

ТРАНСДУЦИН-АКТИВИРОВАННАЯ cGMP-СПЕЦИФИЧНАЯ ФОСФОДИЭСТЕРАЗА НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ БЫКА. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МАГНИЯ

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

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
149290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: petrukhinoleg@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.06.16 г.

Методом рН-метрии в препаратах светоадаптированных наружных сегментов палочек сетчатки быка исследовалось кинетическое поведение фосфодиэстеразы, активированной трансдуцином в комплексе с негидролизуемым аналогом ГТР – гуанозин-5'-О-тиотрифосфатом – в диапазоне концентраций ионов магния 0,4–20 мМ. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при использовании реакционных сред, содержащих 10–15 мМ ионов Mg^{2+} , введение в реакционную среду 2–4 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (хелатора ионов кальция) индуцирует лишь относительно небольшие изменения концентрации свободных ионов магния, которые не способны заметно повлиять на фосфодиэстеразную активность.

Ключевые слова: наружные сегменты палочек сетчатки, система фототрансдукции, cGMP-специфичная фосфодиэстераза, G-белки, трансдуцин, регуляция ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} .

Основными элементами молекулярного усилителя наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки позвоночных являются рецептор света мембранный белок родопсин, гетеротримерный ГТР-связывающий белок (G-белок) трансдуцин и исполнительный фермент cGMP-специфичная фосфодиэстераза (PDE) (см., например, [1,2]). Поглотившая квант света молекула родопсина (фотоактивированный родопсин, R^*) за время ее жизни в активном состоянии ($t \approx 1$ с) последовательно взаимодействует с большим числом (10^2 – 10^3) молекул Gt, индуцируя их переход из неактивного состояния Gt-GDP в активное состояние Gt-GTP [3,4]. Такой процесс ведет к активации значительного количества (10^2 – 10^3) молекул PDE и, как следствие, к гидролизу вторичного мессенджера cGMP [3–5]. Падение концентрации cGMP инактивирует cGMP-регулируемые ионные каналы плазматической мембраны НСП [6] и в конечном итоге приводит к генерации электрического ответа фоторецептора.

Концентрация PDE в НСП очень высока (100–200 мкМ) [2–5]. При активации трансду-

цином молекула PDE способна гидролизовать около 1000 молекул субстрата в секунду. В связи с этим активность PDE в НСП можно измерять относительно простыми и доступными методами, например методом рН-метрии [7].

В качестве субстрата для PDE возможно использовать не только cGMP ($K_m = 70$ мкМ), но и cAMP ($K_m = 2,3$ мМ) [7,8]. Использование высокой концентрации cAMP (10 мМ), который гидролизуетсся заметно (в два–три раза) медленнее, чем cGMP [7,8], позволяет вести регистрацию активности PDE в течение длительного времени. В ряде случаев это дает некоторые экспериментальные преимущества.

Ионы Mg^{2+} необходимы для функционирования PDE НСП и других членов суперсемейства PDE позвоночных [9,10] и могут оказывать влияние на эффективность взаимодействия между трансдуцином и PDE НСП.

Хотя в большинстве работ активность PDE в НСП измеряется при 2–3 мМ Mg^{2+} (см., например, [8,11–18]), остается неясным, достаточны ли такие концентрации ионов Mg^{2+} как для достижения максимальной активности PDE в различных режимах ее работы, так и эффективного функционирования системы фототрансдукции в целом. Решение этого вопроса приобретает дополнительное значение при попытках выяснить влияние ионов Ca^{2+} на процессы фото- и трансдуцин-зависимой активации

Сокращения: НСП – наружные сегменты палочек сетчатки, G-белки – гетеротримерные ГТР-связывающие белки, PDE – cGMP-специфичная фосфодиэстераза наружных сегментов палочек сетчатки, R^* – фотоактивированный родопсин, GTP[S] – гуанозин-5'-[γ-тио]трифосфат.

PDE в НСП, поскольку в этом случае для поддержания определенной концентрации свободных ионов Ca^{2+} в среду вводится кальциевый хелатор EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота), который, обладая сродством ко всем двухвалентным ионам металлов, может изменять также и концентрацию свободных ионов Mg^{2+} .

В связи с вышесказанным в настоящей работе мы предприняли попытку исследовать влияние ионов Mg^{2+} на процесс активации PDE трансдуцином в комплексе с негидролизуемым аналогом GTP гуанозин-5'-О-тиотрифофатом (GTP[S]) в полностью обесцвеченных препаратах НСП. Использование полностью обесцвеченных НСП (в отсутствие экзогенного АТФ) и применение негидролизуемого аналога GTP позволяло сохранить активирующую способность R^* и трансдуцина в течение длительного времени. Отметим, что влияние ионов Mg^{2+} на активность PDE НСП было достаточно детально исследовано ранее, однако в этом случае объектом исследования был фермент, изолированный из НСП и активированный трипсином [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на препаратах НСП сетчатки быка, полученных по методу, близкому к описанному ранее [8], в результате двукратной флотации ($100000 \text{ g} \times 60 \text{ мин}$) НСП в 40% (w/v) растворе сахарозы, приготовленном на изотоническом буфере (50 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0, 140 мМ NaCl, 3,5 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ CaCl_2). Очищенные НСП ($A_{280/500} = 3,0-3,2$) промывали центрифугированием ($100000 \text{ g} \times 60 \text{ мин}$) в буфере, содержащем 50 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 0,7 мМ KCl, 0,4 мМ MgCl_2 и 0,1 мМ CaCl_2 , и суспендировали в 40%-м растворе сахарозы, приготовленном на этом же буфере, в конечной концентрации по родопсину 10 мг/мл. Полученные препараты хранили в темноте при -20°C в пластиковых контейнерах объемом 0,5 мл.

Активность PDE в препаратах НСП измеряли pH-метрическим методом [19], регистрируя закисление среды, обусловленное появлением протонов в ходе реакции гидролиза субстрата (10 мМ cAMP или 2 мМ cGMP). Начальное значение pH составляло 8,0, конечное значение было не ниже 7,8. В данном диапазоне изменение pH являлось практически линейной функцией количества протонов, появившихся в результате реакции. Количество появившихся протонов определяли титруя систему 100 мМ NaOH.

Кинетику изменений pH регистрировали с помощью малогабаритного (диаметр 3 мм) комбинированного pH-электрода E5259 (Sigma-Aldrich, USA) и высокочувствительного компьютерного pH-метра СРХ-2.1 (ИБП РАН, Россия), снабженного специально разработанным для данной задачи программным обеспечением. Использованный измерительный комплекс обладал чувствительностью около 0,001 pH при временном разрешении около 1 с.

Реакцию вели в термостабилизированных пластиковых кюветах объемом 0,3–0,5 мл при 30°C . Реакционная среда содержала 50 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0, 0,7 мМ KCl, 0,1 мМ CaCl_2 , 0,4 мМ MgCl_2 и NaCl в конечной концентрации 100 мМ. Для изменения концентрации ионов магния в реакционную среду добавляли 1 М MgCl_2 до конечных концентраций 1–20 мМ.

Препарат НСП добавляли в реакционную среду до конечной концентрации по родопсину 0,5–1 мг/мл. Непосредственно перед добавлением препараты НСП гомогенизировали с помощью шприца (объем 2 мл) пятикратным пропусканием через иглу 0,5 мм и полностью обесцвечивали светом с длиной волны $> 540 \text{ нм}$ в течение 2 мин.

Измерение базальной активности PDE инициировали добавлением cAMP до конечной концентрации 10 мМ [7]. Скорость реакции была постоянна в течение всего времени измерений (1–5 мин). Последующую активацию PDE трансдуцином инициировали добавлением GTP[S] до конечной концентрации 10 мкМ. Скорость реакции была близка к постоянной в течение не менее 1 мин после добавления GTP[S]. Активность PDE выражали в количестве субстрата, гидролизованного препаратом НСП за 1 мин.

Спектральные измерения выполняли на спектрофотометре Cary 100 (Varian, США). Концентрацию родопсина определяли по разности поглощения образцов НСП при 500 нм до и после их полного обесцвечивания оранжевым светом в присутствии гидроксилamina. Молярный коэффициент экстинкции родопсина при 500 нм принимали равным $40600 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичная кинетика гидролиза 10 мМ cAMP фосфодиэстеразой НСП в базальном состоянии и при ее последующей активации комплексом трансдуцин–GTP[S] в среде, содержащей 0,4 мМ Mg^{2+} , показана на рис. 1. Начальная скорость гидролиза субстрата фосфодиэстеразой, активированной комплексом трансдуцин–GTP[S],

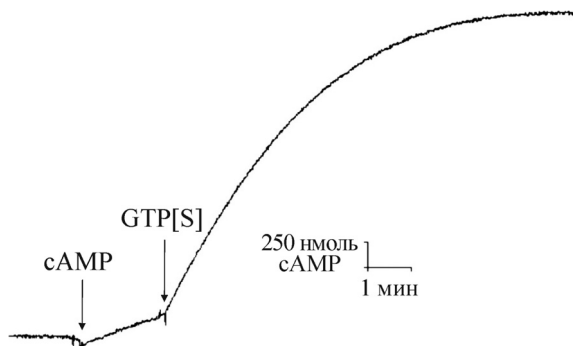


Рис. 1. Кинетика гидролиза субстрата (10 мМ сАМР) PDE в составе полностью обесцвеченных НСП ($[R^*] \approx 0,4$ мг/мл) до и после ее активации комплексом трансдуцин–GTP[S].

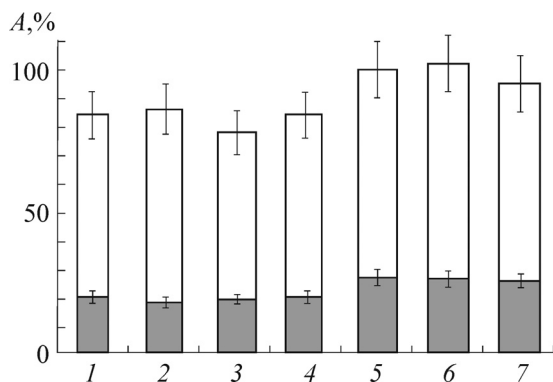


Рис. 2. Средние значения удельной активности PDE (A, %) в полностью обесцвеченных НСП до и после ее активации комплексом трансдуцин–GTP[S] (темные и светлые столбцы соответственно) при различных концентрациях свободных ионов магния: 1 – 0,4 мМ, 2 – 0,8 мМ, 3 – 1,6 мМ, 4 – 3,2 мМ, 5 – 6,4 мМ, 6 – 12,8 мМ, 7 – 20 мМ. Значение удельной активности PDE, принятой за 100%, составляло ≈ 3600 нмоль гидролизованного сАМР в мин на мг родопсина. У-погрешности на диаграмме отражают среднеквадратические отклонения при трех–пяти повторностях при измерении активности PDE.

достигала значений, близких к максимальным, при концентрациях ионов Mg^{2+} более 1 мМ и сохраняла эту величину вплоть до 15–20 мМ (рис. 2). Максимальная активность PDE, активированной комплексом трансдуцин–GTPS, составляла 3500–4000 нмоль гидролизованного сАМР в мин на мг родопсина, что хорошо соответствует данным, полученным нами ранее для данного типа препаратов НСП [13]. В близком согласии с известными данными [7] базальная активность фермента оставалась практически постоянной в всем исследованном диапазоне концентрации ионов Mg^{2+} (0,4–20 мМ),

Таким образом, в средах с умеренной ионной силой для максимальной активации PDE трансдуцином достаточно 2–3 мМ Mg^{2+} . Это хорошо соответствует условиям, использованным в подобных исследованиях ранее (см., например, [8,11–18])

Наши исследования также показали, что активность PDE в комплексе с трансдуцином–GTP[S] остается практически постоянной при изменении концентрации ионов магния в диапазоне 2–20 мМ. Следовательно, введение в реакционные среды, содержащие ионы Mg^{2+} в концентрации 10–15 мМ, 2–4 мМ EGTA для регуляции концентрации свободных ионов Ca^{2+} , может вызвать лишь относительно малые изменения концентрации ионов магния, которые не будут способны вызвать заметные изменения активности PDE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Stryer, *Annu. Rev. Neurosci.* **9**, 87 (1986).
2. L. Stryer, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10711 (1991).
3. E. N. Pugh, Jr. and T.D. Lamb, *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 111 (1993).
4. 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, p. 183.
5. V. Y. Arshavsky, T. D. Lamb, and E. N. Pugh, Jr., *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 153 (2002).
6. E. E. Fesenko, S. S. Kolesnikov, and A. L. Lyubarsky, *Nature* **313**, 310 (1985).
7. R. Yee and P. A. Liebman, *J. Biol. Chem.* **253**, 8902 (1978).
8. N. Ya. Orlov, E. V. Kalinin, T. G. Orlova, and A. A. Freidin, *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 325 (1988).
9. A. T. Bender and J. A. Beavo, *Pharmacol. Rev.* **58**, 488 (2006).
10. F. He, A. B. Seryshev, C. W. Cowan, and T. G. Wensel, *J. Biol. Chem.* **275**, 20572 (2000).
11. J. K. Angleson and T. G. Wensel, *Neuron* **11**, 939 (1993).
12. J. K. Angleson and T. G. Wensel, *J. Biol. Chem.* **269**, 16290 (1994).
13. Н. Я. Орлов, *Системы фототрансдукции палочек и колбочек сетчатки позвоночных. Молекулярные механизмы* (LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland, 2011).
14. N. Bennett and A. Clerk, *Biochemistry* **28**, 7418 (1989).
15. N. Miki, J. J. Keirns, F. R. Marcus, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3820 (1973).
16. N. Miki, J. M. Baraban, J. J. Keirns, et al., *J. Biol. Chem.* **250**, 6320 (1975).
17. W. Baehr, M. J. Dewlin, and M. L. Applebury, *J. Biol. Chem.* **254**, 11669 (1979).

18. A. B. Fawzi and J. K. Northup, *Biochemistry* **29**, 3804 (1990). 19. P. A. Liebman and A. T. Evanczuk, *Methods Enzymol.* **81**, 532 (1982).

Transducin-Activated cGMP-Specific Phosphodiesterase of Bovine Retinal Rod Outer Segments. Influence of Magnesium Ions

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*

The kinetic behaviour of phosphodiesterase stimulated by transducin in a complex with guanosine 5'-O-thiotriphosphate, a nonhydrolyzed GTP analog, was studied by the pH-metric method in totally bleached bovine retinal rod outer segments suspensions at a wide range of magnesium ions concentration (0.4–20 mM). The obtained results assumed that addition of 2–4 mM of ethylene glycol tetraacetic acid (calcium chelating agent) in a reaction media, containing 10–15 mM of Mg^{2+} ions, induces only relatively small changes in the concentration of free Mg^{2+} ions, which can not noticeably affect phosphodiesterase activity.

Key words: retinal rod outer segments, system of phototransduction, cGMP-specific phosphodiesterase, G-proteins, transducin, regulation by Mg^{2+} and Ca^{2+} ions