

1. Osborn M. J. Invest. Dermatol., v. 81, p. 104—109, 1983.
2. Dahl D., Bignami A. — In: Cell. and Muscle Motility, v. 6, 75—96, N. Y., London, 1985.
3. De Armond S. J., Fajardo M., Naughton S. A., Eng L. F. Brain Res., v. 262, p. 275—282, 1983.
4. Dahl D., Bignami A. — In: Handbook of Neurochemistry, v. 5, p. 127—151, N. Y., Plenum Press, 1983.
5. Шевченко Г. М., Бунятян Г. Г., Березин В. А. Нейрохимия, т. 3, с. 400—404, 1984.
6. Osborn M., Altmansberger M., Debus E., Weber K. J. Submicrosc. Cytol., v. 16, p. 149—150, 1984.
7. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Бродская И. А., Шевченко Г. М., Зашко А. С., Понедилок Н. В., Кузнецов А. В., Кузнецова Н. В., Кононова Л. И. Бюл. эксп. биол. и мед., т. 50, № 7, с. 68—70, 1985.
8. Березин В. А., Жмарева Е. Н., Ромоданов С. А., Шевченко Г. М., Бродская И. А. Вopr. онкологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
9. Dittmann L., Axelsen N., Norgaard-Pedersen B., Bock E. Brit. J. Cancer, v. 35, p. 135—141, 1977.
10. Недзвецкий В. С., Березин В. А., Оберняк Т. И., Жмарева Е. Н. Биохимия т. 51, № 11, с. 1843—1850, 1986.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112.5

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА СЕТЧАТКИ БЫКА—ИНГИБИТОРА 3', 5'-cGMP-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

ЛИПКИН В. М., МУРАДОВ Х. Г., *ДУМЛЕР И. Л., *ЭТИНГОФ Р. Н.

Институт биосинтетической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

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

Исследованы роль γ -субъединицы 3', 5'-cGMP-фосфодиэстеразы в первичных механизмах фоторецепции и специфичность γ -субъединицы для ткани сетчатки. Используя моноспецифические антитела к γ -субъединице, установили, что она присутствует только в фоторецепторных мембранах сетчатки разных животных и не обнаруживается в других тканях. Показана необходимость γ -субъединицы для фотоиндуцированной активации фосфодиэстеразы. Определены аминокислотная последовательность γ -субъединицы и нуклеотидная последовательность соответствующей кДНК.

Поглощение квантов света родопсином, содержащимся в фоторецепторных мембранах сетчатки, обуславливает каскад реакций, обеспечивающих усиление сигнала и в результате изменение биоэлектрической активности фоторецепторной клетки. Одной из центральных реакций каскада является фотоиндуцированная активация 3', 5'-cGMP-фосфодиэстеразы (ФДЭ), вследствие чего уменьшается содержание cGMP в фоторецепторе [1, 2]. Этому явлению ряд исследователей [3, 4] при-

дает решающее значение в процессе изменения ионной проницаемости наружной клеточной мембраны, обусловленного поглощением фотонов. В связи с центральной ролью ФДЭ в развитии фоторецепторного акта принципиальный интерес вызывает вопрос о природных регуляторах активности этого фермента.

Ранее нами [5, 6] во фракции термостабильных белков сетчатки быка был обнаружен белковый ингибитор ФДЭ, который понижал V и не влиял на K_m . Было также установлено [7], что белок, ингибирующий ФДЭ, содержится не только в сетчатке быка, но и в сетчатках всех изученных представителей позвоночных животных. В экспериментах по очистке ФДЭ и попытках отделения от нее ингибитора было выяснено, что последний тесно связан с ферментом и не отделяется от него при таких способах разделения белков, как ИЭФ в градиенте плотности сахарозы и в геле, при ИОХ и электрофорезе [5]. На основании этих фактов можно было предположить, что ингибитор является субъединицей фермента; в дальнейшем она получила название γ -субъединицы, поскольку сама ФДЭ состоит из двух субъединиц— α и β [8, 9]. При использовании методов гель-фильтрации на сефадексе ингибитор удалось полностью отделить от фермента, что сопровождалось резким увеличением его активности (рис. 1).

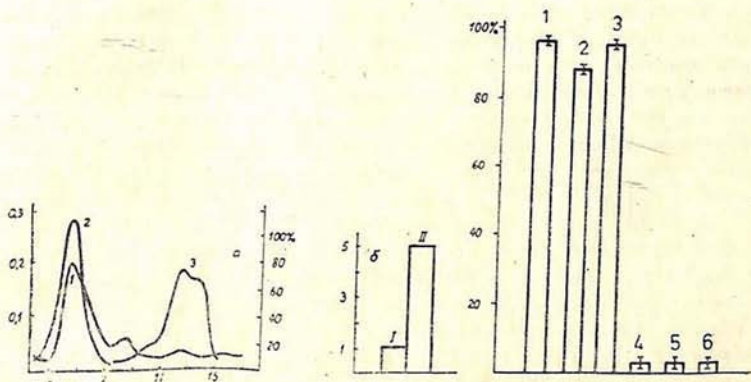


Рис. 1. Профиль элюции ФДЭ, экстрагированной из фоторецепторных мембран на колонке с сефадексом G-150. а: 1—выход белка, $\lambda=280$ нм; 2—активность ФДЭ, $\lambda=660$ нм; 3—степень ингибирования активности ФДЭ стандартного препарата фермента. б—общая активность ФДЭ до (I) и после (II) гель-фильтрации на сефадексе G-150. По оси ординат—активность фермента в усл. ед. По оси абсцисс—№№ фракций элюата; по осям ординат: слева—плотность, в усл. ед., справа—ингибирование, в %

Рис. 2. Влияние антител к белку-ингибитору на ФДЭ фоторецепторных мембран и других тканей: 1—сетчатка быка, 2—сетчатка крысы, 3—сетчатка лягушки, 4—мозг быка, 5—сердце быка, 6—матка крысы

В какой же мере ингибитор специфичен именно для ткани сетчатки, и не имеется ли подобный белок в других тканях? Для решения этого воп-

роса были использованы моноспецифические антитела, выработанные к ингибитору [10]. В результате блокады эндогенного ингибитора, связанного с ферментом, добавление в среду антител к нему приводило к активации ФДЭ [8]. Оказалось, что увеличение активности фермента имело место лишь в случае препаратов сетчаток и не происходило при использовании других тканей (рис. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу специфичности ингибиторного белка для ткани сетчатки.

В какой же части фоторецепторной клетки сетчатки локализован ингибитор? Сопутствует ли он целиком ФДЭ, сосредоточенной в фоторецепторных мембранах, или же имеется и в других областях сетчатки? Эти вопросы изучали с помощью различных методических подходов. В одной из серий экспериментов сопоставляли содержание родопсина и ингибитора при субфракционировании фоторецепторных мембран, в других—исследовали наличие ингибитора в сетчатках, лишенных наружных сегментов механическим путем или же в сетчатках крыс, больных наследственной дистрофией сетчатки. У этих животных в процессе болезни наружные сегменты полностью разрушаются [9]. В результате этих опытов оказалось возможным однозначно заключить, что ингибитор сосредоточен непосредственно в фоторецепторных мембранах и может служить, подобно родопсину, маркером первичных акцепторов световых квантов.

Какова же функция ингибитора в этих структурах? Исследование этого вопроса нами [11] и другими авторами [12, 13] было проведено на реконструированных системах, состоявших из лишенных ФДЭ мембран наружных сегментов и препаратов фермента, очищенного разными способами—с отделением ингибитора и с сохранением его во фракции ФДЭ. Из данных, приведенных на рис. 3, очевидно, что фотоиндуцированная актив-

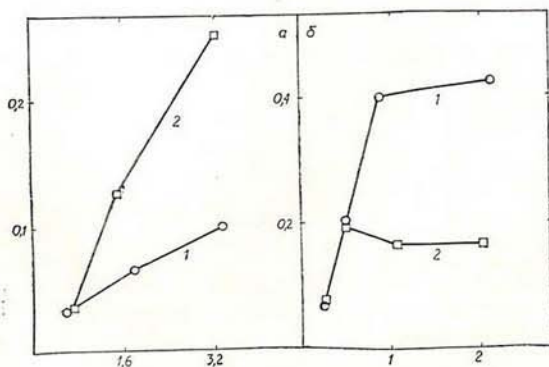


Рис. 3. Влияние GTP на ФДЭ-зависимую активность в реконструированных системах, а—реконструированная система, состоящая из ФДЭ, связанной с ингибитором, и лишенных фермента фоторецепторных мембран; б—аналогичная система, содержащая ФДЭ, лишенную ингибитора. 1—пробы без GTP, 2—пробы с GTP. По оси абсцисс—содержание белка в мкг, по оси ординат—активность в усл. ед.

бация ФДЭ в присутствии ГТР, являющегося необходимым компонентом этого процесса, происходила только в случае использования ФДЭ, содержащей ингибитор (рис. 3, а). При использовании же лишенной ингибитора ФДЭ наблюдали, напротив, ингибирование фермента в присутствии ГТР (рис. 3, б). Эти данные свидетельствуют о необходимости ингибитора для активации ФДЭ при функциональной нагрузке. В предложенных другими авторами [14, 15] схемах активации ФДЭ при освещении ингибитору также отведена ключевая роль в этом процессе. Таким образом, в системе передачи сигнала от родопсина к ферменту взаимодействие ГТР-связывающих белков должно осуществляться не непосредственно с ферментом, а с его ингибитором. Механизм этого взаимодействия остается до настоящего момента неясным [16, 17].

Обсуждая функции ингибитора, следует отметить, что они, возможно, не ограничиваются влиянием его на каталитическую активность ФДЭ. Так, нами было установлено [18], что этот белок является мощным ингибитором метилирования ФДЭ—процесса, который также осуществляется в наружных сегментах [18, 19]. Функциональная значимость метилирования ФДЭ и взаимоотношения этого процесса с каталитической активностью данного фермента пока не изучены.

Что же представляет собой ингибитор по своей природе? Чтобы ответить на этот вопрос, мы определили аминокислотную последовательность ингибитора сGMP-фосфодиэстеразы— γ -субъединицы этого фермента. При этом, наряду с непосредственным исследованием структуры белка, была выделена соответствующая γ -субъединице кДНК и определена ее нуклеотидная последовательность.

Выделяли сGMP-фосфодиэстеразу по методике Ваегг и соавт. [8]. γ -Субъединицу отделяли от α - и β -субъединиц высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой (носитель Synchronac C₄, градиент ацетонитрила в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте). γ -Субъединица элюировалась при 45%-ной концентрации ацетонитрила, а α - и β -субъединицы при 56%-ной. Анализ N-концевых остатков субъединиц сGMP-ФДЭ показал, что их N-концевые аминокислотные группы блокированы. Для определения аминокислотной последовательности γ -субъединицы использовали гидролиз белка трипсином и протеазой из *St. aureus*, а также расщепление бромцианом (на белке, карбоксиметилированной [¹⁴C]-иодуксусной кислотой).

Аминокислотная последовательность γ -субъединицы сGMP-фосфодиэстеразы приведена на рис. 4. В пептиде SP-1(1—9) N-концевая аминокислотная группа была блокирована, однако после расщепления его бромцианом удалось выяснить последовательность аминокислотных остатков с 2-го по 9-ый. Был снят масс-спектр пептида SP-1 и получен молекулярный ион $[M+H]^+$ с массовым числом 1112. Определение величины M_r пептида показало, что в нем N-концевой остаток метионина ацетилирован.

Для уточнения аминокислотной последовательности средней части молекулы γ -субъединицу после модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина янтарным ангидридом гидролизовали трипсином по остаткам аргинина.

Из полученного гидролизата с помощью ВЭЖХ на колонке TSK-2000 SW был выделен 51-членный С-концевой пептид (последовательность 37—38). Анализ этого пептида на секвенаторе позволил установить в γ -субъединице последовательность с 37-го по 60-й аминокислотный остаток и получить перекрытие между бромциановыми пептидами Вг-2 (18—57) и Вг-3 (58—87).

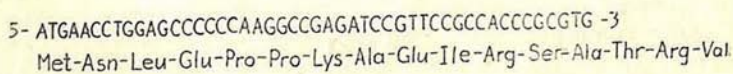
Для локализации в полипептидной цепи остатка триптофана, γ -субъединицу расщепляли BNPS-скатолом. Путем деградации по Эдману продуктов расщепления была определена последовательность 71—75 и высл-

-54	-1
GCCTGAGGGAGTCCAGAAGCTGAAGGTCACTGCGGGATCTCTGCCAACCTGGCC	
ATG AAC CTG GAG CCA CCC AAG GCC GAG ATC CGG TCG GCC ACC AGG	1-45
ACMET-ASN-LEU-GLU-PRO-PRO-LYS-ALA-GLU-ILE-ARG-SER-ALA-THR-ARG-	1-15
GTG ATG GGG GGA CCC GTC ACT CCC AGG AAA GGG CCC CCG AAA TTT	46-90
VAL-MET-GLY-GLY-PRO-VAL-THR-PRO-ARG-LYS-GLY-PRO-PRO-LYS-PHE-	16-30
AAG CAG CGG CAA ACC AGG CAG TTC AAG AGC AAG CCC CCC AAG AAA	91-135
LYS-GLN-ARG-GLN-THR-ARG-GLN-PHE-LYS-SER-LYS-PRO-PRO-LYS-LYS-	31-45
GGT GTC CAA GGG TTT GGT GAT GAC ATC CCT GGA ATG GAA GGC CTG	136-180
GLY-VAL-GLN-GLY-PHE-GLY-ASP-ASP-ILE-PRO-GLY-MET-GLU-GLY-LEU-	46-60
GGA ACA GAC ATC ACC GTC ATC TGC CCG TGG GAG GCC TTC AAC CAC	181-225
GLY-THR-ASP-ILE-THR-VAL-ILE-CYS-PRO-TRP-GLU-ALA-PHE-ASN-HIS-	61-75
CTG GAG CTG CAC GAG CTG GCC CAG TAC GGC ATC ATC TAG CCCTGGA	226-271
LEU-GLU-LEU-HIS-GLU-LEU-ALA-GLN-TYR-GLY-ILE-ILE-TER	76-87
CCCCGCCCTCAGCCCTCTACTCCGCTGCCACCCCTGACCCCTGCTCAAGATTCCTG	272-330
TGAGGAGAGCIGTGCCCCGGGAGGTCAGAGTGTCTGGATIGTGTCTGGAGACCCICAC	331-389
AGGGCGGCAGCCTGGAGCCTCTGAATGCTAGTTACCAGGAGCCACCAGTTCCTTCA	390-448
GGACACCCCTCTCGGGGAGCCAGGCTCTGCTTAACCTCCAGAACAACCTGGTCCACAGAC	449-507
CCTCTCCTCCCCAGGCTGGAAAGC IAGGGCAGGCCCTCCAGTGGTGTCTGCCACACCCC	508-566
GCCTCCTGGCCTGACTGTCTGGGGTGAGAACGGGCTCCCTCACTAGCCTTTCCAGT	567-625
TGAAGCCGTTGGGCCAGCAGGTGGATGCCAGGAGTCTCGAGGCGTCAGACAATGAGAA	626-684
CCCCCTGGACCAGTCAACACAGTAGGAAGCTGTCTTTCCAACGTGGCCCATGCTCGC	685-743
CTCCTGTTTCAATAAAGTTAGCCGTGCTCCCAA	744-779

Рис. 4. Аминокислотная последовательность γ -субъединицы ФДЭ и нуклеотидная последовательность соответствующей кДНК

нено, что остаток триптофана расположен в положении 70. Аминокислотная последовательность пептида SP-6 (81—87) совпадала с С-концевой последовательностью γ -субъединицы (Gly-Ile-Ile), установленной путем гидролиза белка карбоксипептидазой А.

На основании аминокислотной последовательности пептидов γ -субъединицы были синтезированы два уникальных комплементарно перекрывающихся нуклеотидных зонда длиной в 48 оснований каждый:



3'-AGGCGGTGGGCGCACTACCCCCCGGCCACTGGGGGGCATTCCCCGGG-5'

Ser-Ala-Thr-Arg-Val-Met-Gly-Gly-Pro-Val-Thr-Pro-Arg-Lys-Gly-Pro

При выведении нуклеотидных последовательностей зондов учитывали частоту встречаемости кодонов в структурных генах родопсина и трансдуцина [20—23]. Для первоначального скрининга кДНК библиотеки клонов сетчатки быка использовали зонд I. Были идентифицированы 3 клон — рγ12, рγ20 и рγ43, дающие положительный сигнал гибридизации. Эти же клоны гибридизовались, хотя и слабее, с зондом II. После определения последовательности кДНК γ-субъединицы было обнаружено, что структура зонда I отличается от истинной последовательности в 5 положениях, а структура зонда II — в 10, что, очевидно, и определяло разницу в интенсивности гибридизационного сигнала.

Рестрикционный анализ клонированных фрагментов ДНК, выделенных из трех полученных клонов, показал их близкую гомологию. Для определения нуклеотидной последовательности кДНК был выбран клон рγ12.

Полная нуклеотидная последовательность изученного фрагмента кДНК, содержащего 833 пары оснований, представлена на рис. 4. Сравнение выведенной с помощью компьютера аминокислотной последовательности белка с аминокислотной последовательностью γ-субъединицы cGMP-ФДЭ показало, что выведенный фрагмент кДНК содержит всю структурную часть гена этого белка, составляющую 261 пару оснований, а также 5'- и 3'-нетранслируемые области (положение оснований 54 и 518 соответственно). Терминирующий кодон TAG находится в положении 262—264, а 3'-нетранслируемая область в положении 756—761 содержит сигнал полиаденилирования—AATAAA.

Использование в работе параллельного анализа аминокислотной последовательности белка и нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК гарантировало правильность полученных результатов. В частности, определение структуры кДНК подтвердило существование в γ-субъединице в положениях 35 и 63 остатков треонина и аспарагиновой кислоты, что не было однозначно установлено при исследовании аминокислотной последовательности белка. С другой стороны, знание аминокислотной последовательности пептидов помогло установлению нуклеотидной последовательности на отдельных участках фрагмента кДНК.

Полипептидная цепь γ-субъединицы состоит из 87 аминокислотных остатков, что соответствует M_r 9,7 кД. N-концевая аминогруппа ацетилирована. γ-Субъединица является основным белком, в котором на 9 остатков дикарбоновых аминокислот приходится 13 остатков основных. Примечательно, что 10 из этих основных аминокислотных остатков сконцентрированы на сравнительно небольшом участке полипептидной цепи γ-субъединицы (положение 24—45), где нет ни одного остатка дикарбоновой аминокислоты (рис. 4). Можно предположить, что именно этот участок γ-субъединицы является функционально важным. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что ингибиторное действие

γ -субъединицы на активность ФДЭ быстро снималось при обработке белка трипсином в низкой концентрации [6, 9].

Можно заключить, что в ткани сетчатки позвоночных животных в первичных акцепторах световых квантов имеется специфический низкомолекулярный белок своеобразной первичной структуры, играющий ключевую роль в первичных механизмах фоторецепторного акта. Вопросы о характере взаимодействия этого белка с GTP-связывающим белком фоторецепторных мембран, о биологическом значении такого варианта системы трансдукции информационного сигнала, как и о роли отдельных участков этого белка в осуществлении его различных функций (влияние на каталитическую активность и метилирование) является предметом дальнейших исследований.

STRUCTURE AND FUNCTION OF BOVINE RETINAL SPECIFIC PROTEIN-INHIBITOR OF 3',5'-cGMP PHOSPHODIESTERASE

LIPKIN V. M., MURADOV H. H., *DUMLER I. L., *ETINGOF R. N.
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of
Sciences, Moscow

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

The function of the γ -subunit of 3',5'-cGMP phosphodiesterase in primary mechanisms of photoreception and the specificity of this protein for the retina tissue were studied. Using the monospecific antibodies to the γ -subunit, it has been established the latter is present only in the retina photoreceptor membranes of different animals, and was not revealed in other tissues. It has been shown the necessity of the γ -subunit for the photoinduced activation of phosphodiesterase. The amino acid sequence of the γ -subunit and the nucleotide sequence of respective cDNA were determined.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Woodruff M. L., Bownds D. J. *Gen. Physiol.*, v. 73, № 5, p. 629—654, 1979.
2. Govardovski V. I., Berman A. L. *Biophys. Struct. Mech.*, v. 7, № 1, p. 125—130, 1981.
3. Miller W. H. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, v. 15, p. 497—511, 1983.
4. Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lyubarsky A. L. *Nature*, v. 333, № 6000, p. 310—312, 1985.
5. Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. *Докл. АН СССР*, т. 213, № 5, с. 1197—1200, 1973.
6. Dumler I. L., Etingof R. N. *Biochim. et biophys. acta*, v. 429, № 2, p. 476—484, 1976.
7. Etingof R. N., Furayev V. V., Dumler I. L. — In: *FEBS 12th Meeting, Dresden, 1978; Cyclic Nucleotides and Protein Phosphorylation in Cell Regulation* (eds. E. S. Krause et al.), v. 54, p. 71—80, Pergamon Press, Oxford, 1979.
8. Baehr W., Devlin M. J., Applebury M. L. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 11669—11677, 1979.
9. Hurley J. B., Stryer L. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 18, p. 11094—11099, 1982.
10. Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. *Биол. мембр.*, т. 1, № 6, с. 565—572, 1984.

11. Дурлер Н. А., Фураса В. В., Этингоф Р. Н. Докл. АН СССР, т. 253, № 6, с. 1504—1508, 1980.
12. Fung B. K., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, № 1, p. 152—156, 1980.
13. Hurley J. B., Barry B., Ebrey T. G. Biochim. et biophys. acta, v. 675, № 3/4, p. 359—365, 1981.
14. Bitensky M. W., Haliday K. R., Rasenick M., Sorbi R. T., Stein P. J., Uchida S., Wheeler G. L., Yamazaki A. — In: Molecular Processes in Vision. Benchmark Papers in Biochemistry (eds. E. W. Abrahamson, S. E. Ostroy), v. 3, p. 331—339, Hutchinson Ross Publ. Co., Stroudsburg, Pa. 1984.
15. Liebman P. A., Sitaramayya A., Parkes J. H., Buzdygon M. W. Trends Pharmac. Sci., v. 5, № 7, p. 293—296, 1984.
16. Bitensky M. W., Yamazaki A., Wheeler G. L., George J. S., Rasenick M. M. Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 17, p. 227—238, 1984.
17. Kawamura S., Murakami M. Biochim. et biophys. acta, v. 870, № 2, p. 256—266, 1986.
18. Артемьев Н. О., Этингоф Р. Н. Биохимия, т. 52, № 1, с. 154—159, 1987.
19. Swanson R. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem. v. 258, № 17, p. 16599—10605, 1983.
20. Nathans J., Hogness D. S. Cell., v. 34, p. 807—814, 1983.
21. Hurley J. B., Fung B. K., Teplow D. B., Dreyer W. J., Simon M. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 6948—6952, 1984.
22. Tanabe T., Nukada T., Nishikawa Y., Sugimoto K., Suzuki H., Takanashi H., Hoda M., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S. Nature, v. 315, p. 242—245, 1985.
23. Sugimoto K., Nukada T., Tanabe T., Takanashi H., Noda M., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S., Numa S. FEBS Lett., v. 191, p. 235—240, 1985.

Поступила 10. IX 1986

УДК 577.1+577.352

РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОЛЕПТИКОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПРОТЕИНКИНАЗНЫМИ РЕАКЦИЯМИ

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., АБУТИДЗЕ К. Д., САРТАНИЯ Н. А.

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси

Из синаптических мембран головного мозга белых крыс сомобилизованы D_2 -дофаминовый и σ -опиатные рецепторы. При хроматографировании полученного экстракта на сульфатид- и галоперидол-сепаразах были выделены белки с величиной M_r 60, 50, 30 и 20 кД. Первые два из них являлись субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназы II. Гель-фильтрация очищенных фракций на колонках высокого давления показала наличие еще одного низкомолекулярного белкового фрагмента с M_r 9 кД. Данный пептид специфически связывал D_2 -дофаминовый и σ -опиатные лиганды, что свидетельствует о том, что за D_2 -дофаминовую и σ -опиатную рецепцию является ответственным один и тот же участок активного центра. Предполагается, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеникиназа либо функционально связана с рецепторным белком, либо сама содержит активные домены, взаимодействующие со специфическими лигандами.