

УДК 577.151+577.153

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ИОНА ФТОРА НА ФОСФОДИЭСТЕРАЗУ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ

ФУРАЕВ В. В., КАЛИНИНА С. Н., ЭТИНГОФ Р. Н.

Фоторецепторный нейрон—палочка сетчатки—является пока единственным примером, когда рецепторный компонент функционально связан не с аденилатциклазой (АЦ), а с другим ферментом системы циклических нуклеотидов—фосфодиэстеразой (ФДЭ). ФДЭ играет ключевую роль в регуляции содержания циклических нуклеотидов в наружных сегментах палочек (НСП) сетчатки в ответ на поступающий извне стимул. При поглощении фоторецепторами квантов света, то есть освещении, активность ФДЭ НСП резко увеличивается, при этом активность гуанилатциклазы остается неизменной [1, 2].

В ряде работ отмечено подобие механизмов сопряжения АЦ и ФДЭ с соответствующими рецепторами [3, 4]. В обоих случаях для активации ферментов в ответ на поступающий стимул необходимы GTP или его негидролизуемый аналог—гуанилилимидодифосфат ($Gpp(NH)p$), связывающиеся с так называемыми G-белками, в комплекс которых входит и GTPаза. G-белки выполняют функцию непосредственных передатчиков сигнала с рецептора на фермент. Свойства G-белков АЦ системы изучены относительно подробно; так, показана возможность их рибоэпиглирования холерным токсином в присутствии NAD, что приводит к необратимой активации АЦ благодаря ингибированию GTPазы, обеспечивающей обычно обращение активации АЦ. АЦ активируется и NaF , который также воздействует на G-белки [5, 6].

С целью сравнения свойств систем сопряжения ФДЭ и АЦ со своими рецепторами в данной работе изучали влияние холерного токсина и NaF на ФДЭ НСП.

Вся работа выполнена на освещенных препаратах НСП сетчатки быка [7]. Из НСП, несколько модифицируя метод Купп [8], были получены и частично очищены два типа экстрактов: один, содержащий преимущественно ФДЭ (препарат 1), другой—G-белки (препарат 2). Мбелков этих экстрактов по данным диск-электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [9] соответствовали литературным данным [8, 10]. Опыты с холерным токсином проводили, как описано в работе Enomoto, Gill [11]. Активность ФДЭ P_i определяли, как и ранее, варьируя время инкубации и температуру [7].

В первой серии опытов изучали влияние ГТР (10^{-5} М), холерного токсина и NaF (10^{-2} М) на ФДЭ изолированных препаратов НСП.

Очевидно, что ГТР обуславливал существенную активацию ФДЭ (рис. 1, а). В том случае, если ГТР преникубировали с препаратами НСП 10—30 мин при 37°, активирующий эффект нуклеотида резко уменьшался с увеличением времени преникубации. Этот факт, скорее всего, связан с тем, что ГТРаза НСП обуславливала гидролиз ГТР до GDP и Pi, а GDP таким активирующим действием на ФДЭ в отличие от ГТР не обладает.

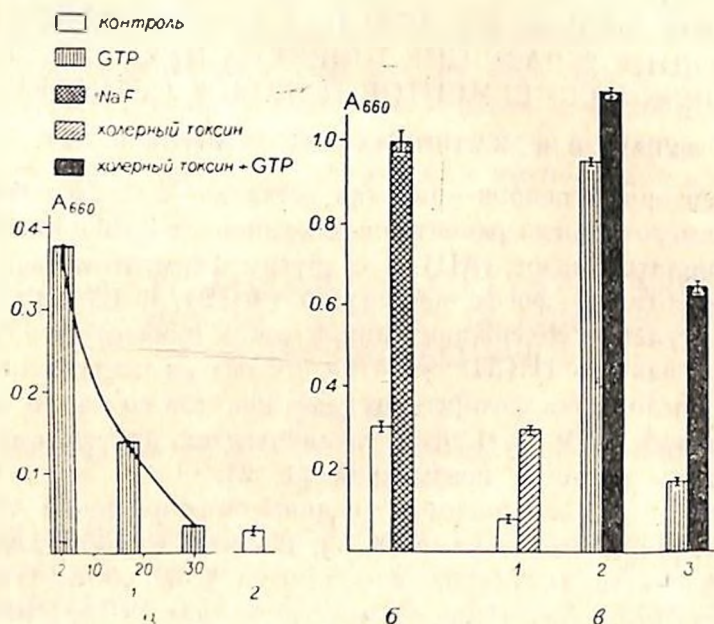


Рис. 1. Влияние ГТР (а), NaF (б) и холерного токсина (в) на ФДЭ в НСП. Ось абсцисс: 1, а—время преникубации ГТР в мин с препаратами НСП; 2, а—активность ФДЭ без ГТР; б—активность ФДЭ в присутствии NaF; 1, в—активность ФДЭ в контроле и опыте; 2, в и 3, в—активность ФДЭ в контроле и опыте в присутствии ГТР (преникубация ГТР с НСП—2 мин и 30 мин соответственно). Ось ординат—активность ФДЭ в единицах оптической плотности при 660 нм. Средние данные из 5—6 опытов

Из данных, представленных на рис. 1, б и в, видно, что как NaF, так и холерный токсин активировали ФДЭ НСП. Косвенным доказательством воздействия холерного токсина именно на ГТРаза НСП являются данные опытов с преникубацией ГТР с НСП (рис. 1, а; 2, 3 в). Очевидно, что в то время как в контрольных пробах активирующее действие ГТР на ФДЭ уменьшалось в 5,9 раза (ГТР гидролизует), в опытных это уменьшение составляло всего 1,6 раза. Наиболее возможная причина этого—ингибирование активности ГТРаза за счет ее рибозилирования.

Таким образом, результаты, полученные в первой серии экспериментов, свидетельствуют о том, что NaF и холерный токсин влияют на ФДЭ в НСП так же, как и на АЦ.

В случае АЦ системы отделение G-белков приводило к потере чувствительности АЦ к F^- [5, 6]. Исходя из полученных нами данных, очевидно, что активация ФДЭ (препарат 1) $Gpp(NH)p(10^{-5}M)$ имеет место лишь при добавлении препарата 2, то есть G-белков (рис. 2, а), и действие фторида обусловлено его влиянием (как и в случае АЦ) на G-белки (рис. 2, б). Незначительная активация препарата ФДЭ фторидом объясняется примесью G-белков в последнем.

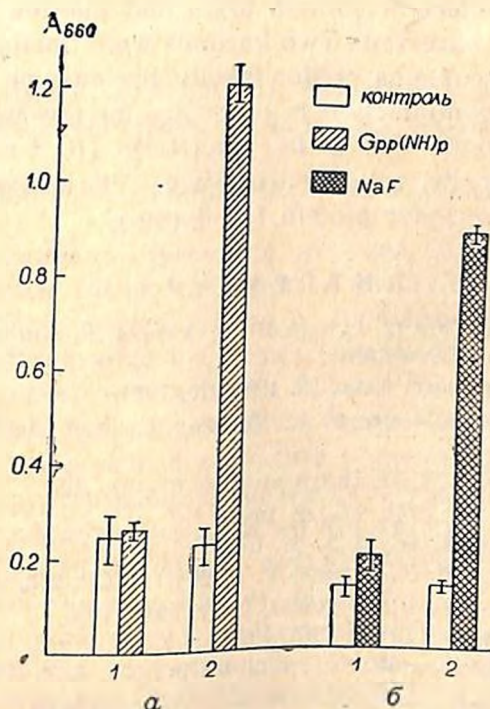


Рис. 2. Влияние $Gpp(NH)p$ (а) и NaF (б) на ФДЭ в реконструированных системах. Ось абсцисс: 1—активность ФДЭ (препарат 1), 2—активность ФДЭ (препарат 1+препарат 2). Ось ординат—активность ФДЭ в единицах оптической плотности при 660 нм. Средние данные из 5—6 опытов

Таким образом, и по характеру влияния, и по направлению действия фторида и холерного токсина на ФДЭ систему подобно действию этих агентов на АЦ систему.

Следует отметить, что в отличие от результатов других исследований [12, 13], нам удалось активировать ФДЭ в реконструированных системах без добавления рецептора, то есть НСП, что требует дальнейшего изучения.

EFFECT OF CHOLERA TOXIN AND FLUORIDE ON CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE FROM RETINAL RODS OUTER SEGMENTS

FURAEV V. V., KALININA S. N., ETINGOF R. N.

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

The activatory effect of cholera toxin and fluoride (10 mM) on the phosphodiesterase is observed. Two fractions were obtained from the rods outer segments: one contains predominantly the enzyme and the other—G-proteins. The G-protein fraction is necessary for the activation of phosphodiesterase by fluoride ions or by Gpp(NH)p (10^{-2} mM). The cholera toxin effect is due to its action on GTPase. The activation takes place without addition of receptor protein (rhodopsin).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bitensky M. W., Wheeler G. L., Aloni B., Vetury S., Matuo Y. Adv. in Cyclic Nucl. Res., 9, 553—572, 1978.
2. Этингоф Р. Н. Успехи совр. биол., 92, 198—213, 1981.
3. Shinozawa T., Sen Y., Wheeler G. L., Bitensky M. W. Y. Supramolec. Struct., 10, 185—190, 1979.
4. Этингоф Р. Н., Думлер И. Л. Нейрохимия, 1, 87—98, 1982.
5. Rodbell M. Nature, 284, 3751, 17—22, 1980.
6. Ткачук В. А. Укр. биохим. ж., 53, 5—27, 1981.
7. Думлер И. Л., Фураев В. В., Этингоф Р. Н. ДАН СССР, 253, 1504—1508, 1980.
8. Kuhn H. Neurochemistry International, 1, 269—285, 1980.
9. Laemmli V. K. Nature, 227, 680—685, 1970.
10. Godchaux W., Zimmerman W. F. J. Biol. Chem., 254, 7874—7884, 1979.
11. Enomoto K., Gill D. M. J. Biol Chem., 255, 1252—1358, 1980.
12. Hurley Y. B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 505—510, 1980.
13. Fung B. R., Hurley Y. B., Stryer L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 152—156, 1981.

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

Поступила 7. VII 1982