

На правах рукописи

АСТАХОВА

Любовь Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ВЫКЛЮЧЕНИЯ КАСКАДА
ФОТОТРАНСДУКЦИИ И СВЕТОВАЯ АДАПТАЦИЯ В
ПАЛОЧКАХ ЛЯГУШКИ**

03.00.13. - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2009

Работа выполнена в лаборатории эволюции органов чувств (заведующий – доктор биологических наук В.И. Говардовский) Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук М.Л. Фирсов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Е.В. Казначеева

кандидат биологических наук К.В. Большаков

Ведущее учреждение:

Институт физиологии им. И.П.Павлова

Защита состоится 10 марта 2009 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Учреждении Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, по адресу:

194223 Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д. 44, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан 05 февраля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор биологических наук,
профессор

Маслова Марина Николаевна

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Среди сигнальных каскадов сенсорных систем наиболее изученным является каскад зрительной трансдукции, благодаря которому поглощение кванта света приводит к генерации нервного импульса. Вторичным посредником в каскаде фототрансдукции является циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Его концентрация в наружных сегментах фоторецепторных клеток зависит от активности двух ферментов противоположного действия: гуанилатциклаза (ГЦ) синтезирует цГМФ, а фосфодиэстераза (ФДЭ) его гидролизует. При воздействии света запускается цепь биохимических превращений, активирующих ФДЭ, вследствие чего уровень цГМФ в наружном сегменте фоторецептора падает, и ионные каналы плазматической мембраны закрываются. Первым звеном каскада является зрительный пигмент родопсин, который возбуждается при поглощении фотона; родопсин активирует G-белок трансдукцин, а он в свою очередь катализирует гидролитическую активность ФДЭ.

Способность фоторецепторной клетки отвечать на световые стимулы восстанавливается, когда концентрация цГМФ в наружном сегменте возвращается к исходному уровню. Поскольку активность ГЦ в первом приближении от света не зависит, для этого необходимо, чтобы активность ФДЭ снизилась до темнового уровня. Обязательным условием снижения активности ФДЭ является инактивация родопсина и трансдукцина. Активность родопсина в значительной степени снижается за счет его фосфорилирования и окончательно выключается при связывании родопсина с аррестином. Комплекс трансдукцин-ФДЭ инактивируется самопроизвольно, в силу присущей α -субъединице трансдукцина ГТФазной активности. Трансдукцин гидролизует связанный с ним ГТФ до ГДФ, после чего комплекс трансдукцин-ФДЭ распадается и ФДЭ ингибируется. Инактивация родопсина регулируется обратными кальциевыми связями, в

то время как инактивация комплекса трансдуцин-ФДЭ до сих пор считалась кальций-независимой.

Очевидно, что скорости активации и инактивации ФДЭ при световой стимуляции являются ключевыми параметрами, определяющими скорость развития и выключения фотоответа. Значения этих параметров неоднократно определялись ранее в экспериментах *in vitro*, однако полученные величины, как правило, плохо согласуются со скоростью развития и выключения фотоответа в интактных клетках. Так, скорость гидролиза ГТФ, измеренная в биохимическом эксперименте на очищенной трансдуцине, оказалась слишком низкой и не соответствовала скорости восстановления темнового тока после вспышки в фоторецепторных клетках *in vivo* (Arshavsky et al., 1987). Аналогичные противоречия возникли и в отношении оценки скорости инактивации родопсина. В физиологических условиях выключение родопсина происходит за время меньше секунды, а определение скорости этого процесса *in vitro* дает результат в минутном диапазоне (Wilden & Kuhn, 1982; Gorodovikova et al., 1994).

На сегодняшний день кинетика этих процессов в интактных фоторецепторных клетках не определялась. Фактором, затрудняющим измерение этих параметров в живом фоторецепторе, является наличие отрицательных обратных кальциевых связей, которые жестко регулируют скорость выключения основных участников каскада, в результате чего параметры реакции существенно меняются в ходе ее протекания. В данной работе это препятствие было преодолено применением методики так называемого «кальциевого клампа» (фиксации внутриклеточной концентрации Ca^{2+}), которая в сочетании со специальным алгоритмом вычислений позволила восстановить временной ход активности ФДЭ после светового стимула. Знание кинетики активации и инактивации ФДЭ позволило, в свою очередь, определить кинетику выключения родопсина и трансдуцина. Применение же фиксации внутриклеточной концентрации

Ca^{2+} на различных уровнях позволило нам проследить зависимость скоростей выключения родопсина и трансдуцина от кальция в интактной клетке. В результате нами был сделан вывод о зависимости скорости выключения трансдуцина от внутриклеточной концентрации кальция.

Цель работы

Исследовать кинетику инактивации основных участников каскада фототрансдукции – родопсина и трансдуцина – в интактных фоторецепторных клетках в условиях темновой и световой адаптаций.

Задачи работы

1. При помощи метода «кальциевого клампа» определить динамику активности фосфодиэстеразы в палочках лягушки при подаче ненасыщающих световых стимулов в отсутствие кальциевых обратных связей.
2. Оценить влияние световой адаптации и сопряженных с ней изменений внутриклеточной концентрации кальция на скорости инактивации родопсина и трансдуцина.
3. Определить, какой из процессов инактивации каскада является лимитирующим для скорости выключения фотоответа палочек лягушки на насыщающие световые стимулы.

Научная новизна результатов исследования

В данной работе нами впервые исследована скорость активации и инактивации светоиндуцированной активности фосфодиэстеразы в интактных палочках лягушки в условиях темновой и световой адаптации. Показано, что световая адаптация в палочках лягушки ускоряет не только выключение родопсина, но и инактивацию трансдуцина. При интенсивных фоновых засветках такое ускорение каждого из процессов выключения может быть более чем 6-кратным. Этот результат заставляет пересмотреть существующие до сих пор представления о том, что выключение

трансдуцина не зависит от внутриклеточной концентрации кальция и световой адаптации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Скорость инактивации трансдуцина, как и скорость фосфорилирования родопсина, находится под контролем световой адаптации. При интенсивных фоновых засветках оба этих процесса могут ускоряться более чем в 6 раз.
2. Величина ускорения обоих процессов выключения каскада фототрансдукции позволяет полностью объяснить уменьшение чувствительности, наблюдаемое при интенсивных фоновых засветках.
3. Ни фосфорилирование родопсина, ни инактивация трансдуцина не лимитируют скорость выключения фотоответа на насыщающие стимулы в палочках лягушки. Процесс, лимитирующий скорость выключения насыщенных фотоответов, может быть гипотетически отождествлен со связыванием родопсина с аррестином.

Теоретическая и практическая значимость работы

Подробное исследование кинетики процессов выключения каскада позволило углубить наше понимание молекулярных механизмов фототрансдукции в темновых и светоадаптированных условиях. Выявленные закономерности могут оказаться полезными и для понимания работы других сигнальных каскадов, которые изучены в меньшей степени, чем каскад фототрансдукции.

Апробация работы и публикации результатов исследования

Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на VI Международном симпозиуме «Visionarium VI» (Твярмине, Финляндия, 2007), XX Съезде физиологического общества им. Павлова, (Москва, 2007 г), Международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2007), IV Европейском Форуме по Нейробиологии FENS (Женева, 2008).

По материалам диссертации опубликовано 3 тезисов докладов на российских и международных конференциях и 1 статья в рецензируемом международном журнале.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах и состоит из введения, четырех глав (обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения результатов), выводов и списка литературы (включает 106 источников). Диссертация иллюстрирована 31 рисунком и 3 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на изолированных палочках лягушки *Rana ridibunda*. Животные подвергались декапитации после адаптации в темноте в течение 12 часов. Глаза лягушек препарировались, затем из глазного бокала выделяли сетчатку, из которой готовили суспензию одиночных фоторецепторов. Все манипуляции проводились при тусклом красном свете и при инфракрасной подсветке.

Изучение работы каскада фототрансдукции проводили путем анализа токовых ответов на световые стимулы. Регистрация тока одиночных палочек проводилась при помощи всасывающей микропипетки (Baylor et al., 1979). Для изучения кинетики выключения компонентов каскада без вмешательства кальциевых обратных связей был применен метод «кальциевого клампа», т.е. фиксации концентрации Ca^{2+} внутри наружного сегмента палочки в течение десятков секунд. Основная идея этого метода состоит во временном прекращении входящих в клетку и исходящих из клетки кальциевых потоков. Метод «кальциевого клампа» реализовывался при помощи системы быстрой смены растворов. Палочки во время экспериментов исходно находились в проточной камере с нормальным раствором Рингера (90 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,6 мМ MgCl₂, 10мМ глюкозы, 1,05 мМ CaCl₂, 5 мМ NaHCO₃, 5 мМ HEPES, 0,05 мМ EDTA; 50 мг/л БСА); для записи фотоответов без вмешательства кальциевых обратных связей наружный сегмент палочки перемещали на 30-40 секунд в раствор «Ca²⁺-кларп» (90 мМ CholCl, 10мМ

глюкозы, 0,04 мМ CaCl₂, 5 мМ CholHCO₃, 5 мМ HEPES, 2 мМ EGTA; 50 мг/л БСА). В растворе «Ca²⁺-кламп» расчетная концентрация свободного Ca²⁺ составляла 3,4 нМ; натрий в этом растворе замещен холином (Chol). В растворе такого состава откачка кальция через Na/Ca,K-обменник блокируется из-за отсутствия в омывающей среде ионов натрия; низкая концентрация кальция в наружной среде практически устраняет электрохимический градиент для кальция, в результате чего вход кальция в клетку также прекращается. Основываясь на предположении о блокировке кальциевых обратных связей, по нормированным ответам вычислялся временной ход светоиндуцированной активности ФДЭ. Сначала из нормированного ответа вычислялся временной ход изменения концентрации цГМФ по формуле:

$$cG(t) = \left(1 - \frac{r(t)}{r_{\max}}\right)^{\frac{1}{n}} \quad (1),$$

где $cG(t)$ – концентрация цГМФ в наружном сегменте, $r(t)/r_{\max}$ – нормированный ответ, n – кооперативность каналов.

Изменение концентрации цГМФ происходит за счет его синтеза ГЦ ($\alpha(t)$), и его гидролиза ФДЭ ($\beta_d + \beta(t)$):

$$\frac{dcG(t)}{dt} = \alpha(t) - [\beta_d + \beta(t)] \cdot cG(t) \quad (2),$$

где α_d – темновая активность гуанилатциклазы, β_d – темновая активность ФДЭ и $\beta(t)$ – светоиндуцированная активность ФДЭ. В отсутствии кальциевых обратных связей $\alpha(t) = \text{const} = \alpha_d = \beta_d$. Исходя из этого, светоиндуцированную активность ФДЭ вычисляли по формуле:

$$\beta(t) = -\beta_d - \frac{1}{cG(t)} \left(\frac{dcG(t)}{dt} - \beta_d \right) \quad (3).$$

Измерение необходимого для расчетов параметра β_d проводили путем аппликации IBMX (изобутилметилксантина) и дальнейшей оценки изменения темнового тока (метод предложен Hodgkin & Nunn, 1988).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение темновой активности ФДЭ

Параметр β_d (темновая активность ФДЭ), необходимый для вычисления светоиндуцированной активности ФДЭ, определялся экспериментально для палочек лягушки *R. ridibunda*. Метод оценки β_d был основан на аппликации раствора с IBMX, который ингибирует активность ФДЭ в палочках. Наблюдаемый при этом резкий рост темнового тока отражал собой нарастание $[цГМФ]_{in}$ в результате его синтеза гуанилатциклазой (ГЦ). При условии постоянства внутренней концентрации кальция, скорость работы ГЦ в начальный период после аппликации IBMX позволяет определить скорость работы ФДЭ в исходном темновом равновесном состоянии. Однако при росте $[цГМФ]_{in}$ дополнительно открывается большое число каналов, через которые входит кальций, способный снижать активность ГЦ, что может приводить к недооценке ее исходной активности. Поэтому протокол эксперимента предусматривал перемещение палочки сначала в раствор «Са-кламп», а затем – на короткое время – в раствор «Са-кламп»+0,5 мМ IBMX.

Изменение темнового тока определяется активностью ГЦ в степени n , где n – кооперативность катионных каналов. В настоящем исследовании мы принимали $n=3$; т.о., из начального участка изменения темнового тока извлекался кубический корень, а β_d вычисляли по углу наклона полученной прямой. Процедура определения β_d проиллюстрирована на *Рис.1*. Среднее значение β_d для 4 исследованных клеток составило $8,3 \pm 2,2 \text{ с}^{-1}$.

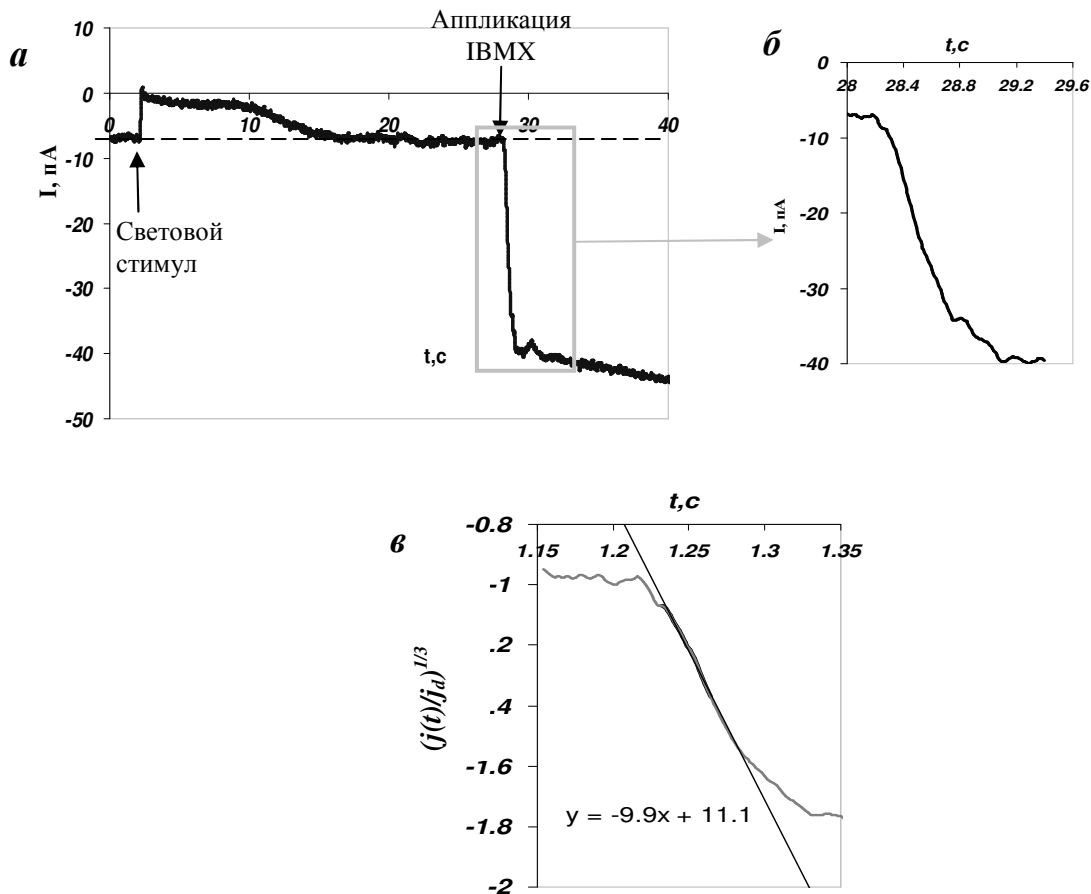


Рис.1. Экспериментальная оценка темновой активности ФДЭ (β_d). **a** – запись насыщенного ответа в растворе «Са-кламп» и последующее перемещение в «Са-кламп»+0.5 мМ IBMX. **б** – подробно показан участок резкого роста темнового тока в ответ на аппликацию IBMX. **б** – кривая, полученная из кривой после нормирования на величину насыщенного ответа и извлечения кубического корня, аппроксимирована прямой. Угол наклона аппроксимирующей кривой дает величину β_d .

Исследование временного хода светоиндуцированной активности ФДЭ

Для исследования временного хода светоиндуцированной активности ФДЭ палочки на короткое время (25-40 с) перемещались в раствор «Са²⁺-кламп», где регистрировался ответ на стимул малой интенсивности, а затем начальный участок ответа на стимул насыщающей интенсивности (начальный участок насыщенного ответа был необходим, чтобы определить темновой ток в растворе «Са²⁺-кламп» для последующей нормировки на него). На Рис.2а показан типичный ненасыщенный ответ, записанный в растворе «Са²⁺-кламп», и для сравнения на него наложен ответ на стимул

такой же интенсивности в нормальном растворе. На графике видно, что в условиях фиксированного внутриклеточного кальция ответ имеет большую амплитуду, максимум достигается позднее, а задний фронт его более пологий, чем у ответа в нормальном растворе Рингера. Все эти признаки характерны для отсутствия кальциевых обратных связей. Далее из ответов, полученных в растворе «Ca²⁺-кламп», проводили вычисление светоиндуцированной активности ФДЭ по алгоритму, описанному в разделе «Материалы и методы» (уравнения (1) – (3)). На *Рис.2б* показана типичная кривая светоиндуцированной активности ФДЭ.

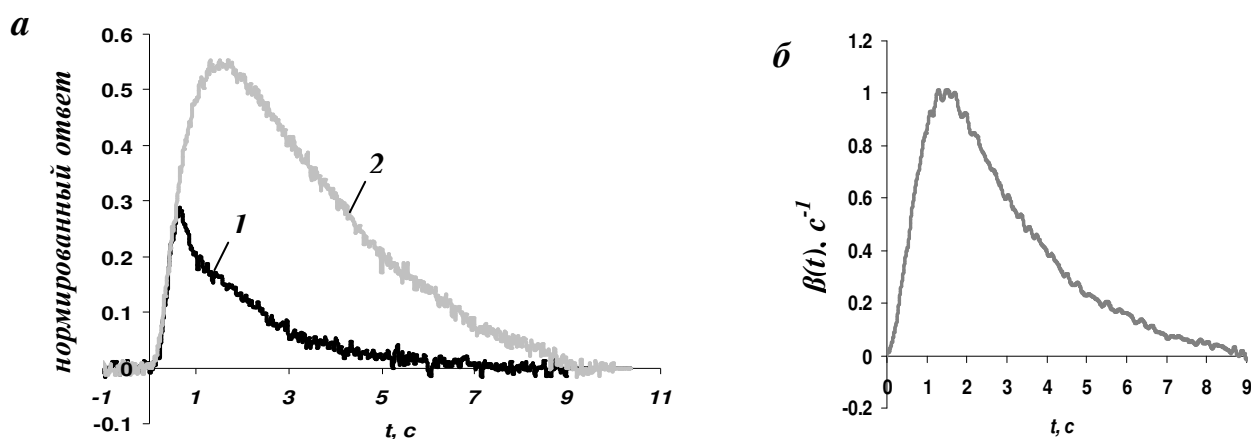


Рис.2. *а* – Ответы палочки на стимул одинаковой интенсивности в нормальном растворе Рингера (кривая 1) и в растворе «Ca²⁺-кламп» (кривая 2). *б* - кривая светоиндуцированной активности ФДЭ, вычисленная из ответа (2), записанного в условиях «Ca²⁺-клампа».

Для количественного описания кривых светоиндуцированной активности ФДЭ проводилась их аппроксимация различными способами. Можно предположить, что простейшее описание волны активности ФДЭ при ответе на световую вспышку (см. *Рис.3*) должно выражаться разностью двух экспонент вида:

$$y(t) = A \cdot \left[\exp\left(-\frac{(t - t_0)}{\tau_1}\right) - \exp\left(-\frac{(t - t_0)}{\tau_2}\right) \right] \quad (4),$$

где A – коэффициент пропорциональности, t_0 – задержка, τ_1 и τ_2 – постоянные времени процессов выключения каскада.

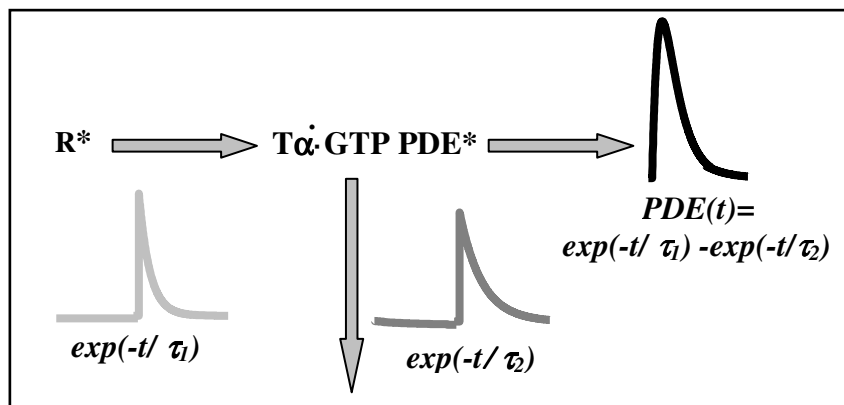


Рис.3. Схема активации и инактивации ФДЭ при ответе палочки на одиночный световой стимул. Родопсин (R^*) активируется, а затем выключается в простейшем предположении по одноэкспоненциальному закону с постоянной времени τ_1 . Трансдуцин (T) выключается также по одноэкспоненциальному закону с постоянной времени τ_2 . Вся кривая активности ФДЭ формируется этими двумя процессами выключения и может быть описана разностью двух экспоненциальных функций с постоянными времени τ_1 и τ_2 . Обозначения: R^* – возбужденный родопсин, $T\alpha$ – α -субъединица трансдуцина, GTP – гуанозинтрифосфат, PDE – фосфодиэстераза, τ_1 , τ_2 – постоянные времени процессов выключения.

Некоторые полученные кривые активности ФДЭ при подгонке их двухэкспоненциальной функцией (4) демонстрировали хорошее качество такой аппроксимации (Рис.4а), но для большинства кривых не удавалось найти хорошую двухэкспоненциальную аппроксимацию. На рис.4б показан пример того, когда предложенная программой Slide в качестве наилучшей двухэкспоненциальная подгонка является совершенно неудовлетворительной. Поскольку к большинству кривых светоиндуцированной активности ФДЭ было невозможно применить адекватную двухэкспоненциальную подгонку, задний фронт кривых аппроксимировали одноэкспоненциальной функцией (см. Рис.4в). Как и в данном примере, задний фронт всех анализируемых кривых ФДЭ хорошо описывался одной экспонентой. Важно отметить, что задний фронт кривой ФДЭ всегда формируется самым медленным процессом, следовательно, $\tau_{з.ф.}$

позволяет охарактеризовать наиболее медленный процесс выключения ненасыщенного ответа. Среднее значение $\tau_{з.ф.}$ составило $1,5 \pm 0,6$ с ($N=7$).

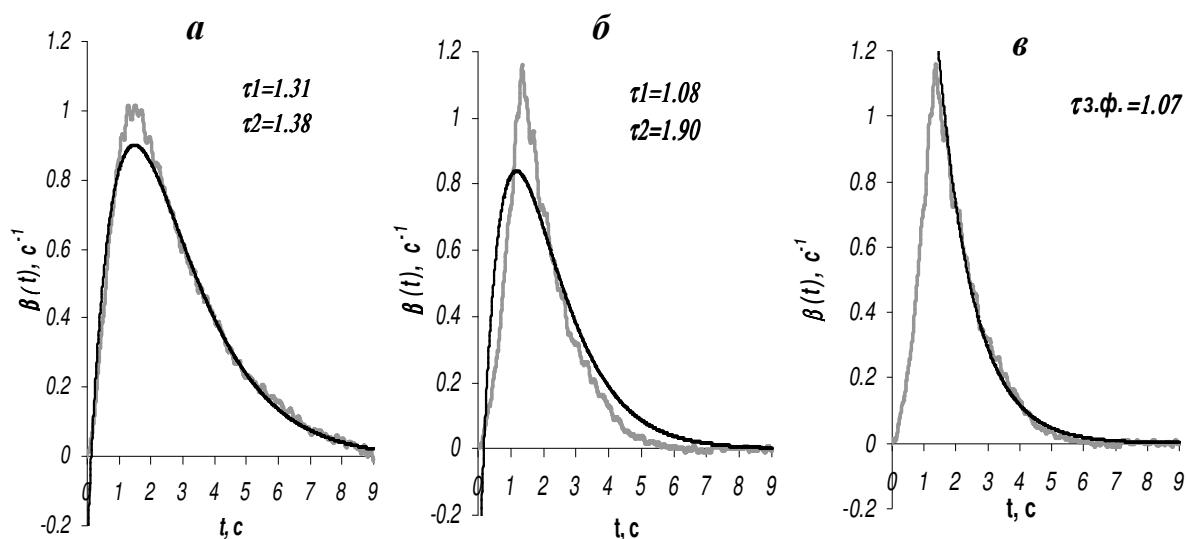


Рис.4. Аппроксимация кривых светоиндуцированной активности ФДЭ разными способами. **а** – пример удачной аппроксимации двухэкспоненциальной функцией вида $\beta(t) = A \cdot (\exp(-(t-t_0)/\tau_1) - \exp(-(t-t_0)/\tau_2))$. **б** – пример неадекватной аппроксимации двухэкспоненциальной функцией другой кривой ФДЭ (такая ситуация наблюдалась для большинства кривых ФДЭ); **в** – подгонка заднего фронт той же кривой (**б**) одноэкспоненциальной функцией вида $\beta(t) = C \cdot \exp(-(t-t_0)/\tau)$.

Анализ кривых активности ФДЭ в условиях световой адаптации (при фоновых засветках)

Для оценки влияния световой адаптации на процессы выключения каскада фототрансдукции метод «Ca²⁺-кламп» был также применен в условиях фоновых засветок разной интенсивности. На палочку подавали непрерывный фоновый свет, закрывающий от 10% до 75% каналов наружного сегмента, а затем, не выключая фоновой засветки, перемещали на несколько десятков секунд в раствор «Ca²⁺-кламп». Таким образом [Ca²⁺]_{in} фиксировался на новом, более низком уровне, соответствующем определенной степени световой адаптации, причем степень световой адаптации прямо пропорционально зависела от интенсивности подаваемой фоновой засветки.

На *Рис.5* показана кривая активности ФДЭ, полученная в условиях фоновой засветки, наложенная на темновую кривую ФДЭ для той же палочки. Этот график демонстрирует типичную картину – все полученные в условиях фоновых засветок кривые ФДЭ значительно ускорились относительно «темновых» кривых ФДЭ для тех же клеток.

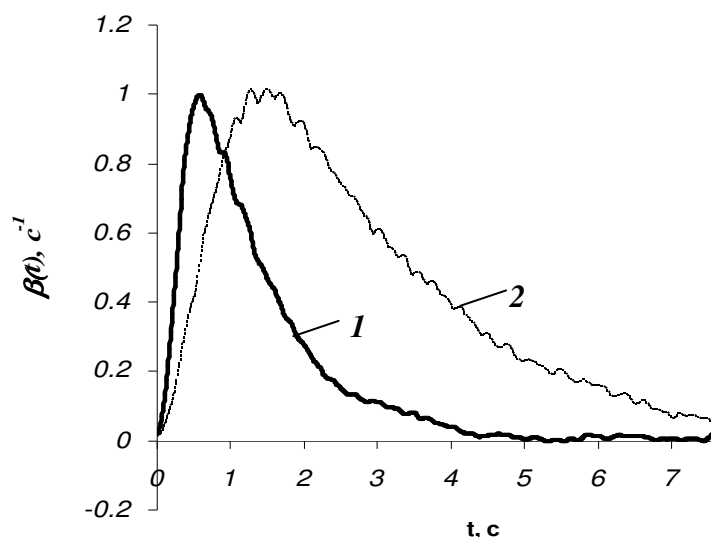


Рис.5. Кривая светоиндуцированной активности ФДЭ, полученная в условиях световой адаптации (фоновая засветка закрывала 25% каналов наружного сегмента) (1), наложена для сравнения на «темновую» кривую активности ФДЭ (2).

Большинство кривых активности ФДЭ, полученных как в темновых, так и в светоадаптированных условиях, не поддавалось аппроксимации единой функцией для всей кривой. Поэтому для оценки изменений кинетики процессов выключения под действием световой адаптации проводили индивидуальное сравнение передних и задних фронтов темновых и светоадаптированных кривых. Такой анализ проиллюстрирован на *Рис.6*. Для заднего фронта сравнивались значения постоянной времени экспоненты нисходящего участка (θ). Поскольку передние фронты кривых ФДЭ не описываются простыми функциями, для оценки их ускорения определялось время полунарастания кривой до максимума ($t_{0.5}$). Такой анализ показал, что при переходе от темновых условий к условиям световой адаптации происходит ускорение как переднего, так и заднего фронта кривых ФДЭ,

причем кривые ускоряются тем больше, чем выше интенсивность фоновой засветки.

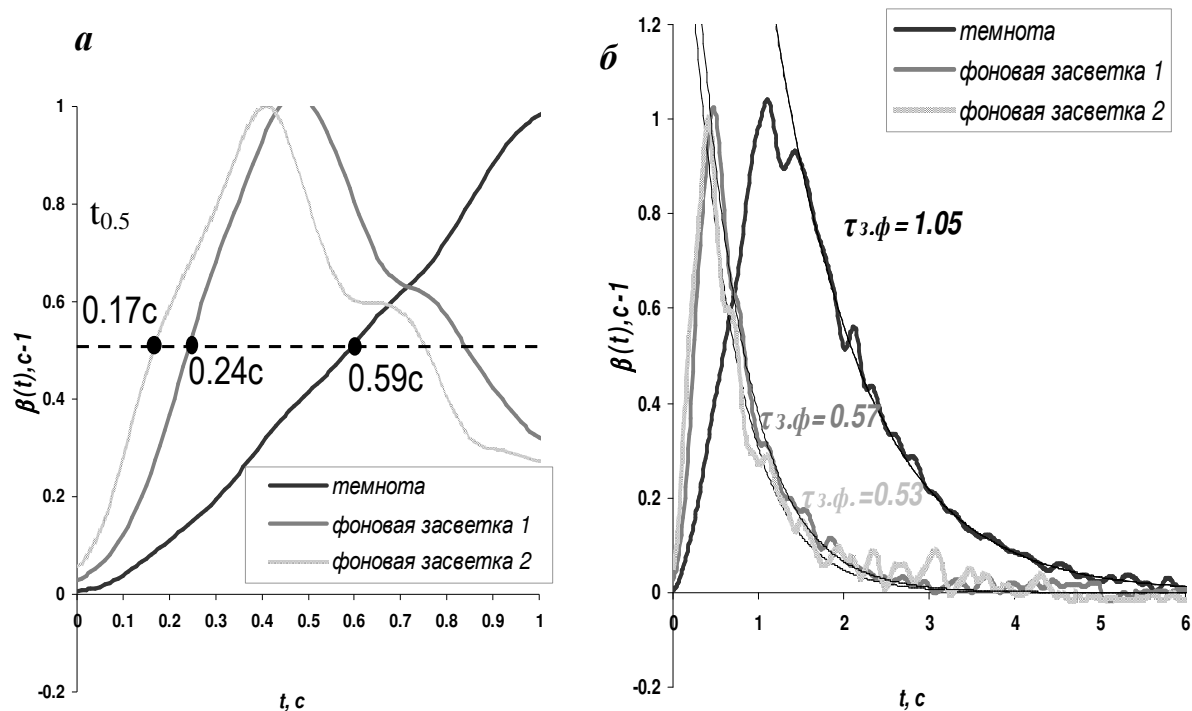


Рис.6. Оценка ускорения переднего и заднего фронтов кривых ФДЭ при переходе от темновых к светоадаптированным условиям. **а** – оценка времени «полунарастания» кривой ФДЭ ($t_{0.5}$) (черная кривая – темновые условия, темно-серая – фоновая засветка, закрывающая 36% каналов, светло-серая – фоновая засветка, закрывающая 73% каналов); **б** – сравнение постоянных времени экспоненты, описывающей задний фронт кривых ($\tau_{з.ф.}$).

В анализ темновых и светоадаптированных кривых ФДЭ были включены 7 клеток. У всех этих клеток было отмечено ускорение переднего и заднего фронтов кривых активности ФДЭ, в соответствии с примером на Рис.6. Обобщенные данные по ускорению переднего и заднего фронтов кривых ФДЭ по всем протестированным клеткам представлены на Рис.7. Видно, что передние фронты имеют тенденцию ускоряться при световой адаптации в большей степени, чем задние фронты кривых ФДЭ

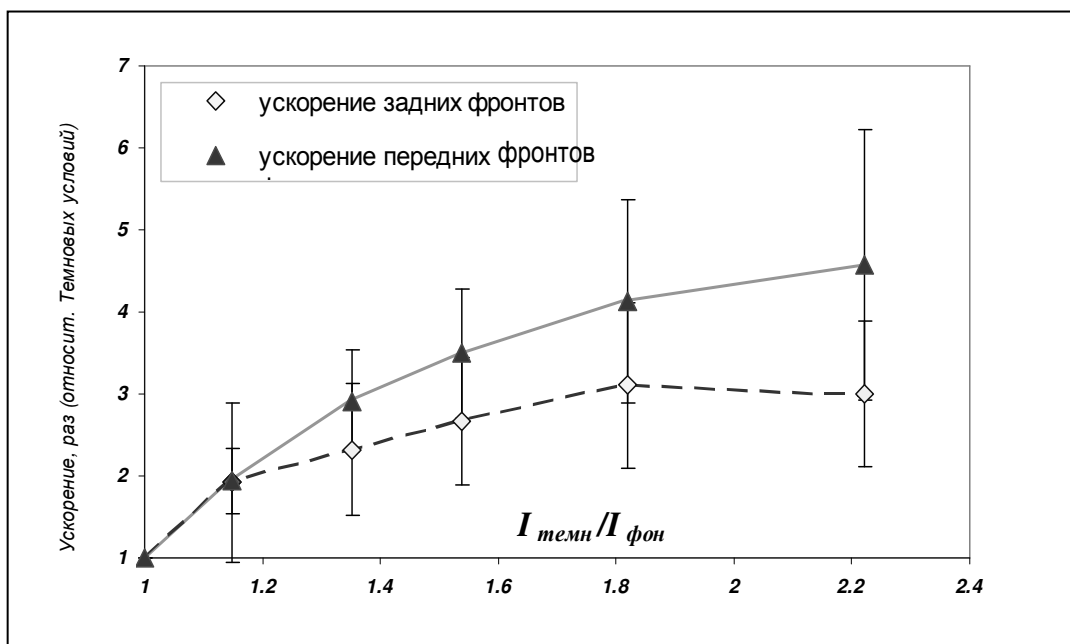


Рис.7. Зависимость ускорения переднего и заднего фронта кривых активности ФДЭ от интенсивности фоновой засветки. Каждая точка представляет собой среднее значение по всем исследованным клеткам \pm СО. Ускорение выражено как число раз относительно темновых кривых ФДЭ для каждой клетки. Обозначения: $I_{\text{темн}}/I_{\text{фон}}$ – отношение темнового тока палочки к току, протекающему при фоновой засветке.

Таким образом, анализ влияния фоновой засветки на кинетику инактивации ФДЭ показал, что у всех тестируемых клеток при световой адаптации ускоряется как передний, так и задний фронт кривых ФДЭ. Это свидетельствует о том, что оба процесса выключения каскада – фосфорилирование родопсина и инактивация трансдуцина – ускоряются при переходе к условиям световой адаптации. Ранее считалось, что при фоновых засветках ускоряется только выключение родопсина, поскольку установленным является тот факт, что снижающаяся при фоновых засветках внутриклеточная концентрация кальция $[Ca^{2+}]_{\text{in}}$ регулирует работу родопсинкиназы, фосфорилирующей родопсин (Makino et al., 2004). В то же время до сих пор преобладало мнение о том, что скорость выключения трансдуцина не зависит от $[Ca^{2+}]_{\text{in}}$ и наличия фоновой засветки (Lyubarsky et al., 1996). Однако результаты настоящего исследования указывают на то, что в палочках лягушки скорость выключения трансдуцина также зависит от наличия фоновой засветки.

Критическая постоянная времени выключения каскада τ_D

Одной из задач данного исследования было сопоставить скорости процессов, формирующих кривую светоиндуцированной активности ФДЭ, с критической постоянной времени τ_D , вычисляемой по наклону так называемой кривой Пепперберга. При анализе Пепперберга записывается набор насыщенных ответов палочки на стимулы возрастающей интенсивности, и далее строится зависимость времени пребывания ответа в насыщении от логарифма интенсивности стимула. Пример построения кривой Пепперберга для палочки лягушки показан на *Рис.8*.

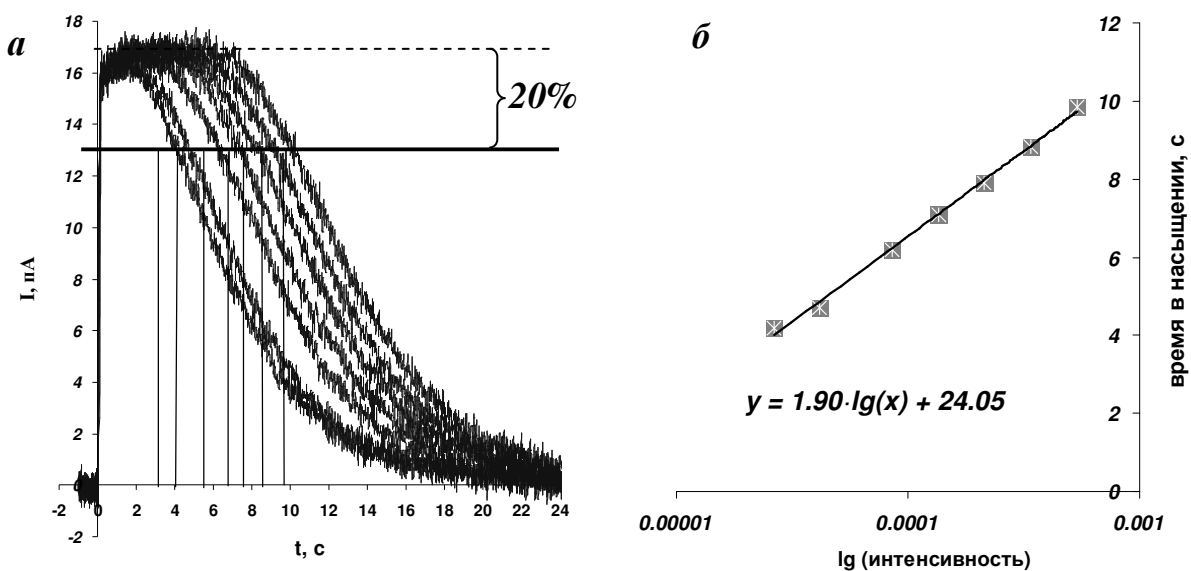


Рис.8. Набор насыщенных ответов на стимулы возрастающей интенсивности (а), и построенная в результате их анализа кривая Пепперберга (б). На графике *a* толстой черной линией указан критерий для определения времени пребывания ответа в насыщении (20% восстановления).

Среднее значение τ_D для девяти клеток, у которых был проведен анализ Пепперберга, составило $1,8 \pm 0,4$ с. Мы сравнили полученное значение τ_D с постоянной времени заднего фронта темновых кривых ФДЭ ($\tau_{з.ф.}$), соответствующей скорости самого медленного процесса выключения ненасыщенного фотоответа. Среднее значение $\tau_{з.ф.}$ ($1,5 \pm 0,6$ с) и среднее τ_D ($1,8 \pm 0,4$ с) статистически неразличимы. Однако поведение кривых Пепперберга в условиях фоновых засветок (см. *Рис.9*) свидетельствует о том,

что скорость процесса выключения каскада, соответствующего τ_D , не изменяется при фоновых засветках, поскольку наклон кривых Пепперберга остается постоянным.

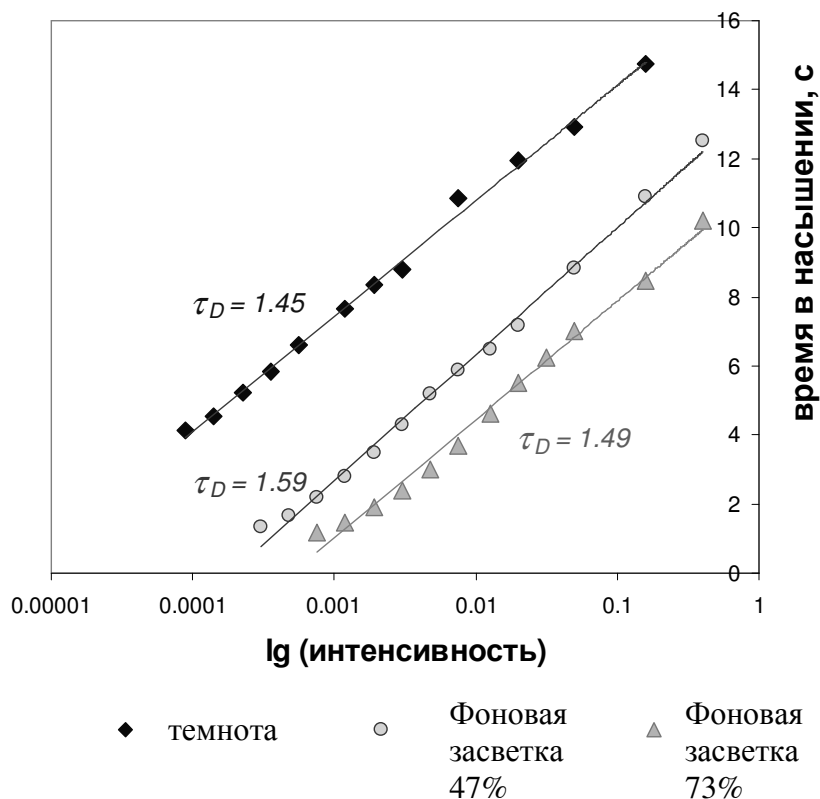


Рис.9. Кривые Пепперберга, снятые на одной палочке в темноте и при двух фоновых засветках различной интенсивности. Полученные значения τ_D приведены на графике.

Хотя при включении фоновых засветок наклон кривых Пепперберга не изменяется, происходит параллельный сдвиг кривых вправо, который отражает собой уменьшение чувствительности фоторецептора. Так на Рис.9. фоновая засветка, закрывающая 47% каналов, привела к сдвигу кривой приблизительно на 1,3 порядка (≈ 20 -кратное падение чувствительности), а фоновая засветка, закрывающая, 73% каналов, - к сдвигу на 1,9 порядка (≈ 80 -кратное падение чувствительности). Уменьшение чувствительности фоторецептора может происходить либо при уменьшении коэффициента усиления каскада фототрансдукции, либо за счет ускорения выключения каскада. Чтобы определить, изменяется ли коэффициент усиления при

переходе от темновых к светоадаптированным условиям, было проведено сравнение начальной фазы насыщенных ответов, записанных в темноте и при разных фоновых засветках (Рис.10). Результат анализа данных показал, что коэффициент усиления не меняется при переходе от темноты к фоновым засветкам. Следовательно, изменение чувствительности может полностью объясняться ускорением процессов выключения. Наши данные о том, что оба процесса выключения при фоновых засветках ускоряются максимально до 4-7, раз хорошо согласуются с таким существенным уменьшением чувствительности при адаптации к ярким фоновым засветкам (до 80 раз) и позволяют полностью его объяснить.

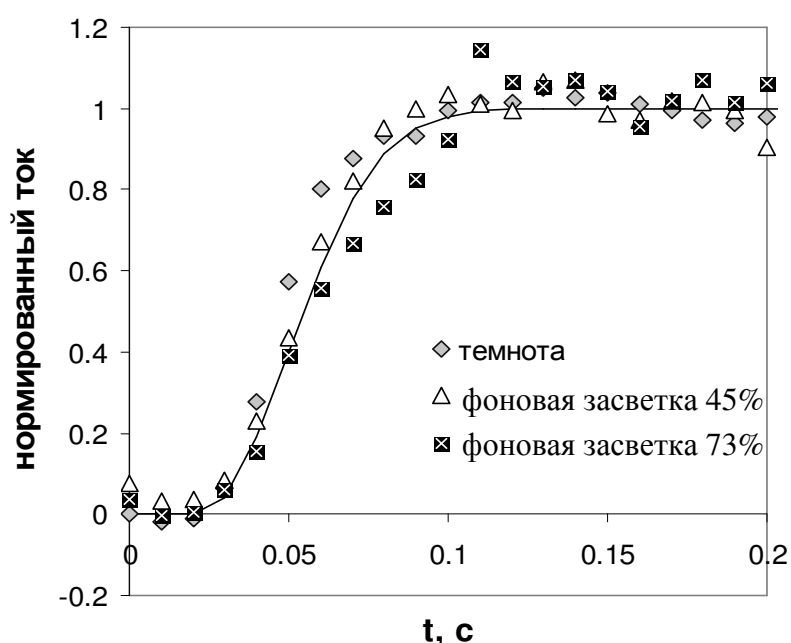


Рис.10. Сравнение коэффициента усиления каскада в темновых условиях и в условиях световой адаптации. Наложены начальные участки нормированных насыщенных ответов на стимул одинаковой интенсивности в темновых условиях и при двух разных фоновых засветках. Экспериментальные кривые аппроксимированы функцией $I(t) = 1 - \exp\left(-\frac{Int * a}{2}(t - t_0)^2\right)$, где Int – интенсивность стимула, t_0 – задержка развития ответа, a – коэффициент усиления каскада.

Таким образом, в палочках лягушки при световой адаптации наряду с фосфорилированием родопсина ускоряется также и инактивация трансдуцина. Вопрос о механизме, посредством которого световая адаптация

может влиять на время жизни активного трансдуцина, остается не выясненным. Одной из возможных мишеней может служить комплекс RGS9-1, который ускоряет гидролиз ГТФ на α -субъединице трансдуцина ($T\alpha$), поскольку в литературе имеются данные о том, что фосфорилирование комплекса RGS9-1 регулируется ионами Ca^{2+} (Balasubramanian et al., 2001), а также, что степень фосфорилирования RGS9-1 уменьшается на свету (Wensel, 2002).

Открытым также остается вопрос о том, какому процессу соответствует критическая постоянная времени выключения насыщенных ответов τ_D в палочках лягушки. Наши данные указывают на то, что ни фосфорилирование родопсина, ни инактивация трансдуцина не могут быть отождествлены с τ_D , поскольку оба они ускоряются при фоновых засветках, а τ_D остается неизменной. Возможное объяснение может состоять в том, что τ_D соответствует скорости связывания фосфорилированного родопсина с аррестином. В этом случае можно предположить такую схему: при интенсивностях ниже насыщающих вклад связывания родопсина с аррестином в формирование волны фотоответа очень мал, он не лимитирует выключения ответа, а формирует низкоамплитудный «хвост» кривых активности ФДЭ. Основной же вклад в формирование волны **ненасыщенных** фотоответов вносят фосфорилирование родопсина и инактивация трансдуцина. Когда интенсивность стимулов увеличивается и ответы становятся насыщенными, два основных процесса выключения успевают завершиться до того, как клетка выйдет из насыщения. Тогда критической становится скорость связывания родопсина с аррестином, и именно она определяет величину τ_D . В настоящее время процесс связывания аррестина с родопсином считается кальций-независимым, что хорошо согласуется с независимостью наклона кривой Пепперберга от световой адаптации.

ВЫВОДЫ

1. В палочках лягушки под контролем световой адаптации находится не только скорость фосфорилирования возбужденного родопсина, но и скорость выключения трансдуцина.
2. Максимальное наблюдаемое в экспериментах ускорение каждого из этих двух процессов составляет 6,5 раз, что позволяет полностью объяснить десенситизацию, наблюдаемую в палочках лягушки при фоновых засветках.
3. Скорость процесса, лимитирующего выключение насыщенных ответов, не изменяется при световой адаптации. Ни фосфорилирование родопсина, ни инактивация трансдуцина не лимитируют выключение насыщенных ответов в палочках лягушки. Гипотетически лимитирующим процессом для выключения насыщенных ответов является связывание аррестина с родопсином.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. **Астахова Л.А.**, Фирсов М.Л., Говардовский В.И. фосфорилирование родопсина и выключение трансдуцина, - лимитируют ли они скорость выключения каскада фототрансдукции?//Тез. докладов XX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. – Москва. – 2007. – С. 13.
2. **Астахова Л.А.**, Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Кинетика инактивации родопсина и трансдуцина *in vivo* в палочках лягушки *R. ridibunda*.//Тез. докладов международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». – Пущино. – 2007. - С. 147–149.
3. **Astakhova L.A.**, Firsov M.L, Govardovskii V.I. Both Rhodopsin and transdusin shut-offs are under light adaptation control in frog rods.// 6th FENS Abstr. – Geneva (Switzerland). – 2008. – V.4 - 054.2
4. **Astakhova L.A.**, Firsov M.L., Govardovskii V.I. Kinetics of turn-offs of frog rod phototransduction cascade.// J Gen Physiol. – 2008. – V.132. – P. 587-604.