

## Ca<sup>2+</sup>-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК, РЕГУЛИРУЮЩИЙ ВРЕМЯ ЖИЗНИ АКТИВНОГО СОСТОЯНИЯ ТРАНСДУЦИНА

© 2019 г. О.В. Петрухин, Т.Г. Орлова, А.Р. Незвецкий, Н.Я. Орлов\*

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

*E-mail: norlov46@mail.ru*

Поступила в редакцию 19.07.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 02.08.2019 г.

Ранее при исследовании кинетического поведения сGMP-специфичной фосфодиэстеразы в препаратах наружных сегментов палочек сетчатки быка, кратковременно активированной 2 мкМ GTP при высоких и низких концентрациях (100 мкМ и <10 нМ, соответственно) свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, было показано, что время жизни сGMP-специфичной фосфодиэстеразы в активном состоянии заметно (≈2 раза) уменьшалось при использовании низких концентраций свободных ионов кальция Ca<sup>2+</sup>. Это предполагало, что в наружных сегментах палочек сетчатки быка присутствует Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок, способный взаимодействовать с так называемым «свободным» трансдуцином и регулировать скорость гидролиза связанного в его активном центре GTP в зависимости от концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup>. Настоящая работа посвящена обсуждению вопроса о том, какой из известных существующих в наружных сегментах палочек сетчатки быка Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков мог бы играть роль искомого регулятора.

*Ключевые слова: наружные сегменты палочек сетчатки, система фототрансдукции, сGMP-специфичная фосфодиэстераза, G-белки, трансдуцин, Ca<sup>2+</sup>-связывающие белки фоторецепторов сетчатки, аффинная хроматография, кальмодулин-сефароза, регуляция ионами Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>.*

DOI: 10.1134/S0006302919050053

Ранее методом рН-метрии в препаратах светоадаптированных наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки быка мы исследовали кинетическое поведение сGMP-специфичной фосфодиэстеразы, активированной 2 мкМ GTP при высоких и низких концентрациях (100 мкМ и <10 нМ соответственно) свободных ионов Ca<sup>2+</sup> [1]. Такой подход показал, что время жизни сGMP-специфичной фосфодиэстеразы в активном состоянии заметно (в полтора-два раза) уменьшалось при низких концентрациях свободных ионов Ca<sup>2+</sup> [1]. Полученные результаты укладывались в точку зрения, согласно которой время жизни активного состояния G-белка трансдуцина, посредника в передаче возбуждения от молекулы фотоактивированного родопсина на молекулы сGMP-специфичной фосфодиэстеразы, определяется не только функционированием известной системы RGS-белков (RGS9-1, R9AP, Gtβ5-L) (см., например, работу [2]), ускоряющих скорость гидролиза GTP в активном центре его α-субъединицы

при ее взаимодействии с ингибиторной γ-субъединицей сGMP-специфичной фосфодиэстеразы, но и до известной степени зависит также от концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup> [1]. Это согласовывалось с представлениями, полученными нами ранее в результате прямых измерений времени гидролиза GTP в активном центре трансдуцина, выполненных в так называемом «однооборотном» режиме ([GTP] << [трансдуцин]) с помощью препарата [α-<sup>32</sup>P]GTP с удельной активностью ≈ 500 Ки/ммоль [3,4]. Синтез этих результатов и представлений послужил основой для формирования точки зрения, согласно которой Ca<sup>2+</sup>-зависимой инактивации подвергается популяция так называемого «свободного» трансдуцина, т. е. белка, который активировался при взаимодействии с родопсином, но не успел вступить во взаимодействие с сGMP-специфичной фосфодиэстеразой за время, определяемое длительностью развития ответа фоторецептора [1]. Такая ситуация, возникающая потому, что концентрация активированного трансдуцина значительно превышает концентрацию фермента-мишени (сGMP-специфичной фосфодиэстеразы),

*Сокращения:* НСП – наружные сегмента палочек сетчатки, GCAP – Ca<sup>2+</sup>-зависимый активатор гуанилатциклазы.

была подтверждена в результате моделирования диффузионного поведения молекул, являющихся главными участниками системы фототрансдукции, методом Монте-Карло [5].

Полученные результаты предполагают, что в НСП присутствует Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок, способный взаимодействовать со «свободным» трансдуцином и регулировать скорость гидролиза связанного в его активном центре GTP в зависимости от концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup>. В связи с этим наше внимание привлекли полученные ранее данные, согласно которым трансдуцин способен взаимодействовать с кальмодулином Ca<sup>2+</sup>-зависимым образом. Это было продемонстрировано нами, в частности, методом аффинной хроматографии на кальмодулин-сефарозе [6] и согласовывалось с результатами ряда работ, выполненных с помощью различных методов и подходов, в которых было продемонстрировано взаимодействие между кальмодулином и комплексами βγ-субъединиц ряда других G-белков (см., например, работу [7]).

Совокупность этих данных создавала впечатление, что искомым регулятором времени жизни свободной формы трансдуцина может быть кальмодулин. Однако кальмодулин далеко не единственный присутствующий в НСП представитель семейства Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков. В частности, в конце 1990-х годов методом аффинной хроматографии на мелиттин-сефарозе нами было показано, что в НСП, помимо кальмодулина, присутствуют белки с кажущейся молекулярной массой 26 и 23 кДа, взаимодействующие с сорбентом Ca<sup>2+</sup>-зависимым образом [8]. В результате большого количества последующих работ эти белки были идентифицированы соответственно как Ca<sup>2+</sup>-зависимый активатор гуанилатциклазы (GCAP-белок) и как реверин — Ca<sup>2+</sup>-зависимый регулятор активности протеинкиназы, фосфорилирующей родопсин (см., например, работы [9–11]). В связи с этим настоящая работа посвящена обсуждению вопроса о том, какой именно из существующих в НСП Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков мог бы играть роль искомого регулятора.

В рамках традиционных представлений о механизмах функционирования кальмодулина и реверина [9–11], функционально-активных в комплексе с кальцием, а также схемах их взаимодействия с белком-мишенью легко допустить, что при так называемых «высоких» концентрациях свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, характерных для работы фоторецептора в темноте, кальмодулин и реверин должны входить в состав трансдуцинового комплекса и играть роль ингибитора процесса инактивации. Следовательно, их концентрация должна быть не меньше чем концентрация трансдуцинового комплекса. Однако, несмотря на многочисленные работы по выделению и исследованию

трансдуцина, присутствие кальмодулина и реверина в составе трансдуцинового комплекса отмечено не было. Кроме того, по данным независимого определения [8] концентрации этих белков в НСП значительно уступают концентрации трансдуцина.

Все это заставляет сомневаться в том, что роль искомого регулятора могли бы играть кальмодулин или реверин и позволяет предположить, что данную роль может играть еще один из присутствующих в НСП Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков, идентифицированный ранее как регулятор активности гуанилатциклазы (GCAP-белок). Данный белок, в отличие от других Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков НСП, является функционально-активным в комплексе с ионами Mg<sup>2+</sup>. Такой комплекс образуется при падении концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме НСП в ответ на свет. Поэтому можно предположить, что в комплексе с ионами Mg<sup>2+</sup> он не только активирует гуанилатциклазу [11], но и, присутствуя в НСП в заметной концентрации, составляющей около 20% от концентрации трансдуцина [11], способен комплексоваться со «свободным» трансдуцином и активировать гидролиз GTP в активном центре его α-субъединицы. Возможная бифункциональность этого белка выглядит дополнительно привлекательной, поскольку способна обеспечить синхронную регуляцию процесса синтеза cGMP гуанилатцилазой и инактивацию процесса гидролиза cGMP фосфодиэстеразой в ответ на индуцированное светом падение концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме НСП.

Предполагалось [12], что ускорение задней фазы фотосоответа при действии на фоторецептор фонового облучения обусловлено фосфорилированием белков RGS-комплекса, что и ускоряет процесс инактивации трансдуцина. Фосфорилирование осуществляется родопсинкиназой, активирующейся в ответ на опосредованное реверинном фотоиндуцированное падение концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме НСП. Эта экзотическая точка зрения, предполагающая мультифункциональность родопсинкиназы, однако, не получила подтверждения — делеция гена реверина не оказала ожидаемого влияния на характеристики фотосоответов. Это и привело к предположению [12] о том, что, помимо регулируемых концентрацией свободных ионов Ca<sup>2+</sup> процессов синтеза cGMP и инактивации родопсина родопсинкиназой, в НСП существуют дополнительные механизмы, которые регулируют каскад фототрансдукции и, таким образом, обеспечивают процесс адаптации к фоновой подсветке. Наше предположение о возможном участии Ca<sup>2+</sup>-зависимого GCAP-белка в процессе инактивации «свободной» формы трансдуцина при понижении концентрации свободных ионов Ca<sup>2+</sup>

в ответ на фоновую подсветку и может быть одним из указаний в пользу существования таких механизмов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О. В. Петрухин, Т. Г. Орлова, А. Р. Незвецкий и Н. Я. Орлов, *Биофизика* **59**, 854 (2014).
2. V. Yu. Arshavsky and T. P. Wenzel, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 7725 (2013).
3. В. Г. Тищенко, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Пушино–Минск, 1984).
4. Н. Я. Орлов, *Системы фототрансдукции палочек и колбочек сетчатки позвоночных. Молекулярные механизмы* (LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland, 2011).
5. О. В. Петрухин, Т. Г. Орлова, А. Р. Незвецкий и Н. Я. Орлов, *Биофизика* **61**, 1128 (2016).
6. В. М. Грищенко, Т. Г. Орлова, А. А. Фрейдин и Н. Я. Орлов, *Биофизика* **51**, 817 (2006).
7. T. Asano, N. Ogasawara, S. Kitajima, and M. Sano, *FEBS Lett.* **203**, 135 (1986).
8. В. М. Грищенко, Т. Г. Орлова, А. А. Фрейдин, и Н. Я. Орлов, *Докл. АН СССР* **307**, 1498 (1989).
9. A. M. Dizhoor, S. Ray, S. Kumar, et al., *Science* **251**, 915 (1991).
10. E. N. Gorodovikova, A. A. Gimelbrant, I. I. Senin, and P. P. Philippov, *FEBS Lett.* **349**, 187 (1994).
11. H.-G. Lambrecht and K.-W. Koch, *EMBO J.* **10**, 793 (1991).
12. Ch.-K. Chen, M. L. Woodruff, and G. L. Fain, *J. Gen. Physiol.* **145**, 213 (2015).

## Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein that Regulates Lifetime of Transducin Active State

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

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

It has been shown by earlier study on the kinetic behavior of bovine retinal rod outer segment cGMP-specific phosphodiesterase, activated by 2 μM GTP at high and low (100 μM and 10 nM, respectively) concentration of free Ca<sup>2+</sup> ions that an approximately twofold decreases in the lifetime of cGMP-specific phosphodiesterase in an active state was notable at low concentrations of free Ca<sup>2+</sup> ions. It has been suggested that retinal rod outer segments contain Ca<sup>2+</sup>-binding protein that interacts with so called free transducin and regulates the rate of GTP hydrolysis in its active site depending on the free Ca<sup>2+</sup> ion concentration. This study is devoted to a discussion of the question about what kind of retinal rod outer segments Ca<sup>2+</sup>-binding proteins may play a role of a regulator of interest.

*Keywords: bovine retinal rod outer segment, system of phototransduction, cGMP-specific phosphodiesterase, G-proteins, transducin, Ca<sup>2+</sup>-binding proteins of retinal photoreceptors, affinity chromatography, calmodulin-sepharose, regulation with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions*