

Н. Я. ОРЛОВ, Е. Е. ФЕСЕНКО, член-корреспондент АН СССР
М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ОБЛАСТИ
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ РОДОПСИНА В ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР
1 — 25°

В настоящее время принято считать, что обесцвечивание зрительного пигмента сопровождается конформационными изменениями его белковой части (¹⁻⁴). Основанием для такой точки зрения являются результаты многочисленных работ (см., например, (⁵⁻¹¹, ¹⁵)) по исследованию родопсина, солюбилизованного некоторыми детергентами (тритон X-100, эмульгоген ВС-720, цетилтриметиламмонийбромид), а также суспензий мембран дисков паружных сегментов (м.д.н.с.) и их дигитониновых экстрактов, при очистке которых использовались квасцы и петролейный эфир, т. е. препаратов, выделенных с помощью «жестких» методов (²).

В то же время данные, полученные при изучении более нативных препаратов (м.д.п.с. и их дигитониновых экстрактов, выделенных без применения квасцов и петролейного эфира) немногочисленны и противоречивы. С одной стороны показано, что в ходе распада метародопсина I происходит поглощение протона (¹²), а на стадии метародопсина II альдиминная связь становится доступной восстановлению NaBH_4 (¹³). С другой стороны, методом кругового дихроизма на таких же препаратах не удалось зарегистрировать конформационного перехода (¹⁴, ¹⁵).

Эти результаты ставят под сомнение предположение о конформационных изменениях родопсина в ходе его распада. В связи с этим мы предприняли исследование дигитониновых экстрактов м.д.н.с., полученных без применения квасцов и петролейного эфира, методом дифференциальной спектроскопии.

Дигитониновые экстракты родопсина быка получали по следующей схеме. Свежепрепарированные сетчатки гомогенизировали 15–20 мин. с помощью перемешивания на магнитной мешалке в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 6,8) при 0°. Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования гомогената при 800 g в течение 10 мин. и содержащую очищенную фракцию паружных сегментов палочек сетчатки, осаждали 15 мин. при 27 000 g. Осадок подвергали двукратной флотации в 40% (вс/объем) растворе сахарозы, центрифугируя по 30 мин. при 34 000 g. Очищенную суспензию промывали 2–3 раза буфером (27 000 g, 15 мин). Мембраны солюбилизировали 1% раствором дигитонина («Lowson Chemical») в фосфатном буфере и центрифугировали 60 мин. при 34 000 g. Препараты родопсина, полученные таким образом, имели оптические критерии чистоты $P_{400/500}$ и $P_{280/500}$ 0, 22–0,25 и 2,4–2,7 соответственно. В ряде случаев в препараты зрительного пигмента добавляли глицерин (5–30% по объему).

Оптические измерения были выполнены на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре «Specord UV Vis» с термостатирующими ячейками, использование которых давало возможность синхронно менять температуры образцов, находившихся в предварительно калиброванных 10-миллиметровых кварцевых кюветах. После достижения необходимой температуры и записи нулевой линии один из образцов облучали в течение 1–5 мин. светом с длиной волны более 575 нм. Запись дифференциального спектра

начинали через 5–10 сек. после прекращения облучения. В диапазоне 260–300 нм время записи спектра составляло не более 1,5 мик.

Облучение дигитонинового экстракта при 3° приводит к спектральным изменениям как в видимой, так и в ультрафиолетовой области (спектр 1, рис. 1). Разностный спектр в диапазоне 340–600 нм свидетельствует об образовании таутомерных форм метародопсина (¹⁶). Дифференциальный спектр в ультрафиолетовой области характеризуется выраженным положительным максимумом при 291 нм и отрицательными максимумами в районах 294 и 275–285 нм. При 1–3° зарегистрированные спектральные

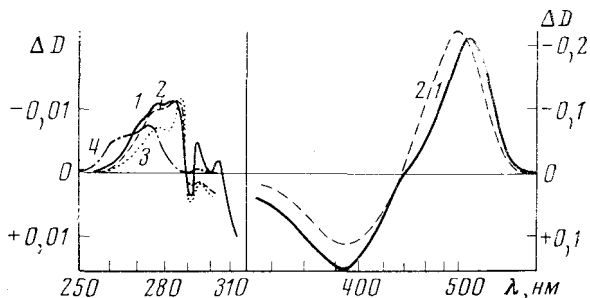


Рис. 1. Дифференциальные спектры препаратов зрительного пигмента. 1 – спектр, полученный при облучении дигитонинового экстракта м.д.н.с. в диапазоне температур 1–3°; 2 – спектр, полученный в результате облучения того же препарата при 3° и его последующего нагревания до 25°; 3 – спектр, полученный Такаги (⁶) при комнатной температуре; 4 – спектр, зарегистрированный Эбри и Хонигом при –105°

изменения сохраняются по крайней мере в течение 30 мин. Глицерин в концентрации 5–30% не оказывал влияния на дифференциальные спектры исследуемых препаратов.

Дифференциальный спектр образца, облученного при 1–3° и нагретого до 25°, несколько отличается от спектров снятых при низкой температуре: положительные и отрицательные максимумы при 291–294 нм становятся менее выраженными (спектр 2, рис. 1). В районе 275–287 нм изменений в разностных спектрах, выходящих за пределы ошибки измерений, не наблюдалось. Дифференциальный спектр в видимой области свидетельствует о том, что при этих условиях родопсин распадается полностью на транс-ретиаль и опсин. Спектральные изменения, аналогичные приведенным на рис. 1 (спектр 2), были получены также и в результате облучения препаратов при 25°.

Дифференциальные спектры, зарегистрированные нами как при 3°, так и при 25°, в основном подобны спектру, полученному Такаги (⁶) при комнатной температуре (рис. 1, спектр 3). Этот автор приводит достаточно убедительные доказательства того, что спектральные изменения в области 280–295 нм обусловлены конформационной перестройкой белковой части зрительного пигмента, а не ее хромофорной группой — ретиналем. Это дает основание считать, что дифференциальные спектры, зарегистрированные в настоящей работе при низкой температуре, также, по крайней мере частично, являются результатом конформационных изменений белка. В пользу быстрой конформационной перестройки свидетельствуют эксперименты по измерению флуоресценции м.д.н.с. в случае их обесцвечивания в присутствии гидроксилamina, выполненные в нашей лаборатории В. Л. Ратнером¹ и одним из авторов настоящей работы (Е. Е. Фесенко). В этих опытах было установлено, что после импульсного облучения при 20° хромофорная группа родопсина становится доступной для реакции с гидроксилaminом за время менее 1 сек.

Следует отметить, что спектры 1–3 (рис. 1) существенно отличаются от дифференциального спектра 4 (рис. 1), полученного Эбри и Хонигом⁽¹⁷⁾ при -105° для люмиродопсина и обусловленного, по мнению этих авторов, цис-транс-изомеризацией хромофора.

Совокупность изложенных данных свидетельствует о том, что конформационная перестройка должна происходить после стадии люмиродопсина, но до распада пигмента полностью на транс-ретиаль и опсин. По-видимому, она связана либо с образованием метародопсина I, либо с образованием метародопсина II. Не исключено также, что она несколько запаздывает по отношению к образованию метародопсина II. При температуре выше 1° время запаздывания не превышает времени, проходящего между началом облучения образца и окончанием записи спектра, которое в наших экспериментах составляло около 3–5 мин.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
27 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Н. Этингер, И. А. Остапенко, Усп. совр. биол., т. 72, 2(5), 200 (1971).
- ² В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, Биофизика, т. 16, 350 (1971).
- ³ E. W. Abrahamson, S. E. Ostroff, Progr. Biophys. Molec. Biol., v. 17, 179 (1967).
- ⁴ A. Kropf, «VI Intern. Congr. Photobiol. Bochum, 1972», p. 22. ⁵ G. Wald, P. K. Brown, J. Gen. Physiol., v. 35, 797 (1951–1952). ⁶ M. Takagi, Biochim. et biophys. acta, v. 66, 328 (1963). ⁷ R. Hubburd, D. Bownds, T. Yoshizawa, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., N. Y., v. 30, 301 (1965). ⁸ J. Heller, Biochemistry, v. 7, 2914 (1968). ⁹ И. Б. Федорович, В сб. Механизмы работы рецепторных элементов органов чувств, Л., «Наука», 1973, стр. 84. ¹⁰ N. Virmaux, T. Weehnelde, P.-F. Urban, C. R., v. D275, 2041 (1972). ¹¹ J. K. Wong, S. E. Ostroff, Arch. Biochem. and Biophys., v. 154, 1 (1973). ¹² H. Emrich, Zs. Naturforsch., B. 26b, 352 (1971). ¹³ R. L. Kimbel, R. P. Poincelot, E. W. Abrahamson, Biochemistry, v. 9, 1817 (1970). ¹⁴ И. Б. Федорович, Биофизика, т. 13, 322 (1968). ¹⁵ H. Shichi, M. S. Lewis et al., J. Biol. Chem., v. 244, 529 (1969). ¹⁶ R. Mathews, R. Hubburd et al., J. Gen. Physiol., v. 47, 215 (1963). ¹⁷ T. G. Ebrey, B. Honig, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 1897 (1972).