



УДК 547.963.4.04

МОДИФИКАЦИЯ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ  
В МОЛЕКУЛЕ РОДОПСИНА

Слободянская Е. М.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Показано, что взаимодействие в темноте родопсина с диазореагентами — N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамином или метиловым эфиром диазоацетил-L-фенилаланина в присутствии ионов двухвалентной меди приводит к модификации одной карбоксильной группы белка, сопровождающейся исчезновением максимума при 500 нм в спектре поглощения и отщеплением ретиналя. Обсуждается локализация данной карбоксильной группы в родопсине.

Зрительный пигмент родопсин — классический представитель мембранных белков, наиболее характерными свойствами которого являются максимум при 500 нм в спектре его поглощения, светочувствительность и способность к регенерации при добавлении к апобелку 11-цис-ретиналя. Практически нет данных о роли отдельных аминокислотных остатков в молекуле родопсина в проявлении этих свойств. В частности, представляет несомненный интерес идентификации аминокислотных остатков, участвующих в нековалентных взаимодействиях 11-цис-ретиналя с опсином [1] и, таким образом, в значительной степени определяющих bathochrome сдвиг в спектре поглощения 11-цис-ретиналя, возникающий при его присоединении к опсину.

Мы исследовали влияние модификации карбоксильных групп родопсина на его спектральные свойства. Реагентами служил N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамин (ДДЭ) и [<sup>14</sup>C]метиловый эфир диазоацетил-L-фенилаланина [<sup>14</sup>C]МДФ, которые применялись ранее для модификации ряда ферментов [2—4].

Количество модифицированных карбоксильных групп определялось для ДДЭ-родопсина по спектру поглощения, а [<sup>14</sup>C]МДФ-родопсина — по радиоактивности полученного белка. При взаимодействии в темноте суспензии наружных сегментов палочек как с ДДЭ, так и с [<sup>14</sup>C]МДФ в родопсине модифицируется одна карбоксильная группа, что сопровождается его обесцвечиванием, происходящим через 80—90 мин после начала реакции с модификатором (рис. 1). В тех же условиях обесцвечивание родопсина в отсутствие модификатора не происходит. В спектрах поглощения модифицированных белков исчезает характерная полоса поглощения при 500 нм. Спектр родопсина, модифицированного ДДЭ, имеет два максимума при 280 и 360 нм (рис. 2), причем предварительно обесцвеченный и затем модифицированный зрительный пигмент имеет такой же спектр поглощения, как и после модификации в темноте. Появление максимума при 360 нм связано с поглощением динитрофенильного хромофора, что

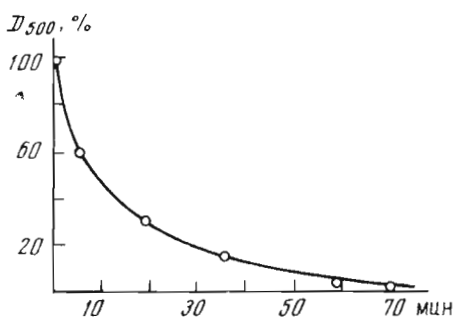


Рис. 1. Спектр поглощения ДДЭ-родопсина. Суспензия в 0,2 М ацетатном буфере, pH 5,6. Концентрация белка 0,5 мг/мл

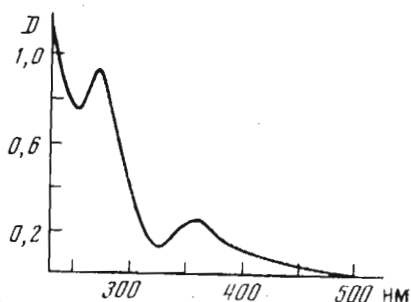


Рис. 2. Падение поглощения при 500 нм в ходе темновой реакции родопсина с ДДЭ. (Условия опыта см. в тексте)

подтверждается совпадением в этой области длин волн спектра модифицированного белка со спектром ДДЭ в растворе. Судя по спектру, 11-*цис*-ретиналь при модификации родопсина отщепляется от опсина и отделяется при пропускании через колонку с сефадексом.

Наблюдаемые при модификации родопсина спектральные изменения могли бы быть вызваны действием модификатора на хромофор — 11-*цис*-ретиналь. Однако, когда ту же самую реакцию проводили с раствором 11-*цис*-ретиналя в спирте, никаких изменений в спектре поглощения последнего не наблюдали.

Доказательством образования эфирной связи между одной карбоксильной группой и diazo-реагентом является также образование эквивалентного количества гидроксамовой кислоты при обработке модифицированного белка 0,5 М гидросиламином.

Способность модифицированных по карбоксильной группе белков регенерировать была исследована на ДДЭ-родопсине. Оказалось, что при его инкубации с 11-*цис*-ретиналем в темноте регенерация не наблюдается. Тот факт, что одна карбоксильная группа в молекуле родопсина модифицируется двумя различными реагентами, предполагает, что такая модификация определяется не свойствами реагента или какими-либо условиями реакции, а именно свойствами данной карбоксильной группы в молекуле зрительного пигмента.

Несмотря на то что в настоящее время нет возможности локализовать аминокислотный остаток, содержащий эту карбоксильную группу, в молекуле родопсина, тем не менее можно утверждать, что эта группа существенна для сохранения его спектральных свойств. Можно предположить, что она либо входит в хромофорный центр родопсина и модификация делает невозможным ее взаимодействие с ретиналем, либо находится на периферии белковой глобулы, но изменение ее состояния приводит к значительному изменению конформации всей молекулы.

Таким образом, одна из 20 карбоксильных групп молекулы родопсина, занимая особое положение в ее третичной структуре, играет принципиально важную роль в природе батохромного сдвига в спектре поглощения хромофора (11-*цис*-ретиналя) в молекуле родопсина.

### Экспериментальная часть

Спектры поглощения снимали на спектрофотометрах Shimadzu MPS-5000 (Япония) и Specord (ГДР), удельную радиоактивность [<sup>14</sup>C]МДФ-родопсина измеряли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Intertechnique (Франция).

Суспензию наружных сегментов палочек быка получали по методике, описанной в работе [5]. Спектральный критерий чистоты полученных препаратов ( $P_{280}$ ) не превышал 2,2.

*Модификация родопсина (стандартный опыт).* Свежеприготовленные наружные сегменты (10 мг) суспендировали в 8 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5, 6), обрабатывали 30 с ультразвуком с частотой 22 кГц при температуре 0° и силе тока 0,2 А с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-1. К этой суспензии при перемешивании добавляли 1 мл 10<sup>-2</sup> М раствора сернокислой меди в том же буфере и через 10 мин 1 мл 4,5 мМ раствора ДДЭ или соответственно [<sup>14</sup>С]МДФ (уд. акт. 20 мКи/моль) в этиловом спирте. Таким образом, соотношение между концентрациями белка, Cu<sup>2+</sup> и модификатора равнялось 1 : 40 : 18. Примерно через 80 мин при комнатной температуре реакционную смесь наносили на колонку с G-25 объемом 180 мл, элюировали водой и собирали белковую фракцию, содержащую 6—8 мг белка. Все операции по получению модифицированного родопсина проводили при слабом красном свете, за исключением опытов с использованием предварительно обесцвеченного (20 мин, дневной свет) родопсина.

*Количество модифицированных карбоксильных групп для ДДЭ-родопсина* определяли по соотношению между поглощением при 280 и 360 нм. Коэффициенты экстинкции принимали равными для родопсина  $\epsilon_{280}$  75 000 [6], для ДДЭ —  $\epsilon_{360}$  20 500 [3]. При этом предполагалось, что  $\epsilon_{360}$  для модифицированного белка равен таковому для ДДЭ. При расчете концентрации родопсина по поглощению при 280 нм учитывали вклад поглощения ДДЭ при этой длине волны, который составляет примерно 30% от его поглощения при 360 нм. Для [<sup>14</sup>С]МДФ-родопсина число прореагировавших карбоксильных групп определяли из расчета удельной активности белковой фракции, полученной после пропускания реакционной смеси через колонку с G-25.

*Количество эфирных связей,* образовавшихся между карбоксильной группой родопсина и модификатором (ДДЭ), определяли реакцией с 0,5 М гидроксиламином при рН 7,0 по методике [7].

*Регенерация* осуществлялась следующим образом: к 3 мл модифицированного родопсина с концентрацией 0,2 мг/мл добавляли 0,1 мл 11-цис-ретиналя в виде эмульсии в Твине-40 так, чтобы конечное поглощение ретиналя при 360 нм было равным 0,8. После инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 2,5 ч дифференциальный спектр против раствора ретиналя такой же концентрации не регистрировался. Затем белковый раствор обесцвечивали (дневной свет, 20 мин) и снова снимали спектр. Изменений в спектре также не наблюдали. Параллельно проводили такой же опыт на немодифицированном родопсине.

Приношу благодарность М. А. Островскому за полезные советы и ценные замечания при выполнении этой работы и Л. Д. Румшу за предоставление препаратов ДДЭ и [<sup>14</sup>С]МДФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abrahamson E. W. (1972) in Handbook of sensory physiology, vol. 7, Springer-Verlag.
2. Stepanov V. M., Lobareva L. S., Mal'tsev N. I. (1968) Biochim. et biophys. acta; **151**, 719—721.
3. Желковский А. М., Апсалон У. Р., Дьяков В. Л., Гинопман Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К. (1977) Биооргани. химия, **3**, 1430—1431.
4. Козлов Л. В., Гинопман Л. М., Орехович В. Н. (1967) Биохимия, **32**, 1011—1019.
5. Остапенко И. А., Берман А. Л., Этингоф Р. Н. (1969) Биохимия, **34**, 1028—1033.
6. Wald G., Brown P. K. (1953) J. Gen. Physiol., **37**, 189—195.
7. Bergman F., Segal R. (1956) Biochem. J., **62**, 542—548.

Поступила в редакцию  
15.XII.1977

После переработки  
30.I.1978

## MODIFICATION OF A CARBOXY GROUP IN RHODOPSIN

SLOBODYANSKAYA E. M.

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

Rhodopsin interaction with diazoreagents, viz. N-diazoacetyl-N'-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamine or diazoacetyl-L-phenylalanine methyl ester, in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions in the dark results in modification of one carboxy group. This entails a concomitant removal of retinal moiety and disappearance of the 500 nm absorption maximum. A possible disposition of the susceptible carboxy group in the rhodopsin molecule is discussed.

---