



УДК 577.354.2

ХАРАКТЕРИСТИКИ И СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО 3',5'-ГУАНОЗИНМОНОФOSФАТА В НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТАХ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ СЕТЧАТКИ СУСЛИКА

КАЛИНИН Е. В., ОРЛОВА Т. Г., ФРЕЙДИН А. А., ОРЛОВ Н. Я.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Исследованы свойства фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов в различных типах препаратов из сетчатки суслика, подавляющую часть зрительных клеток которой составляют фоторецепторы системы фотооптического зрения—колбочки. Обнаружено, что данный фермент подобен по всем исследованным характеристикам ФДЭ циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP) наружных сегментов палочек—фоторецепторов скотопического зрения позвоночных. Методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы показано, что распределение активности ФДЭ совпадает с распределением светочувствительного пигмента, идентифицированного как зрительный пигмент колбочек сетчатки суслика. Относительное содержание фермента в сетчатке оценено величиной 4—6 молекул ФДЭ на 100 молекул зрительного пигмента колбочек. Полученные данные позволяют предположить, что сGMP-специфичная ФДЭ является эндогенным ферментом наружных сегментов фоторецепторов сетчатки суслика и может быть важным элементом системы фототрансдукции в рецепторах фотооптического зрения позвоночных.

По современным представлениям [1], уникальная специфичная к сGMP ФДЭ (КФ 3.1.4.1)—ключевой элемент ферментативного каскада усиления светового стимула в наружных сегментах палочек (НСП) сетчатки позвоночных (система скотопического зрения). Обесцвечивание молекулы зрительного пигмента родопсина, локализованного в мембранах дисков НСП, ведет к активации за 1 с до 1000 молекул ФДЭ и, таким образом, индуцирует значительное уменьшение концентрации сGMP [1], который выполняет роль диффузионного медиатора и способен непосредственно контролировать режим работы катионных каналов плазматической мембраны НСП [2]. Посредником в процессе фотоактивации ФДЭ в НСП является GTP-связывающий белок трансдукции [1].

ФДЭ НСП—периферический белок мембран дисков [1, 3]—легко экстрагируется из них растворами низкой ионной силы и состоит из трех субъединиц ФДЭ₁, ФДЭ₂ и ФДЭ₃, с $M_r \sim 88, 84$ и < 13 кД соот-

ветственно [1, 3]. Ее относительное содержание в НСП велико и составляет ~ 25 молекул фермента на 1000 молекул родопсина [4]; в режиме максимальной активности молекул ФДЭ гидролизует 4000—4500 молекул сGMP в секунду [4, 5]. В темноадаптированных НСП активность ФДЭ значительно подавлена в результате взаимодействия апофермента ФДЭ₁·ФДЭ₂ с субъединицей ФДЭ₃, характеризующейся высоким сродством к нему ($K_d \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ [5]) и играющей роль ингибитора его ферментативной активности [5, 6]. Субъединица ФДЭ₃ термостабильна, но легко инактивируется в присутствии трипсина [5, 6].

Результаты недавних работ, выполненных нами [7] и другими авторами [8], дают основания предполагать, что наружные сегменты колбочек (НСК) сетчатки позвоночных (система фотопического зрения) также содержат ФДЭ, специфичную к сGMP. Однако вопросы о функциональной роли этого фермента в НСК и степени подобия систем фототрансдукции палочек и колбочек пока остаются открытыми, а их решение требует ряда дополнительных данных и, в частности, данных о содержании ФДЭ в НСК и ее характеристиках. Исследования в этом направлении ограничены трудностями получения достаточно очищенных препаратов НСК: известные способы фракционирования гомогенатов сетчаток, содержащих как палочки, так и колбочки, не позволяют разделить НСП и НСК [9]; животные, обладающие преимущественно колбочковыми сетчатками (суслики, змеи, дневные ящерицы и т. д.), труднодоступны.

В настоящей работе для получения частично очищенных препаратов НСК использовали сетчатки сусликов (*Citellus undulatus*). Подавляющая часть ($>95\%$) фоторецепторов этих сетчаток—колбочки [10], содержащие зрительный пигмент с максимумом спектра поглощения $\sim 520 \text{ нм}$ [11]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в наружных сегментах фоторецепторов сетчатки суслика присутствует сGMP-специфичная ФДЭ, близкая по всем исследованным характеристикам детально изученной ранее ФДЭ НСП сетчатки быка [3]. Согласно выполненным оценкам, содержание ФДЭ в сетчатке суслика составляет 4—6 молекул фермента на 100 молекул зрительного пигмента. Совокупность этих данных не только подтверждает предположение о том, что сGMP-специфичная ФДЭ является эндогенным ферментом НСК, но и показывает, что этот фермент может быть ключевым элементом системы фототрансдукции рецепторов фотопического зрения.

Материалы и методы

Животных декапитировали при слабом комнатном освещении, глаза адаптировали к темноте в течение 2—3 ч при 20°. Последующие операции по препарированию сетчаток и их фракционированию проводили при слабом красном свете ($\lambda > 680 \text{ нм}$) и температуре 4° по описанному ранее методу [7] с некоторыми модификациями. Сетчатки резко встряхивали в течение 4—5 мин в 47% (вес/объем) растворе сахарозы, приго-

товленном на изотоническом буфере А (10 мМ трис-НСl, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 3,5 мМ KCl, 0,5 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ дитиотреитол), и центрифугировали 15 мин при 10000 g. Супернатант (S₁) собирали, гомогенизировали в тefлоновом гомогенизаторе, помещали на дно центрифужной пробирки, последовательно насливали 40%- и 30%-ный (вес/объем) растворы сахарозы, приготовленные на буфере А, а затем центрифугировали 1 ч при 100000 g. Материал, локализованный после центрифугирования на границе между 30%- и 40%-ными растворами сахарозы (препарат НСК) и в стартовом 47%-ном растворе сахарозы (препарат Ф₄₇) собирали, хранили в темноте при 0° и использовали в течение трех дней с момента получения. Выход препарата НСК составлял 100—300 мкг белка на сетчатку и в значительной мере определялся условиями гомогенизации. В качестве экстрактов препаратов НСК использовали супернатанты, полученные в результате гомогенизации препаратов НСК в растворе с низкой ионной силой (10 мМ трис-НСl, рН 7,4) и последующего центрифугирования (100000 g, 2 ч). Аналогичным образом получали экстракты фракции Ф₄₇.

В ряде опытов были использованы препараты S_r — супернатанты, полученные по несколько отличной от вышеописанной методике из сетчаток животных, адаптированных к темноте в течение 10—12 ч. Декапитацию животных, препарирование сетчаток и все последующие операции проводили в темноте или слабом красном свете. Сетчатки (1—2 шт.) помещали в 1—2 мл буфера А, резко встряхивали и центрифугировали 1 мин при 300 g. Полученный таким образом супернатант S_r собирали, хранили в темноте при 8—10° и использовали в работе в течение 20—30 мин после их получения.

НСП и ФДЭ НСП сетчатки быка выделяли, как описано ранее [7]. Препараты ингибиторной субъединицы ФДЭ из НСП сетчатки быка (И-НСП) получали по стандартному методу [5] с некоторыми модификациями. Суспензию НСП (концентрация по белку 1—3 мг/мл) в буфере А закисляли до рН 2—3 титрованием 0,1 М HCl, инкубировали при 100° в течение 5 мин, охлаждали до 20°, защелачивали до рН 7,6—8,0 добавлением 0,1 М NaOH и центрифугировали 30 мин при 10000 g. Супернатант собирали и использовали в качестве препарата И-НСП. Ингибитор ФДЭ из препарата НСК (И-НСК) получали аналогичным образом. Определение концентрации белка выполняли, как описано ранее [7].

Измерение активности ФДЭ в светоадаптированных препаратах проводили рН-метрическим методом [7]. Закисление среды в ходе реакции гидролиза сАМР или сGMP регистрировали спектрофотометрически по изменению пропускания рН-индикатора крезолового красного при 575 нм [7]. Реакционная среда (объем 1—2 мл) содержала 2—10 мМ трис-НСl (начальное значение рН 8,0, конечное значение рН > 7,8), 5 мМ MgCl₂, 25—50 мкМ крезоловый красный, сАМР или сGMP (0,02—15 мМ, «Sigma», США) и исследуемый препарат. За

исключением особо отмеченных случаев ФДЭ в препаратах предварительно активировали трипсином в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 мин при 30°. Протеолиз останавливали ингибитором трипсина из сои (40 мкг/мл). Реакции инициировали добавлением циклических нуклеотидов и вели 5—30 мин при 30°. Ингибиторную способность И-НСП и И-НСК определяли, измеряя рН-метрическим способом скорость гидролиза сАМР (2—10 мМ) трипсилизированными препаратами НСП и НСК до и после добавления препаратов ингибиторов. Опыты по изучению влияния видимого света ($\lambda > 540$ нм) на активность ФДЭ в препаратах S_7 проводили при температуре 20°, используя в качестве субстрата [14 C] сGMP (У.А. 55 мКи/ммоль, «Amersham», Англия). Реакционная смесь содержала (в мМ): трис-НСl—50, рН 7,4, NaCl—140, MgCl₂—5, [14 C] сGMP—2—3 (конечная У.А. 5—20 мКи/ммоль) и указанное количество препарата S_7 . Количество [14 C] GMP и [14 C] сGMP в пробах, взятых из реакционного объема в соответствующие моменты времени определяли в результате их разделения методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках «Kieselgel 60F₂₅₄» («Merck», ФРГ) в смеси изопропанол-аммиак-вода в соотношении 7:1:2 по объему с последующей резкой пластин и определением радиоактивности соответствующих зон на счетчике SL-4000 («Intertechnique», Франция) в толуольном сцинтилляторе. Фотоллиз препаратов S_7 и определение содержания обесцвеченного пигмента проводили по стандартной схеме [7, 9, 12].

Спектральные и спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР). Для полного обесцвечивания зрительного пигмента в образцах их облучали светом с $\lambda > 540$ нм в течение 2 мин.

Гель-фильтрацию экстрактов препаратов НСК и Ф₄₇ проводили на предварительно калиброванной с помощью белков-маркеров и декстрана колонке (55 см × 1 см) с сефакрилом S-200 («Pharmacia», Швеция) в 5 мМ трис-НСl, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 0,1 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ дитиотрептоле при скорости элюции 5 мл/ч и температуре 4°. В качестве маркеров использовали очищенную ФДЭ НСП [7], димер и мономер сывороточного альбумина быка, овальбумин, миоглобин кашалота и декстран с $M_r \times 10^{-3} = 180, 134, 67, 45, 18$ и 2000 Д соответственно. Поглощение элюата при 280 нм регистрировали с помощью проточного денситометра «Uvicord S» («ЛКВ», Швеция) при длине оптического пути 0,2 см. Объем собираемых фракций составлял 0,9 мл. ИЭФ экстрактов НСК и Ф₄₇ в градиенте плотности сахарозы в диапазоне рН 3,5—10 проводили при 0° на колонке с рабочим объемом 35 мл при концентрации амфолитов («ЛКВ», Швеция) 0,5% (по объему) и конечных значениях тока и напряжения 0,5 мА и 600 В в течение 24 ч. Объем собираемых фракций—1 мл.

Центрифугирование препаратов НСК при 100000 g в течение 2 ч в линейном градиенте концентрации сахарозы (25—45%, вес/объем), приготовленном на буфере А, проводили в пробирках с объемом 35 мл

в темноте при 10—15° в роторе со свободно подвешенными стаканами. Препарат НСК, разбавленный в 2,5 раза буфером А (объем 1—1,5 мл, концентрация белка 1—2 мг/мл) наносили на поверхность предварительно сформированного градиента концентрации сахарозы. Нанесение препарата и сбор фракций проводили при слабом красном свете ($\lambda > 680$ нм). Плотность раствора и концентрацию сахарозы в образцах определяли взвешиванием дозированного объема (100 мкл), отобранного из фракций.

Точность определения активности ФДЭ составляла 5—7%. Каждый из описанных в работе экспериментов был выполнен не менее 2—3 раз с практически одинаковыми результатами.

Результаты и обсуждение

Светоиндуцированные изменения спектральных характеристик препаратов НСК. Облучение препаратов НСК светом с $\lambda > 540$ нм приводило к уменьшению их поглощения в диапазоне 430—650 нм ($\lambda_m \sim 520$ нм) и его увеличению при длинах волн < 430 нм ($\lambda_m = 380—390$ нм) (рис. 1). Последующая инкубация образцов в темноте в течение 1—2 ч, а также их дальнейшее облучение не вызывали дополнительных спектральных изменений. Однако спектральные изменения, аналогичные представленным на рис. 1, можно было наблюдать в ре-

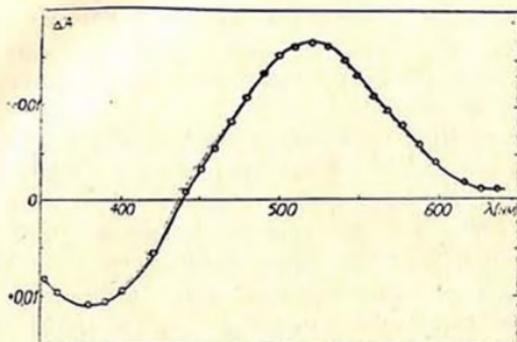


Рис. 1. Дифференциальный спектр, представляющий собой разность оптических плотностей (ΔA) обесвеченного и темноадаптированного препаратов НСК (концентрация белка 3,6 мг/мл). По оси абсцисс—длина волны λ (нм). Длина оптического пути — 0,5 см.

зультате темновой инкубации светоадаптированных препаратов НСК с 11-цис-ретиналом (но не его транс-формой) и их последующего облучения светом.

Описанное спектральное поведение характерно для зрительных пигментов позвоночных, распадающихся при фотолизе на белковую часть и хромофор ретиналь в полностью-транс-форме ($\lambda_m = 380—390$ нм) и восстанавливающих свои спектральные характеристики в ходе темновой реакции с 11-цис-ретиналом [12]. Следовательно, светочувствительный

пигмент препаратов НСК, по-видимому, является зрительным пигментом. Положение максимума его спектра поглощения ($\lambda_{\text{м}} \sim 520$ нм) указывает на то, что этот пигмент является зрительным пигментом НСК, а не НСП сетчатки суслика [11]. Спектральных изменений, свидетельствующих о присутствии светочувствительных пигментов в других препаратах, полученных при фракционировании сетчаток суслика, не наблюдалось.

Содержание зрительного пигмента колбочек в сетчатке суслика определяли путем измерения величины фотоиндуцированного уменьшения поглощения при 520 нм в препаратах НСК, полученных из известного количества сетчаток. Значение молярного коэффициента экстинкции было равно $40000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [12]. По данным 6 определений, выполненных на 4 независимо полученных препаратах НСК, сетчатка суслика содержала 65 ± 18 пмоль зрительного пигмента колбочек.

Близкая величина получена нами в результате оценки, выполненной иным образом. Известно [12], что концентрации зрительных пигментов в фоторецепторах сумеречного и дневного зрения позвоночных близки и составляют около 3 мМ. Данные электронномикроскопического анализа [13, 14] позволяют рассчитать, что сетчатка суслика содержит $1,2-1,5 \cdot 10^6$ колбочек, наружные сегменты которых имеют длину ~ 7 мкм и диаметр ~ 2 мкм. Таким образом, их общий объем составляет 0,026—0,033 мкл. Следовательно, содержание зрительного пигмента колбочек в сетчатке суслика должно составлять около 80—100 пмоль. Это дополнительно свидетельствует о том, что присутствующий в препаратах НСК пигмент с $\lambda_{\text{м}} \sim 520$ нм действительно является зрительным пигментом колбочек сетчатки суслика.

Характеристики ФДЭ препаратов НСК и Ф₄₇. Активность ФДЭ в препаратах S_1 составляла подавляющую часть ($>95\%$) активности гомогената сетчаток и находилась в пределах 0,8—1 мкмоль сGMP в мин на сетчатку. 60—70% ферментативной активности S_1 было обусловлено препаратом НСК. При центрифугировании препаратов НСК в линейном градиенте концентрации сахарозы распределение активности ФДЭ и светочувствительного пигмента с $\lambda_{\text{м}}$ при 520 нм полностью совпадали (рис. 2), при этом пигмент и материал, обладающий активностью ФДЭ, локализовались в зоне с плотностью 1,12—1,13 г/см³ (концентрация сахарозы $\sim 31-33\%$, вес/объем). Подобные значения плавающей плотности характерны для препаратов изолированных наружных сегментов фоторецепторов как палочек, так и колбочек сетчатки позвоночных [9]. Изложенные данные позволили предположить, что активность ФДЭ в препаратах НСК является результатом функционирования эндогенного фермента наружных сегментов фоторецепторов сетчатки суслика. В согласии с этим предположением в сравнительных экспериментах было показано, что ФДЭ в составе препаратов НСК сетчатки суслика подобна фоторецепторной ФДЭ НСП быка по чувствительности к действию трипсина и термостабильности (рис. 3). Высокая чувствительность к действию трипсина позволяет допустить, что

в наружных сегментах фоторецепторов может присутствовать протеолитический фермент, участвующий в регуляции активности ФДЭ.

Процессы гидролиза сАМР и сGMP препаратами НСК хорошо описывались кинетикой Михаэлиса. Полученные значения кинетических характеристик представлены в таблице. Преимущественным субстратом реакции всегда являлся сGMP. Пренникубация препаратов НСК с трипсином увеличивала скорость гидролиза циклических нуклеотидов в 8—15 раз и заметно уменьшала величины K_m . Значения удельных скоростей гидролиза сАМР и сGMP варьировали от препарата к препарату, однако их отношение было постоянной величиной для всех исследованных образцов (см. таблицу). Близкими кинетическими характеристиками описываются и процессы гидролиза циклических нуклеотидов препаратами НСП сетчатки позвоночных [3—5, 8].

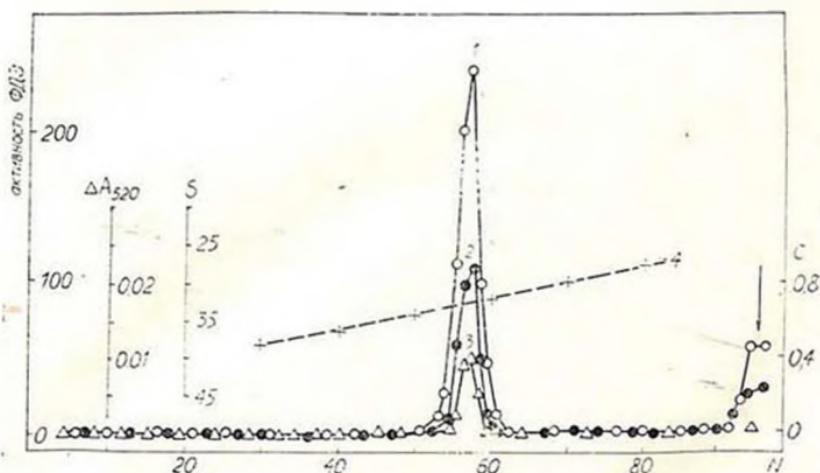


Рис. 2. Анализ препаратов НСК методом центрифугирования в линейном градиенте концентрации сахаразы. N—номер фракции. 1—активность ФДЭ при использовании в качестве субстрата 5 мМ сАМР (нмоль сАМР в мин на фракцию); 2—концентрация белка С (мг/мл) во фракциях; 3—относительное содержание светочувствительного пигмента с максимумом поглощения при 520 нм, измеренное как разность поглощения фракций в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при 520 нм (ΔA_{520}) до и после их облучения светом с $\lambda > 540$ нм; ∇ —концентрация сахаразы S (% , вес/объем). Вертикальной стрелкой отмечена зона, в которую был внесен препарат НСК. Объем фракций—0,35 мл

Результаты дальнейших экспериментов дали основания считать, что ФДЭ препаратов НСК сетчатки суслика, как и ФДЭ сетчатки позвоночных [1, 3], является водорастворимым ферментом. В самом деле, общая активность ФДЭ в экстрактах НСК, полученных при гомогенизации препаратов НСК в растворе с низкой ионной силой и последующего центрифугирования, составляла 70—80% общей ферментативной активности исходного препарата НСК. Последующий анализ экстрак-

тов НСК методами гель-фильтрации и ИЭФ показал (рис. 4), что ФДЭ, экстрагированная из препарата НСК, ведет себя как глобулярный белок с M_r около 180 кД и характеризуется значением pI 5,3—5,6. Такие результаты дополнительно свидетельствуют о подобии фермента препаратов НСК и ФДЭ НСП сетчатки позвоночных [3].

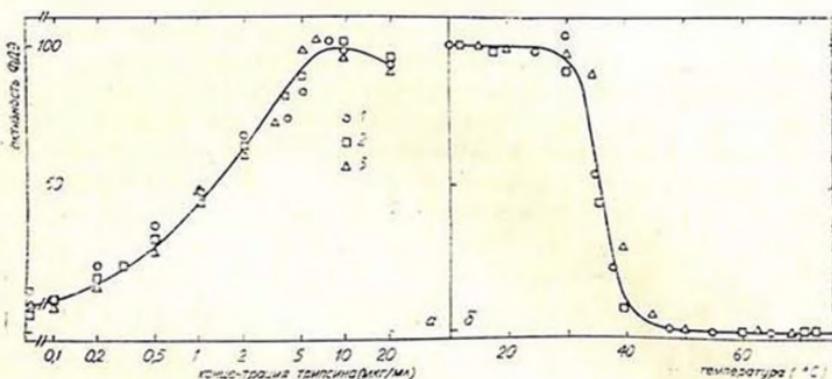


Рис. 3. Зависимости активности ФДЭ (в % от максимального значения) препаратов НСК (1), Ф₄₇ (2) сетчатки суслика и НСП сетчатки быка (3) от концентрации трипсина (а) и температуры прикубации (б): а—препараты НСК, Ф₄₇ и НСП (конечные концентрации 10³ белку 135, 160 и 50 мкг/мл соответственно) прикубировали с трипсином в указанных концентрациях в течение 2 мин при 30°. Активность ФДЭ измеряли при 8 мМ сАМР (1, 2) или 2 мМ сАМР (3). Уровни ферментативной активности, принятые за 100%, составляли 0,8, 0,115 и 3 мкмоль сАМР в мин на мг белка препаратом НСК, Ф₄₇ и НСП соответственно; б—препараты прикубировали в течение 10 мин при указанных температурах и быстро охлаждали до 10°. Значения удельной скорости гидролиза 8 мМ сАМР, принятые за 100%, составляли 0,6, 0,08 и 9 мкмоль сАМР в мин на мг белка препаратов НСК, Ф₄₇ и НСП соответственно

Заметная часть (25—30%) активности ФДЭ в супернатантах S_1 принадлежала препарату Ф₄₇. Эксперименты показали, что фермент, ответственный за гидролиз сАМР и сGMP препаратами Ф₄₇, подобен ФДЭ препаратов НСК по кинетическим характеристикам (см. таблицу), чувствительности к действию трипсина и термостабильности (рис. 3). Общая активность ФДЭ в экстрактах препаратов Ф₄₇ составляла подавляющую часть общей активности исходного препарата Ф₄₇ (>90%), а поведение элюированной формы фермента при гель-фильтрации и ИЭФ не отличалось от поведения ФДЭ, присутствующей в экстрактах препаратов НСК. Таким образом, ферменты препаратов НСК и Ф₄₇, скорее всего, подобны. По-видимому, присутствие ФДЭ в препаратах Ф₄₇ связано с частичной экстракцией фермента из фоторецепторных структур в процессе гомогенизации сетчаток и фракционирования гомогенатов.

Препараты И-НСК подавляли активированный трипсином процесс гидролиза сАМР как в препаратах НСК сетчатки суслика, так и в препаратах НСП сетчатки быка, причем степень ингибирования была примерно пропорциональна количеству И-НСК (рис. 5, а, б.). Предварительная инкубация И-НСК с трипсином (10 мкг/мл) в течение 10 мин при 20° полностью подавляла его ингибирующую способность. Это может означать, что в составе препарата НСК присутствует белковый компонент, близкий по своей термостабильности и функциональной активности субъединице ФДЭ фермента НСП сетчатки позвоночных. В

Таблица

Кинетические характеристики процессов гидролиза сАМР и сGMP препаратами НСК и Ф₄₂ сетчатки суслика

Параметр	Режим измерения ФДЭ-активности	Препарат	
		НСК	Ф ₄₂
$K_m^{сА}$ (мМ)	без трипсина	5.5±1.2	5.0±1.0
$K_m^{сG}$ (мМ)	без трипсина	0.25±0.10	0.3±0.12
$V^{сG}, V^{сА}$	без трипсина	1.2±0.3	1.3±0.4
$K_m^{сА}$ (мМ)	с трипсином	1.5±0.3	1.2±0.4
$K_m^{сG}$ (мМ)	с трипсином	0.10±0.03	0.11±0.03
$V^{сG}, V^{сА}$	с трипсином	2.7±0.7	2.7±0.6

Примечание. Индексы сА и сG при K_m и V означают субстрат (сАМР или сGMP соответственно), при использовании которого получены указанные в таблице значения. Каждое из приведенных значений является результатом измерений, выполненных не менее чем на трех независимо полученных препаратах.

последующих опытах было показано, что И-НСП подавляет гидролиз циклических нуклеотидов не только в препаратах НСП сетчатки быка, но и в препаратах НСК сетчатки суслика (рис. 5, в, г). Таким образом, субъединица ФДЭ из НСП сетчатки быка, по-видимому, может выступать в роли ингибитора фермента препарата НСК. Совокупность полученных данных хорошо согласуется с предположением о том, что присутствующий в препарате НСК сетчатки суслика фермент близок ФДЭ НСП сетчатки позвоночных.

В целях изучения принципов регуляции сGMP-специфичного фермента сетчатки суслика мы выполнили ряд опытов с использованием супернатантов S₁, полученных из сетчаток животных, длительно адаптированных к темноте. Кратковременное облучение светом таких препаратов в присутствии 25 мкМ GTP быстро увеличивало скорость гидролиза сGMP (рис. 6, а): активность ФДЭ в образце, содержащем ~10% обесцвеченного зрительного пигмента, была близка к активности фермента в полностью обесцвеченном препарате и составляла до 50% от величины активности ФДЭ в трипсинизированном супернатанте S₁ (рис. 6, а). В темноадаптированных супернатантах S₁ добавля-

ление ГТР не меняло активности сGMP-специфичной ФДЭ (рис. 6, а), однако, в согласии с полученными ранее результатами [7], в светоадаптированных образцах ГТР увеличивал скорость гидролиза сGMP в 2—3 раза (рис. 6, б). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что сGMP-специфичный фермент сетчатки суслика активируется при обесцвечивании зрительного пигмента, а ГТР, как и в НСП сетчатки позвоночных, играет роль кофактора в процессе фотоактивации ФДЭ.

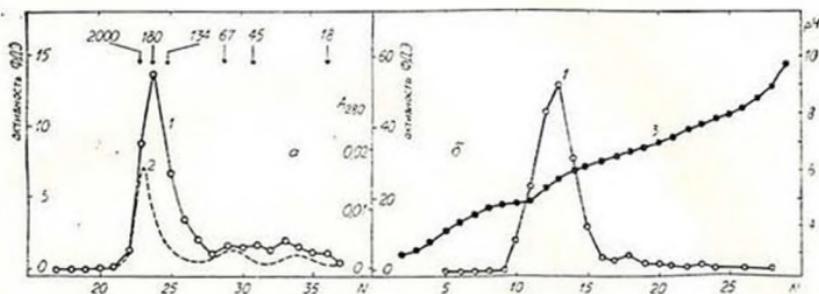


Рис. 4. Гель-фильтрация (а) и ИЭФ (б) экстрактов препаратов НСК. Разделению подвергали 100 мкл (а) и 300 мкл (б) экстрактов с коэлюцией по белку 0,8 мг/мл и величиной У. А. ФДЭ 1,2 мкмоль сАМР в мин на мг белка (при 8 мМ сАМР). N—номер фракции. Стрелками показаны фракции, в которых элюировались белки-маркеры и декстрин указанных значений $M_r \times 10^{-3}$. 1—активность ФДЭ (нмоль сАМР в мин на фракцию), 2—поглощение азюата при 280 нм (A_{280}), 3—значение рН в полученных фракциях

Известно [4, 5], что максимальная скорость гидролиза сGMP фосфодиэстеразой НСП очень велика ($\sim 0,25$ мкмоль сGMP в мин на пмоль фермента) и практически равна предельному значению V (ограниченному диффузией) для фермента с K_m около 10^{-4} М. Согласно данным настоящей работы, сGMP-специфичная ФДЭ фоторецепторов сетчатки суслика подобна ФДЭ НСП сетчатки быка по всем использованным для сравнения характеристикам. Это дает основание считать, что величина максимальной удельной активности фермента фоторецепторов сетчатки суслика не может значительно превышать приведенное выше значение V . Согласно нашим данным, сетчатка суслика способна гидролизовать 0,8—1 мкмоль сGMP в мин. Следовательно, фоторецепторные структуры этой сетчатки содержат не менее 3—4 пмоль ФДЭ.

Количество зрительного пигмента с $\lambda_{max} \sim 520$ нм в сетчатке суслика составляет около 65 пмоль, следовательно на 100 молекул зрительного пигмента колбочек приходится не менее 4—6 молекул ФДЭ. Относительное содержание ФДЭ в НСП сетчатки позвоночных составляет около 2 молекул фермента на 100 молекул родопсина [4], а в сетчатке суслика налочки составляют не более 5% от общего количества фото-

рецепторных клеток [10]. Таким образом, результаты выполненного выше расчета фактически исключают возможность того, что гидролиз циклических нуклеотидов в препаратах сетчатки суслика является результатом функционирования ФДЭ НСП. Следовательно, обнаруженная нами cGMP-специфичная ФДЭ, скорее всего, является эндогенным ферментом колбочек.

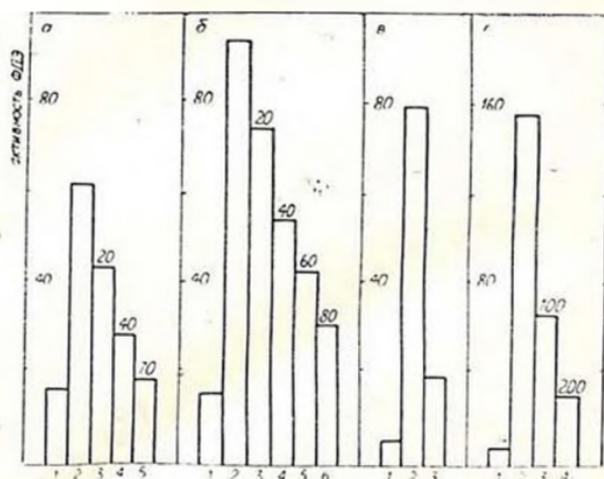


Рис. 5. Влияние препаратов И-НСК (а, б) и И-НСП (в, г) на скорость гидролиза 2 мМ сАМР (а, б) и 10 мМ сАМР (в, г) препаратами НСК сетчатки суслика (а, в) и НСП сетчатки быка (б, г). 1, 2—активность ФДЭ (нмоль сАМР в мин на пробу) в препаратах НСК и НСП до и после их инкубации с трипсином соответственно. 3, 6—активность ФДЭ в препаратах НСК и НСП после добавления указанных количеств (в мкл) препаратов И-НСК или И-НСП. Объем реакционной смеси—2 мл

Полученные нами данные показывают, что в НСК сетчатки суслика присутствует фермент, подобный ФДЭ НСП по своим кинетическим характеристикам во всех исследованных режимах его функционирования, термостабильности, чувствительности к действию трипсина, поведению при его анализе методом гель-фильтрации, значению рI, способности заметно активироваться в присутствии обесцвеченного зрительного пигмента и GTP, а также ингибироваться термостабильным трипсининактивируемым белковым компонентом, функционально подобным субъединице ФДЭ НСП сетчатки быка. Результаты выполненного нами ранее исследования [7] позволяют предполагать, что в состав ФДЭ НСК сетчатки суслика входят субъединицы с M_r около 90 кД. Это хорошо согласуется с данными работы Hurwitz и соавт. [8], в которой было продемонстрировано, что НСК сетчатки позвоночных содержат фермент, иммунологически родственный ФДЭ НСП. Хотя поведение этого фермента при его анализе методом ИОХ несколько отличалось от поведения ФДЭ НСП, он, как и ФДЭ НСП, обладал

ярко выраженной специфичностью к сGMP, имел в своем составе субъединицы с $M_r \sim 90$ кД и активировался в присутствии трансдуцина НСП и GTP [8]. Совокупность этих результатов, а также полученные нами данные, согласно которым содержание ФДЭ в НСК не ниже, чем в НСП, дают веские основания предполагать, что колбочки, как и палочки, содержат ферментативный каскад усиления зрительного стимула, ключевым элементом которого является ФДЭ, посредником—GTP, связывающий белок, а сGMP играет роль диффузионного медиатора. Это заключение хорошо согласуется с данными о наличии в НСК GTP-связывающего белка [15] (по-видимому, несколько отличающегося от трансдуцина [16]) и высоком содержании в колбочках сGMP [17], способного, как и в палочках, управлять катионной проводимостью фоторецепторных мембран [18, 19].

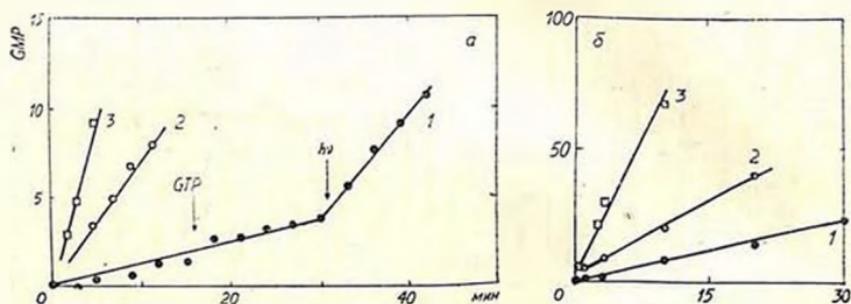


Рис. 6. Действие света (а) и GTP (а, б) на процессе гидролиза [^{14}C] сGMP темноадаптированными (а) и светсадаптированными (б) препаратами супернатантов S_T . По оси абсцисс—время реакции (мин). GMP—количество образовавшегося [^{14}C] GMP (нмоль) в реакционной смеси (объем 30 мкл). Реакции инициировали добавлением [^{14}C] сGMP до конечных концентраций 3 мМ (а) и 2,5 мМ (б). Реакционная смесь содержала 3 мкл (а) и 15 мкл (б) препарата S_T , полученных в результате двух независимых выделений: а—и отмеченные стрелками моменты времени в реакционную смесь добавляли GTP до конечной концентрации 25 мкМ и облучали образец в течение 20 с светом с $\lambda > 540$ нм, облучившим $\sim 10\%$ зрительного пигмента. Кинетики гидролиза [^{14}C] сGMP предварительно полностью обесвеченными и преинкубированными с 25 мкМ GTP препаратами S_T (2) или препаратами S_T , преинкубированными с трипсином в стандартных условиях (3), приведены для сравнения; б—кинетики гидролиза [^{14}C] сGMP светозадаптированными препаратами S_T в отсутствие GTP (1), в присутствии 25 мкМ GTP (2) и после предварительной инкубации препарата S_T с трипсином в стандартных экспериментальных условиях (3)

Хорошо известно [20], что колбочка, в отличие от палочки, характеризуется относительно низкой чувствительностью, но обладает высоким быстродействием и способна работать в широком диапазоне интенсивностей света. Это предполагает наличие некоторых отличий в характеристиках систем фототрансдукции НСП и НСК. Поиску и исследованию таких отличий будет посвящена наша последующая работа.

CYCLIC 3',5'-GUANOSINEMONOPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE PROPERTIES AND CONTENT IN THE GROUND SQUIRREL RETINAL PHOTORECEPTORS OUTER SEGMENTS

KALININ E. V., ORLOVA T. G., FREIDIN A. A., ORLOV N. J.
Institute of Biological Physics of the USSR Academy of Sciences,
Poustchino, Moscow region, USSR

The cyclic nucleotides hydrolysis in the different preparations of cone-dominant ground squirrel retinas has been investigated. Data obtained indicate that this retina contains the cGMP-specific PDE (cGMP-PDE). The characteristics of this enzyme are very similar to those of cGMP-PDE in vertebrate retinal rod outer segments. This enzyme sediments with cone visual pigment containing membranes at sucrose density linear gradient centrifugation. The cGMP-PDE content in the ground squirrel retina has been estimated to be 4–6 copies of enzyme molecules per 100 molecules of cone visual pigment. These results suggest that cGMP-PDE is an endogenous enzyme of cones and may play an important role in phototransduction in vertebrate photopic vision receptor cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stryer L., Hurley J. B., Fung B. K.—K. Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 245—247, 1981.
2. Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lyubursky A. L., Nature, v. 313, p. 310—313, 1985.
3. Baehr W., Dewlin M. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem., v. 254, p. 11669—11677, 1979.
4. Staramayya A., Harkness J., Parkes J. H., Gonzalez-Oliva C., Liebman P. A. Biochemistry, v. 25, p. 651—656, 1986.
5. Hurley J. B., Stryer L. J. Biol. Chem., v. 257, p. 11094—11099, 1982.
6. Dumler I. L., Etingoff R. H., Biochim. et biophys. acta, v. 479, p. 474—484, 1976.
7. Орлов Н. Я., Калинин Е. В., Орлова Т. Г., Фрейдлин А. А., Ивануцкий Г. Р. Докл. АН СССР, т. 286, с. 454—457, 1986.
8. Hurwitz R. L., Bant-Mllam A. H., Chang M. L., Beauvo J. A. J. Biol. Chem., v. 260, p. 568—573, 1985.
9. Matsumoto H., Takunaga F., Yoshizawa T. Biochim. et biophys. acta, v. 404, p. 300—308, 1975.
10. West R. W., Dowling G. J. J. Comp. Neurol., v. 159, p. 439—460, 1975.
11. Jakobs G. H., Netzl J., Croguale M. J. Comp. Physiol., v. A156, p. 503—509, 1985.
12. Fein A., Shutz E. Z., Photoreceptors. Their role in vision. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1982.
13. Anderson D. H., Fisher S. K. J. Ultrastruct. Res., v. 55, p. 119—141, 1976.
14. DeVries G. W., Cohen A. I., Lowry O. H., Ferendelly J. A. Exp. Eye Res., v. 29, p. 315—321, 1979.
15. Fukada Y., Aktino I. Photochem. Photobiophys., v. 11, p. 269—279, 1986.
16. Grunwald G. B., Gierschik P., Nirenberg M., Spiegel A. Science, v. 231, p. 856—859, 1986.
17. Ortez R. A., Tamayo A., Johnson C., Sperling H. G. J. Histochem. and Cytochem., v. 31, p. 1305—1311, 1983.
18. Haynes L., Yau K.—W. Nature, v. 317, p. 61—64, 1985.
19. Cobbs W. H., Barkdoll A. E., Rugh Jr. E. N. Nature, 317, p. 64—66, 1985.
20. Paylor D. A., Nunn B. J. Methods Enzymol., v. 81, p. 403—423, 1982.