



УДК 577.112.5 + 577.113.5

© 1994 В. М. Петров, И. Д. Артамонов,
И. В. Баскаков, О. В. Соловьева, В. М. Липкин

**Ras-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
СУБСТРАТОВ ЭКЗОЭНЗИМА С3 С ФОТОАКТИВИРОВАННЫМ
РОДОПСИНОМ КАЛЬМАРА**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: GTP-связывающие белки; родопсин; ADP-рибозилтрансфераза С3; gas-подобные белки.

Исследован состав и клеточная локализация субстратов ботулинической ADP-рибозилтрансферазы С3 (С3) в фоторецепторах кальмара и наружных сегментах палочек (НСП) быка. В мембранах кальмара ADP-рибозилируются полипептиды с молекулярной массой 22, 24, 30, 45 и 80 кДа, а в мембранах НСП — полипептиды с молекулярной массой 22, 24 и 60 кДа. Цитоплазматическая фракция НСП содержит субстраты С3 с молекулярной массой 22, 24, 28 и 36 кДа. Обнаружено усиление ADP-рибозилирования субстратов 22 и 24 кДа в фоторецепторах кальмара под действием света и их взаимодействие с фотоактивированным родопсином.

В процессе регуляции внутриклеточных функций и передаче трансмембранного сигнала важное место занимают GTP-связывающие белки. Эта обширная группа включает многие десятки белков, имеющих сходство как в структуре, так и в механизме действия. Хорошо исследованы так называемые G-белки — гетеротримерные GTP-азы, опосредующие передачу сигнала с рецептора на эффекторный белок. Все G-белки состоят из α -, β - и γ -субъединиц и содержат нуклеотидсвязывающий центр на α -субъединице. Цикл активности G-белков начинается с того, что рецептор в лигандсвязанной форме катализирует обмен GDP на GTP, после чего происходит диссоциация комплекса $\alpha\beta\gamma$ и взаимодействие α -субъединицы в GTP-связанной форме с белком-эффектором [1]. Эффекторами в различных клетках служат аденилатциклаза, фосфолипаза C, cGMP-зависимая фосфодиэстераза или ионные каналы. Димер $\beta\gamma$ также оказывает действие на эффектор непосредственно [2, 3] или блокируя α -субъединицу после гидролиза связанного GTP [4]. Другой обширной группой GTP-связывающих белков в клетке являются gas-подобные белки. В семейство gas-подобных белков входят GTP-азы с молекулярной массой 20—30 кДа, обладающие различной степенью гомологии между собой и α -субъединицами G-белков [5]. Подобно G-белкам некоторые из них служат субстратами для ADP-рибозилтрансфераз. В отличие от G-белков gas-подобные белки — мономеры, обладают значительно меньшей GTP-азной активностью и требуют дополнительного белка для ее усиления. Ras-подобные белки принимают участие в регулировке многих клеточных процессов, таких,

как дифференцировка, организация цитоскелета, передача трансмембранного сигнала, везикулярный транспорт и секреция [6]. Различные gas-подобные белки обнаружены во многих эукариотических организмах и практически во всех тканях млекопитающих [7]. Точный механизм их действия еще только начинает проясняться, неизвестны и белки-эффекторы. Однако уже ясно, что в процессе функционального цикла эти белки могут находиться в GDP-связанном «неактивном» и GTP-связанном «активном» состоянии. Показано, что цикличность этих GTP-аз между GTP-связанным и GDP-связанным состояниями регулируется тремя классами белков: активаторами GTP-азы (GAPs), ингибиторами диссоциации GDP (GDIs) и активаторами обмена GTP/GDP (GDSs) [7, 8]. Последние два типа регуляторных белков способны также модулировать взаимодействие низкомолекулярных GTP-аз с мембраной [9].

Для исследования G-белков и низкомолекулярных GTP-аз сегодня широко применяют различные бактериальные токсины, действующие на эукариотическую клетку через ADP-рибозилирование регуляторных белков. Например, G-белок зрительной системы позвоночных — трансдуцин способен рибозилироваться холерным и коклюшным токсинами. Линии C и D *Clostridium botulinum* продуцируют ADP-рибозилтрансферазу, названную экзоэнзимом C3 [10]. Этот фермент в присутствии NAD^+ ADP-рибозилирует по остатку Asn-41 некоторые gas-подобные белки, относящиеся к семейству rho, в частности rho A, rho C, rac1 и rac2 [11]. Субстраты C3 были обнаружены во всех исследованных клетках эукариот. В ряде работ указывается на важную роль белков этого семейства в процессах клеточной дифференцировки и построении цитоскелета [12—14]. Недавно было показано, что мембраны наружных сегментов палочек быка содержат кроме гетеротримерного G-белка трансдуцина несколько низкомолекулярных GTP-связывающих белков, два из которых являются субстратом для ADP-рибозилтрансферазы C3. Предполагается, что последние взаимодействуют с фотоактивированным родопсином и наряду с трансдуцином участвуют в процессе передачи зрительного сигнала у позвоночных [15].

Значительно меньше известно на сегодняшний день о регуляторных белках зрительной системы беспозвоночных. Многие аспекты физиологии зрения у позвоночных и беспозвоночных достаточно различны. Однако исследования светиндуцированной GTP-азной активности в фоторецепторах различных видов беспозвоночных позволили предположить наличие у них G-белков, участвующих в передаче зрительного сигнала. Позже иммунохимическими и биохимическими методами в фоторецепторных мембранах беспозвоночных было обнаружено несколько α -субединиц G-белков с различными молекулярными весами [16], причем эффектором для преобладающего из них является не cGMP-фосфодиэстераза, как у позвоночных, а фосфолипаза C [17]. Возможно, у беспозвоночных существует несколько путей амплификации светового сигнала, каждый из которых содержит свою регуляторную GTP-азу.

Данная работа посвящена поиску и характеристике низкомолекулярных GTP-связывающих белков субстратов C3 в фоторецепторных клетках кальмара *Loligo pacificus* и в НСП быка. Показано, что эти белки взаимодействуют с фотоактивированным родопсином в фоторецепторных мембранах кальмара.

Для поиска субстратов экзоэнзима C3 использовались цитоплазматические и мембранные фракции фоторецепторных клеток кальмара и НСП быка, адаптированные к темноте. Из рис. 1 видно, что при [^{32}P]ADP-рибозилировании экзоэнзимом C3 в мембранах кальмара метятся 5 полипептидов с молекулярными массами 22, 24, 30, 45 и 80 кДа. Два из них, 22 и 24 кДа, имеют сходную молекулярную массу с субстратами C3, обнаруженными прежде в различных тканях млекопитающих [15]. Полипептид 45 кДа имеет молекулярную массу, сходную с родопсином, и появление полосы на радиоавтографе могло быть результатом неспецифического связывания [^{32}P]NAD $^+$ или [^{32}P]АТФ с родопсином, преобладающим в фоторецепторных мембранах. Однако инкубация мембран кальмара в среде с [^{32}P]NAD $^+$, но без C3 показала отсутствие каких-либо меченых

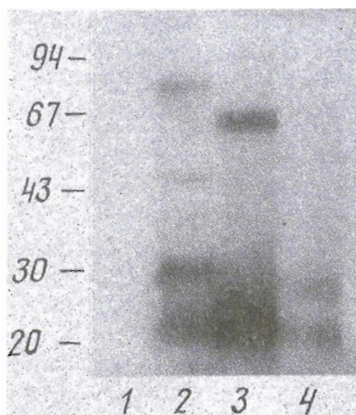


Рис. 1

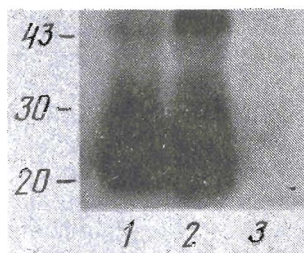


Рис. 2

Рис. 1. [^{32}P]ADP-рибозилирование экзоэнзимом С3 белков фоторецепторных клеток кальмара и быка. Белки цитоплазматической (1) и мембранной (2) фракций сетчатки кальмара; мембранной (3) и цитоплазматической (4) фракций НСП быка [^{32}P]ADP-рибозилировали и разделяли электрофоретически, как описано в «Экспериментальной части». Полипептиды, включившие радиоактивную метку, регистрировали автордиографически. Здесь и на остальных рисунках слева показано местоположение маркерных белков и их молекулярные массы (кДа)

Рис. 2. Сорбция субстратов С3 на DEAE-Тоуорearl. Солюбилизат фоторецепторных мембран кальмара наносили на колонку с DEAE-Тоуорearl и связавшиеся с сорбентом белки элюировали 125 мМ NaCl. Белки солюбилизата (1), после элюции (2) и несорбировавшиеся (3) [^{32}P]ADP-рибозилировали и разделяли электрофоретически, как описано в «Экспериментальной части». Полипептиды, включившие радиоактивную метку, регистрировали автордиографически. Солюбилизацию и хроматографию проводили в темно-красном свете

белков (данные не приведены). Кроме того, когда темновой солюбилизат фоторецепторных мембран кальмара в 1% растворе α -додецил-*D*-мальтозида наносили в темноте на DEAE-Тоуорearl, полипептид 45 кДа связывался с сорбентом, а родопсин нет. ADP-рибозилирование солюбилизата после этой хроматографии показало отсутствие в нём каких-либо субстратов экзоэнзима С3 (рис. 2). Эти данные позволили нам предположить, что в фоторецепторных мембранах кальмара содержится субстрат С3, имеющий ту же молекулярную массу, что и родопсин.

При [^{32}P]ADP-рибозилировании белков цитоплазматической фракции фоторецепторных клеток кальмара нами не было обнаружено ни одного субстрата С3.

В мембранах НСП [^{32}P]ADP-рибозилировались полипептиды 22 и 24 кДа. При увеличении времени экспозиции на автографе так же четко проявлялась полоса в районе 60 кДа. Цитоплазматическая фракция НСП содержала кроме субстратов С3 22 и 24 кДа субстраты 28 и 36 кДа, которые отсутствовали в мембранах (рис. 1). Измерения количества радиоактивной метки, включившейся в эти полипептиды, показали, что в НСП около 90% субстратов 22 и 24 кДа и полностью 60 кДа находятся в мембранной фракции, а полипептиды 28 и 36 кДа — только в цитоплазматической фракции. Степень [^{32}P]ADP-рибозилирования полипептида 36 кДа была незначительной, поэтому этот белок был сконцентрирован нами на GTP-Sepharose и элюирован 500 мМ NaCl (данные не приведены).

Следует отметить, что все ранее описанные субстраты С3 из других тканей являлись GTP-связывающими белками с молекулярными массами в районе 20--26 кДа. Проверка GTP-связывающих свойств полипептидов, которые [^{32}P]ADP-

рибозилировались экзоэнзимом СЗ в фоторецепторных клетках кальмара и быка, нами не производилась.

С целью дальнейшей хроматографической очистки мы попытались избирательно экстрагировать субстраты СЗ из фоторецепторных мембран кальмара и мембран НСП быка. Известно, что трансдуктин после обработки темновых мембран НСП гипотоническим буфером переходит в водную фазу с белками цитоскелета. После освещения мембран образуется мембранный комплекс α -трансдуктина с фотоактивированным родопсином, который разрушается при обработке НСП буфером, содержащим GTP [18]. Сообщалось также, что основной G-белок фоторецепторов кальмара G_q экстрагируется из мембран при обработке их 2 М мочевиной [19]. Однако инкубация фоторецепторных мембран в гипотоническом буфере, в буферах с 100 мкМ GTP, 400 мМ KCl или с 2 М мочевиной не приводила к экстракции субстратов СЗ ни в темноте, ни на свету. Эти результаты говорят о том, что субстраты СЗ прочнее связаны с мембраной, чем G-белки зрительных систем позвоночных и беспозвоночных.

Известно, что при образовании комплекса с фотоактивированным родопсином способность α -трансдуктина рибозилироваться коклюшным токсином значительно снижается. Подобный эффект был описан и для субстратов экзоэнзима СЗ в составе НСП быка [15]. У кальмара обнаружено три полипептида (38, 42 и 46 кДа), которые рибозилируются светозависимым образом коклюшным и (или) холерным токсинами [20]. Наши эксперименты по светозависимому ADP-рибозилированию экзоэнзимом СЗ фоторецепторных мембран кальмара показали, что степень рибозилирования полипептидов 22 и 24 кДа (другие субстраты не исследовались) увеличивается на 30% в освещенных мембранах по сравнению с неосвещенными. Светозависимость рибозилирования низкомолекулярных GTP-связывающих белков, подобно G-белкам, позволяет предположить их участие в процессе передачи зрительного сигнала. Для подтверждения этого предположения мы проверили взаимодействие субстратов экзоэнзима СЗ в фоторецепторных клетках кальмара со светоактивированным родопсином. Известно, что родопсин (но не газ-подобные белки) является гликопротеином и способен взаимодействовать с лектином Con A. Из рис. 3 видно, что субстраты СЗ не связываются с Con A-Sepharose после нанесения на колонку солюбилирата темновых фоторецепторных мембран кальмара и обнаруживаются в проскоке. После нанесения на ту же колонку препарата освещенных мембран субстраты СЗ 22 и 24 кДа связывались с сорбентом в комплексе с родопсином и элюировались α -D-метилманнозидом. Аналогичные результаты были получены нами при использовании иммуносорбента на основе антител к гомогенному родопсину из кальмара. Показано, что субстраты 22 и 24 кДа преципитируются иммуносорбентом из солюбилирата освещенных мембран в значительно большей степени, чем из солюбилирата неосвещенных (рис. 4).

Как было показано, некоторые низкомолекулярные GTP-связывающие белки в отличие от α -субъединиц гетеротримерных G-белков сохраняют способность связывать GTP после электрофореза и переноса на нитроцеллюлозную мембрану [21]. Мы использовали это свойство для обнаружения низкомолекулярных GTP-связывающих белков, обладающих этим свойством в фоторецепторных мембранах кальмара и быка. Из рис. 5 видно, что как минимум два полипептида с молекулярными массами в районе 20—26 кДа связывают $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в препарате мембран кальмара. В мембранах НСП быка нами обнаружены три белка в том же районе молекулярных масс.

Таким образом показано наличие низкомолекулярных GTP-связывающих белков в фоторецепторных мембранах кальмара, среди которых присутствуют субстраты экзоэнзима СЗ. Состав этих белков отличается от подобных в НСП быка; кроме того, различна их локализация в фоторецепторных клетках. В отличие от НСП быка в фоторецепторах кальмара происходит усиление ADP-рибозилирования субстратов СЗ при освещении, что может объясняться участием этих белков в различных светоактивируемых ферментативных каскадах у позвоночных

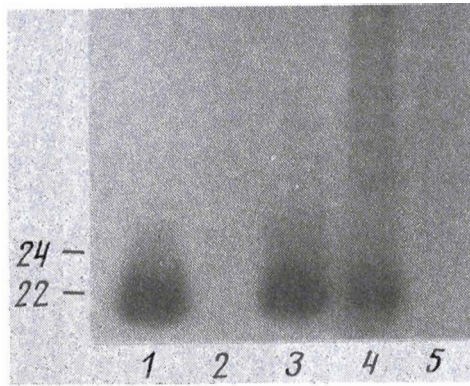


Рис. 3

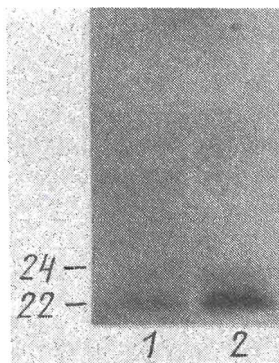


Рис. 4

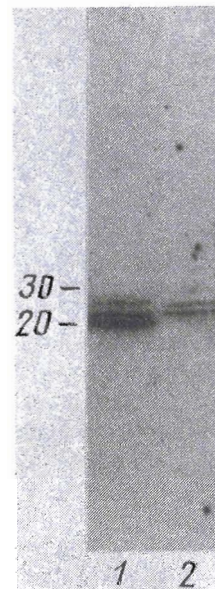


Рис. 5

Рис. 3. Светозависимое взаимодействие субстратов С3 из фоторецепторных мембран кальмара с Sepharose A-Sepharose. Мембранный солюбилизиат наносили на колонку с Sepharose A-Sepharose в темноте или на свету, как описано в «Экспериментальной части». Белковые фракции после элюции $[^{32}\text{P}]$ ADP-рибозилировали и разделяли электрофоретически. Полипептиды, включившие радиоактивную метку, регистрировали автордиографически. Солюбилизиат мембран (1); белки, не сорбирующиеся (2) и сорбирующиеся (3) на Sepharose A-Sepharose из освещенного солюбилизиата; белки, не сорбирующиеся (4) и сорбирующиеся (5) на Sepharose A-Sepharose из темнового солюбилизиата

Рис. 4. Светозависимое взаимодействие субстратов С3 из фоторецепторных мембран кальмара с антителами к родопсину. Солюбилизиат мембран $[^{32}\text{P}]$ ADP-рибозилировали и инкубировали с иммуносорбентом, приготовленным на основе антител к родопсину кальмара, в темноте (1) или на свету (2), как описано в «Экспериментальной части». Белки, связавшиеся с иммуносорбентом в комплексе с родопсином, затем элюировали буфером с SDS и разделяли электрофоретически. Субстраты С3 регистрировали автордиографией

Рис. 5. Белки фоторецепторных мембран быка и кальмара, связывающие GTP после переноса на нитроцеллюлозную мембрану. Белки фоторецепторных мембран быка (1) и кальмара (2) разделяли электрофоретически, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP, как описано в «Экспериментальной части». Полипептиды, связавшие $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP, регистрировали автордиографией

и беспозвоночных. Получены данные, указывающие на взаимодействие субстратов экзоэнзима С3 с фотоактивированным родопсином в фоторецепторных клетках кальмара, что предполагает участие этих белков в передаче зрительного сигнала у беспозвоночных.

Экспериментальная часть

В работе использовали: экзоэнзим С3 из *Clostridium botulinum*, очищенный как описано в [22], [^{32}P]NAD⁺, полученный из [α - ^{32}P]АТФ по методу [23], [α - ^{32}P]GTP (5000 Ки/ммоль) и [α - ^{32}P]АТФ (5000 Ки/ммоль) — отечественного производства (г. Обнинск), нитроцеллюлозу (Bio-Rad, США), DEAE-Toyopearl (Тоуо-Soda, Япония), пленку для автордиографии Hyperfilm-MP (Amersham, Англия). Реактивы для электрофореза имели квалификацию «analytical grade». Другие реактивы отечественного производства имели квалификацию ос. ч.

Наружные сегменты фоторецепторных клеток выделяли из замороженных сетчаток кальмара *Loligo pacificus* флотацией на 40% сахарозе по методу [24]. Все операции проводили при темно-красном свете.

Мембраны НСП были получены из сетчаток быка по методике [25]. Для элюции трансдуцина полученные мембраны трижды обрабатывали гипотоническим буфером. Все операции проводили при темно-красном свете. Мембраны хранили в буфере с 50% глицерином при -20°C .

Связывание низкомолекулярных GTP-связывающих белков с [α - ^{32}P]GTP. Фоторецепторные мембраны кальмара или НСП быка (20 мкг белка) были растворены в буфере для SDS-электрофореза без нагревания. Белки были разделены электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле по методу Лэммли [26] и перенесены электрофоретически на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрана была дважды отмыта в 60 мл буфера 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 0,3% Tween-20 и инкубировалась 2 ч в том же буфере с добавлением [α - ^{32}P]GTP (1 мкКи/мл). После этого мембрана отмывалась тремя сменами буфера без GTP до полного освобождения буфера от радиоактивности и сушилась. Меченые белки визуализировались автордиографированием с усиливающим экраном.

ADP-рибозилирование мембран (10—15 мкг суммарного белка) проводилось в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 20 мМ тимидин, экзоэнзим С3 (1 мкг/мл), [^{32}P]NAD (0,5 мкКи на образец). Реакция проводилась в объеме 15 мкл 1 ч при 37°C . Для остановки реакции к образцам добавляли буфер для электрофореза, содержащий SDS. Белки разделяли электрофоретически в 12,5% полиакриламидном геле, гель красили в растворе кумасси и сушили. Меченые полипептиды регистрировали автордиографированием с усиливающим экраном. Для количественной оценки рибозилирования соответствующие полосы вырезались из геля и помещались в сцинтилляционную смесь (5 мл). Количество распадов регистрировалось в жидкостном сцинтилляционном счетчике фирмы «Beckman».

Хроматография на Con A-Sepharose. Темновые фоторецепторные мембраны кальмара солибилизировали в буфере: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1% додецилмальтозид в течение 1 ч при 4°C . Половина солибилизата освещалась в течение 5 мин и одинаковые количества темнового и освещенного солибилизатов наносились на колонки с Con A-Sepharose, уравновешенные тем же буфером. Элюцию сорбировавшихся белков проводили 250 мМ α -D-метилманнозидом.

Для приготовления иммуносорбента к 100 мкл Protein A-Sepharose 6B добавляли 50 мкг кроличьих поликлональных антител против родопсина кальмара в буфере для солилизации мембран. После часовой инкубации иммуносорбент отмывался от избытка антител 10 объемами того же буфера. По 200 мкл темнового и освещенного солибилизатов после рибозилирования добавляли к 50 мкл иммуносорбента и инкубировали 4 ч при 4°C . К сорбенту после отмывки от несвя-

завшихся белков и избытка радиоактивности добавляли по 30 мкл буфера для SDS-электрофореза и инкубировали 15 мин при 80° С. Элюированные белки разделяли электрофоретически в 12,5% геле и регистрировали автордиографически.

Данная работа финансировалась из гранта 93-04-7310 Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gilman A.*//Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 615—649.
2. *Camps M., Carozzi A., Schnabel P., Scheer A., Parker P., Gierschik P.*//Nature. 1992. V. 360. № 6405. P. 684—686.
3. *Katz A., Wu D., Simon M.*//Nature. 1992. V. 360. № 6405. P. 686—689.
4. *Simon M., Strathmann M., Gautam N.*//Science. 1991. V. 252. № 5007. P. 802—808.
5. *Barbacid M.*//Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 779—827.
6. *Hall A.*//Science. 1990. V. 249. № 4968. P. 635.
7. *Hall A.*//Cell. 1990. V. 61. № 6. P. 921—923.
8. *Martin G., Yatani A., Clark R., Conroy L., Polakis P., Brown A., McCormick F.*//Science. 1992. V. 255. № 50. P. 192—194.
9. *Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A., Kawata M.*//Int. Rev. Cytol. 1991. V. 133. № 1. P. 187—230.
10. *Aktories K., Weller U., Chatwal G.*//FEBS Lett. 1987. V. 212. № 1. P. 109—113.
11. *Aktories K., Hall A.*//Trends Pharmacol. Sci. 1989. V. 10. № 10. P. 415—418.
12. *Rubin E., Gill D., Boquet P., Popoff M.*//Mol. Cell. Biol. 1988. V. 8. № 1. P. 418—426.
13. *Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M., Rubin E., Gill M.*//EMBO J. 1989. V. 8. № 4. P. 1087—1092.
14. *Didsbury J., Weber R., Bokoch G., Evans T., Snyderman R.*//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 3. P. 16378—16382.
15. *Wieland T., Ulibarri I., Aktories K., Gierchik P., Jakobs K.*//FEBS Lett. 1990. V. 263. № 2. P. 195—198.
16. *Tsuda M.*//Retinal Proteins/Ed. Ovchinnikov Yu. A. Utrecht: VNU Science Press, 1987. P. 393—404.
17. *Baer K., Saibil H.*//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 1. P. 17—20.
18. *Kuhn H.*//Nature. 1980. V. 283. № 5746. P. 587—589.
19. *Pottinger J., Ryba N., Keen J., Findlay J.*//Biochem. J. 1991. V. 279. № 1. P. 323—326.
20. *Robinson P., Wood S., Szuts E., Fein A., Hamm H.*//Biochem. J. 1990. V. 272. № 2. P. 79—85.
21. *Bhullar R., Haslam R.*//Biochem. J. 1987. V. 245. № 2. P. 617—620.
22. *Hoffenberg S., Rybin V., Efimenko A., Kurochkin I., Tkachuk V.*//FEBS Lett. 1991. V. 293. № 1, 2. P. 59—61.
23. *Cassel D., Pfeuffer T.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 6. P. 2669—2673.
24. *Saibil H., Michel-Villaz M.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 24. P. 8309—8313.
25. *Papermaster D., Dreyer W.*//Biochemistry. 1974. V. 13. № 11. P. 2438—2444.
26. *Laemmli U.*//Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию
20.X.1993

*V. M. Petrov, I. D. Artamonov, I. V. Baskakov, O. V. Soloviova,
V. M. Lipkin*

**Ras-LIKE PROTEINS OF INVERTEBRATE AND VERTEBRATE
VISUAL SYSTEMS. INTERACTION OF EXOENZYME C3
SUBSTRATES WITH PHOTOACTIVATED RHODOPSIN**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Composition and cell localisation of ADP-ribosyltransferase C3 substrates were studied in squid photoreceptors and in bovine ROS. Polypeptides with M_r 22, 24, 30, 45 and 80 kDa are ADP-ribosylated in squid photoreceptor membranes, and polypeptides with M_r 22, 24, and 60 kDa are ribosylated in cattle ROS membranes. Cytoplasmic fraction of ROS contains C3 substrates with M_r 22, 24, 28 and 36 kDa. Increase in ADP-ribosylation of 22 and 24 kDa substrates and their interaction with photoexcited rhodopsin in squid photoreceptors was found.