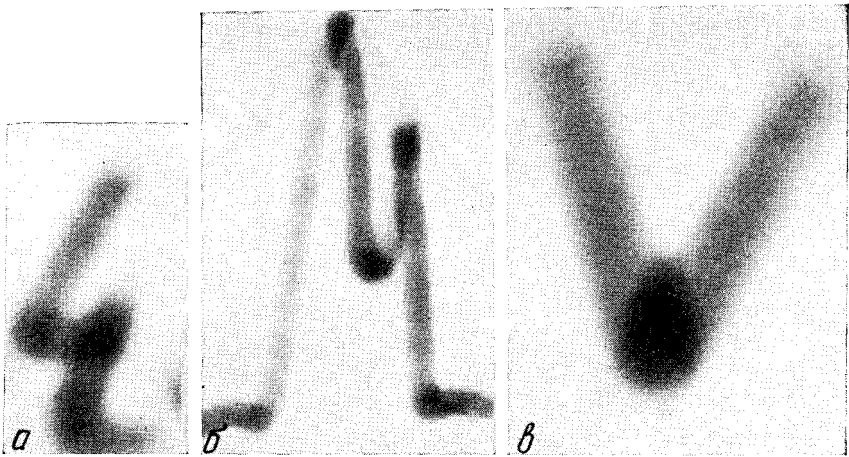


Рис. 1. Иллюстрация возможности выделения информативных фрагментов с помощью расфокусировки. *a* — расфокусированная цифра «4»; *б* — расфокусированный фрагмент электрокардиограммы; *в* — расфокусированное изображение общего информационного фрагмента «уголка»

Ранее были отмечены изменения в поперечном сечении трехслойной структуры ф.м. при их фиксации глутаральдегидом после обработки проназой (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>). В настоящей работе показано, что инкубация с проназой до полного обесцвечивания родопсина в обоих случаях сопровождается гидролизом около 50% пептидов (<sup>7</sup>). Скальвание ф.м. после протеолиза (150 мкг проназы на 1 мг белка) в течение 12 час. выявило незначительное уменьшение числа субчастиц только на г.п. «междисковой» половины мембраны (рис. 1, *д*). Обработка ф.м. более высокой концентрацией проназы (250 мкг на 1 мг белка) в течение 6 час. сопровождается незначительным уменьшением числа субчастиц на г.п. «внутридисковой» половины и сохранением не более 25–30% субчастиц на г.п. «междисковой» половины ф.м. (<sup>7</sup>). Наблюдаемые количественные различия после гидролиза 50% пептидов и полного обесцвечивания родопсина пока трудно объяснимы. Можно лишь предполагать, что в последнем случае этот эффект обусловлен более интенсивным нарушением структурных взаимодействий между гидрофобными участками пептидов и липидов.

Сопоставление этих данных с результатами изучения поперечных срезов ф.м. после протеолиза и фиксации альдегидом (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>) позволяет предполагать, что проназа полностью гидролизует гидрофильные пептиды и как бы частично (в зависимости от концентрации проназы) «разворачивает» их гидрофобные участки, перемещая их в интерфазные зоны мембраны. Это способствует сохранению трехслойной структуры ф.м., фиксированных после протеолиза альдегидами (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>), аналогично структуре протеолипидных модельных мембран (<sup>13</sup>).

Таким образом, нами получены данные, подтверждающие существование «жесткой» системы компонентов, обеспечивающих постоянный период между дисками в наружных сегментах палочек (около 300 Å) и составляющих около 15% их белковых компонентов; полное обесцвечивание родопсина и гидролиз 50% пептидов ф.м. сетчатки лягушки сопровождается различным (в зависимости от концентрации проназы) уменьшением количества субчастиц на гидрофобной поверхности «междисковой» половины ф.м.; нагревание ф.м. до 90° в присутствии 25% глицерина приводит к появлению β-структуры в пептидах и исчезновению субчастиц на гидрофобных поверхностях мембран при сохранении размеров поперечного сечения мембран контрольных препаратов при альдегидных фиксациях, сопоставление этих данных свидетельствует о том, что субчастицы не могут представлять собой молекулы глобулярного родопсина, расположенного в центре гидрофобной области мембран (<sup>12</sup>); обнаруженное распределение субчастиц на гидрофобных поверхностях ф.м. быка и лягушки подтвердило модель мембраны с асимметричной локализацией родопсина (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>).

Авторы выражают благодарность Е. Е. Фесенко, А. И. Жаворонку и М. А. Островскому за содействие в получении суспензий ф.м. быка и лягушки, Ю. А. Лазареву — за возможность проведения спектроскопических исследований, Ю. Н. Чиргадзе — за ценные замечания при чтении рукописи, Ю. Ерохину — за предоставление препарата проназы.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино Московской обл.

Поступило  
13 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, Биофизика, т. 16, 350 (1971).
- <sup>2</sup> В. Л. Боровягин, Т. А. Иванина, Д. А. Мошков, ДАН, т. 207, № 5, 1223 (1972).
- <sup>3</sup> V. L. Borovjagin, T. A. Ivanina, D. A. Mosckov, Vision Res., v. 13, 745 (1973). <sup>4</sup> F. E. Erhard, S. E. Ostroy, E. W. Abrachamson, Biochim. et biophys. acta, v. 112, 256 (1966).
- <sup>5</sup> E. Kimura, M. Okubo et al., Osaka City Med. J., v. 4, 107 (1957). <sup>6</sup> Д. А. Мошков, Е. П. Северина и др., Биофизика, т. 20, 4 (1975). <sup>7</sup> Т. А. Иванина, Автореф. канд. дисс., Пушино, 1974. <sup>8</sup> H. Hong, W. L. Hubbell, Biochemistry, v. 12, 4517 (1973).
- <sup>9</sup> Y. S. Chen, W. L. Hubbell, Exp. Eye Res., v. 17, 6, 517 (1973). <sup>10</sup> M. Chabre, A. Cavaggoni et al., FEBS Letters, v. 26, 197 (1972). <sup>11</sup> D. Bownds, A. C. Gaide-Huguenin, Nature, v. 225, 870 (1970). <sup>12</sup> В. Л. Боровягин, Усп. сов. биол., т. 77, 3, 339 (1974).
- <sup>13</sup> R. A. Raubach, P. P. Nenes, E. A. Dratz, Exp. Eye Res., v. 18, 1, 1 (1974). <sup>14</sup> J. Olive, E. L. Benedetti, Mol. Biol. Rep., v. 1, 5, 245 (1974). <sup>15</sup> V. L. Borovjagin, D. A. Mosckov, Membrane Biol., v. 13, 245 (1973).