

УДК 577.151

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ АТР-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА КАЛЬЦИЯ В ФОТОРЕЦЕПТОРАХ (ПАЛОЧКАХ) СЕТЧАТКИ ПОЗВОНОЧНЫХ

БЕРМАН А. Л., АЗИМОВА А. М.

Исследовали способность различных фрагментов фоторецепторов сетчатки позвоночных—наружных и внутренних сегментов палочек к АТР-зависимому транспорту Ca^{2+} .

При исследовании кинетики АТР-зависимого накопления Ca^{2+} везикулами плазматических мембран фоторецепторов сетчатки позвоночных было установлено, что в присутствии АТР фрагменты мембран внутренних сегментов накапливали около 20 нмоль Ca^{2+} /мг белка; в то время как фрагменты мембран наружных сегментов такой способностью не обладали. Сделан вывод, что АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} локализован в плазматических мембранах внутреннего сегмента палочки и отсутствует в фоторецепторных мембранах дисков наружных сегментов.

В присутствии ионов натрия и калия АТР-зависимое накопление Ca^{2+} фрагментами внутреннего сегмента подавлялось в присутствии строфантина, ингибитора Na^+ , K^+ -АТРазы. На основании полученных данных предполагается, что активный транспорт Ca^{2+} плазматическими мембранами внутреннего сегмента обеспечивается работой Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТРазы, а также в присутствии ионов натрия и калия путем $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

Некоторые исследователи полагают, что Ca^{2+} играет роль внутриклеточного медиатора в механизме возбуждения фоторецептора сетчатки позвоночных, в частности, передает возбуждение от поглотившей квант света молекулы родопсина, расположенного в мембранах дисков наружного сегмента палочки (НСП), на ионные каналы, локализованные в наружной плазматической мембране (ПМ) фоторецептора [1, 2]. В этой так называемой «кальцевой» гипотезе о механизме возбуждения фоторецептора позвоночных постулируется, что в мембранах дисков НСП должна быть локализована кальцевая помпа, которая поддерживает градиент Ca^{2+} на фоторецепторной мембране дисков НСП [1, 2]. В то же время результаты экспериментальных исследований, посвященных изучению системы активного транспорта кальция во фракции фоторецепторных мембран (ФМ) дисков НСП, крайне противоречивы [3—9]: одни исследователи находят во фракции НСП активность Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТРазы [3, 4], которая, как предполагают, обуславливает активное накопление Ca^{2+} мембранами дисков НСП, а также наблюдают во фракции НСП способность в присутствии АТР накапливать кальций [5—8], другие исследователи находят, что

Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТРаза локализована в палочках сетчатки в ПМ внутреннего сегмента и отсутствует в ФМ дисков [9].

В настоящей работе проведено сравнение способности различных фракций ПМ фоторецепторов сетчатки позвоночных—НСП и ВСП (внутренних сегментов палочек) к АТР-зависимому накоплению кальция, а также изучены особенности системы его активного транспорта в палочках сетчатки. Мы полагали, что таким образом можно будет более однозначно ответить на вопрос, в какой же части фоторецептора (в области внутреннего или наружного сегментов) локализован кальциевый насос и охарактеризовать некоторые свойства Ca^{2+} -транспортирующей системы ПМ фоторецепторов.

Материалы и методы

Исследования проведены на двух субфракциях ПМ палочек сетчатки быка: фракции НСП, в мембранах которой преимущественно содержится родопсин, и фракции ВСП, в которых преимущественно локализована Na^{+} , K^{+} -АТРаза [9, 10]. Фракции НСП и ВСП выделяли по методу, описанному нами ранее [9, 10]. Определение белка производили по модифицированному биуретовому методу [11]. О принадлежности различных субфракций ПМ фоторецептора сетчатки к НСП или ВСП судили по биохимическим маркерам: для фракции НСП таким маркером являлся родопсин, а для фракции ВСП— Na^{+} , K^{+} -АТРаза и сукцинатдегидрогеназа [10].

Опыты по изучению АТР-зависимого накопления Ca^{2+} проводили на вывернутых везикулах ПМ фоторецептора, полученных обработкой фракций ВСП и НСП гипотоническим шоком в 6 мМ трис-НСI буфере pH 7,4 в течение 10 мин при $+4^{\circ}$ [12]. Для изучения АТР-зависимого накопления Ca^{2+} применяли инкубационную среду, содержащую: 20 мМ трис-НСI буфера (pH 7,4), 2 мМ $MgCl_2$, 5×10^{-5} М $CaCl_2$ (0,6 мкК_в ^{45}Ca), 2 мМ АТР и 100—200 мкг белка. Объем инкубационной среды составлял 5 мл. Количество адсорбированного кальция определяли в такой же среде, но при 0° или в отсутствие АТР. АТР-зависимое накопление Ca^{2+} определяли как разность между общим накоплением Ca^{2+} в присутствии АТР при 30° в течение 15 мин и адсорбированным кальцием за тот же промежуток времени.

Для изучения Na^{+}/Ca^{2+} обмена в инкубационную смесь добавляли 100 мМ NaCl и 10 мМ KCl. В этом случае АТР-зависимое накопление Ca^{2+} определяли как разность между общим накоплением Ca^{2+} в присутствии АТР без строфантина „K“ и при наличии этого ингибитора Na^{+} , K^{+} -АТРаза в инкубационной среде (0,2 мМ).

Фракцию НСП или ВСП вносили в инкубационную смесь, прогретую до 30° , пробы (100—200 мкг белка) инкубировали при 30° в течение 1, 5, 10 и 15 мин, после чего суспензию фильтровали через мембранные фильтры (размер пор 0,45—0,6 мкм) и промывали один раз охлажденным до $+4^{\circ}$ раствором 20 мМ трис-НСI буфера (pH 7,4). Ко-

личество накопленного кальция выражали в нмоль/мг белка. Фракции НСП и ВСП хранили в жидком азоте.

Результаты и обсуждение

Возможность образования в определенных условиях замкнутых, вывернутых наизнанку везикул из фрагментов ПМ нервной ткани [12], способных накапливать Ca^{2+} в присутствии АТР, позволила нам исследовать АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} во фракциях НСП и ВСП.

Исследование влияния концентрации Ca^{2+} на АТР-зависимое накопление этого катиона фрагментами плазматических мембран ВСП фоторецепторов показало, что по мере возрастания концентрации кальция происходило увеличение АТР-зависимого накопления Ca^{2+} , причем максимального значения АТР-зависимое накопление катиона достигало при концентрации Ca^{2+} , равной 50 мкМ; при дальнейшем повышении концентрации катиона АТР-зависимое накопление Ca^{2+} уменьшалось (рис. 1). В то же время АТР-зависимое накопление Ca^{2+}

отсутствовало во фракции фрагментов ПМ НСП: небольшой концентрационный максимум АТР-зависимого накопления Ca^{2+} во фракции НСП был статистически недостоверен, составлял менее 2% от того

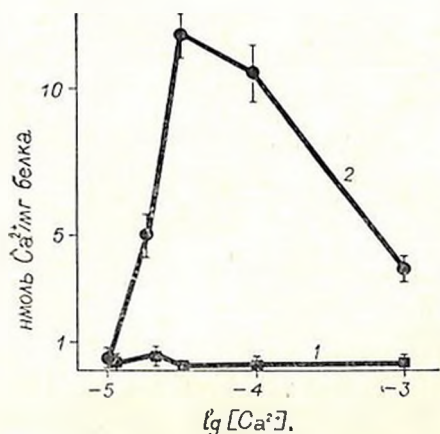


Рис. 1. Влияние концентрации Ca^{2+} на АТР-зависимое накопление Ca^{2+} фракциями НСП и ВСП сетчатки. По оси абсцисс—концентрация Ca^{2+} (М в логарифмическом масштабе); по оси ординат—АТР-зависимое накопление Ca^{2+} фракциями НСП (1) и ВСП (2) сетчатки. Среда инкубации: 20 мМ трис-буфера (pH 7,4) 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТР, инкубация—15 мин при 30°

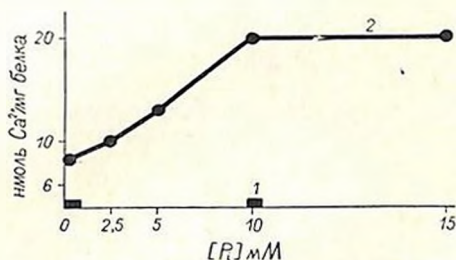


Рис. 2. Влияние концентрации P_i на АТР-зависимое накопление Ca^{2+} мембранами НСП (1) и ВСП (2) сетчатки. Среда инкубации: 20 мМ трис-буфера (pH 7,4) 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТР, 5×10^{-5} CaCl_2

количества катиона, которое адсорбировалось мембранами НСП в отсутствие АТР (рис. 1), и мог быть обусловлен незначительной примесью фрагментов ВСП во фракции НСП.

Чтобы убедиться, что наблюдавшееся увеличение содержания Ca^{2+} во фракции ВСП в присутствии АТР было обусловлено накоп-

лением катиона внутри замкнутых мембранных везикул, в следующей серии опытов исследовали влияние различных концентраций P_i на величину АТР-зависимого накопления Ca^{2+} (рис. 2). Оказалось, что для фракции ВСП с увеличением концентрации P_i АТР-зависимое накопление Ca^{2+} увеличивалось, в то время как во фракции НСП никакого АТР-зависимого накопления Ca^{2+} не наблюдали независимо от присутствия или отсутствия P_i в среде инкубации (рис. 2). Таким образом, наблюдавшаяся нами зависимость накопления Ca^{2+} в присутствии АТР фракцией ВСП от концентрации P_i (рис. 2) свидетельствует, по-видимому, о том, что увеличение концентрации кальция во фракции ВСП в присутствии АТР было обусловлено накоплением катиона в замкнутых мембранных везикулах.

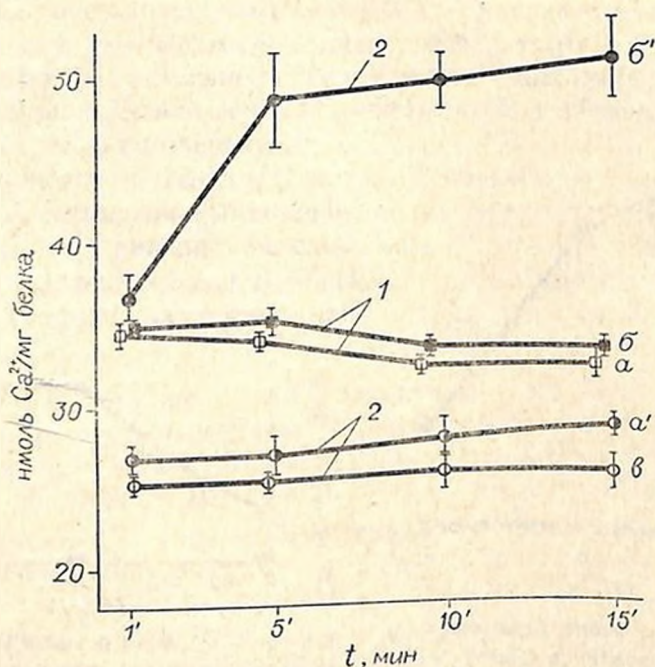


Рис. 3. Кинетика адсорбции и АТР-зависимого накопления Ca^{2+} фракциями НСП (1) и ВСП (2) сетчатки: α, α' — в отсутствие АТР при 30°; β, β' — в присутствии АТР при 30°; в — в присутствии АТР при 0°. Среда инкубации та же, что и на рис. 2, концентрация P_i — 10 мМ

При исследовании кинетики АТР-зависимого накопления Ca^{2+} везикулами, образованными из фрагментов мембран НСП или ВСП, было установлено, что в присутствии АТР фрагменты мембран ВСП накапливают в течение 5 мин около 20 нмоль Ca^{2+} /мг белка, в то время как фрагменты мембран НСП не накапливают Ca^{2+} в этих же условиях (точнее, это накопление Ca^{2+} для фрагментов фракции НСП составляло менее 0,5 нмоль Ca^{2+} /мг белка (рис. 3) и могло быть обусловлено незначительной, менее 3%, примесью мембран ВСП). Наблюдавшееся нами АТР-зависимое накопление Ca^{2+} мембранными фраг-

ментами фракции ВСП не было обусловлено митохондриями ВСП, так как олигомицин (ингибитор митохондриальной АТФазы) не подавлял АТФ-зависимое накопление Ca^{2+} фрагментами ВСП (рис. 4).

Сопоставляя результаты настоящей работы (рис. 1—4) с ранее полученными данными о наличии Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы во фракции ВСП и отсутствии этого фермента во фракции мембран НСП [9], можно заключить, что замкнутые везикулы, образованные из фрагментов ПМ ВСП, обладают способностью в присутствии АТФ и Mg^{2+} накапливать Ca^{2+} в результате работы Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы. Фоторецепторные мембраны дисков фракции НСП, согласно полученным результатам, такой способностью накапливать Ca^{2+} в присутствии АТФ не обладают. Можно предположить, что наблюдавшаяся другими авторами способность фракции НСП активно накапливать Ca^{2+} в присутствии АТФ [5—8] могла быть обусловлена незначительной примесью во фракции фрагментов ВСП.

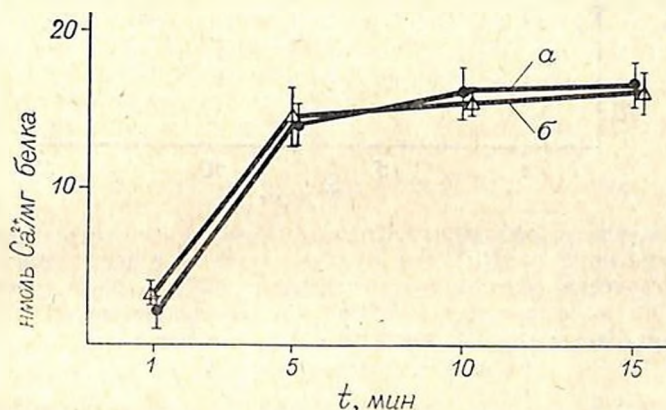


Рис. 4. Влияние олигомицина на АТФ-зависимое накопление Ca^{2+} фрагментами мембран фракции ВСП сетчатки: а — инкубация без олигомицина, б — инкубация в присутствии олигомицина. Среда инкубации та же, что на рис. 2

Особый интерес представляют результаты, которые свидетельствуют о том, что во фрагментах ВСП, помимо Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы, по-видимому, имеется и другой механизм транспорта Ca^{2+} , так называемый $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ обменный механизм накопления Ca^{2+} [12, 13]. Как видно из результатов, представленных на рис. 5, в присутствии Na^{+} и K^{+} АТФ-зависимое накопление Ca^{2+} фрагментами мембран ВСП полностью подавлялось строфантином „К“ (0,2 мМ) — специфическим ингибитором Na^{+} , K^{+} -АТФазы.

Как известно, фракция ВСП обладает высокой активностью Na^{+} , K^{+} -АТФазы [9, 10]. В присутствии АТФ, Mg^{2+} , а также Na^{+} и K^{+} , натриевый насос создает и поддерживает градиент концентрации Na^{+} на замкнутых везикулах, образованных из ПМ ВСП; возможно, что энергия, заключенная в этом градиенте, используется для накопления

Ca^{2+} внутри везикул. Подобный механизм сопряженного АТР-зависимого транспорта Ca^{2+} в замкнутые везикулы ПМ был описан ранее для других тканей [14, 15],

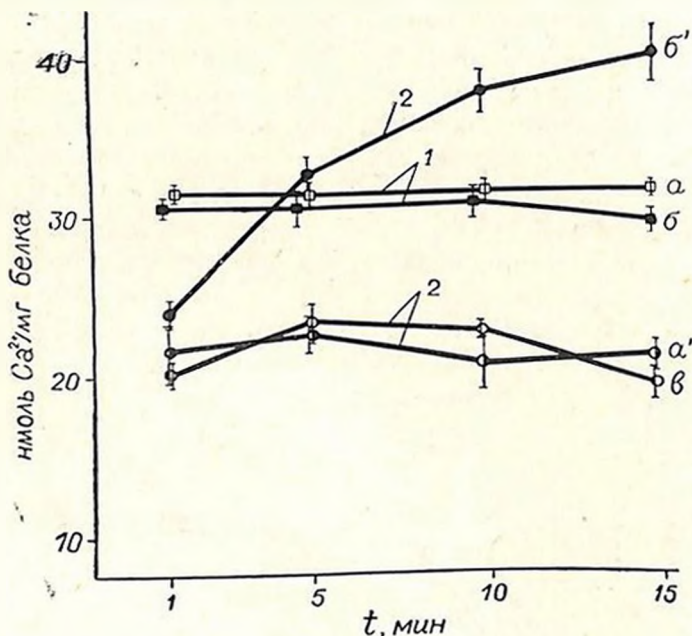


Рис. 5. Влияние строфантина K^+ на АТР-зависимое накопление Ca^{2+} везикулами мембран НСП (1) и ВСП (2) сетчатки в присутствии Na^+ и K^+ ; α, α'—среда инкубации не содержит АТР; β, β'—в присутствии 2 мМ АТР; β—в присутствии АТР (2 мМ) и строфантина K^+ (0,2 мМ). Среда инкубации: 100 мМ NaCl , 10 мМ KCl , в остальном так же, как на рис. 2, температура 30°

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что в палочках сетчатки позвоночных АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} локализован в ПМ внутреннего сегмента фоторецептора и отсутствует в мембранах дисков НСП. Можно также предположить, что в ВСП сетчатки АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} может поддерживаться двумя различными механизмами: за счет работы Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТРазы и, кроме того, путем $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменного механизма.

LOCALIZATION AND MECHANISMS OF ATP-DEPENDENT TRANSPORT OF CALCIUM IN RETINAL RODS OF VERTEBRATES

BERMAN A. L., AZIMOVA A. M.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry USSR Academy of Sciences, Leningrad

The ability of outer and inner segments of retinal rods (ROS and RIS) to the ATP-dependent transport of Ca^{2+} has been studied. The turned inside out, closed vesicles obtained from plasmic membranes of ROS

and RIS fractions were incubated at 30° or 0° in the presence of 2 mM ATP, Ca^{2+} , 2 mM MgCl_2 to which 100 mM NaCl, 10 mM KCl and inorganic phosphate were added if needed.

A study of kinetics of ATP-dependent accumulation of Ca^{2+} by the vesicles has shown that the RIS-vesicles accumulated about 20 nmoles of Ca^{2+} per mg of protein in the presence of ATP, whereas ROS-vesicles were incapable of ATP-dependent Ca^{2+} accumulation.

It has been demonstrated that the ATP-dependent Ca^{2+} accumulation by RIS-vesicles, most likely, takes place due to activity of the RIS Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase when Na^+ and K^+ were absent and due to Na^+/K^+ exchange when Na^+ and K^+ were present in the incubation medium. It is concluded that ATP-dependent transport of Ca^{2+} is localized in the RIS plasmic membranes but not in those of ROS.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hagins W. A. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1, 131—153, 1972.
2. Hagins W. A., Yoshikami S. Exp. Eye Res., 18, 299—305, 1974.
3. Sack R. A., Harris C. H. Nature, 265, 465—466, 1977.
4. Ostwald T. J., Heller J. Biochemistry, 11, 4679—4685, 1972.
5. Hemminki K. Acta Physiol. Scand., 95, 117—125, 1975.
6. Neufeld A. H., Miller W. H., Bitensky M. W. Biochim. Biophys. Acta, 266, 67—71, 1972.
7. Schnetkamp P. P. M., Daemen F. J. M., Bonting S. L. Biochim. Biophys. Acta, 468, 259—270, 1977.
8. Miki N., Kuo Che-Hut, Hayasi Y., Akiyama M. Photochemistry and Photobiology, 32, 503—508, 1980.
9. Berman A. L., Azimova A. M., Gribakin F. G. Vision Res., 17, 527—536, 1977.
10. Берман А. Л. Биохимия, 40, 659—662, 1975.
11. Берман А. Л., Чирковская Е. В. Ж. эвол. биох. и физиол., 10, 566—576, 1974.
12. Лушко В. К. Биохимия, 40, 538—544, 1975.
13. Blaustein M. P. Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol., 70, 33—38, 1974.
14. Ichida S., Hata F., Matsuda T., Yoshida H. Jap. J. Pharmacol., 26, 31—37, 1976.
15. Reuter H., Seitz N. J. Physiol., 195, 451—455, 1968.

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград

Поступила 16.XI 1981