



УДК 547.963.4 : 543.4

ВЛИЯНИЕ  $\text{Ca}^{2+}$  НА СПЕКТРЫ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА  
СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОГО РОДОПСИНА \*

Слободянская Е. М.

*Институт химической физики Академии наук СССР,  
Москва*

Добавление  $\text{Ca}^{2+}$  к дигитонинovому экстракту родопсина приводит к изменениям его спектров КД как в УФ-, так и в видимой областях. Они обусловлены, вероятно, изменением конформации зрительного пигмента, вызванными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Образование агрегатов дигитониновых мицелл родопсина в подобных условиях, согласно данным седиментационного анализа, исключается. Показано, что изменение конформации родопсина при его взаимодействии с  $\text{Ca}^{2+}$  не связано с его обесцвечиванием, так как при этом его спектры поглощения не меняются.

Информация о поглощении света молекулами зрительного пигмента (родопсина), локализованными в мембране диска наружного сегмента, должна передаваться к плазматической мембране зрительной клетки с помощью какого-то медиатора. Предполагается, что таким внутриклеточным медиатором могут быть ионы  $\text{Ca}^{2+}$  [1, 2]. Согласно этой гипотезе, возникновение рецепторного потенциала (зрительного сигнала) — следствие блокирования кальцием натриевых каналов наружной клеточной мембраны. В последнее время было показано [3], что наружные сегменты содержат  $\text{Ca}^{2+}$  двух типов: прочно связанный с фоторецепторной мембраной (часть его при освещении переходит в среду инкубации [4]) и свободный.

Можно представить себе несколько способов восстановления в темноте после освещения исходной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме междискового пространства наружного сегмента. Например, активный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы, локализованной в фоторецепторной мембране, или сорбция  $\text{Ca}^{2+}$  молекулярными компонентами этой мембраны.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая АТФ-аза действительно была найдена в наружных сегментах палочек (НСП) [5, 6]. С другой стороны, появились сведения о способности фрагментов наружных сегментов связывать  $\text{Ca}^{2+}$  [7], причем этот процесс происходит интенсивнее в темноте, чем на свету.

Представляет существенный интерес исследовать возможность изменения конформации зрительного пигмента при его взаимодействии с  $\text{Ca}^{2+}$ .

Один из наиболее информативных методов изучения изменения конформации белков — метод кругового дихроизма (КД). Методом КД изучалось изменение конформации различных растворимых белков при их взаимодействии с металлами [8—12]. В частности, при взаимодействии таких белков, как тропонин [10], лизоцим [11] и растворимые фрагменты эластина

\* Работа выполнена в рамках проекта «Родопсин»

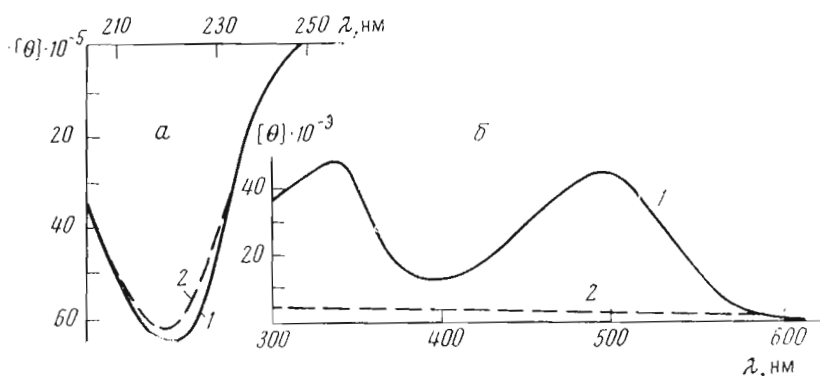


Рис. 1. Спектр КД дигитонинового экстракта родопсина: темного (1) и после обесцвечивания (2). Концентрация белка 0,2 мг/мл (а), 1,0 мг/мл (б);  $P_{280}$  2,7; 2%-ный дигитонин

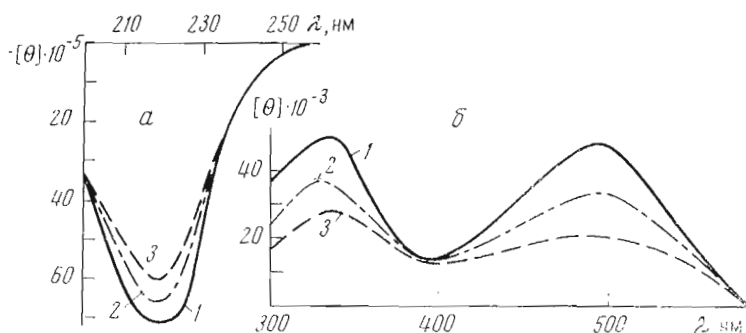


Рис. 2. Спектр КД родопсина без солей и в присутствии  $\text{Na}^+$  (1),  $\text{Mn}^{2+}$  (2) и  $\text{Ca}^{2+}$  (3). а — концентрация белка 0,2 мг/мл, солей — 5 мМ; б — концентрация белка 1 мг/мл, солей — 60 мМ;  $P_{280}$  2,8—3,0; 2%-ный дигитонин

[12], с двухвалентными металлами было обнаружено изменение спиральности молекул. В работах [11, 12] рассчитаны, кроме того, константы связывания.

Изучали также изменения спектров КД, вызванные взаимодействием металлов с фрагментами биологических мембран. Если в случае растворимых белков влияние ионов металлов на спектры КД рассматривалось только как отражение изменения белковой конформации, то в случае фрагментов мембран изменения, вызванные добавлением солей, относили за счет агрегации, не разделяя эффектов действительно агрегации и возможного изменения конформации белковой молекулы. В качестве примера можно привести работы [13, 14], где добавление  $\text{Ca}^{2+}$  к фрагментам плазматических мембран приводило к «красному сдвигу» спектра и уменьшению интенсивности полос КД.

Целью настоящей работы было исследование взаимодействия солибилизированного дигитонином родопсина с  $\text{Ca}^{2+}$  методом КД.

При спектральных исследованиях систем, содержащих подобно дигитониновому экстракту родопсина крупные, оптически активные частицы, возникают некоторые трудности в интерпретации результатов, поскольку истинная картина может осложняться различными артефактами, обусловленными в первую очередь светорассеянием и приводящими к изменениям интенсивности полос и «красному сдвигу» спектра [17, 18].

Известно [19], что дигитониновая мицелла родопсина состоит из одной молекулы хромопротеида, окруженной большим числом молекул липидов и дигитонина. Она имеет константу седиментации порядка 10 S, что

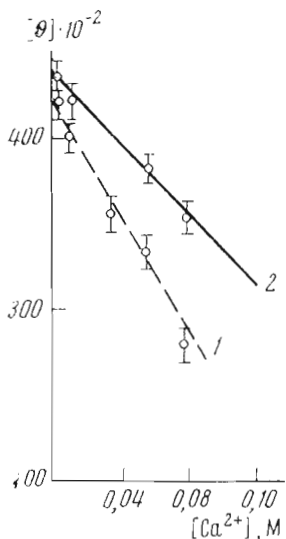


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость  $[\theta]_{490}$  (1) и  $[\theta]_{340}$  (2) от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .  $P_{280}$  2,8—3,0. Концентрация белка 0,8—1,0 мг/мл

Рис. 4. Поглощение дигитонинового экстракта родопсина без  $\text{Ca}^{2+}$  (1) и в присутствии 50 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .  $P_{280}$  2,7; 1,8%-ный дигитонин

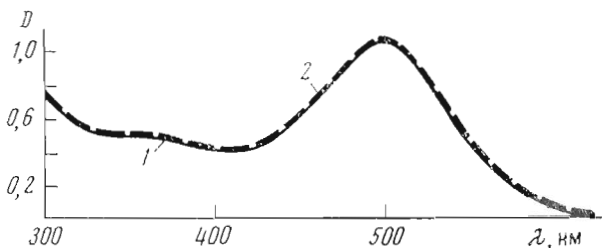


Рис. 4

соответствует молекулярному весу мицеллы около 300 000 при молекулярном весе белка порядка 40 000 [20].

Спектр КД дигитонинового экстракта родопсина в видимой и УФ-областях (рис. 1) характеризуется [15, 16] тремя эффектами Коттона: отрицательным при 220 нм и двумя положительными при 340 и 490 нм, соответствующими трем полосам в спектре поглощения. Максимумы в видимой области обусловлены хромофорной группой. При освещении родопсина они исчезают, в то время как в УФ-области в этих условиях происходит лишь незначительное уменьшение интенсивности.

Было показано, что взаимодействие родопсина с  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к изменению спектров КД\*: уменьшению эффектов Коттона в видимой и УФ-областях (рис. 2). На рис. 3 представлены зависимости  $[\theta]_{340}$  и  $[\theta]_{490}$  от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Наклон прямых на этом графике различен, т. е. максимум при 490 нм более чувствителен к взаимодействию родопсина с  $\text{Ca}^{2+}$ , чем эффект Коттона при 340 нм.

Эффект действия  $\text{Ca}^{2+}$  на спектры КД родопсина сравнивался с действием на них других одно- и двухвалентных катионов. Как следует из спектров, представленных на рис. 2, ионы  $\text{Na}^+$  в концентрации, в несколько раз превышающей концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ , не вызывают никаких изменений в спектрах КД. Ионы  $\text{Mn}^{2+}$  изменяют спектр КД родопсина, однако лишь в значительно больших концентрациях, чем  $\text{Ca}^{2+}$ .

Была предпринята попытка с помощью лизиса фрагментов НСП удалить  $\text{Ca}^{2+}$ , не связанный с компонентами фоторецепторной мембраны. Установлено, что описанные выше изменения в спектрах КД дигитониновых экстрактов не зависят от того, из какой суспензии НСП (лизированной или нелизированной) были получены экстракты. Однако после удаления из фоторецепторной мембраны с помощью ЭДТА  $\text{Ca}^{2+}$ , связанного с родопсином, эффект изменения спектров КД родопсина при последующем добавлении  $\text{Ca}^{2+}$  к дигитониновому экстракту не наблюдался.

Введение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в дигитониновый экстракт родопсина не отражается на его спектрах поглощения (рис. 4). Следовательно, изменение спектра КД не связано с обесцвечиванием родопсина.

Не происходит также заметных изменений при длинах волн больше 600 нм, т. е. в области, где отсутствует собственное поглощение зритель-

\* Автор приносит глубокую благодарность Г. А. Когану и А. И. Полетаеву за предоставленную возможность провести измерения на спектрополяриметрах.

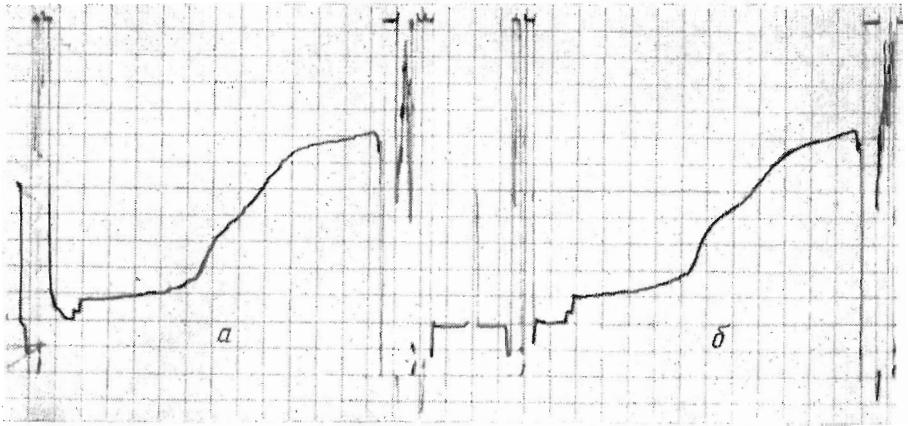


Рис. 5. Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на седиментационное поведение дигитониновых мицелл родопсина. Концентрация белка 0,8 мг/мл.  $P_{280}$  2,3. Скорость вращения ротора 52 000 об/мин. Время опыта 1,5 ч. *a* — образец без  $\text{Ca}^{2+}$  (71 мин от начала опыта), *б* — в присутствии 100 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (73 мин от начала опыта)

ного пигмента и где изменение спектра могло бы быть связано только с увеличением светорассеяния. Таким образом, при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$  мутность экстрактов не возрастает.

В связи с тем что  $\text{Ca}^{2+}$  обладает способностью вызывать слипание фрагментов мембран, представлялось целесообразным исследовать, не связано ли изменение спектров КД родопсина при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$  с агрегацией дигитониновых мицелл, содержащих родопсин. Из приведенных на рис. 5 седиментограмм видно, что поведение дигитониновых экстрактов родопсина в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и без него весьма сходно, что отрицает возможность агрегации.

Следовательно, изменения спектров КД родопсина при добавлении солей двухвалентных металлов не вызваны ни его обесцвечиванием, ни увеличением мутности экстрактов, ни агрегацией дигитониновых мицелл, содержащих родопсин. Можно предположить, что этот факт связан с изменением состояния пептидной цепи молекулы (что обуславливает уменьшение эллиптичности при 220 нм в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ ), а также с изменением конформации в области хромофорного центра, о чем свидетельствуют изменения в видимой области спектра КД.

Таким образом, показано, что молекула родопсина способна взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Экспериментальная часть

Суспензию наружных сегментов палочек крупного рогатого скота получали по методике, описанной в работе [21]. Спектральный критерий чистоты —  $P_{280}$  — препаратов суспензии, использованных в работе, не превышал 2,5.

Лизис НСП проводили при добавлении 20-кратного избытка деионизованной воды с последующим осаждением при 48 000 *g* в течение 30 мин на центрифуге «Beckman JA21B» (США). В некоторых опытах НСП предварительно обрабатывали ЭДТА (5 мг ЭДТА на 20 мг НСП), а затем дважды отмывали водой. Дигитониновые экстракты родопсина получали при обработке суспензии НСП 2%-ным раствором дигитонина в воде. 2%-ный дигитонин получали после осаждения его 4%-ного раствора в воде. Использовали дигитонин фирмы «Fluka» (Швейцария). Для получения прозрачных экстрактов их центрифугировали при 50 000 *g* в течение 30 мин.  $P_{280}$  экстрактов не превышал 3,0. Концентрацию родопсина определяли по поглощению при 500 нм, принимая молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{500}$  равным 40 600 [22]. Использовали соли  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$

квалификации х. ч. Образцы родопсина для спектральных опытов готовили следующим образом: при слабом красном свете к исходному экстракту добавляли аликвоты солей или воды; на одних и тех же образцах в темноте снимали спектры поглощения и КД; в качестве контроля использовали экстракты родопсина, разбавленные водой. Разбавление экстрактов производили непосредственно перед началом съемки спектра. Спектры КД регистрировали на приборах «Cary-60» (США), снабженном приставкой типа CD-6002, и «Jouan-2» (Франция). Температура 25° С. Длина оптического пути — 0,01 см для области 190—250 нм и 1 см для области 300—600 нм. Молекулярную эллиптичность рассчитывали по известным формулам [15], принимая молекулярный вес родопсина равным 40 000. Спектры поглощения получали в 1-см кювете на спектрофотометрах «Cary-15» (США) и «Specord» (ГДР).

Седиментационные измерения проводили при 25° на аналитической ультрацентрифуге «Beckman» — модель Е с ультрафиолетовой абсорбционной оптикой. Ротор ANFTi.

Приношу глубокую благодарность д-ру биол. наук М. А. Островскому и канд. биол. наук И. Б. Федорович за критические замечания и полезные советы при выполнении этой работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hagins W. A. (1972) Annual Rev. Biophys. and Bioeng., 1, 131—158.
2. Hagins W. A., Joshikami S. A. (1974) Exp. eye res., 18, 299—306.
3. Hendriks Th., Daemen F. Z. M., Bonting S. L. (1974) Biochim. et biophys. acta, 345, 468—475.
4. Poo M. M., Cone R. A. (1973) Exp. eye res., 17, 503—510.
5. Bounds D., Gordon-Walker A., Gaide-Huguenin A.-C., Robinson W. (1971) J. Gen. Physiol., 58, 225—237.
6. Ostwald T. J., Heller J. (1972) Biochemistry, 11, 4679—4686.
7. Hemminki K. (1975) Vision res., 15, 69—72.
8. Nickerson K. W., van Holde K. E. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2022—2030.
9. Kalb A. J., Pecht I. (1973) Biochim. et biophys. acta, 303, 264—268.
10. Abatangelo G., Daga-Gordin D., Tamburro A. M. (1973) Int. J. Peptide Protein Res., 5, 63—68.
11. McCubbin W. D., Kay C. M. (1973) Biochemistry, 12, 4228—4232.
12. Ikeda K., Hamaguchi K. (1973) J. Biochem., 73, 307—322.
13. Litman B. J. (1972) Biochemistry, 11, 3243—3247.
14. Gordon A. S., Wallach D. F. H., Straus J. H. (1969) Biochim. et biophys. acta 183, 405—416.
15. Shichi H. (1971) Photochem. and Photobiol., 13, 499—502.
16. Федорович И. Б. (1968) Биофизика, 13, 322—324.
17. Gordon D. J., Holzwarth G. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2365—2369.
18. Urry D. W., Krivacic J. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 845—852.
19. Hubbard R. (1954) J. Gen. Physiol., 37, 381—399.
20. Daemen F. J. M., De Grip W. J., Jansen P. A. A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 271, 419—428.
21. Остапенко И. А., Берман А. Л., Этингер П. И. (1969) Биохимия, 34, 1028—1033.
22. Wald G., Brown P. K. (1953) J. Gen. Physiol., 37, 189—198.

Поступила в редакцию  
4.VII.1975

### THE INFLUENCE OF Ca<sup>2+</sup> ON CIRCULAR DICHROISM SPECTRA OF SOLUBILIZED RHODOPSIN

SLOBODYANSKAYA E. M.

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

The addition of Ca<sup>2+</sup> to digitonin extract of rhodopsin is shown to modify its CD spectra both in peptide and visible region. The changes might be caused by Ca<sup>2+</sup> induced conformational change of visual pigment. The aggregate formation in rhodopsin digitonin micelles is ruled out by the results of sedimentation analysis. It is also found that the conformational change does not arise from unbleaching because there is no change in the rhodopsin absorption spectra.