



УДК 577.15 + 578.088

**О ЛОКАЛИЗАЦИИ ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА
В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ**

*Баламжаров Г. Р., Развский А. В., Салитра И. С.,
Пивоварова Т. С., Островский М. А., Левченко Л. А.,
Лихтенштейн Г. И.*

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Для изучения локализации родопсина в фоторецепторной мембране был использован метод электронно-плотных меток. Основным модифицирующим агентом служил этаноксигексамеркарбид, многоядерное ртутьорганическое соединение, избирательно блокирующее SH-группы. Показано, что в зависимости от функционального состояния мембраны характер распределения белка в ней может изменяться. В темноте родопсин диффузно распределен в мембране, обнаруживая при этом 2—3 реакционноспособные SH-группы, расположенные в непосредственной близости друг от друга. На свету в молекулах родопсина дополнительно открываются еще 4—3 SH-группы и в мембране происходит образование белковых «кластеров». В опытах с родопсином, солюбилизованным цетилтриметиламмонийбромидом, наблюдалась аналогичная картина фотоиндуцированного увеличения числа функционально активных SH-групп в родопсине, однако образования белковых «кластеров» замечено не было.

В последнее время в проблеме фоторецепции большой интерес вызывает вопрос о распределении зрительного пигмента родопсина в фоторецепторной мембране. Этот пигмент составляет 80—90% всего белка фоторецепторной мембраны [1, 2], и исследование его различными физико-химическими методами представляет особый интерес. Рядом авторов [3, 4] были предприняты попытки использовать для выяснения локализации родопсина иммунохимические метки, а также метод замораживания и скола. Однако ни один из указанных методов не дал однозначного ответа. Дело в том, что в случае иммунохимических меток встает вопрос об их специфичности к зрительному пигменту, а при применении «замораживания и скола» не исключена возможность денатурации мембраны и «вымораживания» гидрофобного белка, каким является родопсин, в водную фазу.

В настоящей работе для исследования распределения родопсина в мембране, а также для выяснения локализации сульфгидрильных групп в молекуле зрительного пигмента нами был применен метод электронно-плотных меток. В работах [5—7] показана возможность использования этого метода для изучения топографии различных функциональных групп в белках и мембранах. Основным модифицирующим агентом служил этаноксигексамеркарбид (ЭОГМ), многоядерное ртутьорганическое соединение, синтезированное по методу [8]. ЭОГМ специфически взаимодействует с сульфгидрильными группами, обладает высокой электронной плотностью и на электронных микрофотографиях имеет вид гранул размером 6—7 Å [5].



Рис. 1. Электронные микрофотографии контрольных фоторецепторных мембран при негативном контрастировании и увеличении 300 000

Молекула родопсина содержит 10 цистеиновых остатков, четыре из которых участвуют в образовании дисульфидных связей, в то время как шесть остальных обладают свободными SH-группами [9]. Однако количество определяемых SH-групп сильно зависит от функционального состояния родопсина, а также от степени денатурации его детергентом. В работе [10] показано, что 90% сульфгидрильных групп фоторецепторной мембраны принадлежит молекулам родопсина. Таким образом, модифицируя SH-группы в фоторецепторной мембране, можно фактически наблюдать распределение молекул зрительного пигмента.

Исходная суспензия наружных сегментов фоторецепторных палочек быка (НСП) после озвучивания представляет собой смесь мембранных фрагментов разного размера (рис. 1).

При титровании этой суспензии серебром в темноте были обнаружены 2—3 свободные SH-группы на молекулу родопсина. Повторное титрование после инкубации с ЭОГМ показало, что все они блокированы меткой. На электронных микрофотографиях указанных препаратов (рис. 2а, б) видны электронно-плотные гранулы размером 13—20 Å, равномерно распределенные в мембране. Исходя из размера индивидуальных молекул ЭОГМ, можно считать, что гранула такого размера включает 2—3 молекулы ЭОГМ и образуется в результате взаимодействия с 2—3 близкорасположенными SH-группами белка. Этот результат хорошо согласуется с данными амперометрического титрования и свидетельствует о том, что две «темновые» SH-группы родопсина находятся рядом. Аналогичные результаты получены нами при использовании метода ЭПР [11]. Кроме того, картина диффузного распределения электронно-плотной метки позволяет сделать вывод о неупорядоченном характере распределения молекул зрительного пигмента в плоскости фоторецепторной мембраны, что хорошо согласуется с существующими представлениями о свободной латеральной и вращательной диффузии родопсина в мембране [12, 13].

Титрование обесцвеченной суспензии НСП серебром показало, что в ходе фотоллиза родопсина в молекуле белка дополнительно открываются еще 3—4 SH-группы. Однако при определении SH-группы в этих же условиях спектрофотометрически по реакции с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) и *n*-хлормеркурибензойной кислотой фотоэффект обнаружить не удалось. В то же время повторное амперометрическое

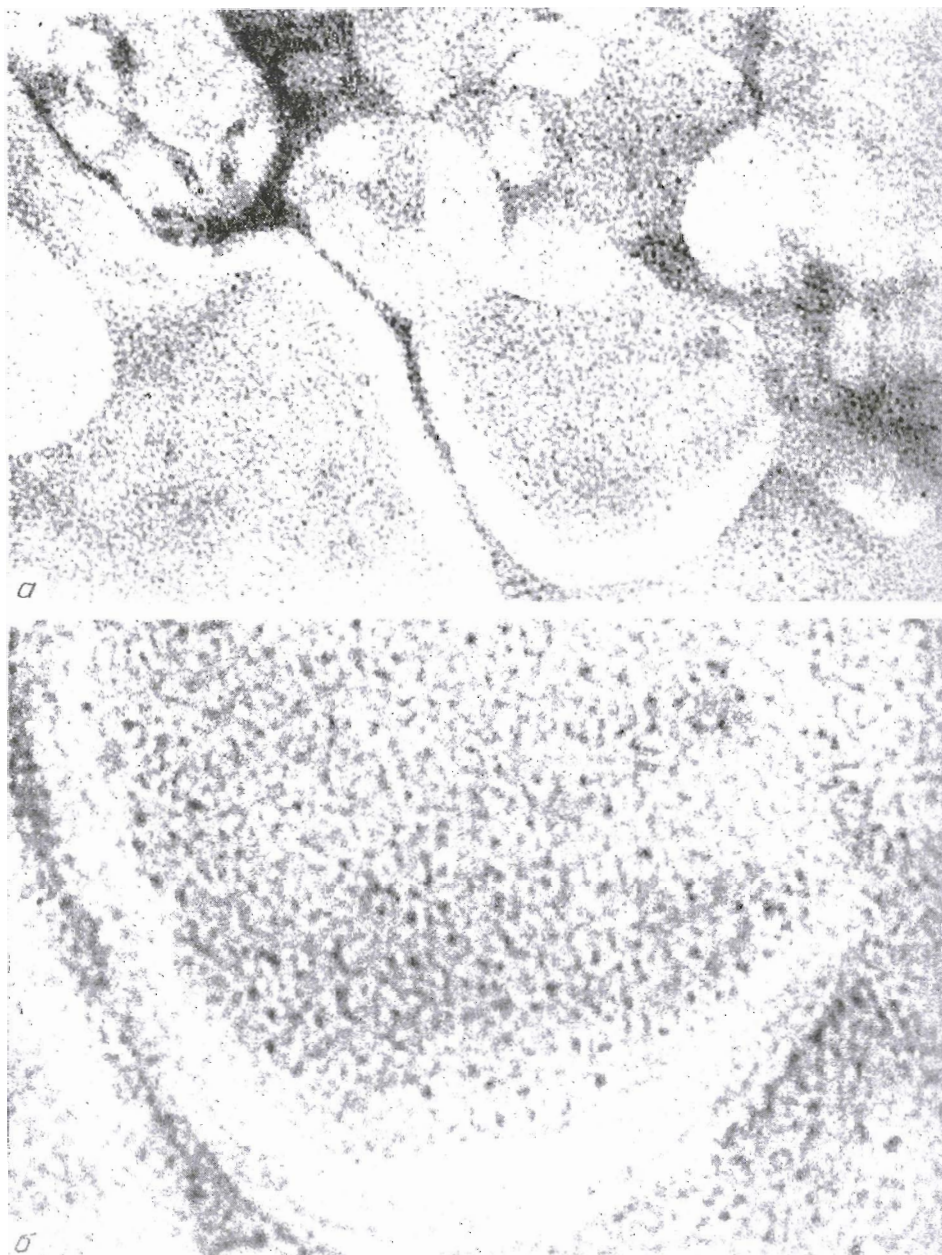


Рис. 2. Электронные микрофотографии фоторецепторных мембран, инкубированных с 2 экв. ЭОГМ в темноте, при негативном контрастировании и увеличении 300 000 (а) и 700 000 (б)

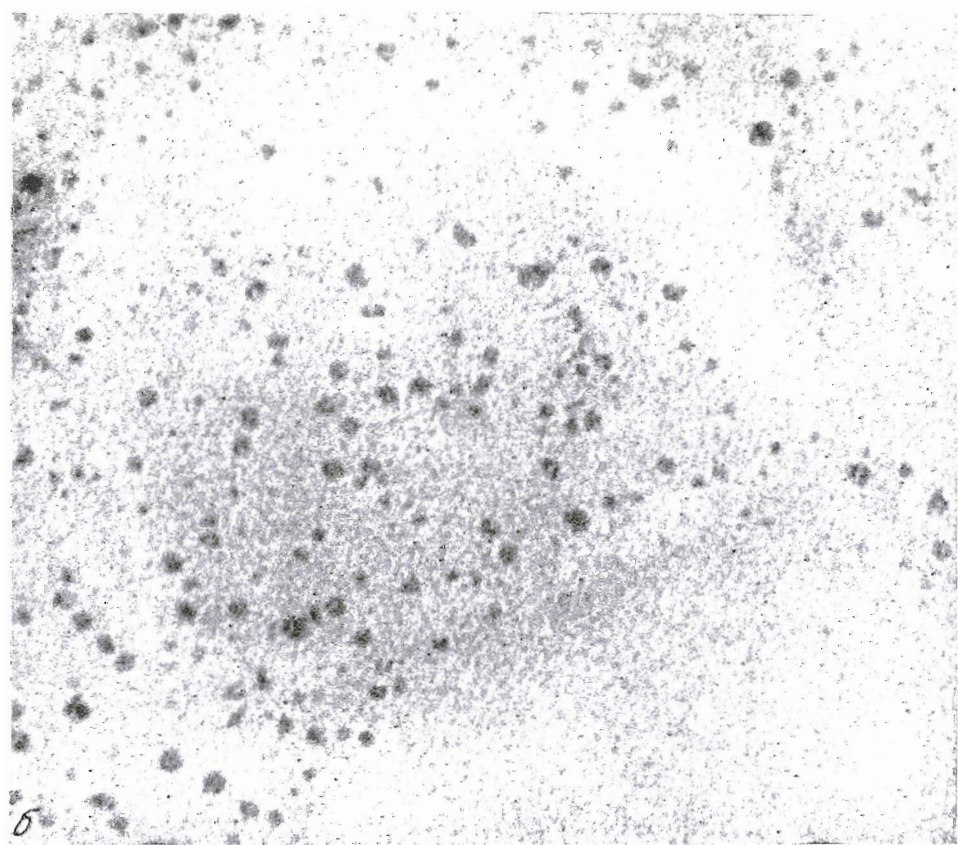
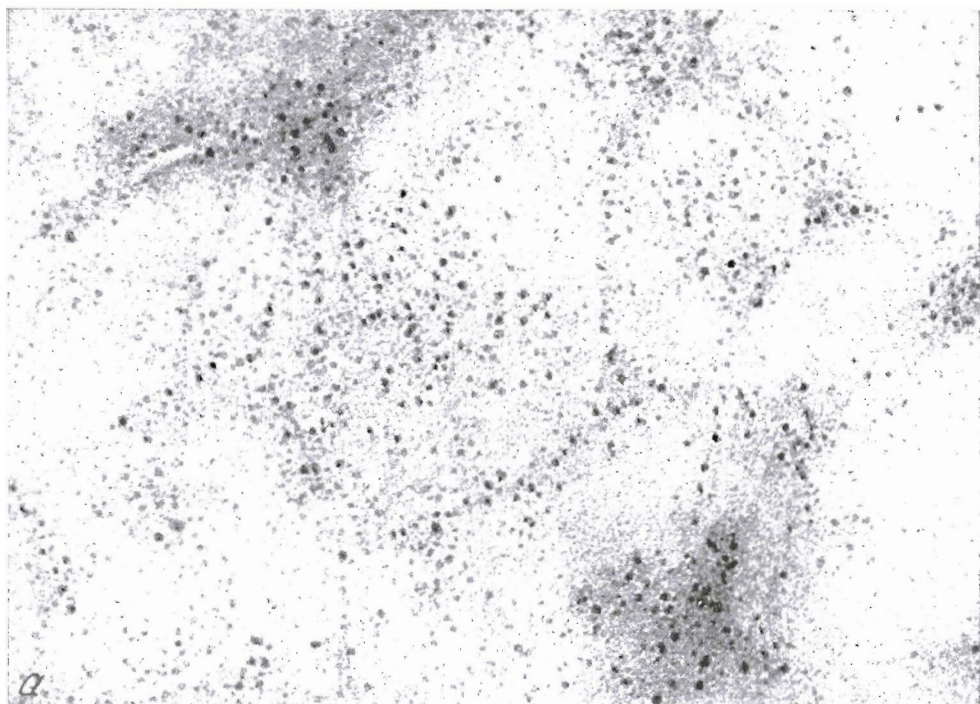
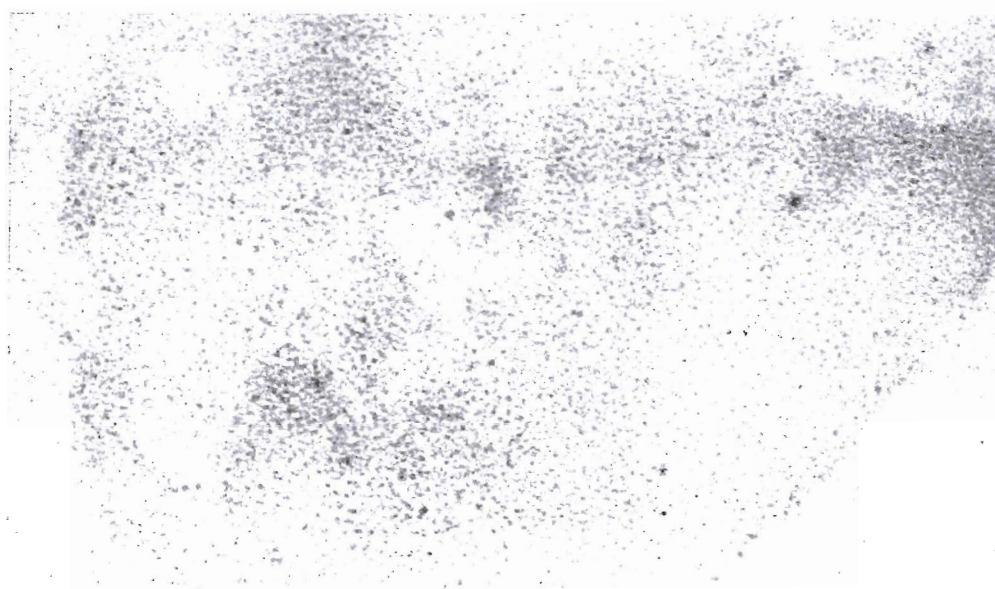
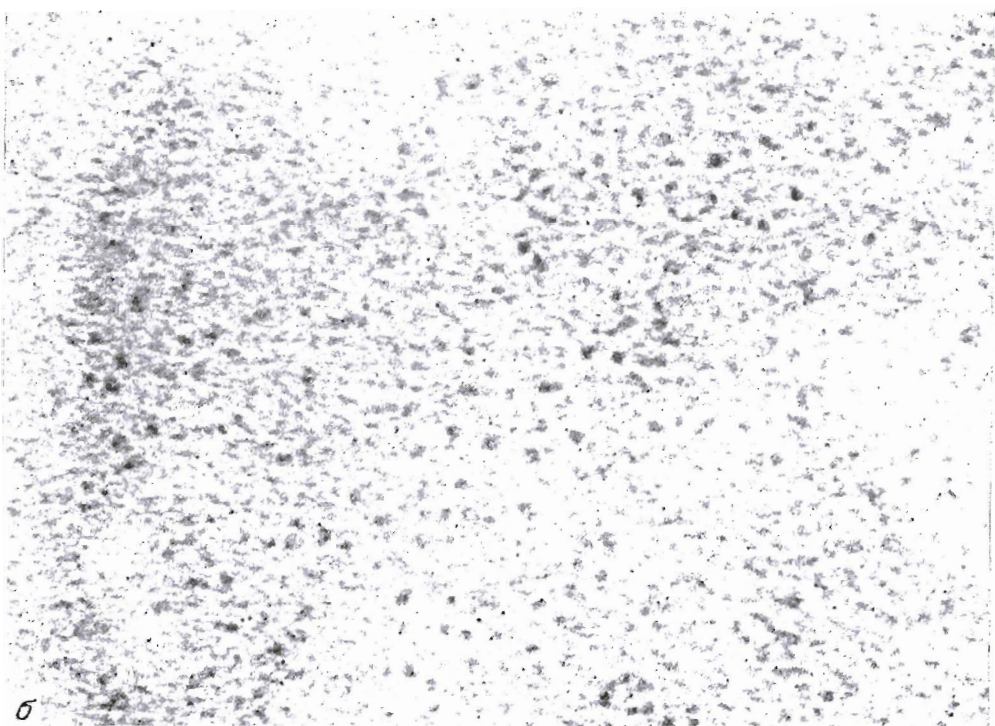


Рис. 3. Электронные микрофотографии обесцвеченных фоторецепторных мембран, инкубированных с 6 экв. ЭОГМ, при негативном контрастировании и увеличении 300 000 (а) и 700 000 (б)



a



б

Рис. 4. Электронные микрофотографии фоторецепторных мембран, инкубированных с ЭОГМ после предварительного насыщения *n*-децилмеркаптаном, при негативном контрастировании и увеличении 300 000 (*a*) и 700 000 (*б*)



Рис. 5. Электронные микрофотографии необесцвеченных препаратов родоспиры, экстрагированных ЦТАБ, инкубированных с 2 экв. ЭОГМ в темноте при увеличении 700 000

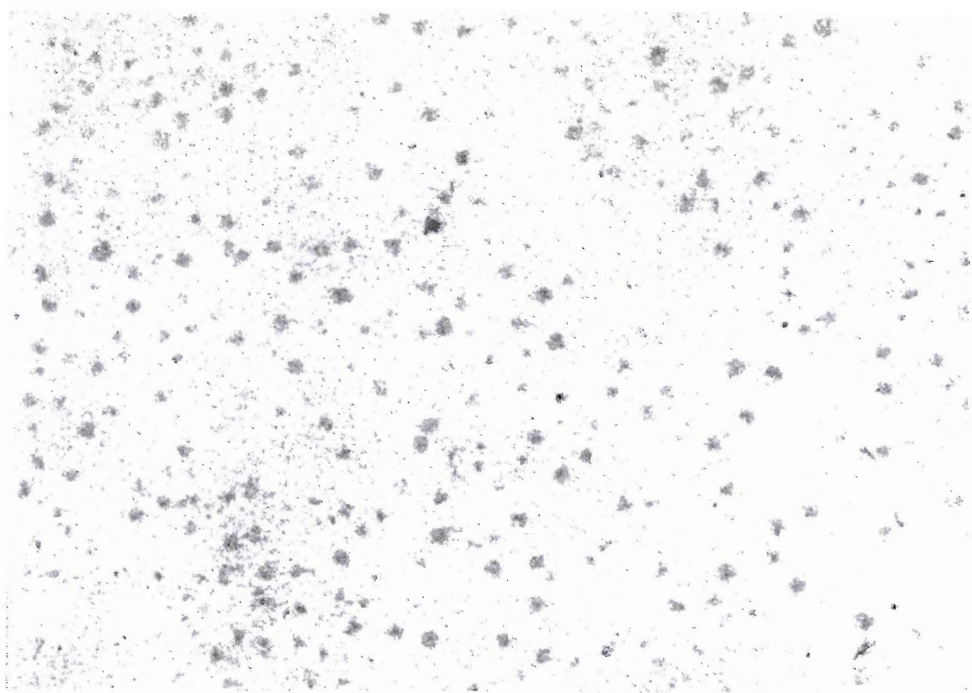


Рис. 6. Электронные микрофотографии обесцвеченных препаратов родоспиры, экстрагированных ЦТАБ, инкубированных с 6 экв. ЭОГМ на свету при увеличении 700 000

титрование препаратов после инкубации с ЭОГМ (6 мол. экв.) показало, что практически все 6 «световых» SH-групп блокированы меткой. Таким образом, ЭОГМ взаимодействует с SH-группами белка подобно ионам серебра.

При параллельном электронно-микроскопическом исследовании обесцвеченной суспензии НСП, обработанной ЭОГМ (рис. 3а, б), обнаружилось, что на свету в молекулах родопсина, включенных в фоторецепторную мембрану, не только дополнительно открываются несколько SH-групп, но, по всей вероятности, может происходить образование небольших белковых кластеров, состоящих из 2—3 молекул родопсина. Об этом свидетельствуют размеры и структура электронно-плотных гранул, наблюдаемых в мембране. Гранулы имеют размер 50—60 Å и отличаются большей компактностью по сравнению с аналогичными образованиями, характерными для препаратов, экстрагированных цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ) и содержащих отдельные молекулы родопсина (см. ниже).

Для выявления структурных перестроек в фоторецепторной мембране был использован реагент-посредник — *n*-децилмеркаптан [7], имеющий в своем составе неполярный фрагмент. Амперометрическое титрование мембран, насыщенных *n*-децилмеркаптаном на свету, показало увеличение количества свободных SH-групп в 2—3 раза по сравнению с исходными обесцвеченными препаратами. Инкубация таких мембран с ЭОГМ приводила к блокированию большей части SH-групп. Сравнение электронных микрофотографий мембран, модифицированных *n*-децилмеркаптаном и ЭОГМ, показывает (рис. 4а, б), что общее количество электронно-плотных гранул заметно увеличилось и на ряде участков появилась упорядоченность в их расположении. Этот эффект можно объяснить дополнительной модификацией липидных участков мембраны гидрофобным реагентом, приводящей к структурной перестройке мембраны.

Использованная в настоящей работе суспензия НСП (рис. 1—4) содержала наряду с крупными значительное количество мелких фрагментов мембран. В результате на электронных микрофотографиях препаратов, обработанных ЭОГМ (рис. 2—4), можно наблюдать электронно-плотные гранулы, расположенные вне крупных фрагментов. Размер гранул совпадает, как правило, с размерами гранул, включенных в мембрану, и составляет в темновом варианте 13—20 Å, в световом — 50—60 Å. Увеличение размера этих гранул в световых препаратах свидетельствует о том, что они не скопление молекул ЭОГМ, а результат взаимодействия родопсина с электронно-плотной меткой.

При исследовании родопсина, экстрагированного ЦТАБ (титрование ДТНБ), было выявлено в темноте 2—3 SH-группы, а после обесцвечивания — 5—6 SH-групп на молекулу белка. Этот результат хорошо согласуется с данными работы [9]. Картина, наблюдаемая на электронных микрофотографиях препаратов, экстрагированных ЦТАБ, инкубированных с ЭОГМ (рис. 5, 6), совпадает с данными амперометрического титрования. Для обесцвеченных препаратов родопсина, экстрагированных ЦТАБ, характерны гранулы размером 13—20 Å, соответствующие 2—3 модифицированным SH-группам (рис. 5). После обесцвечивания препаратов размеры гранул увеличиваются до 30—40 Å, причем во многих из них хорошо разрешена структура и можно наблюдать, что они образованы не более чем 5—6 молекулами ЭОГМ и выявляют, таким образом, одну молекулу родопсина (рис. 6). На электронных микрофотографиях «светового» варианта также встречаются электронно-плотные гранулы несколько меньшего размера, включающие 2—4 молекулы ЭОГМ и соответствующие, по всей вероятности, молекулам родопсина, не прореагировавшим к данному моменту на световое воздействие.

Сравнительное рассмотрение электронных микрофотографий обесцвеченных фоторецепторных мембран (рис. 3а, б) и обесцвеченных препаратов

родопсина, экстрагированных ЦТАБ (рис. 6), приводит к выводу о возможности фотоиндуцированного объединения зрительного пигмента в кластеры, состоящие из 2—3 молекул. Тот факт, что размер гранул в обесцвеченной фоторецепторной мембране в 1,5—2 раза больше, чем в препарате, экстрагированном ЦТАБ при одинаковом числе SH-групп на молекулу родопсина, позволяет предположить, что под действием света имеют место перестройки в фоторецепторной мембране, хотя трудно полностью исключить возможность образования артефактных картин. Предположение о фотоиндуцированном возникновении белковых кластеров в фоторецепторной мембране было выдвинуто ранее в работе [3].

Неизвестно, имеет ли место описанный эффект *in vivo* и образуются ли кластеры из двух обесцвеченных молекул родопсина, или же одна из них может быть необесцвеченной. Наиболее интересен второй случай, так как здесь образование белковых кластеров могло бы происходить и при достаточно слабых интенсивностях света. В первом случае образование кластеров *in vivo* было бы крайне редким, поскольку при нативных освещенностях вероятность нахождения рядом двух обесцвеченных молекул родопсина очень мала.

Экспериментальная часть

Суспензию НСП получали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Использовались препараты со спектральным критерием чистоты $P_{278,500}$ не выше 2,1—2,2. При электрофорезе в полиакриламидном геле препарат характеризовался в основном одной белковой полосой (80% интенсивности) с M 36 000. Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 20 000 об/мин на центрифуге J-21 (Beckman, США), осадок дважды промывали дистиллированной водой и ресуспендировали в 0,05 М Трис-HCl-буфере (pH 7). Суспензию озвучивали в течение 30 с при частоте 22 кГц и силе тока 0,2 А, используя ультразвуковой генератор марки УЗДН-1. В работе применяли смесь озвученной и неозвученной суспензии в соотношении 1 : 1.

Для получения солюбилизованного родопсина в качестве детергента использовали ЦТАБ. Экстракцию проводили 0,04 М раствором ЦТАБ в течение 5 ч. Затем экстракт осаждали 1 ч при 30 000 об/мин на центрифуге J-21.

Количество свободных SH-групп в молекулах солюбилизованного родопсина определяли спектрофотометрическим методом по реакции с ДТНБ [5], а количество свободных SH-групп родопсина в суспензии НСП — методом амперометрического титрования ионами серебра [6, 7], а также спектрофотометрическим методом по реакции с ДТНБ и *n*-хлор-меркурибензойной кислотой.

Для модификации SH-групп родопсина электронно-плотной меткой препараты, экстрагированные ЦТАБ, и суспензию НСП инкубировали 30 мин с эквивалентным количеством ЭОГМ при комнатной температуре. Степень блокирования SH-групп родопсина молекулами ЭОГМ контролировали повторным титрованием суспензии и экстрактов. Раствор ЭОГМ готовили по методике, описанной в работе [5]. Спектральные измерения осуществляли на спектрофотометрах Shimadzu MPS-5000 (Япония) и Specord UV-Vis (ГДР).

Обработку мембран *n*-децилмеркаптаном проводили при комнатной температуре и слабом перемешивании в течение 1 ч. О внесении реагента в мембраны судили по появлению дополнительных SH-групп, регистрируемых амперометрическим методом. Мембраны, насыщенные *n*-децилмеркаптаном, инкубировали с ЭОГМ в течение 30 мин и проводили контрольное титрование.

Техника приготовления образцов для электронно-микроскопических исследований описана нами в работе [7]. Исследование контрольных

препаратов смеси озвученной и неозвученной суспензии фоторецепторных мембран проводили методом негативного контрастирования [17]. Модифицированную ЭОГМ суспензию наносили на сетки с формваровой подложкой без предварительного контрастирования. Параллельно часть модифицированных препаратов контрастировали 0,2% раствором фосфорновольфрамовой кислоты (рН 7). Время обработки контрастером составляло 2—3 мин. Препараты модифицированного родопсина, экстрагированного ЦТАБ, исследовали в электронном микроскопе без обработки контрастером, так как последний реагирует с ЦТАБ, давая прозрачные игольчатые кристаллы. Работа выполнена на электронном микроскопе Hitachi HU-125-E1 (Япония) со следующими характеристиками: ускоряющее напряжение 100 кВ, рабочее увеличение 100 000, разрешающая способность 4—5 Å.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bownds D., Gordon-Walker A., Gaide-Huquenin A. C. (1971) *J. Gen. Physiol.*, 58, 225—232.
2. Daemen F. J. M., de Grip W. J., Jansen P. A. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 271, 419—423.
3. Chen J. S., Hubbell W. L. (1973) *Exp. Eye Res.*, 17, 517—532.
4. Blazie J. K., Wornington C. R., Dewey M. M. (1969) *J. Mol. Biol.*, 39, 407—420.
5. Лихтенштейн Г. И., Левченко Л. А., Раевский А. В., Садков А. П., Пивоварова Т. С., Гвоздев Р. И. (1973) Докл. АН СССР, 213, 1442—1444.
6. Левченко Л. А., Раевский А. В., Садков А. П., Лихтенштейн Г. И. (1973) Докл. АН СССР, 211, 238—240.
7. Левченко Л. А., Раевский А. В., Салитра И. С., Пивоварова Т. С., Лихтенштейн Г. И. (1975) Биорган. химия, 1, 1778—1782.
8. Hoffman K. A. (1900) *Ber.*, 33, 1328—1345.
9. Bonting S. L., de Grip W. J., Rotmans T. P. R., Daemen F. J. (1974) *Exp. Eye Res.*, 18, 77—83.
10. De Grip W. J., Bonting S. L., Daemen F. J. M. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 396 (1), 104—115.
11. Каламкарров Г. Р., Салитра И. С., Ванин А. Ф., Григорян Г. Л., Островский М. А. (1977) в сб. Механизмы сенсорной рецепции, «Наука», Л.
12. Brown P. R. (1972) *Nature New Biol.*, 236, 15—18.
13. Cone R. A. (1974) *Nature New Biol.*, 247, 15—19.
14. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 82, 70—73.
15. Benesh R. Z., Lardy H. A., Benesh R. J. (1955) *J. Biol. Chem.*, 216, 663—676.
16. Липде В. Р., Узенская А. М., Кочетков В. В. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1, 100—104.
17. Brenner S., Horne R. (1959) *Biochim. et biophys. acta*, 34, 103—110.

Поступила в редакцию
25.X.1976

После доработки
16.XII.1976

ON LOCATION OF RHODOPSIN IN THE PHOTORECEPTOR MEMBRANE

KALAMKAROV G. R., RAEVSKII A. V., SALITRA I. S., PIVOVAROVA T. S.,
OSTROVSKII M. A., LEVCHENKO L. A., LIKHTENSTEIN G. I.

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

It was found that there are changes in the protein distribution within the membrane which depend on functional state of the latter. In the dark, rhodopsin is diffusively arranged in membrane and has 2-3 reactive SH-group. In light, 3-4 more sulphhydryl groups become exposed, and the protein clusters are formed within the membrane. In the case of cetyl trimethylammoniumbromide-solubilized rhodopsin, similar photoinduced increase in the content of reactive SH-groups was observed, however no protein clusters were produced.