



Памяти Учителя, академика Ю. А. Овчинникова,  
инициатора и вдохновителя этой работы

УДК 612.843:577.314.042

© 1994 В. М. Липкин, А. М. Алексеев, В. А. Бондаренко,  
Х. Г. Мурадов, А. Н. Обухов, В. Е. Заграничный

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ИНГИБИТОРНОЙ  
 $\gamma$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ cGMP ИЗ НАРУЖНЫХ  
СЕКМЕНТОВ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ БЫКА. НОВАЯ ГИПОТЕЗА  
О МЕХАНИЗМАХ ИНГИБИРОВАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СУБЪЕДИНИЦ  
 $\gamma$ -СУБЪЕДИНИЦЕЙ И АКТИВАЦИИ ХОЛОФЕРМЕНТА ТРАНСДУЦИНОМ

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А.  
Овчинникова РАН, Пущино Московской обл.

Ключевые слова: фосфодиэстераза cGMP, взаимодействия субъединиц; транс-  
дуцин; мутагенез олигонуклеотиднаправленный; мутанты  $\gamma$ -субъединицы фосфо-  
диэстеразы; мембраны наружных сегментов палочек.

Два мутанта  $\gamma$ -субъединицы (PDE $\gamma$ ) фосфодиэстеразы (PDE) из палочек сетчатки быка получены *in vitro*. Мутанты PDE $\gamma$ , R24E и H79L показали сходные с PDE $\gamma$  дикого типа (wtPDE $\gamma$ ) ингибиторные свойства. В то же время сродство к мембранам наружных сегментов палочек (НСП) у R24E снижено и у H79L повышено по сравнению с wtPDE $\gamma$ .  $\alpha$ -Субъединица трансдуцина (в комплексе с негидролизуемым аналогом GTP, GTP $\gamma$ S) активировывает обработанную трипсином PDE (tPDE), ингибированную wtPDE $\gamma$ , слабее, чем tPDE, ингибированную R24E, и сильнее, чем tPDE, ингибированную H79L.

Для объяснения свойств этих и ранее изученных мутантов PDE $\gamma$  выдвинута новая гипотеза о механизмах ингибирования  $\gamma$ -субъединицей димера каталитических субъединиц PDE (PDE $\alpha\beta$ ) и активации холофермента PDE (PDE $\alpha\beta\gamma_2$ )  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина в комплексе с GTP (T $\alpha$ -GTP): 1) два сайта на PDE $\alpha\beta$ , связывающие PDE $\gamma$  (A- и B-сайт), структурно различны. Сайты на PDE $\gamma$ , взаимодействующие с A- и B-сайтами на PDE $\alpha\beta$ , структурно также различны. Сайт PDE $\gamma$ , взаимо-

Использованы сокращения: T $\alpha$  —  $\alpha$ -субъединица трансдуцина; PDE, PDE $\gamma$ , PDE $\alpha\beta$ , tPDE и wtPDE $\gamma$  — фосфодиэстераза cGMP, ее  $\gamma$ - и  $\alpha\beta$ -субъединицы, фосфодиэстераза, обработанная трипсином, и  $\gamma$ -субъединица фермента дикого типа; R24E — мутант  $\gamma$ -субъединицы фосфодиэстеразы с заменой Arg<sup>24</sup> на Glu; НСП — наружные сегменты палочек. Аббревиатуры остальных точечных мутантов построены по тому же принципу.



действующий с В-сайтом, частично перекрывается с сайтом связывания  $T\alpha \cdot GTP$ ; 2)  $PDE\gamma$ , связанная в В-сайте на  $PDE\alpha\beta$ , вносит основной вклад в ингибирование каталитической активности фермента; 3)  $T\alpha \cdot GTP$  сначала взаимодействует с  $PDE\gamma$ , связанной с А-сайтом в составе холофермента  $PDE$ , и удаляет эту  $PDE\gamma$  в комплексе  $PDE\gamma \cdot (T\alpha \cdot GTP)$ . Это приводит к небольшому повышению каталитической активности остающегося связанным с мембранами НСП комплекса  $PDE\alpha\beta\gamma$ ; 4) после удаления  $PDE\gamma$  из А-сайта другая молекула  $T\alpha \cdot GTP$  становится способной к взаимодействию одновременно с  $PDE\alpha\beta$  и с  $PDE\gamma$ , связанной с В-сайтом на  $PDE\alpha\beta$ . Это взаимодействие приводит к образованию связанного с мембраной НСП полностью каталитически активного тройного комплекса  $PDE\alpha\beta \cdot PDE\gamma \cdot (T\alpha \cdot GTP)$ .

В палочках сетчатки позвоночных активированный светом родопсин катализирует образование комплекса  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина с  $GTP$  ( $T\alpha \cdot GTP$ ) [1]. Этот комплекс, в свою очередь, активирует фосфодиэстеразу  $cGMP$  ( $PDE$ ) [2].  $PDE$  — периферический мембранный белок, состоящий из трех типов субъединиц:  $\alpha$  (98 кДа) [3],  $\beta$  (98 кДа) [4] и двух идентичных  $\gamma$  (каждая по 10 кДа) [5]. Последние ( $PDE\gamma$ ) ответственны за неконкурентное ингибирование каталитического комплекса, состоящего из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц ( $PDE\alpha\beta$ ) [6]. Степень активации  $PDE$  реципрокно зависит от соотношения концентраций  $PDE\gamma$  и  $T\alpha \cdot GTP$  [7].

До недавнего времени существовали две альтернативные гипотезы о механизме активации  $PDE$ . Согласно одной из них [8, 9], в процессе активации  $PDE$  трансдуцином последний взаимодействует с  $PDE\gamma$  и удаляет их из холофермента в виде растворимого комплекса  $PDE\gamma \cdot (T\alpha \cdot GTP)$ . Существование этого комплекса в растворе неоднократно подтверждено экспериментально [8—10]. Согласно другой гипотезе [11], комплекс  $T\alpha \cdot GTP$  остается связанным с  $PDE$ , находящейся на мембране дисков наружных сегментов палочек (НСП), в течение всего времени, пока  $PDE$  проявляет свою каталитическую активность. Имеется экспериментальное подтверждение [12] существованию каталитически активного комплекса  $PDE\alpha\beta\gamma_2 \cdot (T\alpha \cdot GTP)_2$  в мембранах НСП.

Для изучения роли отдельных аминокислотных остатков  $PDE\gamma$  в процессе функционирования  $PDE$  нами были использованы олигонуклеотиднаправленный мутагенез гена и его экспрессия *in vitro*. Ранее нами был получен ряд точечных мутантов  $PDE\gamma$  в центральной и С-концевой областях, а также мутанты с делециями 7 С-концевых ( $\Delta 7C$ ) или 6 N-концевых аминокислотных остатков. Были исследованы взаимодействия этих мутантов с  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина и с каталитическими субъединицами  $PDE$  [13—16]. Полученные результаты позволили нам предложить модель взаимодействия  $PDE\gamma$  с каталитическими субъединицами: взаимодействие проходит в две стадии — первичное связывание и последующее ингибирование комплекса  $PDE\alpha\beta$ . Центральная часть молекулы  $PDE\gamma$ , богатая основными аминокислотными остатками, принимает участие в первичном связывании, тогда как С-конец играет ключевую роль в ингибировании  $PDE\alpha\beta$ . Для ингибирования необходима определенная пространственная ориентация С-конца  $PDE\gamma$ . В то же время С-концевая область также влияет на связывание с  $PDE\alpha\beta$  [15, 16].

В настоящей работе описываются две новые точечные мутации  $PDE\gamma$ : R24E и H79L. Мы изучили следующие свойства мутантов  $PDE\gamma$ : 1) ассоциацию с мембранами НСП; 2) ингибирование активированной трипсином  $PDE$  ( $tPDE$ ); 3) способность  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина в комплексе с негидролизующим аналогом  $GTP$  —  $GTP\gamma S$  ( $T\alpha \cdot GTP\gamma S$ ) активировать  $tPDE$ , ингибированную мутантами  $PDE\gamma$ . Для объяснения особенностей этих и ранее описанных мутантов  $PDE\gamma$  предложен новый гипотетический механизм ингибирования  $PDE\alpha\beta$   $\gamma$ -субъединицей и активации трансдуцином холофермента  $PDE$  (из НСП млекопитающих).



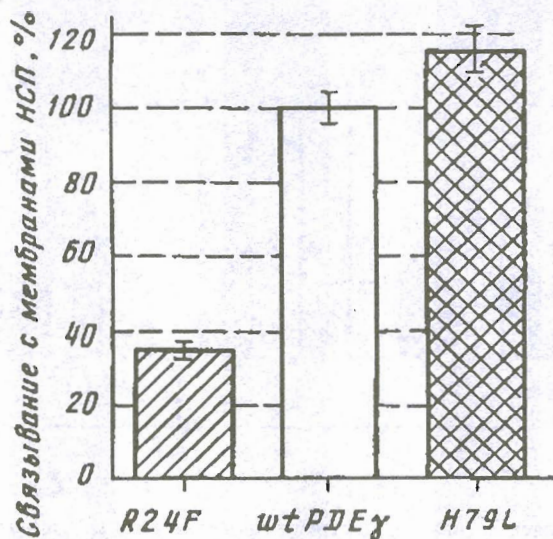


Рис. 1. Относительное связывание мутантных форм PDE $\gamma$  и PDE $\gamma$  дикого типа (wtPDE $\gamma$ ) с мембранами НСП. 4 пмоль  $^{14}\text{C}$ -меченого препарата wtPDE $\gamma$  или ее мутанта добавляли к содержащей ~5 мкг PDE суспензии мембран НСП [15, 16]. В этих условиях ~20% добавленной wtPDE $\gamma$ , составлявших ~2,5% от эндогенной  $\gamma$ -субъединицы PDE в мембранах НСП, связывалось с ними

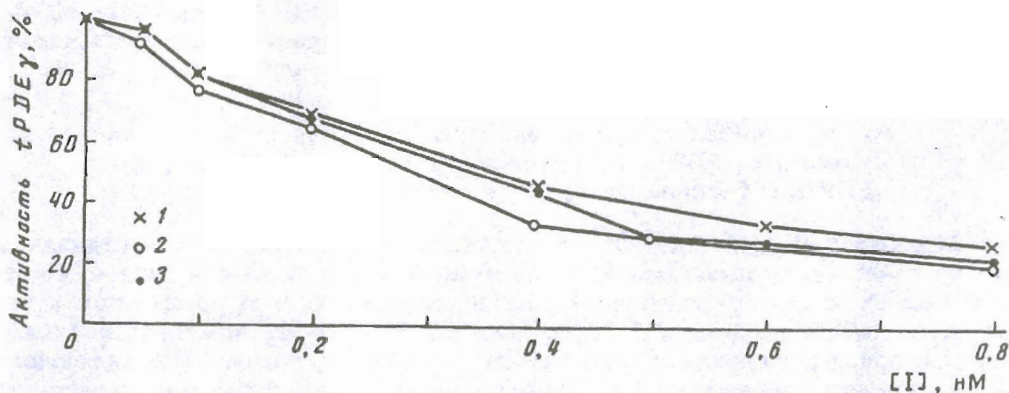


Рис. 2. Кривые ингибирования активированной трипсином PDE (tPDE) мутантными формами PDE $\gamma$  — R24E (1) и H79L (2), а также wtPDE (3). Удельная активность препарата tPDE, составившая 400 нмоль cGMP/мин/мг белка, принята за 100%

### Свойства мутантов PDE $\gamma$ R24E и H79L

Замена R24E существенно снижает включение мутантной PDE $\gamma$  в мембраны НСП (35% по сравнению с рекомбинантной PDE $\gamma$  дикого типа (wtPDE $\gamma$ )), а мутант H79L проявил повышенное сродство к ним (115%, рис. 1). Ранее нами было показано [15, 16], что включение PDE $\gamma$  в мембраны НСП отражает их сродство к каталитическим субъединицам PDE. С другой стороны, кривые ингибирования tPDE для обоих этих мутантов PDE $\gamma$  в отсутствие  $\text{T}\alpha\text{-GTP}\gamma\text{S}$  почти неотличимы друг от друга и от таковой для wtPDE $\gamma$  (рис. 2). В то же время 2 мкМ  $\text{T}\alpha\text{-GTP}\gamma\text{S}$  активирует tPDE, ингибированную wtPDE $\gamma$ , слабее, чем tPDE, ингибированную R24E, и сильнее, чем tPDE, ингибированную H79L (рис. 3).



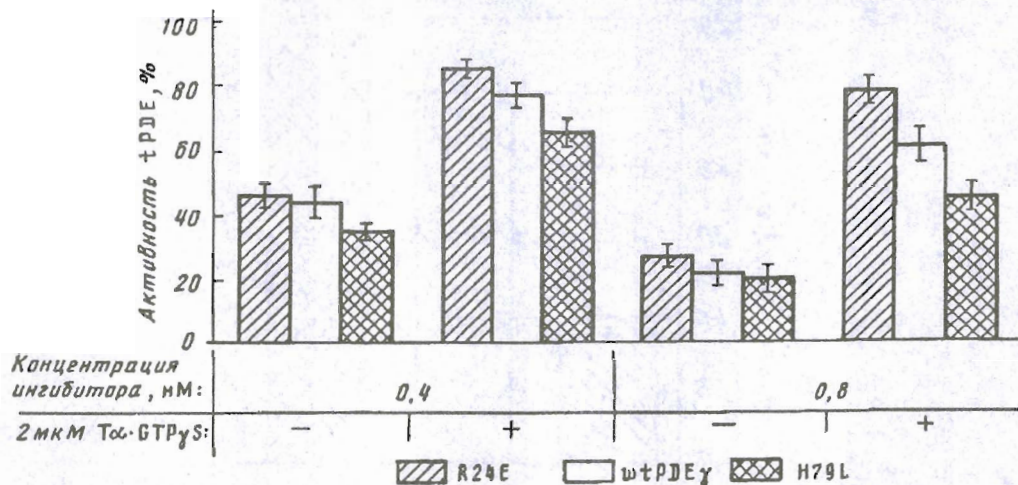


Рис. 3. Влияние комплекса  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина с  $GTP\gamma S$  на ингибирование  $tPDE$  рекомбинантной  $PDE\gamma$  дикого типа и ее мутантами R24E и H79L. Анализ проводили, как описано в «Экспер. части». Ось ординат — см. рис. 2

Отметим, что последний эксперимент проводили при следующих концентрациях: 0,2 нМ  $tPDE$  и 2 мкМ  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$ . Большой избыток трансдуцина необходим для надежного детектирования активации *in vitro* обработанной трипсином  $PDE$  после ее ингибирования экзогенной  $PDE\gamma$ . Концентрация трансдуцина в междисковом пространстве НСП *in vivo* может достигать 500 мкМ [17], а соотношение трансдуцина и фосфодиэстеразы в НСП составляет 10 : 1 [18, 19]. Таким образом, созданные экспериментальные условия моделируют таковые *in vivo* в междисковом пространстве вблизи мембраны в НСП сетчатки млекопитающих.

### Новая гипотеза о механизмах ингибирования каталитических субъединиц $PDE$ $\gamma$ -субъединицей и активации холофермента $PDE$ $\alpha$ -субъединицей трансдуцина в НСП млекопитающих

Мутанты  $PDE\gamma$ , R24E и H79L, обладают рядом необычных свойств, отличающих их от ранее изученных нами [15, 16] мутантов. Так, у всех мутантов, которые отличались от рекомбинантной  $\gamma$ -субъединицы дикого типа по сродству к каталитическим субъединицам  $PDE$ , кроме R24E и H79L, изменялась также и ингибиторная активность. Среди изученных ранее мутантов  $PDE\gamma$  обращает на себя внимание группа с пониженным сродством к каталитическим субъединицам  $PDE$  (K29T, K31R, K31T, R33G, P55L и Y84A). Эти мутанты при низких концентрациях (до эквимольных  $tPDE$ ) ингибируют  $tPDE$  аналогично  $wtPDE\gamma$ , а при более высоких концентрациях их ингибиторная активность снижена [15, 16]. У мутантов R24E (у которого заметно снижено сродство к каталитическим субъединицам) и H79L (у которого это сродство повышено) кривые ингибирования  $tPDE$  в отсутствие  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$  практически неотличимы от таковой для рекомбинантной  $PDE\gamma$  дикого типа.

Другое необычное свойство мутантов R24E и H79L — это отличная от  $wtPDE\gamma$  способность влиять на процесс активации  $tPDE$   $\alpha$ -субъединицей трансдуцина (в комплексе с негидролизуемым аналогом GTP). При этом обнаруживается обратная зависимость между сродством этих мутантов к каталитическим субъединицам  $PDE$  и способностью  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$  активировать  $tPDE$ , предварительно ингибированную мутантной  $PDE\gamma$ . Удивительно, что ни один из большого числа изученных нами ранее мутантов не отличался от  $wtPDE\gamma$  по влиянию на процесс активации  $tPDE$  трансдуцином. Ни один из предлагавшихся ранее механизмов функционирования  $PDE$  не позволяет объяснить эти новые результаты.



Новая модель функционирования PDE должна дать ответы на следующие вопросы: 1) почему замены R24E и H79L, по-разному влияя на взаимодействие мутантной PDE $\gamma$  с каталитическими субъединицами PDE, в то же время не изменяют (в отсутствие трансдуцина) кривых ингибирования tPDE; 2) почему эти же замены (R24E и H79L) влияют на процесс активации tPDE трансдуцином и почему это воздействие обратно их сродству к PDE $\alpha\beta$ ; 3) почему, наконец, ранее изученные мутации PDE $\gamma$  не влияли на активацию tPDE в присутствии T $\alpha$ -GTP $\gamma$ S?

Предлагаемая нами схема ингибирования  $\gamma$ -субъединицей PDE и активации  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина фосфодиэстеразы из наружных сегментов палочек сетчатки млекопитающих (рис. 4) хорошо согласуется со всеми свойствами изученных нами и другими авторами мутантов PDE $\gamma$ . В общих чертах она следует предложенной в 1989 г. Валеном и Битенски [20] и модифицированной в 1990 г. Такемото и Канник [21], однако содержит и ряд существенных уточнений и изменений.

В соответствии с данными Валена и Битенски [20] на PDE $\alpha\beta$  палочек млекопитающих существуют два центра связывания PDE $\gamma$ , обладающих различным сродством к ингибитору. Авторы [20] не вычисляли констант связывания PDE $\gamma$  с этими сайтами по причине отсутствия данных о соотношениях концентраций промежуточных комплексов [PDE $\alpha\beta\gamma$ /PDE $\alpha\beta$ ] и [PDE $\alpha\beta\gamma_2$ /PDE $\alpha\beta\gamma$ ] при разных концентрациях свободной PDE $\gamma$ . Мы предполагаем, что мутации R24E и H79L влияют на связывание PDE $\gamma$  в одном из этих центров, тогда как мутации K29T, K31R, K31T, R33G, P55L и Y84A [15, 16] — в другом. Назовем эти центры А- и В-сайтами соответственно. Поскольку последние шесть мутаций, снижая сродство PDE $\gamma$  к PDE $\alpha\beta$ , влияют на процесс ингибирования tPDE только при высоких концентрациях, можно предположить, что у этих мутантов понижено сродство к низкоаффинному центру (В-сайту) связывания PDE $\gamma$  на PDE $\alpha\beta$ . Однако для точного определения каждого из этих центров как сайтов связывания PDE $\gamma$  с высоким или низким сродством пока недостаточно экспериментальных данных. Возможно также, что константы связывания PDE $\gamma$  с сайтами А и В на PDE $\alpha\beta$  не сильно отличаются друг от друга. Вклад каждой из двух связанных с разными центрами на PDE $\alpha\beta$   $\gamma$ -субъединиц в ингибирование ферментативной активности PDE может быть различным.

Такое предположение согласуется с данными Валена и соавт. [22], согласно которым удаление одной  $\gamma$ -субъединицы из практически неактивного комплекса PDE $\alpha\beta\gamma_2$ , находящегося в составе мембран НСП быка, приводит лишь к приблизительно 17% активации PDE. Мы предполагаем, что PDE $\gamma$ , связанная с В-сайтом на PDE $\alpha\beta$ , вносит основной вклад в ингибирование каталитической активности PDE. В соответствии с этим предположением мутанты PDE $\gamma$  с измененными параметрами взаимодействия с В-сайтом на PDE $\alpha\beta$  заметно отличаются от wtPDE $\gamma$  и по кривой ингибирования. К этим мутантам относятся K29T, K31R, K31T, R33G, P55L и Y84A [15, 16]. В то же время мутации, влияющие на взаимодействие PDE $\gamma$  с А-сайтом на PDE $\alpha\beta$ , заметного влияния на кривые ингибирования могут и не оказывать, как это и наблюдается в случае R24E и H79L.

Данные о том, что разные мутации по-разному влияют на взаимодействие PDE $\gamma$  с А- и В-сайтами, свидетельствуют, что сайты на PDE $\gamma$ , взаимодействующие с А- и В-сайтами, структурно различны. Соответственно и сами А- и В-сайты должны быть различны. Последний вывод согласуется с данными Такемото с соавт. [23, 24], которые изучали связывание с  $\gamma$ -субъединицей синтетических пептидов, соответствующих различным участкам полипептидных цепей PDE $\alpha$  и PDE $\beta$ . Авторы [23, 24] высказали предположение, что центры связывания PDE $\gamma$  на высокомолекулярных между собой PDE $\alpha$  и PDE $\beta$  расположены в негомологичных



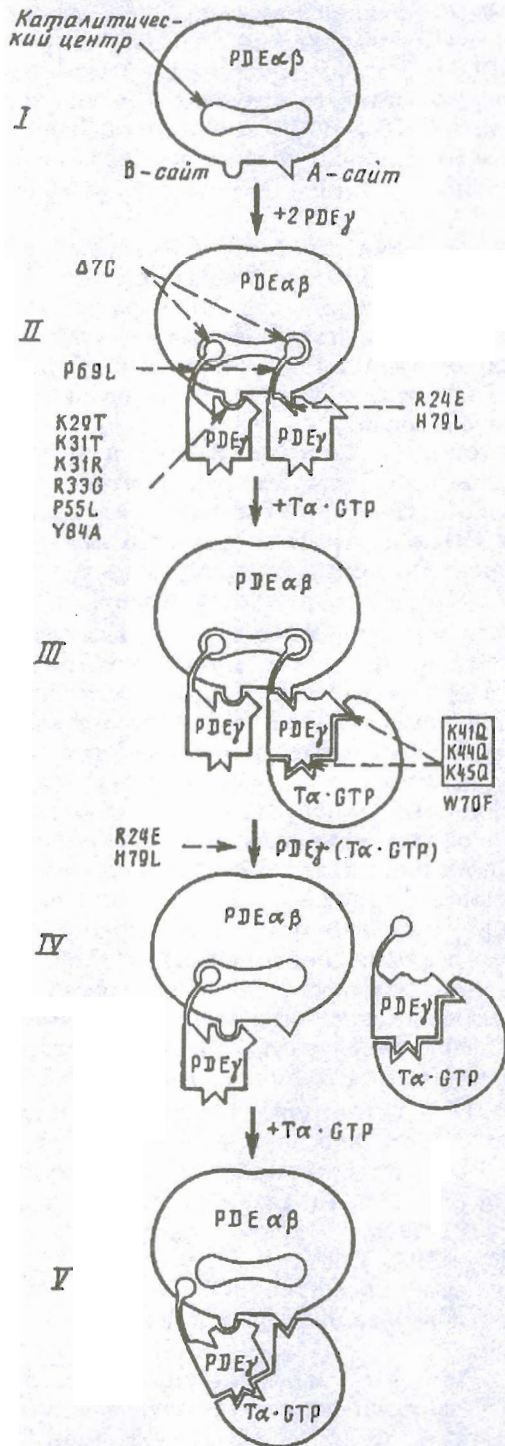


Рис. 4. Схема ингибирования каталитических субъединиц PDE (PDE $\alpha\beta$ )  $\gamma$ -субъединицей (I, II) и активации холофермента (PDE $\alpha\beta\gamma$ )  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина (III, IV и V). Мутации K29T, K31T, K31R, R33G, P55L и Y84A [15, 16] влияют на взаимодействие PDE $\gamma$  с B-сайтом. Мутации R24E и H79L по-разному изменяют сродство мутантной PDE $\gamma$  к A-сайту на PDE $\alpha\beta$  и влияют на процесс диссоциации PDE $\gamma$  в комплексе с T $\alpha$ ·GTP из A-сайта. Мутации  $\Delta 7C$  и P69L [15, 16] влияют на процесс ингибирования PDE $\alpha\beta$   $\gamma$ -субъединицей. Мутации K41Q, K44Q, K45Q [26] и W70F [27] нарушают взаимодействие PDE $\gamma$  с трансдуцином



областях и формируются участками 16—30 и 78—90 PDE $\alpha$  [23] и 15—34, 91—110 и 211—230 PDE $\beta$  [24].

Согласно данным Хэмм с соавт. [25], в PDE $\gamma$  имеются два участка связывания T $\alpha$ ·GTP с координатами 24—45 и 70—76, а центр связывания PDE $\alpha\beta$  также расположен на участке 24—45 и может частично перекрываться с центром связывания T $\alpha$ ·GTP. Наши результаты по направленному мутагенезу PDE $\gamma$  показывают, что в  $\gamma$ -субъединице центр связывания с В-сайтом на PDE $\alpha\beta$  включает остатки K29, K31 и R33 и, следовательно, именно он может частично перекрываться с центром связывания трансдуцина. Если это так, то  $\alpha$ -субъединица трансдуцина способна беспрепятственно взаимодействовать только с PDE $\gamma$ , находящейся в А-сайте в составе холоферментного комплекса PDE $\alpha\beta\gamma_2$ .

По нашей схеме функционирования PDE, аналогично схемам Битенски и Такемото [20, 21], активация PDE  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина начинается с диссоциации одной молекулы PDE $\gamma$  в составе комплекса PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP) из холофермента PDE $\alpha\beta\gamma_2$  с образованием каталитически малоактивного комплекса PDE $\alpha\beta\gamma$ . Ведь, по данным Валена и соавт. [22], в присутствии низких концентраций T $\alpha$ ·GTP $\gamma$ S (0,1—1,0 мкМ) диссоциация одной молекулы PDE $\gamma$  из каталитически неактивного холофермента PDE $\alpha\beta\gamma_2$ , находящегося в составе мембран НСП из палочек сетчатки быка, приводит лишь к 17% активации фермента от максимально достижимого уровня активности.

Мы предполагаем, что при этом диссоциирует PDE $\gamma$ , связанная с А-сайтом на PDE $\alpha\beta$ , так как по крайней мере один из участков взаимодействия с T $\alpha$ ·GTP на PDE $\gamma$ , связанной с В-сайтом в составе холофермента PDE, недоступен для трансдуцина. Взаимодействие T $\alpha$ ·GTP с холоферментом PDE (точнее, с PDE $\gamma$ , связанной в А-сайте) приводит к заметному снижению сродства этой PDE $\gamma$  к PDE $\alpha\beta$  и к последующей ее диссоциации из мембраносвязанного комплекса. Иными словами,  $\alpha$ -субъединица трансдуцина служит катализатором диссоциации PDE $\gamma$  из А-сайта на PDE $\alpha\beta$ . Очевидно, что мутации R24E и H79L, по-разному влияющие на процесс взаимодействия PDE $\gamma$  с этим А-сайтом на PDE $\alpha\beta$ , должны иметь обратный эффект на процесс диссоциации PDE $\gamma$  из холоферментного комплекса.

Попробуем объяснить аналогичное влияние этих мутаций и на процесс активации PDE трансдуцином. Мы предполагаем, что основной вклад в эту активацию принадлежит второй молекуле T $\alpha$ ·GTP, которая, связываясь с PDE $\gamma$  (находящейся в В-сайте в комплексе PDE $\alpha\beta\gamma$ ) в одном из двух участков связывания T $\alpha$  (вероятно, 70—76, поскольку второй участок, 24—45, блокирован в результате взаимодействия с В-сайтом), взаимодействует также и с PDE $\alpha\beta$ . Такое двухцентровое связывание T $\alpha$ ·GTP с PDE $\alpha\beta\gamma$  должно затруднить диссоциацию PDE $\gamma$  из В-сайта. В результате этого взаимодействия меняется конформация фермента, и PDE $\gamma$ , остающаяся в составе комплекса PDE $\alpha\beta$ ·PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP), перестает оказывать ингибиторное действие. Если предположить, что центр связывания T $\alpha$ ·GTP и А-сайт на PDE $\alpha\beta$  частично перекрываются, становится объяснимым, почему диссоциация первой PDE $\gamma$  влияет на процесс активации. Если эта диссоциация затруднена, как в случае мутанта H79L, то затруднена и активация PDE трансдуцином. Наоборот, если сродство мутанта PDE $\gamma$  к А-сайту ослаблено, как в случае мутанта R24E, то и активация трансдуцином выше, чем в случае PDE $\gamma$  дикого типа.

Небезынтересно сопоставить выдвинутые нами предположения с полученными ранее данными [15, 16] по ингибированию tPDE в присутствии и в отсутствие T $\alpha$ ·GTP $\gamma$ S шестью мутантами (K29T, K31R, K31T, R33G, P55L и Y84A), аминокислотные замены в которых, как мы предположили выше, нарушили их взаимодействие с В-сайтом на PDE $\alpha\beta$ . Если бы активация фосфодиэстеразы трансдуцином состояла в полном удалении PDE $\gamma$  из каталитического комплекса, можно было бы ожидать заметного увеличения уровня активности tPDE, инги-



бириванной этими мутантами при их молярных избытках над  $tPDE$ , в присутствии  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$ . Однако кривые ингибирования этими мутантами  $tPDE$  в присутствии  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$  могут быть интерпретированы как результат простого сложения соответствующих кривых в отсутствие трансдуцина с разностью между кривыми ингибирования  $tPDE$   $\gamma$ -субъединицей дикого типа в присутствии и в отсутствие  $T\alpha \cdot GTP\gamma S$ . Это свидетельствует о том, что снижение сродства  $PDE\gamma$  к В-сайту на  $PDE\alpha\beta$  не влияет на активацию фосфодиэстеразы трансдуцином, а эти аминокислотные замены не приводят к изменению параметров взаимодействия мутантной  $PDE\gamma$  с  $T\alpha \cdot GTP$ . Следовательно, активация  $PDE$  трансдуцином (по крайней мере в В-сайте) скорее всего происходит без удаления ингибитора из каталитического комплекса.

Ранее мы показали, что в  $PDE\gamma$  сайты первичного связывания с  $PDE\alpha\beta$  и ингибирования пространственно разделены [15, 16]. Удаление 7 С-концевых аминокислотных остатков  $PDE\gamma$ , лишь в небольшой степени снижая ее сродство к каталитическим субъединицам (вероятно, в основном из-за отсутствия остатка  $Tyr84$ ), в то же время драматически снижало ингибиторную активность этого делеционного мутанта. Аналогичное влияние на процесс ингибирования оказывали мутанты с делецией 5 [26] и 3 (Н. Hamn, личное сообщение) С-концевых аминокислотных остатков. Возможно, в процессе ингибирования участвует С-концевая карбоксильная группа. Для ингибирования чрезвычайно важно пространственное расположение С-концевого участка  $PDE\gamma$  как относительно каталитического (или аллостерического) центра  $PDE\alpha\beta$ , так и относительно центральной части самой  $PDE\gamma$ .

Шабр и соавт. [27] высказали предположение, что  $PDE\gamma$  непосредственно взаимодействует с каталитическим центром  $PDE\alpha\beta$ . У мутанта P69L [15, 16] сродство к  $PDE\alpha\beta$  идентично таковому у  $PDE\gamma$  дикого типа, в то время как его ингибиторная активность чрезвычайно низка, что, по нашему мнению, связано с отсутствием у этого мутанта  $\beta$ -изгиба в области 68—71. Это изменяет пространственное расположение С-концевого участка полипептидной цепи мутантной  $PDE\gamma$ , связанной с  $PDE\alpha\beta$ , что препятствует его взаимодействию с каталитическим (или аллостерическим) центром фермента.

Аналогичный процесс, вероятно, происходит при активации  $PDE$  трансдуцином. Вторая молекула  $T\alpha \cdot GTP$ , связываясь одновременно с  $PDE\gamma$  (связанной в В-сайте) и с  $PDE\alpha\beta$  и действуя наподобие рычага, смещает расположение С-концевого участка  $PDE\gamma$  относительно каталитического (или аллостерического) центра  $PDE\alpha\beta$ , тем самым нарушая процесс ингибирования. Аналогично, вероятно, и действие мутанта K45T [15, 16], чье сродство к мембранам НСП (т. е. к  $PDE\alpha\beta$ ) не было затронуто, тогда как ингибиторное действие на  $PDE\alpha\beta$  при высоких концентрациях мутантной  $PDE\gamma$  (двух- или более кратных молярных избытках по сравнению с  $tPDE$ ) было заметно снижено.

Ранее сообщалось о двух мутантах  $PDE\gamma$ , которые препятствовали активации  $PDE\alpha\beta$  трансдуцином после их связывания с каталитическим комплексом  $PDE$ : это тройной мутант K41Q, K44Q, K45Q [26] и точечный W70F [27]. Оба мутанта связывались с  $PDE\alpha\beta$  и ингибировали каталитическую активность  $tPDE$  так же, как и рекомбинантная  $PDE\gamma$  дикого типа. Следовательно, можно предположить, что обе эти мутации затронули лишь сайты взаимодействия  $PDE\gamma$  с трансдуцином и не повлияли на их взаимодействие с  $PDE\alpha\beta$  ни в А-, ни в В-сайте. Не исключено, что мутация K41Q, K44Q, K45Q влияет только на взаимодействие  $T\alpha \cdot GTP$  с  $PDE\gamma$ , связанной в А-сайте. В соответствии с нашей схемой этого достаточно, чтобы препятствовать процессу активации в результате простого нарушения способности мутантной  $PDE\gamma$  к диссоциации из А-сайта.

Таким образом, в соответствии с предлагаемой нами схемой механизм взаимодействия двух молекул  $T\alpha \cdot GTP$  с  $PDE$  абсолютно разный. Первая молекула  $T\alpha \cdot GTP$ , взаимодействуя с двумя сайтами  $PDE\gamma$ , связанной в А-сайте на  $PDE\alpha\beta$ ,



способствует диссоциации  $PDE\gamma$  из комплекса  $PDE\alpha\beta\gamma_2$  и относительно небольшой активации фермента. Вторая же молекула  $T\alpha\cdot GTP$ , связываясь как с одним из сайтов на  $PDE\gamma$ , находящийся в В-сайте на  $PDE\alpha\beta$ , так и с самим димером  $PDE\alpha\beta$ , участвует в образовании максимально каталитически активного комплекса  $PDE\alpha\beta\cdot PDE\gamma\cdot (T\alpha\cdot GTP)$ . При этом диссоциации  $PDE\gamma$ , связанной в В-сайте на  $PDE\alpha\beta$ , не происходит. Поэтому все мутации  $PDE\gamma$ , влияющие на процесс ее взаимодействия с В-сайтом на  $PDE\alpha\beta$ , не оказывают никакого воздействия на процесс активации фосфодиэстеразы трансдуцином. Предложенная схема также согласуется с данными Черioni с соавт. [28, 29], показывающими, что при активации PDE трансдуцин может взаимодействовать непосредственно с ее каталитическими субъединицами, а также с данными Клерк и Беннетт [12] о том, что трансдуцин остается связанным с активированным им каталитическим комплексом PDE в мембранах НСП.

Можно предположить, что такой сравнительно сложный механизм активации PDE палочек сетчатки млекопитающих облегчает процесс реингибирования фермента после гидролиза GTP  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина и ее диссоциации в комплексе с GDP из активного мультисубъединичного агрегата. При этом  $PDE\gamma$ , по-прежнему связанная в В-сайте на  $PDE\alpha\beta$ , непосредственно после диссоциации  $T\alpha\cdot GTP$  способна ингибировать фермент на 80—90%. Возможно, параллельно существует и еще один механизм реингибирования PDE. Свободная  $PDE\gamma$  при повышении ее концентрации может конкурировать с  $T\alpha\cdot GTP$  за А-сайт. В результате последний может диссоциировать из комплекса  $PDE\alpha\beta\cdot PDE\gamma\cdot (T\alpha\cdot GTP)$  независимо от того, произвел ли он гидролиз GTP. Таким образом, в этом случае гидролиз GTP  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина, находящейся в составе растворимого комплекса с  $PDE\gamma$ , окажется лимитирующей стадией процесса реингибирования. Иначе, наличие и/или локальная концентрация свободной  $PDE\gamma$  в междисковом пространстве НСП могут служить дополнительными регуляторами активности PDE при тонкой настройке всей системы амплификации на определенный уровень освещенности. Согласно нашим предположениям, два (возможно, различающихся по сродству к  $PDE\gamma$ ) центра на  $PDE\alpha\beta$  играют противоположную роль в процессах ингибирования PDE и активации ее трансдуцином: В-сайт важен в процессе ингибирования активированной фосфодиэстеразы, а А-сайт играет главную роль в активации фосфодиэстеразы трансдуцином.

Схема функционирования части зрительного каскада млекопитающих должна выглядеть, согласно нашим предположениям, следующим образом. Активированный взаимодействием с фотовозбужденным родопсином трансдуцин обменивает GDP на GTP и диссоциирует на  $\alpha$ -субъединицу в комплексе с GTP ( $T\alpha\cdot GTP$ ) и комплекс  $\beta\gamma$ -субъединиц.  $T\alpha\cdot GTP$  взаимодействует с  $PDE\gamma$ , связанной в А-сайте на  $PDE\alpha\beta$ , в составе гетеротетрамера  $PDE\alpha\beta\gamma_2$  и удаляет  $\gamma$ -субъединицу как часть растворимого комплекса  $PDE\gamma\cdot (T\alpha\cdot GTP)$ . Оставшийся на мембране НСП комплекс состава  $PDE\alpha\beta\gamma$  обладает некоторой ферментативной активностью и с небольшой скоростью гидролизует cGMP до GMP. Если локальная концентрация свободной  $T\alpha\cdot GTP$  невысока, то освободившаяся из комплекса  $PDE\gamma\cdot (T\alpha\cdot GTP)$  (в результате спонтанного гидролиза трансдуцином GTP)  $\gamma$ -субъединица вновь связывается с  $PDE\alpha\beta$  в А-сайте. Таким образом, трансдуцин и фосфодиэстераза возвращаются в исходно неактивное темновое состояние и способны к новому акту рецепции зрительного сигнала.

Если на стадии образования частично активированного комплекса  $PDE\alpha\beta\gamma$  локальная концентрация свободной  $T\alpha\cdot GTP$  достаточно высока, она может взаимодействовать с  $PDE\gamma$ , связанной с В-сайтом на  $PDE\alpha\beta$ , с образованием комплекса  $PDE\alpha\beta\cdot PDE\gamma\cdot (T\alpha\cdot GTP)$ , в котором  $\gamma$ -субъединица уже не оказывает ингибирующего влияния. Это приводит к активации PDE до максимального уровня и соответственно к максимальной амплитуде ответа на зрительный стимул. Прекращение функционирования фосфодиэстеразы в этом случае может быть до-



стигнуто вытеснением свободной  $\gamma$ -субъединицей  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина (неважно, в каком комплексе — с GTP или GDP) из А-сайта в полностью активированном комплексе PDE $\alpha\beta$ ·PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP), что должно приводить к возвращению PDE в полностью неактивное состояние.

Другая возможность — спонтанный гидролиз GTP  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина в составе полностью активированного комплекса PDE $\alpha\beta$ ·PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP) и диссоциация из него T $\alpha$ ·GDP. В этом случае PDE катализирует превращение сGMP в GMP значительно дольше, причем этот процесс не прекращается полностью. Следующим шагом приведения PDE в темновое состояние должна быть опять-таки ее ассоциация со свободной PDE $\gamma$  в А-сайте. Предложенная схема открывает возможность тонкой подстройки зрительного каскада к уровню освещенности путем регулирования концентрации (предположительно, связывания в некоем гипотетическом депо) свободной  $\gamma$ -субъединицы в междисковом пространстве наружных сегментов, т. е. PDE $\gamma$  может служить одним из возможных модуляторов системы фоторецепции.

Представленная нами схема функционирования PDE во многих отношениях является гипотетической и не может претендовать на роль окончательно доказанной. Она хорошо объясняет имеющиеся на сегодняшний день факты, однако вполне возможно, что ее придется дополнять или исправлять по мере получения новых результатов. Эта схема в основном базируется на результатах, полученных при изучении процессов ингибирования и последующей активации препаратов PDE, лишенных эндогенной  $\gamma$ -субъединицы в результате ограниченного протеолиза трипсином. При такой обработке происходит солюбилизация PDE из мембран дисков НСП. Будет ли справедлива наша схема также и для функционирования мембраносвязанной PDE? Мы считаем, что большинство положений нашей гипотезы будут справедливы и в этом случае, хотя связывание с мембраной может внести свою специфику. Одним из подходов к изучению роли мембран в процессе функционирования PDE может быть изучение свойств (в частности, взаимодействия с мутантными PDE $\gamma$ ) каталитических субъединиц, полученных в результате экспрессии в эукариотических клетках.

### Экспериментальная часть

Олигодезоксирибонуклеотиды d(CCGTCACTCCGGAGAAAGGGCCC) и d(CCTGAGCTCTTAGAGCTGGCC) использованы для введения точечных замен R24E и H79L соответственно в кодирующую последовательность кДНК PDE $\gamma$ . Все остальные экспериментальные процедуры (очистка tPDE и T $\alpha$ ·GTP $\gamma$ S; клонирование, мутагенез и экспрессия PDE $\gamma$  и ее мутантов; включение мутантов PDE $\gamma$  в мембраны НСП) были идентичны описанным [15, 16].

Для определения ингибиторной активности PDE $\gamma$  различные ее (или ее мутантов) количества добавляли к смеси (100 мкл), содержащей: 80 мМ трис-НСl (рН 7,5), 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% бычий сывороточный альбумин и ~0,2 нМ tPDE. Добавлением сGMP до концентрации 2 мМ инициировали реакцию. Смесь инкубировали 10 мин при 30° С. Реакцию останавливали нагреванием (90° С, 2 мин). После этого добавляли 20 мкл {0,1 ед. акт.} бактериальной щелочной фосфатазы и продолжали инкубацию 15 мин при 30° С. Содержание неорганического фосфата определяли с помощью (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, как описано [30]. Для определения влияния трансдуцина на ингибирование tPDE  $\gamma$ -субъединицей или ее мутантными формами анализ проводили в присутствии 2 мкМ T $\alpha$ ·GTP $\gamma$ S. Результаты по связыванию PDE $\gamma$  с мембранами НСП и по определению активности PDE являются средними значениями по трем или более независимым измерениям со стандартными отклонениями менее 5%.



Авторы выражают признательность д-ру хим. наук Л. М. Гинодману и акад. В. Т. Иванову (ИБХ РАН, Москва), а также канд. хим. наук М. Ю. Наточину (Вейсмановский институт наук, Израиль) за плодотворное обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-04-7310) и Международного научного фонда (MU5000).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stryer L.//Ann. Rev. Neurosci. 1986. V. 9. P. 87—119.
2. Fung B. K.-K., Hurley J. B., Stryer L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 152—156.
3. Ovchinnikov Yu. A., Gubanov V. V., Khrantsov N. V., Ischenko K. A., Zagranichny V. E., Muradov K. G., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M.//FEBS Lett. 1987. V. 223. P. 169—173.
4. Lipkin V. M., Khrantsov N. V., Vasilevskaya I. A., Atabekova N. V., Muradov K. G., Gubanov V. V., Li T., Johnston J. P., Volpp K. J., Applebury M. L.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12955—12959.
5. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Kumarev V. P., Gubanov V. V., Khrantsov N. V., Akhmedov N. B., Zagranichny V. E., Muradov K. G.//FEBS Lett. 1986. V. 204. P. 288—292.
6. Hurley J. B., Stryer L.//J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 11094—11099.
7. Wensel T. G., Stryer L.//Proteins: Struct. Func. Genet. 1986. V. 1. P. 90—99.
8. Deterre P., Bigay J., Robert M., Pfister C., Kuhn H., Chabre M.//Proteins: Struct. Func. Genet. 1986. V. 1. P. 188—193.
9. Fung B. K.-K., Griswold-Prenner I.//Biochemistry. 1989. V. 28. P. 3133—3137.
10. Yamazaki A., Hayashi F., Tatsumi M., Bitensky M. W., George J. S.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 11539—11548.
11. Catty P., Pfister C., Bruckert F., Deterre Ph.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 27. P. 19489—19493.
12. Clerc A., Bennett N.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 6620—6627.
13. Lipkin V. M., Udovichenko I. P., Bondarenko V. A., Yurovskaya A. A., Telnykh E. V., Skiba N. P.//Biomed. Sci. 1990. V. 1. P. 305—308.
14. Наточин М. Ю., Мурадов Х. Г., Бондаренко В. А., Добрынина Л. Н., Скиба Н. П., Липкин В. М.//Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 4. С. 442—445.
15. Lipkin V. M., Bondarenko V. A., Zagranichny V. E., Dobrynina L. N., Muradov Kh. G., Natochin M. Yu.//Biochim. et biophys. acta. 1993. V. 1176. № 3. P. 250—256.
16. Липкин В. М., Бондаренко В. А., Заграничный В. Е., Добрынина Л. Н., Мурадов Х. Г., Наточин М. Ю.//Биол. мембраны. 1994. Т. 11. № 3. С. 335—345.
17. Chabre M.//Annu. Rev. Biophys. Chem. 1985. V. 14. P. 331—360.
18. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 11669—11677.
19. Sitaramayya A., Harkness J., Parkes J. H., Gonsales-Oliva C., Liebman P.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 651—656.
20. Whalen M. M., Bitensky M. W.//Biochem. J. 1989. V. 259. P. 13—19.
21. Takemoto D. J., Cunnick J. M.//Cellular Signalling. 1990. V. 2. P. 99—104.
22. Whalen M. M., Bitensky M. W., Takemoto D. J.//Biochem. J. 1990. V. 265. P. 655—658.
23. Oppert B., Cunnick J. M., Hurt D., Takemoto D.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 16607—16613.
24. Oppert B., Takemoto D.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1991. V. 178. P. 474—479.
25. Artemyev N. O., Rarick H. M., Mills J. S., Skiba N. P., Hamn H. E.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 25067—25072.
26. Brown R. L.//Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5918—5925.
27. Otto-Bruc A., Antony B., Vuong T. M., Chardin P., Chabre M.//Biochemistry. 1993. V. 32. P. 8636—8645.
28. Kroll S., Phillips W. J., Cerione R. A.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4490—4497.
29. Phillips W. J., Trukawinski S., Cerione R. A.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16679—16688.
30. Eibl H., Lands W. E. M.//Anal. Biochem. 1969. V. 30. P. 51—57.

Поступила в редакцию  
16.III.1994



**SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE cGMP PHOSPHODIESTERASE  
INHIBITORY  $\gamma$  SUBUNIT FROM BOVINE ROD OUTER SEGMENTS:  
A NEW HYPOTHESIS ON THE MECHANISMS OF CATALYTIC  
SUBUNITS INHIBITION BY  $\gamma$  SUBUNIT AND HOLOENZYME  
ACTIVATION BY TRANSDUCIN**

*Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Sciences, 142292 Pushchino, Moscow Region*

**Key words:** cGMP phosphodiesterase, subunits interactions,  $\gamma$  subunit mutants; transducin; rod outer segment membranes, site-directed mutagenesis.

Two mutants of the phosphodiesterase (PDE)  $\gamma$  subunit (PDE $\gamma$ ) from bovine retinal rods were synthesized by sequential transcription and translation in vitro. PDE $\gamma$  mutants R24E and H79L exhibited inhibitory properties similar to those of the wild-type PDE $\gamma$  (wtPDE $\gamma$ ). At the same time, affinity to the rod outer segment (ROS) membranes is lower for R24E and higher for H79L in comparison with wtPDE $\gamma$ . The transducin  $\alpha$  subunit (in a complex with the GTP non-hydrolyzable analogue, GTP $\gamma$ S) activates the trypsin-treated PDE (tPDE) inhibited by wtPDE $\gamma$  weaker than tPDE inhibited by R24E and stronger than tPDE inhibited by H79L. To explain the properties of these and earlier studied PDE $\gamma$  mutants, a new hypothesis on the mechanisms of inhibition of the PDE catalytic subunit dimer (PDE $\alpha\beta$ ) by PDE $\gamma$  and mechanism of the PDE holoenzyme (PDE $\alpha\beta\gamma_2$ ) activation by the transducin  $\alpha$  subunit in a complex with GTP (T $\alpha$ ·GTP) is proposed: 1) two sites on PDE $\alpha\beta$  for the PDE $\gamma$  binding (A- and the B-site) are different in structure. Sites on PDE $\gamma$  interacting with A- and the B-sites on PDE $\alpha\beta$  are also different in structure. The site on PDE $\gamma$  interacting with the B-site partially overlaps with the T $\alpha$ ·GTP binding site; 2) PDE $\gamma$  bound to the B-site provides the main contribution to inhibition of the enzyme catalytic activity; 3) T $\alpha$ ·GTP first interacts with the PDE $\gamma$  bound to the A-site in the PDE holoenzyme and removes this PDE $\gamma$  in a PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP) complex. This results in a slight increase of the catalytic activity of the PDE $\alpha\beta\gamma$  complex remaining bound to the ROS membranes; 4) after removal of PDE $\gamma$  from the A-site, another T $\alpha$ ·GTP molecule is enabled to interact with both PDE $\alpha\beta$  and PDE $\gamma$  bound to the B-site on PDE $\alpha\beta$ . This interaction results in the formation of a ROS membrane-bound fully catalytically active triple complex PDE $\alpha\beta$ ·PDE $\gamma$ ·(T $\alpha$ ·GTP).