



УДК 547.963.4:543.42

ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ИОДОПСИНА В НАТИВНЫХ КОЛБОЧКАХ СЕТЧАТКИ ЛЯГУШКИ
(МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Новицкий И. Ю., Зак П. П., Островский М. А.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Зарегистрированы спектры поглощения одиночных наружных сегментов фоторецепторов травяной лягушки *Rana temporaria*. Исследовано влияние нитратов и хлоридов на спектральные свойства колбочковых и палочковых пигментов. Показано, что замена хлорида на нитрат не влияет на положение максимума поглощения палочкового пигмента. В то же время максимум спектра поглощения колбочек в составе нативной фоторецепторной мембраны смещается в коротковолновую область на 20–25 нм при замене хлорид-ионов на нитрат-ионы в среде инкубации. Делается вывод, что хлориды вносят вклад в bathochromный сдвиг полосы поглощения ретинальсодержащих пигментов и защищают их хромофорный центр от действия гидрофильного окружения.

Иодопсин — красночувствительный зрительный пигмент колбочек (λ_{\max} 562 нм) впервые был выделен Дж. Уолдом из сетчатки цыпленка [1]. По сравнению с родопсином из палочек той же сетчатки максимум спектра поглощения иодопсина смещен на 61 нм в длинноволновую область. Кроме того, иодопсин в отличие от родопсина нестабилен и легко обесвечивается при действии таких гидрофильных агентов, как квасцы, гидроксилламин, боргидрид натрия, а также при изменении pH среды [1–3]. Другое отличительное свойство иодопсина в экстракте — это иохроминость: как было показано в дигитониновых экстрактах иодопсина, отсутствие ионов хлора приводит к коротковолновому смещению максимума поглощения на 35–40 нм [4–7]. Аналогичный гипсохромный сдвиг при удалении ионов хлора наблюдался также в экстрактах пигмента P_{521} геккона [8], а также галородопсина [9].

Проявляются ли иохромные свойства иодопсина в нативной фоторецепторной мембране? Наиболее адекватный метод, позволяющий ответить на этот вопрос, — микроспектрофотометрия наружных сегментов одиночных зрительных клеток. Первые исследования были выполнены на своеобразных рецепторах различных видов гекконов, у которых фоторецепторы являются промежуточными между палочками и колбочками [10, 11]. Замена хлорида на нитрат приводит к гипсохромному сдвигу основной полосы в спектре поглощения этих клеток на 25 нм. В данной работе на фоторецепторах травяной лягушки *Rana temporaria* иохромные свойства зрительных пигментов оценивали с помощью замены хлорида на нитрат в нормальном физиологическом растворе.

Микроспектрофотометрическая регистрация спектров поглощения наружных сегментов палочек лягушки во всех использованных ионных средах показала, что они имеют стандартную форму спектра родопсина P_{505} (рис. 1). В нитратной среде не обнаружено достоверных различий со спектрами палочек в нормальном физиологическом растворе. При проверке гипотезы о совпадении спектров в нитратном и хлоридном растворах уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента, превысил 0,99. Это согласуется с известными данными о том, что внешнее ионное окружение существенно не влияет на форму спектра поглощения родопсина [5–7].

В типичном спектре паружного сегмента колбочки лягушки в растворе Рингера с нормальным содержанием хлорида (рис. 2а) среднее положение максимума находится в области 552 ± 2 нм.

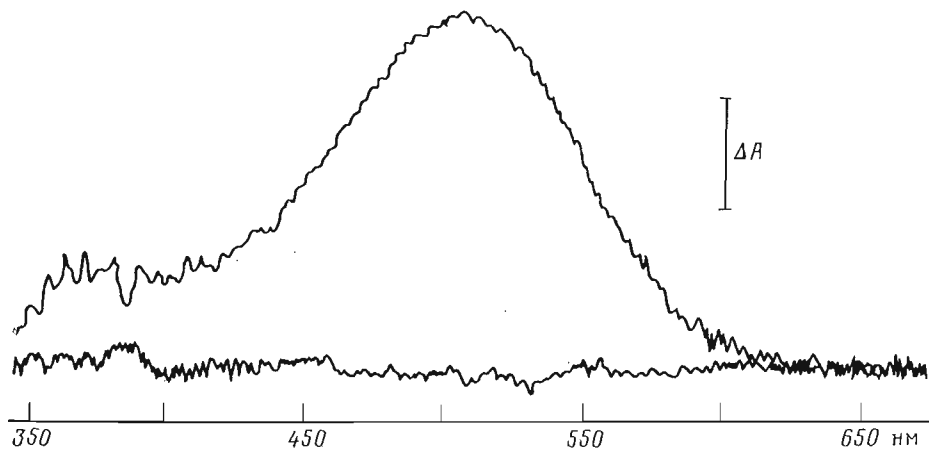


Рис. 1. Спектр поглощения наружного сегмента палочки P₅₀₅ лягушки, $\Delta A = 0,025$.
Нижняя кривая — базовая линия

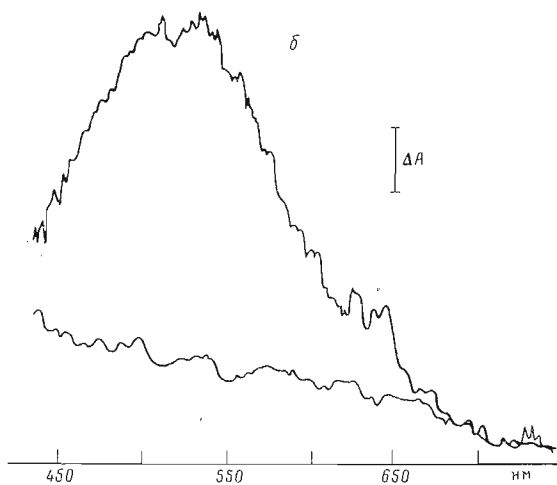
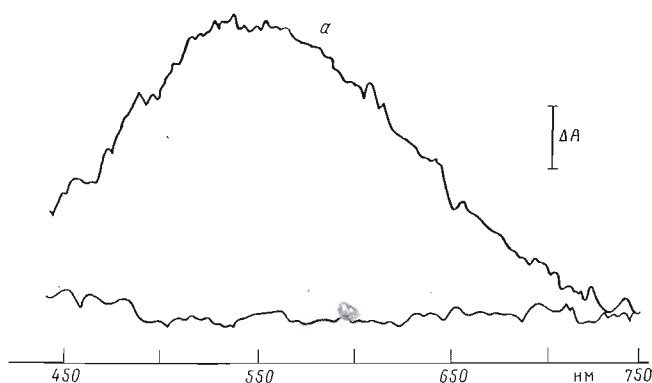


Рис. 2. Спектры поглощения наружных сегментов колбочек лягушки в хлоридном (а) и нитратном растворе (б). $\Delta A = 0,01$, нижние кривые — базовые линии

При оценке влияния ионного окружения на спектры поглощения колбочек основным критерием было сравнение гистограмм статистического распределения положения λ_{max} их спектров поглощения в различных ионных средах. В отличие от палочек (рис. 3) спектры поглощения колбочек в бесхлоридной среде 2 (хлориды полностью замещены на нитраты в концентрации 118 мМ), как и в экстракте, смещены в коротковолновую об-

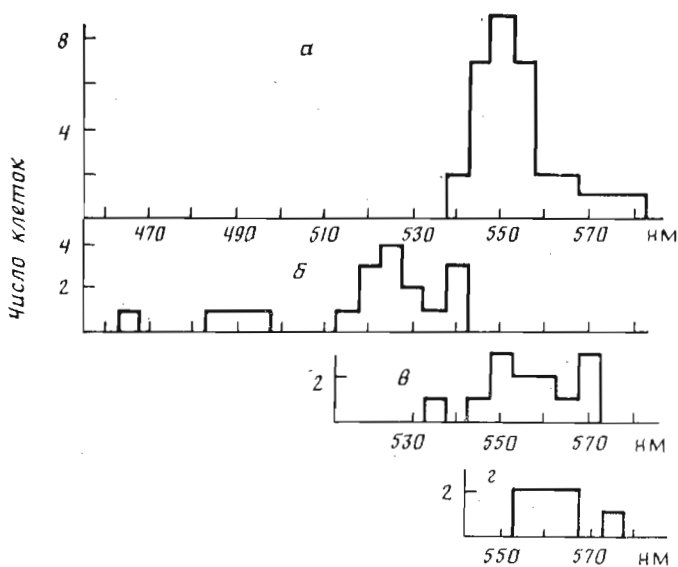


Рис. 3. Гистограммы распределения максимумов в спектрах поглощения колбочек в хлоридном растворе 1 (а), в нитратном растворе 2 (б), в нитратном растворе при добавлении гидроксилamina (среда 4; в), при частичной замене хлорида на нитрат (среда 3; г)

ласть (рис. 2б и таблица). При этом большинство спектров имеет λ_{\max} в диапазоне 510—540 нм при среднем λ_{\max} 517 ± 5 нм (рис. 3б). Это распределение с достоверностью 99,9% отличается от распределения λ_{\max} в нормальном хлоридном растворе, что позволяет говорить о гипсохромном сдвиге спектров под действием нитрата и в отсутствие ионов хлора.

Несколько спектров из этой серии имели λ_{\max} короче 500 нм. По данным Кресчители и Карвали [8], полученным на экстрактах пигмента геккона, появление подобных спектров определяется возникающими под действием нитрата долгоживущими интермедиатами типа метародопсина-III с λ_{\max} 465—475 нм. В связи с этим остается неясным, является ли гипсохромный сдвиг, индуцируемый нитратом при отсутствии ионов хлора, следствием ионохромной модификации хромофорного центра зрительного пигмента фоторецепторов геккона, или положение λ_{\max} в этих спектрах определяется смесью нативного пигмента и образованных под действием нитрата интермедиатов, согласно [8].

Частичная, а не полная замена хлорида на нитрат (12 мМ хлорид и 106 мМ нитрат (среда 4)), судя по нашим данным (рис. 3г), не оказывает столь заметного влияния на положение максимумов в спектрах поглощения зрительного пигмента в колбочках. К сожалению, для построения гистограммы 3г удалось выполнить лишь семь измерений спектров поглощения, поэтому делать статистически обоснованный вывод о сохранении λ_{\max} в этом случае представляется преждевременным. Однако можно с

Усредненные положения максимумов полос в спектрах поглощения наружных сегментов колбочек лягушки в средах с различным ионным составом *

Номер среды	Анионы	$\lambda_{\max} \pm S\bar{x}$, нм	Число измерений
1	118 мМ Cl^-	555 ± 2	84
2	118 мМ NO_3^-	517 ± 7	17
3	106 мМ NO_3^- + 12 мМ Cl^-	565 ± 4	7
4	118 мМ NO_3^- + 10 мМ NH_2OH	557 ± 3	13

* Состав сред № 1—4 см. в «Экспер. части». $S\bar{x}$ — среднеквадратичное отклонение.

уверенностью утверждать, что сдвиг λ_{\max} (если он существует) значительно меньше, чем при полной замене хлорида на нитрат. Складывается впечатление, что даже небольшого количества хлорида (12 мМ) достаточно для защиты хромофорного центра от модифицирующего действия 10-кратного избытка нитрата.

Можно предположить, что хлорид связан с какой-то группой вблизи хромофорного центра пигмента. Об этом свидетельствуют и результаты опытов с гидроксиламином. Его добавление к хлоридному раствору не меняет гистограмму распределения положения λ_{\max} (таблица и рис. 3), а к солибилизированному иодопсину — меняет. В то же время гидроксиламин существенно влияет на гистограмму распределения максимумов поглощения нитратной формы пигмента (таблица и рис. 3), когда хлорид отсутствует.

Как и в случае пигмента P_{534} каспийского геккона [11], некоторая доля зрительного пигмента колбочек лягушки в полностью нитратной среде остается, по-видимому, в нативной, связанной с хлоридом форме. По всей видимости, это тот хлорид, который остается связанным в анионсвязывающем центре даже при его полном отсутствии в среде инкубации. Добавление 10 мМ гидроксилamina вызывало обесцвечивание пигмента в среде, содержащей нитрат (среда 4), но не хлорид. Регистрируемые в среде 4 спектры имели гистограмму распределения λ_{\max} , сходную с гистограммой, полученной в хлоридсодержащей среде 1 (рис. 3в). Иными словами, пигмент в нитратной среде обесцвечен и вклада в распределение не вносит. Об этом же свидетельствуют и данные Кресчителли [10], который показал, что на экстрактах пигмента токайского геккона хлорид предотвращает обесцвечивающее действие гидроксилamina.

Следует отметить, что в этом отношении зрительный пигмент геккона отличается от иодопсина цыпленка, который, будучи в солибилизированном состоянии, при действии гидроксилamina обесцвечивается. Это может объясняться тем, что зрительные клетки геккона являются промежуточными между палочками и колбочками, а именно: форма наружных сегментов палочковая, а λ_{\max} зрительного пигмента, скорее, колбочковая. Таким образом, в хлоридсодержащей среде в отличие от нитратсодержащей гидроксиламин не обесцвечивает зрительный пигмент в «красных» колбочках лягушки.

Итак, между иодопсином и родопсином в нативной фоторецепторной мембране зрительных клеток лягушки имеется существенное различие: хромофорный центр иодопсина в отличие от пигментов с коротковолновым максимумом поглощения доступен гидрофильному окружению. Эта доступность ограничена хлоридом, который находится в хромофорном центре и обеспечивает батохромный сдвиг полосы поглощения в спектре нативной «хлоридной» формы пигмента. Сходные различия обнаружены в нативной мембране и между пигментами P_{534} и P_{452} у каспийского геккона [11].

Спектральные и физико-химические различия между родопсином и йодопсином, по всей вероятности, определяются различиями их первичной структуры и механизма взаимодействия 11-цис-ретиналя с белковым окружением в хромофорном центре, а также топографией хромофорсвязывающего центра в липидном бислое фоторецепторной мембраны. Поскольку положение максимума спектра поглощения зрительных пигментов в большой мере определяется нековалентным электростатическим взаимодействием полиеновой цепи остатка ретиналя с заряженными группами в хромофорном центре опсина [12–15], зарядовое состояние молекулы может вносить существенный вклад в спектральные и ионхромные различия между родопсином и иодопсином.

На основании полученных в последнее время данных об аминокислотном составе и первичной структуре родопсина в палочках и красно-, зелено-, синечувствительных пигментов в колбочках сетчатки человека [16, 17] были определены изоэлектрические точки (pI) и зарядовые состояния этих пигментов [18]. Как выяснилось, родопсин — более кислый белок (pI 6,05), чем колбочковые пигменты (pI 9,44–9,45). При этом моле-

кула родопсина содержит при физиологическом значении рН (7,0) 3 суммарных отрицательных заряда, а молекула зрительного пигмента колбочек — 7—8 положительных зарядов. В то же время, по расчетам Натанса [16], суммарный внутримембранный заряд родопсина (λ_{\max} 500 нм) равен -1 , зеленочувствительного (λ_{\max} 530 нм) — тоже -1 , а синечувствительного (λ_{\max} 420 нм) — $+1$. Вполне вероятно, что различия в зарядовом состоянии молекул зрительных пигментов в сочетании с неодинаковой локализацией этих зарядов могут определять спектральную «настройку» каждого из этих пигментов.

Прямо противоположное, согласно расчетам японских авторов [18], зарядовое состояние палочковых и колбочковых пигментов может объяснить ряд принципиальных физико-химических различий между ними, в том числе существование у иодопсина и отсутствие у родопсина повохромных свойств. Влияние ионов хлора на спектральные свойства иодопсина указывает на наличие в его белковой, доступной гидрофильному окружению области одного или нескольких анионсвязывающих мест [7]. Недавно удалось получить высокоспецифичные моноклональные антитела к иодопсину цыпленка [19]. При этом оказалось, что при связывании одного из четырех полученных антител наблюдается смещение положения максимума спектра поглощения иодопсина в дигитониновом экстракте в синюю область примерно на 20 нм. Авторы полагают, что это может быть следствием конформационных изменений в хлоридсвязывающем центре (центрах) опсина, хотя не исключено непосредственное влияние антитела на хромофорсвязывающий центр. Интересно, что на родопсин цыпленка ни одно из этих антител никакого влияния не оказывало.

Как известно, ионы хлорида необходимы и для нормальной работы галородопсина — хлоридтранспортирующего белка галобактерий [20]. Удаление хлорида приводит к депротонированию Шиффова основания в щелочных условиях (рН ~ 9) и к обратимому гипсохромному сдвигу полосы поглощения галородопсина от 576 к 566 нм [9]. Предполагается, что в галородопсине имеются два хлоридсвязывающих центра, один из которых отвечает за батохромный сдвиг спектра поглощения пигмента, а другой обеспечивает протонирование Шиффова основания [21].

В отношении зрительного пигмента геккона хлорид также обладает двояким действием: 1) определяет положение максимума в спектре поглощения, 2) защищает альдиминную связь от действия щелочной среды.

Таким образом, в ретинальсодержащих пигментах с длинноволновым максимумом спектра поглощения хлорид, судя по всему, вносит вклад в батохромный сдвиг максимумов спектров поглощения, а также в защиту хромофорного центра от гидрофильного окружения. Как следует из полученных нами данных, положительно заряженная молекула зрительного пигмента в мембране наружного сегмента колбочки лягушки, во всяком случае иодопсин в красночувствительных колбочках, легко связывает в анионсвязывающем (или хромофорном) центре опсина анионы хлора и тем самым поддерживает длинноволновое («красное») положение максимума спектра поглощения. Поскольку хлорид защищает иодопсин от обесцвечивающего действия нитрата и гидроксилamina, то, скорее всего, место связывания иона хлора находится в нативной фоторецепторной мембране колбочки вблизи хромофорного центра.

Авторы выражают благодарность И. Б. Федорович за полезное обсуждение результатов.

Экспериментальная часть

Работа проведена на родопсинсодержащих палочках P_{505} и иодопсинсодержащих колбочках P_{552} лягушки *Rana temporaria*. Препаровку проводили по методике, описанной ранее [11, 22].

Поглощение изолированных наружных сегментов и наружных сегментов целых фоторецепторных клеток регистрировали на микроспектрофотометрической установке по схеме, представленной в работе [22]. Фотометрирующий луч был направлен перпендикулярно продольной оси на-

ружных сегментов и имел размеры 6×40 мкм для палочек и 2×5 мкм для колбочек. Последовательные записи от одних и тех же сегментов не показывали значительного обесцвечивания зрительного пигмента фотометрирующим лучом. При регистрации спектров поглощения луч фокусировали в центр фоторецепторных клеток. Оптическое поглощение наружных сегментов составляло у палочек 0,08–0,10, а у колбочек – 0,01–0,03.

Измерения проводили в растворах со следующим содержанием ионов в омывающей препарат среде: 1) нормальный раствор Рингера – 112 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 2,2 мМ NaHCO₃, 5,6 мМ глюкоза (изучали 84 колбочки и 53 палочки); 2) тот же раствор с полной заменой хлоридов на нитраты (17 колбочек и 21 палочка), 3) смесь растворов (1) и (2) в соотношении 1 : 9 (7 колбочек и 5 палочек); 4) раствор (2) с добавлением 10 мМ гидроксилamina (13 колбочек и 4 палочки); pH растворов 7,5.

Эффективность действия ионных растворов определяли, исходя из достоверности различия средних положений λ_{\max} , полученных в результате проведения серии опытов. Проверку гипотезы о различии двух распределений λ_{\max} осуществляли с помощью критерия Стьюдента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wald G., Brown P. K., Smith P. H. // J. Gen. Physiol. 1955. V. 38. № 5. P. 623–681.
2. Matsumoto H., Tokunaga F., Yoshizawa T. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 404. № 2. P. 300–308.
3. Fager R. S., Kandel M., Heppner Th., Abrahamson E. W. // Vision Res. 1975. V. 15. № 6. P. 741–742.
4. Knowles A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 73. № 1. P. 56–62.
5. Knowles A. // Vision Res. 1980. V. 20. № 6. P. 475–483.
6. Fager L. Y., Fager R. S. // Exptl Eye Res. 1979. V. 29. № 4. P. 401–408.
7. Слободянская Е. М., Абрашин Е. В., Островский М. А. // Биооргани. химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 223–229.
8. Crescitelli F., Karvaly B. // Proc. Roy. Soc. London. 1983. V. 220. № 1215. P. 69–87.
9. Lanyi J. K., Shobert B. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 11. P. 2763–2769.
10. Crescitelli F. // Vision Res. 1980. V. 20. № 11. P. 937–945.
11. Говардовский В. И., Зак П. П., Новицкий И. Ю. // Биофизика. 1985. Т. 30. № 2. С. 292–296.
12. Crescitelli F., Liu R. S. H. // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 41. № 3. P. 309–316.
13. Kakitani H., Kakitani T., Rodman H., Honig B. // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 41. № 4. P. 471–479.
14. Христофоров В. Л., Слепнева Л. М., Островский М. А. Природа связи хромофора с белком в родопсине. Препринт. Черноголовка, 1979.
15. Becker R. S. // Photochem. and Photobiol. 1988. V. 48. № 3. P. 369–399.
16. Nathans J., Thomas D., Hogness D. S. // Science. 1986. V. 232. № 4747. P. 193–202.
17. Nathans J., Piatanida T. P., Eddy R. L., Shows T. B., Hogness D. S. // Science. 1986. V. 232. № 4747. P. 203–210.
18. Fukami I., Fukany Y. // Proc. Yamada Conference XXI. Molecular Physiology of Retinal Proteins/Ed. Hara T. 1988. P. 377–378.
19. Kuwata O. // Proc. Yamada Conference XXI, Molecular Physiology of Retinal Proteins/Ed. Hara T. 1988. P. 379–380.
20. Ogurusu T., Maeda A., Sasaki W., Yoshizawa T. // Biochim. et Biophys. acta. 1982. V. 682. № 3. P. 446–452.
21. Lanyi J. K. // Ann. Rev. Biophys. and Biophys. Chem. 1986. V. 15. P. 11–28.
22. Новицкий И. Ю., Зак П. П. // Биол. науки. 1989. № 1. С. 44–49.

Поступила в редакцию
12.X.1988

После доработки
17.III.1989

THE EFFECT OF ANIONS ON ABSORPTION SPECTRUM
OF THE LONGWAVELENGTH RETINAL-CONTAINING PIGMENT
IODOPSIN IN NATIVE FROG CONES
(A MICROSPECTROPHOTOMETRIC STUDY)

NOVITSKIY I. Yu., ZAK P. P., OSTROVSKIY M. A.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Absorption spectra of single outer segments of the frog *Rana temporaria* photoreceptors were registered. Effects of nitrate and chloride ions on spectral properties of cone and rod pigments were compared. These pigments proved to differ in structure of the native photoreceptor membrane and, therefore, in effect of hydrophile environment on the chromophore centrum. Substitution of chloride by nitrate ions led to the hypsochromic shift of the cone absorption spectrum (20–25 nm) but does not affect the spectrum on case of rod pigment. The ionochromic behaviour of cone pigments resembles that of the light-sensitive halobacterium protein halorhodopsin, in native membrane. We suppose that the effect of anions on the chromophore centrum may be the cause of bathochromic shifts of absorption spectra of longwavelength retinal-containing pigments.