

С. А. ВЛАСОВА, К. Е. КРУТЛЯКОВА, М. А. ОСТРОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ С ПОМОЩЬЮ ПАРАМАГНИТНОГО ЗОНДА

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 25 IV 1975)

В настоящее время имеется ряд косвенных данных, свидетельствующих о конформационных перестройках фоторецепторной мембраны (ф.м.) в процессе ее функционирования — трансформации энергии кванта света в зрительный сигнал ⁽¹⁾. Широкое использование физико-химических и кинетических методов исследования, разрабатываемых школой академика Н. М. Эмануэля, позволяет изучать тонкие механизмы функционирования сложных биологических систем ⁽²⁾. Среди них важное место занимает метод парамагнитных зондов и меток.

Используя этот метод, мы исследовали структурные превращения ф.м. при действии на нее видимого света.

В качестве парамагнитного зонда использовали бирадикал — ди-мин-оксидимер-3,3-диметилентриацетонамин ⁽³⁾, структурная формула которого представлена на рис. 1.

Суспензию наружных сегментов палочек (н.с.п.) получали из сетчаток глаза лягушек в градиенте плотности сахарозы по модифицированному методу ⁽⁴⁾.

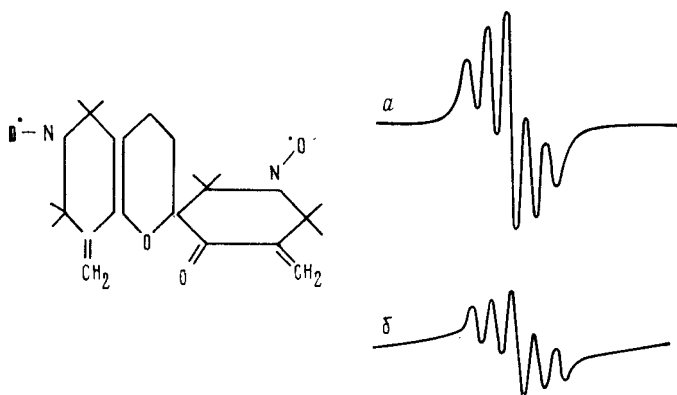


Рис. 1. Строение бирадикала и его спектры э.п.р. в этаноле (а) и фоторецепторной мембране (б)

Концентрация белка в суспензии, определенная методом Лоури, составляла 23—27 мг/мл. Количество родопсина, оцененное по спектрам поглощения, составляло 40—50% белка (или $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, принимая мол. вес родопсина равным 40 000 и коэффициент молярной экстинкции $40\,600\text{ см}^2$ на моль-эквивалент ретиналя). Суспензия имела критерии чистоты $P_{278} = 2,58$ и $P_{400} = 0,316$ ⁽⁴⁾. Поскольку бирадикал нерастворим в воде, его вводили в суспензию н.с.п. в растворе этилового спирта. Оптимальная концентрация спирта 12%, при которой его денатурирующее действие минимально, была определена на основании спектрофотометрических опытов.

Конечная концентрация бирадикала в образце суспензии н.с.п. (0,08 мл, pH 7,5) составляла $5 \cdot 10^{-4} - 10^{-3} M$; при этих концентрациях бирадикал дает спектры э.п.р. с хорошо разрешенной сверхтонкой структурой. Спектры э.п.р. записывали на э.п.р.-радиоспектрометре Е-4 фирмы «Varian» при амплитуде модуляции 1,6 гс и СВЧ мощности 50 мвт.

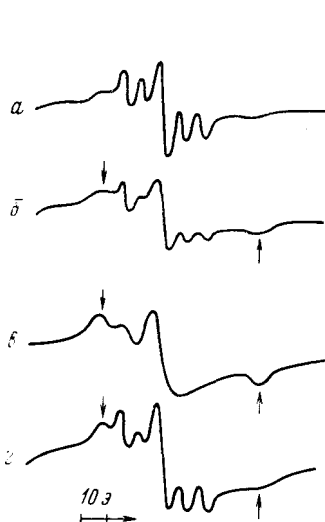


Рис. 2

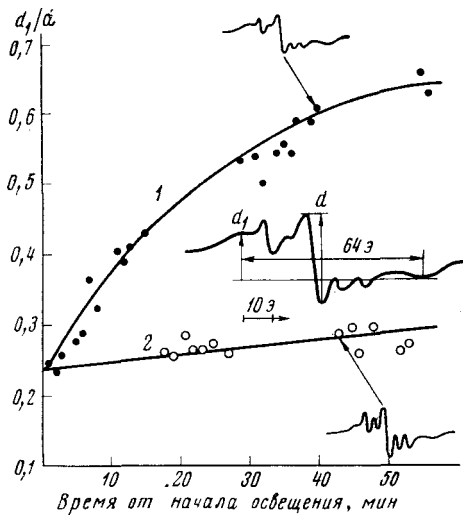


Рис. 3

Рис. 2. Спектры э.п.р. бирадикала: *a* — в необесвеченной ф.м., после 40 мин. инкубации при 18° ; *б* — в обесвеченной ф.м., после 40 мин. освещения; *в* — то же, что и *б*, но в присутствии феррицианида калия ($10^{-1} M$); *г* — в необесвеченной ф.м. при быстром понижении температуры до -1° . Появление широкого сигнала указано стрелками

Рис. 3. Изменение параметра d_1/d спектров э.п.р. бирадикала при освещении ф.м. (1) и в темноте (2). Графически изображен способ определения параметра d_1/d

Освещение образцов проводили непосредственно в резонаторе спектрометра монохроматическим светом с $\lambda = 500$ нм, используя интерференционный фильтр. Опыты проводили при постоянной температуре 18° .

Бирадикал имеет трициклическое строение с двумя парамагнитными центрами N—O (рис. 1).

Между радикальными фрагментами существует жесткая химическая связь, препятствующая внутримолекулярным движениям бирадикала. Пространственное расположение радикальных фрагментов относительно друг друга таково, что неспаренный электрон каждого азотокисного центра может взаимодействовать как с собственным ядром азота, так и с ядром азота соседнего центра. Поэтому спектр э.п.р. бирадикала в растворе (рис. 1, *a*) и в фоторецепторной мембране (рис. 1, *б*) состоит из пяти линий. В обоих случаях форма линии э.п.р. свидетельствует о сильном электронном обмене между радикальными фрагментами.

Как видно из рис. 2, *б*, спектр э.п.р. бирадикала в обесвеченной ф.м. существенно отличается от спектра э.п.р. бирадикала, солюбилизованного темновой ф.м. (рис. 2, *a*). В обесвеченной мембране спектр анизотропен, появляются новые компоненты, обозначенные на рис. 2, *б* стрелками. По мере освещения наблюдается возрастание интенсивности новых компонент. Поэтому для наблюдения закономерностей изменения спектров э.п.р. бирадикала был выбран произвольный параметр d_1/d , где величина d_1 — суммарная интенсивность новых компонент, а d — амплитуда центральной компоненты спектра (рис. 3).

При освещении мембран эта величина резко увеличивается (рис. 3, 1), в то время как в темноте d_1/d изменяется незначительно (рис. 3, 2). Вели-

чина фотоиндуцированного эффекта (разница свет — темнота) не зависела от концентрации бирадикала в пределах $5 \cdot 10^{-4}$ — 10^{-3} М.

Наблюдаемое появление новых компонент спектра (рис. 2б) указывает на то, что бирадикал сильно заторможен в ф.м., когда она обесцвечена. Доказательство этого было получено, когда систему ф.м.—бирадикал в условиях темноты охлаждали до низких температур, при которых существенно увеличивается вязкость системы. Как видно из рис. 2г, спектр э.п.р. бирадикала при температуре -1° аналогичен спектру рис. 2б, полученному при освещении ф.м., причем оба спектра имеют равное значение величины $d_1/d=0,6$.

Так как спектр бирадикала в обесцвеченной ф.м. (рис. 2б), по-видимому, представляет собой наложение двух спектров, было сделано предположение, что бирадикал распределяется в двух областях мембраны. Это предположение удалось подтвердить, используя феррицианид калия⁽⁵⁾. Последний за счет динольного взаимодействия с легкодоступными молекулами радикала приводит к исчезновению узких линий спектра, обусловленных локализацией радикала в поверхностных областях мембраны. Тогда в присутствии феррицианида можно получить спектр э.п.р., обусловленный локализацией радикала в более глубоких, недоступных для феррицианида, гидрофобных областях мембраны.

В нашем случае при добавлении феррицианида калия в систему обесцвеченная ф.м.—бирадикал удалось выделить из спектра рис. 2б спектр сильно заторможенных молекул бирадикала (рис. 2в), который включает два крайних максимума, обозначенных стрелками (расстояние между ними порядка $64 \text{ \AA}$).

Следовательно, спектр рис. 2б действительно является наложением двух сигналов, узкого и уширенного (рис. 2в), и подтверждает то, что бирадикал может распределяться как в поверхностных, так и в глубоких гидрофобных областях мембраны.

Поскольку спектр рис. 2б является суммой двух сигналов, то выбранный нами параметр d_1/d показывает долю сильно заторможенных молекул бирадикала. Иными словами, мы с уверенностью можем говорить о том, что доля таких молекул в процессе обесцвечивания ф.м. значительно возрастает (рис. 3).

Фотоиндуцированные структурные превращения ф.м., вызывающие сильную иммобилизацию бирадикала, можно трактовать по-разному в зависимости от того, является ли бирадикал зондом или меткой.

Если это зонд, способный равномерно распределяться в гидрофобных областях ф.м., то, будучи жестко упакован, он может дать спектр э.п.р., характерный для сильно иммобилизованного радикала (ср. спектры б и г, рис. 2). Тогда можно было бы предположить, что в процессе фотолиза родопсина происходит значительное увеличение микровязкости среды в области локализации молекул бирадикала. В таком случае введение зондов, аналогичных бирадикалу по структуре, должно было бы дать фотоиндуцированное изменение спектров э.п.р. в ф.м. Однако с гидрированным производным этого бирадикала по двойным связям у групп $=\text{CH}_2$ (см. рис. 1) такого эффекта не наблюдалось. Более того, форма спектров э.п.р. была совершенно иной: отсутствовали уширенные компоненты (рис. 4, 2), т. е. этот бирадикал не заторможен в обесцвеченной ф.м.

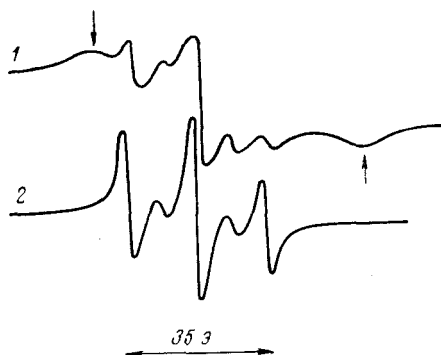


Рис. 4. Спектры э.п.р. бирадикала (1) и его гидрированного производного (2), солиобилизованных обесцвеченной ф.м.

Это указывает на то, что выбранный нами бирадикал скорее всего не

зонд, а метка. И тогда сильная иммобилизация бирадикала должна быть объяснена иначе.

Поскольку известно, что спектры э.п.р. сильно заторможенного типа характерны только для случая спин-мечения SH-групп белков (независимо от того, в растворе они (⁶, ⁷) или входят в состав мембраны (⁸⁻¹¹)), можно предположить, что в ф.м. местом связывания с бирадикалом являются именно SH-группы.

Для выяснения специфического связывания бирадикала с этими группами были проведены опыты, в которых темновую и фотолизированную суспензию перед введением бирадикала обрабатывали N-этилмалеимидом (10^{-3} M), блокирующим сульфгидрильные группы. В этом случае спектр э.п.р. полностью обесцвеченной ф.м. не отличается от спектра темновой мембраны. Это указывает на то, что местом ковалентного связывания бирадикала в мембране, действительно, могут быть SH-группы.

В таком случае бирадикал может связываться с этими группами за счет своих $=CH_2$ -групп (рис. 1). В пользу этого говорят описанные выше эксперименты, из которых следует, что гидрированное по этим группам производное бирадикала не дает ни фотоиндуцированного эффекта, ни подобного рода спектров э.п.р. (рис. 4).

Следовательно, полученные нами результаты указывают на то, что при освещении в гидрофобной области ф.м. появляются новые SH-группы, доступные для взаимодействия с молекулами бирадикала. При этом в обесцвеченной ф.м. примерно в 2 раза больше таких групп, чем в темновой ф.м. (рис. 3).

В нашем случае наблюдается довольно быстрое связывание парамагнитной метки с SH-группами ф.м. (рис. 3). Однако подобное быстрое связывание ранее было получено с помощью малеимидной метки на эритроцитарных мембранах (⁹).

Таким образом, в работе показано, что выбранный нами бирадикал является тем инструментом, с помощью которого можно наблюдать конформационные превращения в ф.м. после освещения, количественно оценивать глубину таких превращений и исследовать их локализацию в мембране.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Н. М. Эмануэлю за внимание и интерес к работе. Авторы признательны А. Б. Шапиро за синтез и предоставление бирадикала и его гидрированного производного.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, Биофизика, т. 16, 2, 350 (1971). ² Н. М. Эмануэль, В кн.: Химическая кинетика и цепные реакции, М., «Наука», 1966, стр. 34. ³ А. Б. Шапиро, В. П. Иванов и др., Изв. АН СССР, сер. хим., № 7, 1688 (1973). ⁴ Е. Kimura, М. Okubo et al., Osaka City Med. J., v. 4, 1 (1957). ⁵ Г. И. Лихтенштейн, Ю. Б. Гребенщиков и др., Мол. биол., т. 4, 662 (1970). ⁶ О. Н. Griffith, Н. М. McConnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 55, 1, 8 (1966). ⁷ Н. В. Медведева, Э. К. Рууге, Л. А. Блюменфельд, Биофизика, т. 20, 1, 26 (1975). ⁸ Н. Е. Sandberg, L. H. Piette, Agressologie, v. 9, 1, 59 (1968). ⁹ Н. Е. Sandberg, R. G. Bryant, L. H. Piette, Arch. Biochem. and Biophys., v. 133, 1, 144 (1969). ¹⁰ D. Chapman, M. D. Barrat, V. B. Kamat, Biochim. et biophys. acta, v. 173, 1, 154 (1969). ¹¹ F. H. Kirkpatrick, Н. Е. Sandberg, Arch. Biochem. and Biophys., v. 156, 653 (1973).