



УДК 577.217.5

© 1990 г.

*В. В. Гуревич, С. А. Зозуля, Е. П. Широкова,
Т. А. Звяга, М. Н. Гарновская*, И. Л. Думлер*,
И. Р. Бадалов, М. Ю. Наточин, И. Д. Покровская,
Б. Е. Шмуклер*

СИНТЕЗ ЗРИТЕЛЬНОГО РОДОПСИНА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ТРАНСЛЯЦИИ

II *. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО РОДОПСИНА И ЕГО МУТАНТНЫХ ФОРМ

*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Пушино;*

** Институт эволюционной физиологии и биохимии им. П. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград*

Описана экспрессия зрительного родопсина в бесклеточной системе трансляции с котрансляционным встраиванием его в липосомы из фосфатидилхолина. Показано, что рекомбинантный родопсин по своим спектральным и функциональным свойствам не отличается от природного. Получены методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза и охарактеризованы два мутантных родопсина с заменами в гидрофильном С-концевом домене. Показано, что замена Cys-316→Ser не изменяет способность родопсина активировать зрительный каскад усиления, а двойная мутация Asp-330→Asn, Asp-331→Asn резко снижает его функциональную активность.

В предыдущей статье этой серии [1] мы сообщали о разработке препаративной системы экспрессии опсина быка в бесклеточной системе трансляции — экстракте из зародышей пшеницы. Нами было показано, что котрансляционно встроенный в фосфатидилхолиновые липосомы и в микросомы из коры мозга крысы опсин после регенерации 11-цис-ретинала становится функционально активным [2].

Цель настоящей работы — описание функциональных свойств экспрессированного *in vitro* рекомбинантного родопсина и двух его мутантных форм, полученных методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза. По относительной способности активировать фосфодиэстеразу гуанозин-2',3'-монофосфата (сGMP) к природному родопсину наиболее близок рекомбинантный, встроенный в липосомы из фосфатидилхолина [2]. Именно такие препараты позволили подробнее охарактеризовать рекомбинантный родопсин и его мутантные формы. Так как содержание родопсина в липосомах составляет более 10% общего белка, возможно его функциональное тестирование с использованием соответствующих контрольных препаратов липосом [2] без дальнейшей очистки.

Для количественного функционального сравнения рекомбинантного родопсина с природным, выделенным из сетчатки быка, необходима степень его регенерации 11-цис-ретиналом. Чтобы узнать ее, после добавления к опсину кофактора был получен спектр рекомбинантного родопсина, снятый против такого же образца после полной засветки. Его максимум поглощения совпал с максимумом поглощения природного родопсина (500 нм) (рис. 1). Рассчитанная по этому спектру степень регенерации (исходя из молярного коэффициента поглощения родопсина $42\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) составляет 90%.

Функциональные свойства рекомбинантного родопсина исследовали по его способности активировать фосфодиэстеразу сGMP и GTP-азу транс-

* Предыдущее сообщение см. [1].

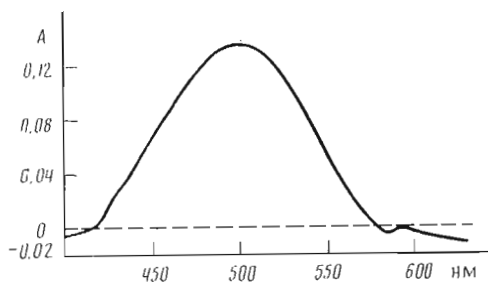


Рис. 1. Дифференциальный спектр препарата, содержащего 44,5 мкг рекомбинантного родопсина, встроенного в липосомы из фосфатидилхолина, регенерированного 10-кратным молярным избытком 11-*цис*-ретиная и затем растворенного в темноте в 2% бромиде цетилтриметиламмония, снятый против такого же образца, засвеченного после солиubilизации в течение 15 мин лампой мощностью 100 Вт с расстояния 10 см (полная засветка)

длина. Зависимость активации фосфодиэстеразы cGMP от количества природного и рекомбинантного родопсина, добавленного при реконструкции зрительного каскада усиления (в случае рекомбинантного родопсина учтено, что его количество составляет 90% от присутствующего в препарате опсина), свидетельствует (рис. 2а), что по способности активировать фосфодиэстеразу cGMP рекомбинантный родопсин дикого типа не отличается от природного. Данные по кинетике фосфодиэстеразной реакции также указывают на отсутствие функциональных различий между природным и встроенным в липосомы рекомбинантным родопсином (рис. 2б). Данные по стимуляции GTP-азной активности трансдуцина разными количествами природного и рекомбинантного родопсина и кинетика GTP-азной реакции (рис. 2в, г) подтверждают это.

Таким образом, экспрессированный в бесклеточной системе трансляции и котрансляционно встроенный в липосомы из фосфатидилхолина опсин обладает высокой способностью к регенерации хромофором — 11-*цис*-ретином. По способности после регенерации активировать зрительный каскад усиления, измеренной как по стимуляции им GTP-азной активности трансдуцина, так и по активации фосфодиэстеразы cGMP, он не отличается от природного родопсина. Это делает возможным проводить структурно-функциональные исследования зрительного родопсина с применением метода олигонуклеотид-направленного мутагенеза, используя эту систему экспрессии.

С тех пор как в 1982 г. была установлена первичная структура зрительного родопсина быка [3], определены полные или частичные структуры 12 родопсинов и родопсинов, а также большой группы структурно родственных им рецепторов гормонов и нейромедиаторов, сопряженных с G-белками. Сравнение известных последовательностей эукариотических фоторецепторных белков позволяет выделить наиболее консервативные, потенциально важные для их функционирования аминокислотные остатки. Существующие в литературе сведения дают возможность предположить, что во взаимодействии активированного родопсина с трансдуцином (как и во взаимодействии рецепторов с соответствующими G-белками) участвуют прежде всего гидрофильный домен, расположенный между V и VI трансмембранными доменами, и/или C-концевой гидрофильный домен.

Так, например, исследование химерных рецепторов, состоящих из доменов адренергических рецепторов α_2 (ингибирующих аденилатциклазу) и β_2 (стимулирующих фермент) показало, что основную роль в определении того, с каким G-белком, ингибирующим или стимулирующим, будет взаимодействовать рецептор, играет гидрофильный домен между трансмембранными доменами V и VI [4]. Замена Lys-248 в этом домене родопсина лишает его способности стимулировать GTP-азную активность трансдуцина [5]. Правда, связывание с родопсином антител к этому участку его молекулы, по данным Джонсона с сотр. [6], не влияет на последующее взаимодействие его с трансдуцином, в отличие от связывания антител к C-концевому домену и к участку между трансмембранными доменами III и IV. На участке C-концевого гидрофильного домена (кроме, по-видимому, его 12 C-концевых аминокислотных остатков) во взаимодействии с трансдуцином указывает также и то, что его фосфорилирование родопсинкиназой ослабляет это взаимодействие. В пользу та-

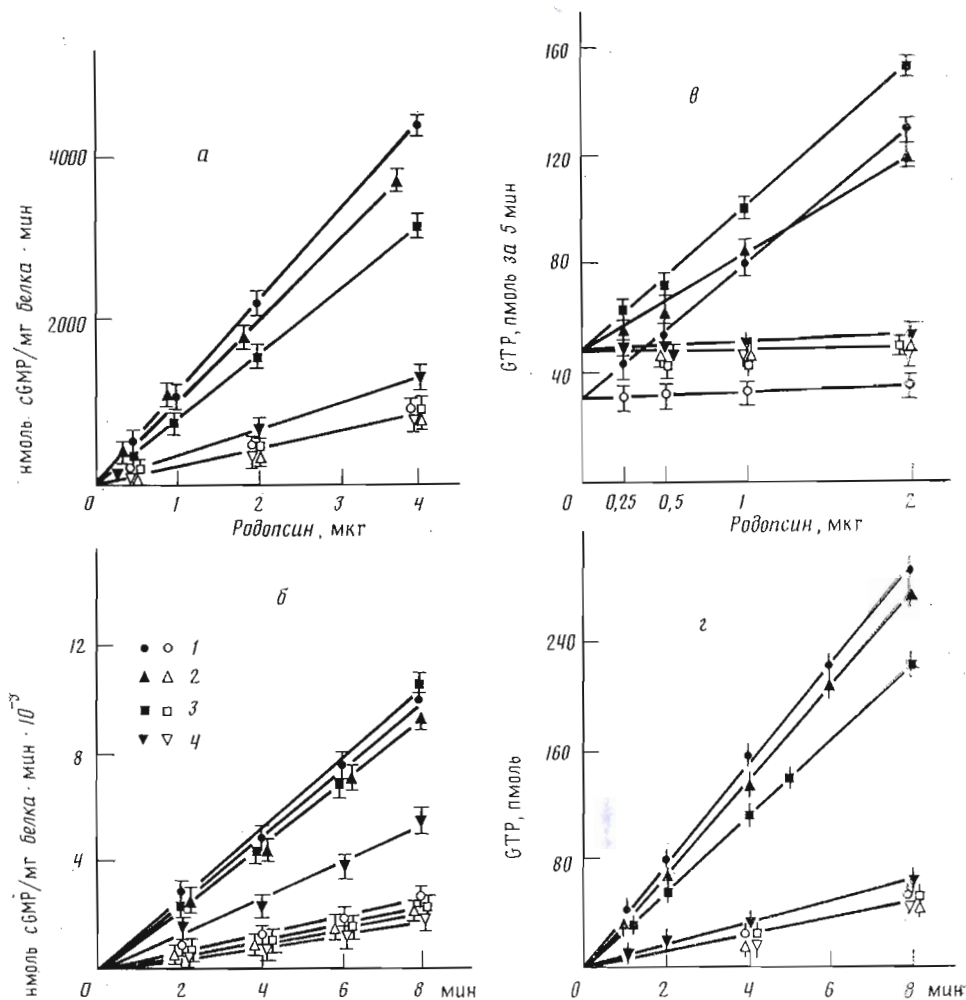


Рис. 2. Функциональная активность природного (1), рекомбинантного родопсина дикого типа (2), мутанта Cys-316→Ser (3) и двойного мутанта Asp-330→Asn, Asp-331→Asn (4), а — к родопсину добавляли фосфодиэстеразу и трансдуцин и измеряли активность в течение 4 мин; б — кинетика фосфодиэстеразной реакции при активации ее 4 мкг родопсина каждого типа; в — к родопсину добавляли трансдуцин и проводили GTP-азную реакцию 5 мин на свету; г — кинетика GTP-азной реакции при активации ее 2 мкг родопсина каждого типа. Контрольными препаратами во всех экспериментах служили липосомы, подвергнутые тем же экспериментальным процедурам, что и содержащий родопсин липосомы, за исключением того, что в трансляционную смесь не добавляли опсиновую мРНК. Во всех случаях активности определяли в трех параллельных измерениях (показаны средние значения ± стандартное отклонение). Измерения проводили в присутствии (темные символы) или в отсутствие (светлые символы) 10 мкМ рNppG

кого взаимодействия свидетельствуют также данные, полученные методом ограниченного протеолиза этого домена и при изучении ингибирования пептидами, соответствующими его отдельным определенным участкам, активации трансдуцина родопсином [7]. На этом же участке у родопсинов быка, овцы и человека присутствуют два расположенных рядом остатка Cys (соответствующих Cys-322, Cys-323 родопсина быка), которые у родопсина быка пальмитоилированы [8].

Среди наиболее консервативных остатков С-концевого домена в качестве первых мишеней для направленного мутагенеза нами были выбраны остатки Cys-316, Asp-330 и Asp-331. Остаток цистеина, расположенный рядом с положительно заряженными остатками, соответствующими, по-видимому, области взаимодействия С-концевого участка VII трансмембранного домена с отрицательно заряженными «головками»

фосфолипидов, т. е. находящийся в самом начале С-концевого гидрофильного домена молекулы родопсина и соответствующий Cys-316 родопсина быка, высококонсервативен и присутствует не только в родопсинах млекопитающих, но и в рецепторах гормонов и нейромедиаторов [7]. Несущие отрицательные заряды остатки, соответствующие Asp-330 и Asp-331, также присутствуют во всех родопсинах и расположены рядом с теми остатками Ser и Thr, фосфорилирование которых препятствует активации родопсином трансдуцина.

При выборе аминокислотных остатков, на которые предполагалось заменить выбранные мишени, мы исходили из требований минимального изменения стерических параметров изменяемых остатков. Поэтому остатки Cys заменяли на Ser, а Asp — на Asn.

Как видно из рис. 2, замена Cys-316→Ser не влияет на способность родопсина активировать фосфодиэстеразу и GTP-азную способность трансдуцина, тогда как двойная мутация Asp-330→Asn, Asp-331→Asn снижает способность родопсина активировать GTP-азу трансдуцина в 10–12 раз, а фосфодиэстеразу cGMP — в 6–7 раз (кажущийся более слабый эффект мутации на способность родопсина активировать фосфодиэстеразу может объясняться тем, что меньшая чувствительность этого теста несколько увеличивает ошибку при определении очень слабой, но не полностью утраченной функциональной активности этого мутанта).

Таким образом, замена двух отрицательно заряженных остатков Asp-330 и Asp-331 на незаряженные остатки Asn в гидрофильном С-концевом домене родопсина резко снижает его способность активировать зрительный каскад усиления, тогда как замена остатка Cys-316 на Ser не влияет на эту его способность. Такие же данные о роли остатка Cys-316 получены в лаборатории Х. Г. Кораны [9] с использованием для экспрессии родопсина культивируемых эукариотических клеток; роль остатков Asp-330 и Asp-331 ранее не изучалась.

По нашему мнению, трансляция *in vitro* может использоваться как препаративная система экспрессии при белково-инженерных исследованиях и других, в том числе рецепторных, белков, а при непрерывной подаче в трансляционную смесь аминокислот и источников энергии по методу, недавно описанному Спириным с сотр. [10], — как система крупномасштабного синтеза белка для практического использования. В бесклеточной системе трансляции отсутствуют многие регуляторные механизмы, которые, по-видимому, препятствуют в ряде случаев успешной экспрессии интегральных мембранных белков в гетерологичных клеточных системах. Экспрессия в системе трансляции *in vitro* с котрансляционным встраиванием интегрального мембранного белка в липосомы позволяет преодолеть, в частности, такое присущее экспрессии в эукариотических клетках всех типов ограничение, как присутствие в них белков, функционально близких или идентичных экспрессируемому. Экстракт из зародышей пшеницы удобен еще и потому, что в нем практически полностью отсутствует эндогенная протеолитическая активность. Кроме того, очевидными преимуществами этой системы являются возможности: 1) быстрого (в течение 1 дня) получения мутантного белка после введения мутации в ДНК; 2) получения рекомбинантного белка, меченного радиоактивными или модифицированными аминокислотами; 3) получения рекомбинантного мембранного белка в интересующем исследователя липидном окружении.

Экспериментальная часть

Транскрипцию in vitro плазмидной ДНК pG2S6-I и ее мутантных производных проводили как описано нами ранее [1].

Трансляцию мРНК в экстракте из зародышей пшеницы осуществляли как описано нами ранее [1, 2], используя только опсиновую мРНК с оптимальной 5'-нетранслируемой областью (pG2S6-I) [1]. Трансляцию вели в присутствии липосом из фосфатидилхолина [2]; встроенный в липосомы опсин отделяли от невстроенного согласно [2]. Рекомбинантный

опсия в липосомах регенерировали добавлением 10-кратного мольного избытка 11-*цис*-ретиная (0,01 М раствор в этаноле) в темноте при 25° С. в течение 15 мин непосредственно перед функциональным тестированием.

Реконструкцию зрительного каскада и определение активности фосфодиэстеразы проводили соответственно [2] в буфере, содержащем 40 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 150 мМ NaCl, 6 мМ MgSO₄, 3 мМ дитиотрепт, при 4° С. К препаратам, содержащим указанное количество родопсина, добавляли 5 мкг фосфодиэстеразы и 10 мкг трансдуцина с последующей инкубацией в течение 20 мин в присутствии или в отсутствие 10 мкМ негидролизуемого аналога GTP — гуанозин-5'-(β , γ -имидо)трифосфата. Фосфодиэстеразную реакцию начинали добавлением 1 мМ [³H]cGMP и продолжали инкубацию в течение указанного времени. Реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин, добавляли 0,1 ед. акт. фосфатазы из кишечника теленка и ZnCl₂ до конечной концентрации 2 мМ, инкубировали 15 мин при 30° С и наносили на колонки (0,7×2 см) с DEAD-сефадексом. Продукт элюировали непосредственно во флаконы для сцинтилляционного счета и измеряли количество радиоактивности в 10 мл сцинтиллятора ЖС-8и (Союзреактив) в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

GTP-азную активность трансдуцина измеряли при добавлении 4 мкг трансдуцина к указанным количествам исследуемого препарата родопсина в присутствии 10 мкМ [³²-P]GTP, инкубировали в течение указанного времени при 25° С. Реакцию останавливали добавлением к 100 мкл реакционной смеси 1 мл суспензии 10% активированного угля (Norit A, Serva, ФРГ) в растворе, содержащем 10 мМ фосфат натрия и 5% трихлоруксусной кислоты. Реакционную смесь встряхивали, инкубировали 10 мин при 4° С и центрифугировали 20 мин при 8000 g. Надосадочную жидкость (400 мкл) переносили во флаконы для сцинтилляционного счета и измеряли радиоактивность в 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8и.

Олигонуклеотиднаправленный мутагенез осуществляли методом дуплексов с брешью [11]. Препарат ДНК pG2S6-I в одной аликвоте линеаризовали обработкой рестриктазой *SalGI*, а в другой расщепляли рестриктазой *SphI* и фрагменты длиной 2519, 1014 и 830 п. о. выделяли электрофорезом в легкоплавкой агарозе. Для введения мутации линеаризованную плазмиду (100 нг) смешивали с фрагментом 2519 п. о., одним из малых *SphI*-фрагментов, не содержащим области гена, в которую вводится мутация, и мутагенизирующим олигонуклеотидом в молярном соотношении 1 : 10 : 10 : 1000 в 40 мкл раствора, содержащего 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7,6), 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дитиотрепт. Смесь нагревали в кипящей водяной бане 3 мин для денатурации фрагментов, медленно охлаждали в течение 4—6 ч до 30° С. Этой смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм DH5 α), которые затем высевали на нитроцеллюлозные фильтры, помещенные на чашки Петри с агаром, содержащим ампициллин (50 мкг/мл). Двойную мутацию Asp-330→Asn, Asp-331→Asn вводили с использованием 26-членного олигонуклеотида (5')dCCCCGTGGGTAACAACGAGGCCTCCA, а мутацию Cys-316→Ser — с использованием 22-членного олигонуклеотида (5')dTCCGGAACTCCAT·GGTCACCAC (некомплементарные нуклеотиды подчеркнуты). Поиск мутантов вели гибридизацией радиоактивно меченных мутагенизирующих олигонуклеотидов с колониями. Правильность введения мутации и интактность участков гена, не подвергавшихся мутагенезу, проверяли секвенированием по методу Сэнгера.

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезировали твердофазным фосфитамидным методом с применением автоматического ДНК-синтезатора System 1 Plus (Beckman, США) по методикам, рекомендованным фирмой-изготовителем. После полного деблокирования олигонуклеотиды очищали электрофорезом в денатурирующем 15—20% полиакриламидном геле и при необходимости дополнительно очищали хроматографией на колонке «Mono Q» с использованием системы FPLC (Pharmacia, Швеция) в условиях, рекомендуемых фирмой для этих целей. Компьютерный анализ структур ДНК при выборе схемы олигонуклеотид-направлен-

ного мутагенеза проводили на персональной ЭВМ IBM-PC-AT с использованием пакета программ «Microgenie» (Beckman, США).

Спектр рекомбинантного родопсина снимали на спектрофотометре «Ultraspec» с компьютерной системой обработки данных (ЛКВ, Швеция) после растворения образца в 2% цетилтриметиламмонийбромиде. Белок определяли по методу Брэдфорд [42].

Авторы благодарят д-ра хим. наук В. М. Липкина (ИБХ АН СССР) за ценные советы и помощь в работе, Б. И. Миднера (МИТХТ) за синтез 11-цис-ретиналя и И. В. Северцову (ИБХ АН СССР) за помощь в олигонуклеотидном синтезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля С. А., Гуревич В. В., Шмуклер Б. Е., Наточин М. Ю., Звяга Т. А., Грязнов С. М., Широкова Е. П. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1663–1670.
2. Гуревич В. В., Зозуля С. А., Звяга Т. А., Наточин М. Ю., Широкова Е. П., Гарновская М. Н., Думлер И. Л., Шмуклер Б. Е., Короткова Н. В. // Биол. мембраны. 1989. Т. 6. № 6. С. 647–649.
3. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Мирошников А. И., Мартынов В. И., Костина М. Б., Куделин А. В., Богачук А. С. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 10. С. 1424–1427.
4. Kobilka V. K., Matsui H., Kobilka T. S., Yang-Feng T. L., Francke U., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Regan J. W. // Science. 1987. V. 238. № 4827. P. 650–656.
5. Franke R. R., Sakmar T. P., Oprian D. D., Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 4. P. 2119–2122.
6. Weiss E. R., Kelleher D. J., Johnson G. L. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 13. P. 6150–6154.
7. Dohlman H. G., Caron M. G., Lefkowitz R. J. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 10. P. 2657–2664.
8. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Bogachuk A. S. // FEBS Lett. 1988. V. 230. № 1–2. P. 1–5.
9. Karnik S. S., Sakmar T. P., Chen H.-B., Khorana H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 22. P. 8459–8463.
10. Spirin A. S., Baranov V. I., Ryabova L. A., Ovodov S. Yu., Alakhov Yu. B. // Science. 1988. V. 242. № 4881. P. 1162–1164.
11. Foss K., McClain W. H. // Gene. 1987. V. 59. № 2. P. 285–290.
12. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248–254.

Поступила в редакцию
11.VII.1989

V. V. GUREVICH, S. A. ZUZUYA, E. P. SHIROKOVA, T. A. ZVYAGA,
M. N. GARNOVSKAYA*, I. L. DUMLER*, P. R. BADALOV, M. Yu. NATOCHIN,
I. D. POKROVSKAYA, B. E. SHMUKLER

SYNTHESIS OF VISUAL RHODOPSIN IN A CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM. II. FUNCTIONAL PROPERTIES OF RECOMBINANT RHODOPSIN AND ITS MUTANT FORMS

Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region;

**I. M. Sechenov Institute of Evolutional Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Functional expression of bovine visual rhodopsin in the cell-free translation system with cotranslational insertion of the protein into phosphatidylcholine liposomes is described. The recombinant rhodopsin has spectral and functional properties similar to those of natural rhodopsin from bovine retina. Two mutant rhodopsins with amino acid substitutions in the hydrophilic C-terminal domain were obtained using oligonucleotide-directed mutagenesis. It was found that substitution Cys-316→Ser does not affect rhodopsin's ability to activate the visual amplification cascade, whereas double mutation Asp-330→Asn, Asp-331→Asn dramatically lowers the rhodopsin functional activity.