БИОФИЗИКА, 2016, том 61, вып. 5, с. 879–883

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

УМЕНЬШЕНИЕ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПАЛОЧКИ СЕТЧАТКИ ЛЯГУШКИ В ПРИСУТСТВИИ НЕСПОСОБНОГО К ФОСФОРИЛИРОВАНИЮ АНАЛОГА GDP ГУАНОЗИН-5′-О-(2-ТИОДИФОСФАТА) КАК ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ГИПОТЕЗЫ ОБ АКТИВАЦИИ ТРАНСДУЦИНА ПОСРЕДСТВОМ МЕХАНИЗМА ТРАНСФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

© 2016 г. О.В. Петрухин, Т.Г. Орлова, А.Р. Незвецкий, Н.Я. Орлов

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: petrukhinoleg@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.06.16 г.

Показано, что уменьшение светочувствительности изолированной палочки сетчатки лягушки в результате ее кратковременной перфузии гуанозин-5′-О-(2-тиодифосфатом) – аналогом GDP, не способным к фосфорилированию нуклеозиддифосфаткиназой, может быть объяснено в рамках гипотезы об активации основного GTP-связывающего белка фоторецепторов сетчатки позвоночных трансдуцина посредством индуцированного активированным рецептором родопсином фосфорилирования связанного GDP до GTP и, таким образом, может рассматриваться как одно из подтверждений этой гипотезы.

Ключевые слова: GTP-связывающие белки, трансдуцин, трансфосфорилирование.

Принято считать, что гетеротримерные GTP-связывающие белки (G-белки) активируются в результате индуцируемого активированным рецептором обмена связанного GDP на свободный GTP (см., например, [1]). Аналогичный механизм был использован и для объяснения механизма активации трансдуцина – G-белка, играющего роль молекулярного предусилителя в системе фототрансдукции палочек сетчатки позвоночных [2–9].

Однако, несмотря на широкое распространение этой модели, данная точка зрения не свободна от противоречий, поскольку требует огромных изменений константы скорости диссоциации комплекса трансдуцин–GDP в присутствии активированного рецептора, в данном случае фотоактивированного родопсина (R*). Действительно, в темновом фоторецепторе время диссоциации комплекса трансдуцин–GDP составляет десятки часов [10]. Это предотвращает спонтанную активацию трансдуцина и, таким образом, обеспечивает предельно низкий уровень собственных шумов палочки сетчатки и, следовательно, ее способность работать в режиме счетчика одиночных фотонов [11]. Далее, для обеспечения требуемого коэффициента усиления одна молекула R* последовательно активирует за 1 с до 1000 молекул трансдуцина [7,12–14]. Это означает, что активация одной молекулы трансдуцина, включающая в себя как этап и диссоциацию комплекса трансдуцин–GDP, происходит за время около 1 мс. Таким образом, активированный рецептор должен изменять время диссоциации комплекса трансдуцин–GDP на огромную величину, составляющую около 10^9–10^{10} раз. Пока неясно, возможно ли обеспечить столь значительное изменение константы скорости диссоциации. И, следовательно, пока неясно, применим ли механизм обмена связанного GDP на свободный GTP для процесса активации трансдуцина.

В связи с этим все большее внимание привлекает другой механизм активации GTP-связывающих белков, так называемое трансфосфорилирование [15–21]. Данный механизм подразумевает, что активация происходит не в результате обмена, а в результате прямого фосфорилирования связанного GDP до GTP за счет донора макроэргического фосфата, например, ATP. Особенность такого механизма со-

Сокращения: G-белки – гетеротримерные GTP-связывающие белки, R* – фотоактивированный родопсин, NDP-киназа – нуклеозиддифосфаткиназа, GDP[S] – гуанозин-5′-О-(2-тиодифосфат).

стоит в том, что он не требует диссоциации связанного GDP [17,21].

Показано также, что процесс фосфорилирования не является автофосфорилированием, как предполагалось нами ранее [22], а катализируется независимым компонентом [23]. Существуют веские экспериментальные аргументы в пользу того, что ключевым ферментом, обеспечивающим процесс трансфосфорилирования, является нуклеотиддифосфаткиназа (NDP-киназа, EC 2.7.4.6), осуществляющая перенос γ-фосфата от нуклеозидтрифосфатов на нуклеозиддифосфаты [24]. Представления о свойствах и функциональной роли этого фермента в норме и патологии за последние десятилетия (начиная с 1990-х гг.) претерпели принципиальные и до известной степени революционные изменения. Оказалось, что NDP-киназа участвует в регуляции экспрессии генов, процессов роста, дифференцировки, эмбрионального развития и апоптоза (см., например, [16,19,25–27]), а уровень экспрессии NDP-киназы в раковых клетках определяет их способность вызывать метастазы (см., например, [29–33]). Все это привлекло к исследованию NDP-киназы большой круг новых исследователей, специализирующихся в области структуры и функции белков, энзимологов, молекулярных биологов и медиков (см., например, обзоры [16,34]).

В частности, показано, что NDP-киназы млекопитающих являются гексамерами [35–37], состоящими из двух типов случайным образом организованных α- и β-субъединиц длиной по 152 ам. остатка каждая, и, таким образом, существуют в клетке в виде набора изоформ [38–41]. Субъединицы подобны по своей первичной структуре: степень их гомологии составляет 87–90% для всех исследованных видов млекопитающих [38,42]. Умеренное различие первичных структур локализовано в вариабельных областях V1 и V2 (остатки 36–50 и 130–152 соответственно). Более того, исследование рекомбинантных NDP-киназ млекопитающих, состоящих только из одного типа субъединиц (α или β), методом рентгеноструктурного анализа показало практически полное подобие их пространственных структур [36]. Каталитические свойства изоформ также весьма подобны [38,42]. Физиологический смысл присутствия в клетке изоформ NDP-киназы с практически одинаковыми каталитическими и структурными свойствами оставался неясным, хотя и являлся предметом интенсивных исследований многих лабораторий. Можно было только предполагать, что существование изоформ NDP-киназы в тканях млекопитающих имеет принципиально важный функциональный смысл: иммунологические исследования, выполненные с использованием моноклональных антител, специфичных для каждого из двух типов субъединиц, показали, что распределение изоформ (1) характерно для каждого из органов и тканей, (2) различно в норме и патологии и (3) варирует в пределах клетки (см., например, [16,17,21,34]).

Было также показано, что NDP-киназа присутствует в НСП и высокоспецифично взаимодействует с комплексом фотоактивированный родопсин-трансдуцин (комплекс R*–трансдуцин) [43] – взаимодействие нарушалось при хорошо изученном ранее процессе диссоциации комплекса в присутствии GTP и его негидролизуемых аналогов [44,45]. Более того, как показали дальнейшие модельные исследования [46], выполненные с использованием рекомбинантных изоформ NDP-киназы, взаимодействие имело место лишь для α-формы фермента, которая отличается от изоформы β способностью существовать в равновесии между двумя состояниями [47], одно из которых и характеризуется высоким сродством к комплексу R*–трансдуцин [48,49]. Дополнительно было также показано, что конформационная лабильность NDP-киназы α крысы и ее способность взаимодействовать с отмеченным комплексом, скорее всего, обусловлена структурой и свойствами вариабельного участка V1 [49].

Значительная часть этих данных о взаимодействии между NDP-киназой и одним из типичных представителей семейства гетеротримерных G-белков трансдуцином была недавно подтверждена работами немецких исследователей [50,51], использовавших независимые методы и подходы. Все это создает уверенность, что обнаруженное взаимодействие NDP-киназы с комплексом R*–трансдуцин, которое было использовано как высокоспецифичный тест, позволяющий различить изоформы NDP-киназы, неразличимые рядом других использованных ранее методов, не является одним из многочисленных экспериментальных и инструментальных артефактов, сопровождающих исследования взаимодействий между NDP-киназой и гетеротримерным G-белками, а совокупность изложенных данных заставляет задуматься о функциональном смысле такого взаимодействия в клетке.

Один из вариантов механизма трансфосфорилирования для системы фототрансдукции подразумевает, что NDP-киназа предварительно фосфорилирует β-субъединицы трансдуцина [21,52–56], концентрация которых в фоторецепторе, в отличие от других типовых систем клеточной трансдукции, функционирующих при участии G-белков, в несколько раз превышает концентрацию α-субъединиц [57,58]. Активация трансдуцина происходит в результате переноса

макроэргического фосфата с β-субъединицы на GDP, связанный в активном центре α-субъединицы. Данный процесс протекает лишь в присутствии активированного родопсина. Особенность такого механизма состоит в том, что он не требует диссоциации связанного GDP и потому свободен от кинетических ограничений, свойственных обменному механизму [17,21].

Несмотря на теоретическую привлекательность модели трансфосфорилирования, ее прямые экспериментальные подтверждения пока недостаточны. Именно потому наше внимание привлекли данные [59,60], полученные ранее в ряде лабораторий при исследовании изолированных палочек сетчатки лягушки современными электрофизиологическими методами в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*, но до настоящего времени не получившие объяснения. Речь идет о способности изолированных палочек сетчатки лягушки [59,60] понижать свою фоточувствительность в результате их кратковременной (1–5 мин) перфузии аналогом GDP guanosine-5′-O-(2-thio-diphosphate) (GDP[S]), неспособным к фосфорилированию NDP-киназой [61].

Возможности объяснения этих результатов на момент их получения были значительно ограничены в связи с недостатком существующих тогда знаний о системе фототрансдуции фоторецепторов и механизмах работы ее элементов. Современные данные о конструкции и свойствах системы фототрансдукции, включая и предположение об активации трансдуцина по механизму трансфосфорилирования, существенно расширяют возможности интерпретации данных, полученных ранее [59,60], и одновременно являются веским аргументом в пользу модели трансфосфорилирования, полученным в условиях, максимально приближенных к *in vivo*.

Наше объяснение может быть кратко суммировано следующим образом. 1). Как уже отмечено выше, в темновом фоторецепторе комплекс трансдуцин–GDP необычайно стабилен. Время диссоциации этого комплекса составляет порядка 10 ч при 37°C [10]. Это означает, что при кратковременной (1–10 мин) инкубации палочки в темноте с 2 мМ GDP[S] ввиду очень низкой скорости обмена GDP на GDP[S] будет образовываться весьма ограниченной количество (не более 1%) молекул комплекса трансдуцин–GDP[S].

2). Далее, гипотеза трансфосфорилирования полагает, что трансдуцин активируется в результате индуцируемого активированным ролопсином фосфорилирования связанного GDP до GTP. Однако при локализации в активном центре альфа-субъединицы GDP[S], не способного к фосфорилированию NDP-киназой [61] трансдуцин в промежуточном комплексе между R* и Gt-GDP[S] потеряет способность переходить в GTP-состояние и тем самым освобождать молекулу R* для продолжения процесса активации следующих молекул трансдуцина [4–9]. Таким образом, трансдуцин в состоянии трансдуцин-GDP[S] можно рассматривать как ингибитор процесса активации.

3). Принято считать, что одна молекула обесцвеченного родопсина за время ее жизни в активном состоянии (около 1 с) активирует порядка 1000 молекул трансдуцина [7,12–14]. Поэтому легко видеть, что наличие среди молекул трансдуцина даже относительно небольшого количества (~1%) молекул комплекса трансдуцин–GDP[S], выступающего в роли ингибитора активности родопсина, приведет к тому, что каждая из молекул R* в среднем будет способна активировать не 1000, а всего лишь около 100 молекул трансдуцина. Таким образом, процесс активации трансдуцина будет подавлен примерно в 10 раз. Этого будет достаточно для значительного подавления процесса генерации активных молекул трансдуцина и соответственно значительного уменьшения светочувствительности фоторецептора.

Данное заключение было подтверждено нами в результате расчетов диффузионного поведения молекул системы фототрансдукции в мембране диска, выполненных методом Монте-Карло, использованным ранее [62]. Расчеты показали, что при содержании ингибитора (трансдуцин–GDP[S]) 0,1 и 1% от общего содержания трансдуцина в среднем активируется около 400 и 100 молекул (но не 1000) трансдуцина соответственно.

Таким образом, обнаруженное ранее уменьшение светочувствительности фоторецептора в присутствии GDP[S] может быть объяснено в рамках так называемой гипотезы трансфосфорилирования и соответственно может рассматриваться как одно из ее косвенных подтверждений. В заключение хотелось бы подчеркнуть, что в данном случае экспериментальные результаты, использованные для подтверждения вышеупомянутой гипотезы, были получены в условиях, максимально приближенных к *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. G. Gilman, Biosci. Rep. **15**, 65 (1995).
2. B. K.-K. Fung, and L. Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2500 (1980).
3. B. K.-K. Fung, J. B. Hurley, and L. Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 152 (1981).
4. L. Stryer, Annu. Rev. Neurosci. **9**, 87 (1986).
5. L. Stryer, Harvey Lectures **87**, 129 (1993).
6. L. Stryer, J. Biol. Chem. **266**, 10711 (1991).

7. E. N. Pugh, Jr., and T. D. Lamb, Biochim. Biophys. Acta **1141**, 111 (1993).
8. E. N. Pugh, Jr., and T. D. Lamb, in *Handbook of Biological Physics*, Ed. by D. G. Stavenga, E. N. Pugh, Jr., and W. J. de Grip. (Elsevier Science B.V., Amsterdam 2000). Chapter **5**, 183.
9. V. Y. Arshavsky, T. D. Lamb, and E. N. Pugh, Jr., Annu. Rev. Physiol. **64**, 153 (2002).
10. A. B. Fawzi, and J. K. Northup, Biochem., **29**, 3804 (1990).
11. D. A. Baylor, T. D. Lamb, and K.-W. Yau, J. Physiol. **288**, 613 (1979).
12. R. Uhl and N. J. Ryba, Biochim. Biophys. Acta **1054**, 56 (1990).
13. R. Uhl, R. Wagner, and N. Ryba, Trends Neurosci. **13**, 64 (1990).
14. E. J. Helmreich, and K. P. Hofmann, Biochim. Biophys. Acta **1286**, 285 (1996).
15. N. Kimura and N. Nagata, J. Biol. Chem. **254**, 3451 (1979).
16. N. Kimura, N. Shimada, M. Fukuda, et al., J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 309 (2000).
17. Д. Н. Орлов и Н. Я. Орлов, Биофизика **53**, 922 (2008).
18. A. S. Otero, Biochem. Pharmacol. **39**, 1399 (1990).
19. A. S. Otero, J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 269 (2000).
20. В. Г. Тищенков, Л. О. Грумбкова и Н. Я. Орлов, Докл. АН СССР **268**, 735 (1982).
21. Н. Я. Орлов, *Системы фототрансдукции палочек и колбочек сетчатки позвоночных. Молекулярные механизмы.* (LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deucschland, 2011).
22. В. Г. Тищенков и Н. Я. Орлов, Молекуляр. биология **18**, 776 (1984).
23. A. Kowluru, S. E. Seavey, C. J. Rhodes, and S. A. Metz, Biochem. J. **313**, 97 (1996).
24. R. E. Parks, Jr. and R. P. Agarwal, in *The Enzymes*, (Academic Press, New-York, 1973), Vol. 8, pp. 307–334.
25. E. H. Postel, S. J. Berberich, J. W. Rooney, and D. K. Kaetzel, J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 277 (2000).
26. M. T. Hartsough and P. S. Steeg, J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 301 (2000).
27. M. L. Lacombe, L. Milon, A. Munier, et al., J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 247 (2000).
28. A. M. Rosengard, H. C. Krutzsch, Shearn A., et al., Nature **342**, 177(1989).
29. R. Barnes, S. Masood, E. Barker, et al., Am. J. Pathol. **139**, 245 (1991).
30. P. S. Steeg, A. de la Rosa, U. Flatow, et al., Breast Cancer Res. Treat. **25**, 175 (1993).
31. P. S. Steeg, D. Palmieri, T. Ouatas, and M. Salerno, Cancer Lett. **190**, 1 (2003).
32. J. Biggs, E. Hersperger, P. Steeg, et al., Cell **63**, 933 (1990).
33. J. Biggs, N. Tripoulas, E. Hersperger, et al., Genes **2**, 1333 (1988).
34. N. Ishikawa, J. Bioenerg. Biomembr. **32**, 309 (2000).
35. C. Dumas, I. Lascu, S. Morera, et al., EMBO J. **11**, 3203 (1992).
36. J. Janin, C. Dumas, S. Morera, et al., J. Bioenerg. Biomembranes **32**, 215 (2000).
37. I. Lascu, A. Giartosio, S. Ransac, and M. Erent, J. Bioenerg. Biomembranes **32**, 227 (2000).
38. A. M. Gilles, E. Presecan, A. Vonica, and I. Lascu, J. Biol. Chem. **266**, 8784 (1991).
39. J. A. Stahl, A. Leone, A. M. Rosengard, et al., Cancer Res. **51**, 445 (1991).
40. Ishikawa, N., Shimada, N., Munakata, et al., J. Biol. Chem. **267**, 14366 (1992).
41. N. Shimada, N. Ishikawa, Y. Munakata, et al., J. Biol. Chem. **268**, 2583 (1993).
42. T. Fukuchi, N. Shimada, N. Hanai, et al., Biochem. Biophys. Acta **1265**, 113 (1994).
43. N. Ya. Orlov and N. Kimura, Biochemistry (Moscow) **63**, 171(1998).
44. H. Kuhn, Nature **283**, 587 (1980).
45. H. Kuhn, Curr. Top. Membr. Transp. **15**, 171(1981).
46. N. Ya. Orlov, T. G. Orlova, K. Nomura, et al., FEBS Lett. **389**, 186 (1996).
47. N. Ya. Orlov, T. G. Orlova, Ya. K. Reshetnyak, et al., J. Biomol. Struct. and Dynamics **16**, 955 (1999).
48. N. Ya. Orlov, T. G. Orlova, Ya. K. Reshetnyak, et al., Biochem. Mol. Biol. International **41**, 189 (1997).
49. Н. Я. Орлов, Ю. Ишиджиима, Д. Н. Орлов и др., Биохимия **72**, 1027 (2007).
50. F. Cuello, R. A. Schulze, F. Heemeyer, et al., J. Biol. Chem. **278**, 7220 (2003).
51. H. J. Hippe, S. Lutz, F. Cuello, et al., J. Biol. Chem. **278**, 7227 (2003).
52. Д. Н. Орлов, Т. Г. Орлова, А. Р. Незвецкий и Н. Я. Орлов, Биофизика **55**, 986 (2010).
53. Д. Н. Орлов, А. Р. Незвецкий, Т. Г. Орлова и др., Биофизика **59**, 837 (2014).
54. T. Wieland, I. Ulibarri, P. Gierschik, and K. H. Jakobs, Eur. J. Biochem. **196**, 707 (1991).
55. T. Wieland, M. Ronzani, and K. H. Jakobs, J. Biol. Chem. **267**, 20791 (1992).
56. T. Wieland, B. Nurnberg, I. Ulibarri, et al., J. Biol. Chem. **268**, 18111 (1993).
57. J. W. Clack, M. Juhl, J. Li, et al., Electrophoresis **24**, 3493 (2003).
58. J. W. Clack, M. L. Springmeyer, C. R. Clark, and F. A. Witzmann, Cell Biology Internatl. **30**, 829 (2006).
59. T. D. Lamb, and H. R. Matthews, J. Physiol. **407**, 463 (1988).
60. W. A. Sather and P. B. Detwiler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 9290 (1987).
61. I. Lascu and P. Gonin, J. Bioenerg. Biomemb. **32**, 64 (2000).
62. T. D. Lamb, Biophys. J. **67**, 1439 (1994).

The Decrement in Light Sensitivity of the Isolated Frog Retinal Rod in the Presence of the Phosphorylation-Resistant GDP Analogue Guanosine-5′-O-(2-Thio-Diphosphate) as a Confirmation of the Hypothesis about Transducin Activation via Transphosphorylation Mechanism

O.V. Petrukhin, T.G. Orlova, A.R. Nezvetsky, and N.Ya. Orlov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

It was shown that the decrement in light sensitivity of the isolated frog retinal rod cell after short-time perfusion with guanosine-5′-O-(2-thio-diphosphate), an analogue of GDP, resistant to phosphorylation by nucleoside diphosphate kinase can be explained based on the hypothesis that transducin, the main GTP-binding protein of retinal rod photoreceptor of vertebrates, is activated via phosphorylation of bound GDP to GTP, which is induced by the activated receptor rhodopsin, and thus this could be considered to be one of the proofs supporting this hypothesis.

Key words: GTP binding proteins, transducin, transphosphorylation